

平成30年6月4日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11080

研究課題名(和文) 口腔領域マクロファージにおける小胞体ストレスシグナルを介した炎症病態機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of inflammatory pathology through ER stress signaling in oral macrophages

研究代表者

門脇 寿枝 (Kadowaki, Hisae)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：40568200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：口腔内は常に創傷・温熱刺激・細菌・ウイルス感染・異物接触などのストレスに曝されており、難治性の口腔粘膜炎症を引き起こすことが多い。このような口腔内慢性炎症は、ときに口腔前がん病変、さらには発がんの原因に繋がり、その病態メカニズムの解明は重要である。最近の研究により、様々な炎症性疾患に共通した細胞内現象として、小胞体ストレスが注目されている。そこで本研究では、*in vitro*および*in vivo*炎症モデル実験系を用いて、炎症病態に関わる主要な細胞の一つ、マクロファージの分化・活性化・アポトーシスの分子機構を、小胞体ストレスシグナルの観点から解明し、炎症性疾患の克服に繋げることを目指す。

研究成果の概要(英文)：The oral cavity is exposed to various stresses such as wounds, thermal stimuli, bacterial and viral infections, and contacts with foreign bodies, and often causes refractory oral mucosal inflammation. Since oral chronic inflammation sometimes leads to the causes of oral precancerous lesions and carcinogenesis, it is significant to elucidate the pathological mechanism. Recent studies focus on endoplasmic reticulum (ER) stress as a common intracellular phenomenon in various inflammatory diseases. Therefore, in this study, from the viewpoint of ER stress signaling, we clarify the molecular mechanisms of macrophage differentiation, activation, and apoptosis using the *in vitro* and *in vivo* inflammation model experimental systems, and aim to overcome inflammatory diseases.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞体ストレス 炎症 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

細胞内小器官の一つである小胞体は、分泌および膜タンパク質の合成を担い、その機能破綻は細胞および個体の機能障害を引き起こし、さらには疾患発症に繋がる。この小胞体品質管理の制御機構は、現在特に注目されている研究対象の一つである。我々はこれまでに、小胞体機能異常による小胞体ストレスと様々な疾患との関係について研究してきた(Nishitoh, Kadowaki, et al. *Genes Dev.* 2008)。小胞体タンパク質の品質管理は巧妙かつ厳密に制御されており、小胞体不良タンパク質の蓄積は、小胞体シャペロンの発現誘導、タンパク質翻訳停止、小胞体関連分解(ER-associated degradation: ERAD)により減弱され、細胞は生存が可能となる。しかし、何らかの原因でこれらの小胞体品質管理機構が破綻すると、小胞体不良タンパク質が過度に蓄積し、小胞体ストレス誘導性アポトーシスが惹起される。我々の研究グループは、この小胞体ストレス誘導性アポトーシス実行因子として ASK1 を同定し解析してきた。ASK1 は JNK・p38 経路を特異的に活性化するストレス MAP キナーゼの一つで、その抑制因子として Trx・PP5、活性化因子として Daxx・Traf2 などを同定した。さらに、ASK1 ノックアウト(KO)マウスを作製し、小胞体ストレス誘導性アポトーシスに ASK1 が必要であることを明らかにしている。また、炎症に深く関わる ASK1 の活性化依存的な細胞死が、神経変性疾患(アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症など)における神経細胞死に關与することを明らかにしてきた(Kadowaki, et al. *Cell Death Differ.* 2005)。

小胞体ストレスと炎症に関して、炎症組織においては、IL-1 β 、TNF などのサイトカインや細胞外分泌因子(例えば MMP など)の産生が亢進しており、その分泌過程では、小胞体が重要な役割を担う。細胞は小胞体のタンパク質産生能力を高めるために、積極的に小胞体ストレスシグナルを活性化し、細胞機能を亢進させていることが考えられる。このように、炎症性細胞は自ら生存するため、また周辺組織へ浸潤するために積極的に小胞体ストレスシグナルを活用していると予想される。これまで口腔領域とくに炎症関連の研究において、小胞体ストレスの観点からのアプローチは殆ど無く、口腔内炎症性疾患の緩解に向けた新たな分子メカニズムの解明ならびに創薬標的の可能性を見いだすために、本研究領域は重要な研究対象であると考えられる。

2. 研究の目的

これまで、マクロファージと小胞体ストレスに関する報告は数少ない。急性炎症においてマクロファージは自ら生存・機能するために積極的に小胞体ストレス応答を活用し、一方で慢性炎症においては持続的で過度な刺激が小胞体ストレスを介したアポトーシス

