

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461595

研究課題名(和文) 免疫プロテアソームの機能異常による自己炎症病態の分子基盤解明

研究課題名(英文) Clarifying the molecular mechanism of autoinflammation caused by dysfunction of immunoproteasome complexes

研究代表者

北村 明子 (KITAMURA, Akiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号：10448318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、発熱、結節性紅斑、脂肪萎縮等を特徴とする新規自己炎症症候群(JASL)がPSMB8の遺伝子異常に起因しており、免疫プロテアソームの機能破綻が自己炎症病態に関与することを明らかにしたが、分子機構は不明である。本研究では、分子機構を解明するために、JASL罹患者と同じPsm8変異をもつノックインマウスとMHCクラスIIプロモーター下に変異Psm8を発現するトランスジェニックマウスを樹立した。その結果、若年の遺伝子改変マウスは野生型と比べて、炎症応答や脾臓細胞の表現型等に有意な差は見られなかった。一方、ノックインマウスでは脂肪細胞の分化異常が観察され、脂肪萎縮症の原因と考えられた。

研究成果の概要(英文)：We found two Japanese families suffered from an autoinflammatory syndrome characterized by recurrent fever, nodular erythema and partial lipodystrophy (JASL) and identified a missense mutation in the immunoproteasome subunit PSMB8. The PSMB8 mutation caused autoinflammation through the dysfunction of immunoproteasome complexes, but the underlying molecular mechanism has not been clarified. To understand how dysfunction of immunoproteasomes causes autoinflammation, we established knock-in mouse harboring the same Psm8 mutation as JASL patients and transgenic mice that expressed mutant Psm8 under the invariant chain promoter. Both genetically modified young mice did not show any signs of inflammation and splenomegaly. The Psm8 knock-in mice had a defect in adipocytes differentiation, which would be attributable to lipodystrophy phenotypes in JASL patients.

研究分野：医歯薬学

キーワード：自己炎症症候群

1. 研究開始当初の背景

小児の免疫疾患の発症には環境要因とともに遺伝的要因が関与していると考えられるが、ヒトの遺伝的背景は多様であるために、ヒト疾患の遺伝的要因を見いだすことは非常に困難である。しかし、最近の超高速シーケンサーを用いたエクソーム解析あるいは全ゲノム解析の進歩により、明らかな遺伝的背景を原因として発症する疾患については少ない家数でもその遺伝的要因を明らかにすることが可能になりつつある。事実、申請者らも自己炎症症候群の原因遺伝子 (J Clin Invest 2011) および家族性血球貪食症候群の新たな原因遺伝子 (未発表) をそれぞれ、2 家系、1 家系を対象にしたエクソーム解析により明らかにすることに成功している。

自己炎症症候群は、自然免疫系の過剰な活性化を主体とする炎症症候群であり、稀少な家族性症例のゲノム解析から、その病態を誘導するシグナル系が報告されている。例えば、*NLRP3* の遺伝子変異により *NLRP3* インフラマソーム経路が過剰に活性化することで、*caspase1* の活性化とそれに引き続く *interleukin-1 β* (*IL-1 β*) の過剰な産生が自己炎症応答を誘導することが知られている。しかし、未だ原因不明の自己炎症症候群が数多く報告されており、それらの原因を知るとはヒト炎症病態の分子基盤を明らかにするために、極めて重要な研究課題である。

申請者らは、日本で 40 年以上前に報告された乳幼児期からの 39 を超える発熱、結節性紅斑、部分的脂肪萎縮、肝脾腫を特徴とする症候群 (Japanese Autoinflammatory Syndrome with Lipodystrophy: JASL) の原因遺伝子を、2 つの近親婚家系のゲノムサンプルを用いることで解明し、免疫プロテアソームの構成分子の一つである *PSMB8* に変異を見いだすことに成功した (Kitamura et al. J Clin Invest 2011)。プロテアソームおよび免疫プロテアソームは、ユビキチン修飾されたタンパクの分解に必須の分子複合体であり、ユビキチン-プロテアソーム系と神経変性疾患、癌、免疫疾患など様々な難治性疾患の病態との関連性が数多く報告されてきた。しかし、これまで、免疫プロテアソームあるいはプロテアソームの構成分子そのものの遺伝子変異に起因するヒト疾患は報告されておらず、プロテアソームの機能異常がどのようにヒトの疾患に関与するかを知ることは極めて重要な課題であると思われる。

これまでの培養細胞を用いた研究から、JASL の炎症病態には *IL-6* の過剰な産生が寄与する可能性を明らかにした。しかし、炎症を誘導する主要分子については個体レベルで明らかにする必要があり、本研究では JASL 罹患者と同変異を持つノックインマウスおよび変異 *PsmB8* を高発現するトランスジェニックマウスを樹立し、その目的を達成することを目指す。また、変異 *PSMB8* は免疫プロテアソームの分子集合を阻害し、その

結果として免疫プロテアソームの機能を低下させることを見いだしているが、その分子機構は不明である。本研究では、変異 *PSMB8* がどのように免疫プロテアソームの分子集合を阻害するかについて生化学的に解明することを目指す。本研究の成功により、タンパク分解障害に起因する自己炎症応答の分子基盤、および炎症を誘導する分子群が明らかになることが期待できる。

2. 研究の目的

自己炎症症候群は、自然免疫系を制御する分子群の遺伝子異常により自然免疫系が過剰に活性化することが病態であると考えられている。申請者らは、乳幼児期からの発熱、結節性紅斑、脂肪萎縮、長く節くれ立った指、肝脾腫などを特徴とする新規自己炎症症候群 (JASL) を見だし、免疫プロテアソームの構成分子の一つである *PSMB8* の遺伝子異常を同定した。この発見は、免疫プロテアソームの機能破綻が自己炎症病態に深く関与するという新たな視点をもたらしたが、その分子機構は未だ明らかにされていない。

本研究では、JASL 罹患者と同変異を持つノックインマウスおよびトランスジェニックマウスを樹立し、炎症を誘導する主要な分子を明らかにするとともに、*PSMB8* の遺伝子変異が免疫プロテアソームの機能を低下させる分子メカニズムを明らかにすることによって、タンパク分解障害に起因するヒト炎症病態の分子基盤を解明することを目的とする。その成果は、炎症病態を治療する方法論の開発にも直結すると予測されることから、臨床医学的にも大きな意義があると考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、JASL 罹患者と同じ *PsmB8* 変異を持つノックインマウスおよび変異 *PsmB8* を高発現するトランスジェニックマウスを樹立し、個体レベルで炎症を誘導する主要分子を明らかにするとともに、本変異により免疫プロテアソームの機能低下が誘導される分子機構を明らかにする。

(1) *PsmB8* 変異を持つノックインマウスおよび変異 *PsmB8* を過剰発現するトランスジェニックマウスを樹立する。

PSMB8 の遺伝子変異により自己炎症応答が誘導される分子機構の一つとして、*PSMB8* の機能異常により、B リンパ球から *interleukin-6* (*IL-6*) が過剰に産生されることを見いだした (J Clin Invest 2011)。その現象を個体レベルで検討するために、JASL 罹患者と同じ遺伝子変異を持つ、ノックインマウスを樹立する (図 1a, b)。

変異 *PSMB8* 遺伝子により、プロテアソーム活性が低下することを見いだしているが、それが dominant-negative 効果を持つかどうかを明らかにすることと、免疫細胞に発現する

PSMB8 が病態の原因が否かを明らかにするために、MHC クラス II プロモーター下に変異 *Psmb8* を高発現するトランスジェニックマウスを樹立する。既に、変異 *Psmb8* を pD01-6 カセット (Eα エンハンサーと Ii プロモーターの下流に遺伝子を発現するプラスミド) に挿入し、受精卵にインジェクションを行った (図 2)。

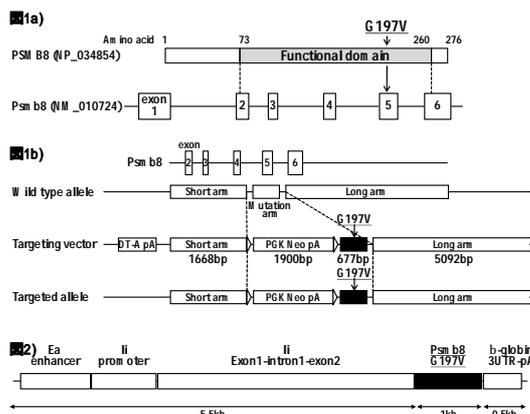


図 1a) PSMB8 の分子構造

Psmb8 遺伝子は 6 個のエクソンから構成され、エクソン 2-6 が PSMB8 の機能ドメインをコードする。JASL 罹患者にみられた遺伝子変異はエクソン 5 に位置し、機能ドメインにミスセンス変異 (G197V) をきたす。