に繋がることが考えられる。本研究では、マクロファージの分化・機能・アポトーシスの分子機構を、小胞体ストレスシグナルの観点からアプローチすることによって、炎症性疾患の緩解に向けた新規分子機構の発見を目指す。我々は既に、小胞体品質管理に必須の分子 Derlin-1 および小胞体ストレス誘導性アポトーシスに重要な分子 ASK1 の KO マウスを有しており、これらを用いることで、小胞体ストレスが発信する「生存・機能」と「アポトーシス」の両シグナルの炎症における重要性を明らかにすることを目指す。

具体的には、単球からマクロファージへの分化段階、起炎に伴う炎症組織への遊走、Fc 受容体やレクチン活性依存的な標的認識と貪食作用、サイトカイン産生による T

リンパ球の活性化と抗原提示、慢性炎症組織でしばしば観察されるマクロファージアポトーシスなど、マクロファージの一生のあらゆる局面に、小胞体ストレスシグナルがどのように関与しているか、その分子機構を明らかにする。具体的には、培養マクロファージを用いて上記①～⑤における小胞体ストレスの関与を検討する。また、小胞体ストレス受容体 IRE1、小胞体品質管理に関わる ERAD 関連分子 Derlin-1、小胞体ストレス誘導性アポトーシス実行因子 ASK1 の KO・ノックダウン(KD)マクロファージを用いて、これらの分子の必要性を検討する。さらに、細胞を用いた解析結果の生理的検証として、KO マウスを用いて表皮あるいは口腔粘膜創傷治癒モデル実験や、マウス頬嚢部粘膜口内炎モデル実験などによる個体レベルでの評価を行う。最終的に、小胞体ストレス寛解低分子化合物のスクリーニングを実施し、既に獲得している ASK1 阻害剤と併せて、口腔粘膜疾患モデルでの効果検証を検討する。これらの *in vitro*・*in vivo* 解析により、小胞体ストレスシグナルを介したマクロファージの分化・機能・アポトーシス制御の分子メカニズムを明らかにし、口腔粘膜炎症性疾患の克服に繋げることを目標とする。

3. 研究の方法

口腔領域はもとより他臓器においても、炎症反応に重要な役割を担う貪食細胞における小胞体ストレスシグナルの重要性については、未だ詳細な研究報告はない。そこで、本研究では、単球細胞および初代培養マクロファージを用いて、炎症と小胞体ストレスシグナルの関係を検討した。さらに、小胞体ストレス関連分子、IRE1-KD、Derlin-1・ASK1-KO 細胞をもちいて、マクロファージの一生の各段階における必要性を検討した。また、Derlin-1・ASK1KO マウスを用いて、マウス口腔内炎症性疾患モデル実験および腹腔内 LPS・サルモネラ菌投与実験により、小胞体ストレスの急性・慢性炎症における役割の検討を行なった。最終的には、小胞体ストレスを制御する化合物を探索し、病態モデ

ルにおける効果検証を行う実験系確立を目指した。

4. 研究成果

小胞体タンパク質の品質管理は厳密に制御されており、小胞体不良タンパク質の蓄積は、小胞体シャペロンの発現誘導、タンパク質翻訳停止、小胞体関連分解により減弱され、細胞は生存できる。しかし、これらの小胞体品質管理機構が破綻すると、小胞体不良タンパク質が過度に蓄積し、小胞体ストレス誘導性アポトーシスが惹起される。小胞体ストレスと炎症に関して、炎症組織ではサイトカインや分泌因子の産生が亢進し、細胞は小胞体のタンパク質産生能力を高めるために、小胞体ストレスシグナルを活性化する。このように急性炎症においてマクロファージは生存のために小胞体ストレス応答を活用し、一方で慢性炎症においては持続的で過度な刺激が小胞体ストレスを介したアポトーシスに繋がると考えられる。本研究では、マクロファージの分化・機能・アポトーシスの分子機構を、小胞体ストレスシグナルの観点からアプローチすることで炎症性疾患の緩解に向けた新規分子機構の発見を目指した。

(1)マクロファージの一生における小胞体ストレス誘導の検討。

小胞体ストレス検出蛍光プローブ：小胞体受容体 IRE1 は、蓄積した不良タンパク質を感知して活性化し、活性化型 Xbp-1 が翻訳され転写因子として小胞体シャペロン分子などを発現誘導する。この原理を応用して、IRE1 の活性化依存的に GFP タンパク質を発現させることで、小胞体ストレスを可視化する。このシステムを用いて、次の ~ における小胞体ストレス誘導の有無を定量的に検討した。

単球からマクロファージへの分化：骨髄で産出され末梢白血球の 3~6% を占める単球は、血管外の組織や体腔に遊走し、そこで組織固有のマクロファージに分化する。分化モデルとして、ヒト単球性白血病細胞株 (THP-1) を Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) で刺激し分化させる実験系を用いた。