図 1b) *Psmb8* G197V ノックインマウスの設計図

Short arm に *Psmb8* のエクソン 2~4、mutation arm にエクソン 5、long arm にエクソン 6 を含むように targeting vector を設計した。相同組み換えによって、*Psmb8* 遺伝子座に JASL 罹患者と同じ遺伝子変異 (G197V) をもつ ES 細胞が作製される。

図 2) *Psmb8* G197V トランスジェニックマウスの設計図

Eαエンハンサーと Ii プロモーターの下流に、JASL 罹患者と同じ遺伝子変異 (G197V) をもつ *Psmb8* 遺伝子を挿入した。

(2)(1)で樹立した *Psmb8* ノックインマウス、*Psmb8* トランスジェニックマウスについて、炎症応答の有無、脂肪萎縮の有無を検討し、*Psmb8* 変異による炎症誘導機構明らかにする。

Psmb8 ノックインマウスおよびトランスジェニックマウスについて経時的に免疫担当細胞の数、血清中の各種サイトカイン、抗体価を測定し炎症応答の有無を検討する。さらに、脾臓細胞を分離し、T リンパ球、B リンパ球、樹状細胞、マクロファージの活性化マーカーについてフローサイトメーターを用いて検討する。また、それぞれの細胞を抗 CD3 抗体 (T リンパ球に対して)、LPS (B リンパ球、樹状細胞に対して) で刺激して、その増殖能、サイトカイン産生能をコントロール細胞と比較する。

Psmb8 ノックインマウスおよびトランスジェニックマウスの体重および脂肪量を経時的に動物用 CT で計測するとともに、高脂肪

食を与えて脂肪蓄積の程度をコントロールマウスと比較検討する。

Psmb8 ノックインマウスおよびトランスジェニックマウスを、IL-6 あるいは IL-1β などの各種サイトカイン遺伝子欠損マウスと交配することにより、炎症誘導に關与するどの経路が活性化しているかを解明する。

(3) 変異 *Psmb8* による免疫プロテアソームおよび構成型プロテアソームの分子集合不全の分子メカニズムを解明する。

(4) *Psmb8* の発現を調節する転写因子を同定し、脂肪細胞での *Psmb8* の転写調節機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 研究計画に従い、JASL 罹患者と同変異を持つノックインマウスおよび MHC クラス II プロモーター下に変異 *Psmb8* を高発現するトランスジェニックマウスを樹立することに成功した。

初年度に樹立した二系統の遺伝子改変マウスについて、経時的に免疫担当細胞の数、血清中の各種サイトカイン、抗体価を測定し炎症応答の有無を検討した。その結果、若年齢の遺伝子改変マウスでは、表現型に有意な差は見られなかったため、老齢マウスを作製し、表現型の差を検討中である。

二系統の遺伝子改変マウスの脾臓細胞を分離し、フローサイトメーターを用いて T リンパ球、B リンパ球、樹状細胞、マクロファージの活性化マーカーについて検討したが、若年齢の遺伝子改変マウスでは表現型に有意な差は見られなかったため、老齢マウスを用いて検討中である。

ノックインマウスの経時的な体重変化および動物用 CT を用いて脂肪量を測定したところ、コントロールマウスに比べて脂肪量は少ない傾向であった。また、ノックインマウスでは脂肪前駆細胞数の低下が観察され、脂肪細胞の分化異常が脂肪萎縮症の原因になっていると考えられた。

(2) *PSMB8* の遺伝子変異により免疫プロテアソームの活性が低下する分子機構を解明するために、JASL 罹患者由来の B リンパ球を用いて、グリセロール密度勾配法によりプロテアソーム分画を分離し、*PSMB8* の遺伝子変異によって免疫プロテアソームの分子集合が阻害されることを確認した。現在、レトロウイルスベクターを用いて、JASL 罹患者由来の B リンパ球に野生型 *PSMB8* を高発現する細胞を作製しており、樹立されれば同様の解析を行う予定である。

(3) JASL の症状の特徴である脂肪萎縮と *PSMB8* の関連性を解明するために、脂肪細胞の分化を調節する *PSMB8* の上流のシグナルの

同定を目指した。その結果、*PSMB8* のプロモーター領域を決定し、その領域に結合する *Psmb8* の転写調節因子を同定することに成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Kitamura A, Sasaki Y, Abe T, Kano H, Yasutomo K. An inherited mutation in *NLR4* causes autoinflammation in human and mice. *J Exp Med* 211: 2385-2396 (2014) 査読有
doi: 10.1084/jem.20141091

6. 研究組織

(1)研究代表者

北村 明子 (KITAMURA, Akiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号: 10448318