炎症組織への遊走：Cell migration assay を用いて、マクロファージ遊走時の小胞体ストレス誘導をリアルタイムイメージングした。細胞は、骨髄由来マクロファージ (Bone marrow-derived macrophage: BMDM) を用いた。

サイトカイン産生による T リンパ球の活性化と抗原提示：マクロファージは抗原提示の際、各種のサイトカインを放出し特定の T 細胞を活性化させる。さらに貪食した抗原を、クラス II MHC と結合させ細胞表面に表出させる。この過程で、サイトカイン・MHC-II の産生には、小胞体でのタンパク質品質管理機構が重要である。そこで、抗原提示時の小胞体ストレス誘導を定量的かつ経時的に検討

した。また、近年、IL-1 β 産生において、NLRP3 インフラマゾームの活性化の重要性が報告されている。BMDM は、ATP 刺激により NLRP3 活性化を惹起するが、この際に小胞体ストレスがどのように関与するかも併せて検討した。

標的認識と貪食作用：DsRed タンパク質発現大腸菌または蛍光ラテックスビーズをマクロファージに貪食させ、全自動細胞イメージアナライザー (Array scan) を用いて貪食・非貪食細胞を分け、小胞体ストレス誘導を定量的に解析した。

マクロファージアポトーシス：慢性炎症を伴う疾患において、マクロファージアポトーシスの関与が示唆されており、その分子メカニズムを明らかにすることは重要である。我々は、過度で持続的な小胞体ストレスが、ストレス応答性 MAP キナーゼ ASK1-JNK-p38 経路の活性化を介して、アポトーシスが誘導されること、LPS-TLR4 シグナルの下流で ASK1-p38 経路が活性化されることを明らかにしてきた。そこで、LPS-ATP 長期刺激によるマクロファージアポトーシス誘導時に、小胞体ストレス-ASK1 経路が関与するか否かについて検討した。

(2)マクロファージの一生における小胞体ストレス関連分子の必要性の検討。

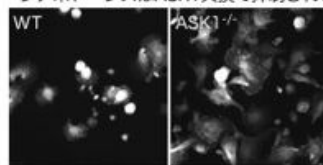
マクロファージ特異的 Derlin-1KO マウス：これまでに、小胞体関連分解 (ERAD) に Derlin-1 が重要な役割を担うことを明らかにし (Nishitoh, Kadowaki, et al. *Genes Dev.* 2008)、そのコンディショナルノックアウト (cKO) マウスの作成に成功している (未発表)。このマウスを、マクロファージ特異的プロモータを用いた *MAC1^f-Cre* マウスと交配し、cKO を作成することで、マクロファージ各段階におけるその必要性を調べた。

小胞体ストレス受容体 IRE1-KD 細胞：siRNA を用いて、BMDM の IRE1 タンパク質発現を抑制し、マクロファージ各段階におけるその必要性を検討した。

マクロファージ特異的 ASK1KO マウス：これまでに、ASK1cKO マウスの作成に成功している (未発表)。また、全身性 ASK1-/- マウス由来 BMDM では、小胞体ストレスによるアポトーシスが抑制されることがわかった (図 1)。そこで、LPS-ATP 長期刺激ならびにサルモネラ感染による BMDM アポトーシス誘導実験に

より、マクロファージ特異的 cKO マウス由来 BMDM 細胞を用いて ASK1 経路の必要性を調べた。

図1：小胞体ストレスによるマクロファージアポトーシスはASK1欠損で抑制される



MAC1(マクロファージマーカー)染色

(3) In vivo 急性・慢性炎症マウスモデルの確立とマクロファージ特異的 cKO マウスによる検証。

in vitro 実験系によって明らかにされた、マクロファージの分化・機能・アポトーシスと小胞体ストレスシグナルの関係をより生理的に検討するため、連携研究者ならびに大学院生と共にマウスを用いた炎症モデル実験系を確立し、野生型マウスとマクロファージ特異的 ASK1・Derlin-1KO マウスの比較において評価を目指した。

マウス表皮創傷治癒モデル：これまでに、マウス背部表皮のパンチングによる創傷治癒モデルを確立しており、このモデルを各 KO マウスに応用した。

口腔粘膜創傷治癒モデル：疾患、治療の過程で口腔粘膜においてしばしば観察される創傷による炎症モデルとして、マウス口蓋粘膜の創傷により、その治癒過程でのマクロファージの動態、炎症病態について観察する系を確立した。

酢酸滴下による口腔粘膜炎症誘発モデル：口腔内は、熱・酸・たばこ・刺激物などの刺激に絶えず曝されている。物理化学的炎症モデルとして、酢酸の滴下によるマウス頬粘膜での炎症誘導実験の確立を目指した。

急性炎症としての敗血症モデル：マウス腹腔に LPS・サルモネラ菌を投与することで炎症性サイトカインの放出を介して、敗血症によるマウス個体死が誘発される。全身性に ASK1 を KO したマウスでは、LPS による敗血症ショック死が緩和されることを既に報告している (Matsuzawa, et al. *Nat. Immunol.* 2005)。そこで、ASK1・Derlin-1cKO マウスにより検証を試みた。

小胞体ストレス研究は、現在とくに脚光を浴びている領域の一つであり、我々がこれまでに明らかにしてきた知見と物質的基盤をもとに、マクロファージからみた炎症病態分子メカニズムの解明により、口腔粘膜炎症性疾患に関する研究を推進することは、他に類を見ない発見を生み出すとともに、世界に先駆けた創薬モデルの開発に繋がる可能性があり、極めて意義深いと考えている。

口腔領域はその組織の特性から、動物を用いた粘膜実験モデルを構築しやすく、分子生物学的なアプローチが容易である。我々は、これまで糖尿病、神経変性疾患などに関する研究を行ってきた実績を大いに活用し、本研究領域においても小胞体ストレスシグナル関連分子の関与を一部明らかにすることができた。ここで得られた研究成果は「口腔機能障害をもたらす口腔粘膜炎症性疾患の改善」「がん病変への進行をくい止める」可能性を持つという点で、社会的貢献度も極めて大きいと考えている。

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 3 件)

Kadowaki H, Satrimafitrah P, Takami Y,

Nishitoh H: Molecular mechanism of ER stress-induced pre-emptive quality control involving association of the translocon, Derlin-1, and HRD1. *Sci. Rep.* 8:7317 (2018) 査読有

DOI:10.1038/s41598-018-25724-x

Fujisawa T, Yamaguchi N, Kadowaki H, Tsukamoto T, Tsuburaya N, Tsubota A, Takahashi H, Naguro I, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Nishitoh H, Homma K, Ichijo H: A systematic immunoprecipitation approach reinforces the concept of common conformational alterations in amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants. *Neurobiol. Dis.* 82:478-486 (2015) 査読有

DOI:10.1016/j.nbd.2015.08.010

Kadowaki H, Nagai A, Maruyama T, Takami Y, Satrimafitrah P, Kato H, Honda A, Hatta T, Natsume T, Sato T, Kai H, Ichijo H, Nishitoh H: Preemptive quality control protects the ER from protein overload via the proximity of ERAD components and SRP. *Cell Rep.* 13:944-956 (2015) 査読有

DOI:10.1016/j.celrep.2015.09.047

[学会発表](計 11 件)

門脇 寿枝、西頭 英起、小胞体の予防的品質管理における新規合成タンパク質の分解機構、第 69 回日本細胞生物学会大会、2017

門脇 寿枝、西頭 英起、小胞体の予防的品質管理における新規合成タンパク質の分解機構、第 12 回小胞体ストレス研究会、2017

門脇 寿枝、西頭 英起、小胞体の予防的品質管理における新規合成タンパク質の分解機構、新学術領域 新生鎖の生物学班会議、2017

門脇 寿枝、西頭 英起、小胞体の予防的品質管理における新規合成タンパク質の分解機構、ConBio2017、2017

門脇 寿枝、西頭 英起、小胞体の予防的品質管理における新規合成タンパク質の分解機構、第 11 回小胞体ストレス研究会、2016

Hisae Kadowaki, Hideki Nishitoh, Molecular mechanism of newly synthesized protein degradation in ER stress-induced preemptive quality control, 新学術領域 新生鎖の生物学国際会議、2016

Hisae Kadowaki, Hideki Nishitoh, Molecular mechanism of newly synthesized protein degradation in ER stress-induced preemptive quality control, EMBO Conference 国際学会、2016

門脇 寿枝、西頭 英起、小胞体の予防的品質管理における新規合成タンパク質の分解機構、第 39 回日本分子生物学会年会、2016

門脇 寿枝、西頭 英起、小胞体ストレス誘導性翻訳時分解の分子機構、第 67 回日本細胞生物学会大会、2015

門脇 寿枝、西頭 英起、小胞体の予防的品質管理における新生鎖分解の分子機構、BMB2015、2015

Hisae Kadowaki, Hideki Nishitoh, Molecular mechanism of novel ER quality control system, Gordon Research Conferences on Stress Proteins in Growth, Development & Disease 国際学会, 2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

門脇 寿枝 (KADOWAKI, Hisae)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：40568200

(2) 連携研究者

西頭 英起 (NISHITOH, Hideki)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：00332627