

令和 5 年 3 月 19 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06883

研究課題名（和文）自然免疫、炎症、骨代謝の新たな制御機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of the molecular mechanism of inflammation and bone metabolism.

研究代表者

松本 佳則（Matsumoto, Yoshinori）

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80803155

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：サイトカイン・ケモカインの異常産生は、炎症性腸疾患や関節リウマチをはじめとする自己免疫性炎症疾患の病因となっている。我々は、酵素Tankyraseを阻害することによりサイトカイン産生が亢進することを見出した。本研究ではTankyrase阻害により発生する炎症がTLRシグナル活性化を介する分子生物学的メカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりサイトカイン産生におけるTankyraseの役割が明らかとなり、自然免疫、サイトカイン産生、炎症を制御するメカニズムの一端を明らかにすることが出来た。その成果は自己免疫性炎症疾患の病態解明へと繋がることが期待される。本研究により、Tankyrase活性化が自己免疫性疾患の治療ターゲットになり得ることを示した。

研究成果の概要（英文）：We uncover that Tankyrase controls cytokine production. Tankyrase serves as a major checkpoint regulator of cytokine production and inflammation. Our present data demonstrate that inhibition of Tankyrase enhances cytokine production through activation of the TLR signaling pathway, leading to the therapeutic target for autoinflammatory diseases.

研究分野：リウマチ・膠原病学

キーワード：サイトカイン産生 マクロファージ 炎症

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患、関節リウマチをはじめとする自己免疫性炎症性疾患は、腸内常在菌や自己または外来抗原に対する異常な免疫応答により活性化された炎症細胞から、サイトカインやケモカインが異常産生されることで生じる。近年、TNF- α や IL-6 など炎症性サイトカインの阻害薬が炎症性疾患の主な治療法の1つとなっているが、その効果は十分でなく、またサイトカイン異常産生の機序も明らかになっていない。これらの機序を解明することは、治療ターゲットとなる新たな因子の発見に繋がり、疾病と遺伝的・環境的素因の関係を明らかにする上でも重要である。

“3BP2”はチロシンキナーゼを活性化するアダプタータンパクで、2001年に3BP2のミスセンス変異が、幼児期に発症し顔面骨の炎症性骨破壊を特徴とする遺伝性骨疾患“チェルビズム”の原因であると報告された(Ueki Y et al. Nat Genet, 2001)。申請者はその機序の解明を起点とし、3BP2が炎症を惹起する重要な蛋白であると考えている。まず poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) family のメンバーである“Tankyrase”が基質蛋白である3BP2と結合、ADPリボシル化して、これを標識に E3-ubiquitin ligase の“RNF146”が3BP2に結合、ユビキチン化し、ユビキチン化された3BP2は Proteasome で分解される。一方チェルビズム変異3BP2は Tankyrase と結合出来ず、3BP2 分解障害、細胞内発現量の増加により、下流のチロシンキナーゼ (SRC/Syk など) が活性化し、破骨細胞の異常活性化が起こる (Levaot N et al. Cell, 2011)。以上の結果から3BP2の細胞内増加は、チロシンキナーゼ活性化、破骨細胞分化促進を通して骨量を低下させることが示された。

チェルビズムは全世界で患者数250人の希少疾患だが、その研究成果から申請者は、3BP2の正常な代謝が恒常性維持に極めて重要であると確信し、Tankyraseの阻害は自然免疫・炎症の制御不全を惹起すると考えた。

2. 研究の目的

サイトカイン・ケモカインの異常産生は、炎症性腸疾患や関節リウマチをはじめとする自己免疫性炎症疾患の病因となっている。本研究の目的として、Tankyrase 阻害による生体内、細胞内の変化を明らかにする。

更に Tankyrase の阻害が破骨細胞分化促進や自然免疫の異常応答を誘発し、サイトカイン異常産生や炎症を呈する分子生物学的なメカニズムについても検討する。

最後に Tankyrase ノックアウトマウスから抽出した細胞を用いて、サイトカイン産生亢進の有無についてノックアウト細胞でも確認する。

3. 研究の方法

本研究はマウス骨髄から抽出したマクロファージを用いて検討を行う。破骨細胞必須サイトカイン RANKL や TLR のリガンドであるバクテリア由来の抗原 (Lipopolysaccharide; LPS (TLR4) など) で刺激して、破骨細胞分化やサイトカインの mRNA 発現量、下流シグナルを検討する。

4. 研究成果

本研究の成果として、下記を明らかにした。

(1) Tankyrase と炎症のメカニズム：マクロファージ分画の Tankyrase ノックアウトマウスではサイトカインの異常産生による炎症を呈した。

(2) In vitro でのサイトカイン産生メカニズムの解明：Tankyrase ノックアウトマウスで見られる炎症性サイトカインの異常産生は Toll-like 受容体経路の活性化によることが明らかとなった。

- (3) Tankyrase の破骨細胞活性化作用及びサイトカイン産生作用についての検討：野生型マウス骨髄より分離したマクロファージを RANKL 単独または RANKL と Tankyrase 阻害薬を含んだ培地で培養したところ、Tankyrase 阻害薬で刺激した群では非刺激群と比較して破骨細胞分化能や骨吸収能が著明に増加した。これらの培養条件で得られた細胞内の TNF-mRNA の発現量も上昇が見られた。
- (4) Tankyrase ノックアウト細胞では転写因子 NF- κ B の核内移行が促進し、TLR のリガンド刺激でコントロール細胞に比して IL-6 発現が増加した。
- (5) Tankyrase ノックアウトによる炎症性サイトカイン産生は 3BP2 のダブルノックアウトによりレスキューされた。
- (6) Tankyrase 阻害による破骨細胞分化の促進作用は、3BP2 ノックアウト細胞ではレスキューされた。
- (7) Tankyrase は 3BP2 の他に、AXIN の分解にも関与する。AXIN は Wnt/ β -Catenin を抑制する因子であり、Tankyrase を阻害すると AXIN の発現量増加から、Wnt/ β -Catenin 経路が抑制される。Tankyrase 阻害による破骨細胞分化の促進作用は、Wnt シグナルを活性化させる LiCl 添加でレスキューされた。

以上の結果から、Tankyrase 阻害により 3BP2 が増加し、TLR シグナル活性化からサイトカイン産生を促進させることが明らかとなった。更に Tankyrase 阻害による破骨細胞分化の促進作用は、3BP2 増加のみならず、AXIN の増加に伴う Wnt/ β -Catenin 経路の抑制も寄与することが明らかとなった。

Tankyrase 阻害薬は Wnt/ β -Catenin 経路の抑制から大腸癌など悪性腫瘍の治療薬として研究開発が進んでいるが、本検討から Tankyrase を阻害するとサイトカイン産生や破骨細胞分化が促進することが明らかとなり、副作用が出現する可能性がある。それを克服するためには、組織/細胞特異的な Tankyrase 阻害剤の開発が重要となることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Pharmacologic inhibition of PARP5, but not that of PARP1 or 2, promotes cytokine production and osteoclastogenesis through different pathways.

Asano Y, Matsumoto Y, He F, Katsuyama T, Katsuyama E, Tsuji S, Kamioka H, La Rose J, Rottapel R, Wada J.

Clin Exp Rheumatol. 2023 Jan 23. doi: 10.55563/clinexprheumatol/qf55h8. Online ahead of print. PMID: 36700637

Tankyrase represses autoinflammation through the attenuation of TLR2 signaling.

Matsumoto Y, Dimitriou ID, La Rose J, Lim M, Camilleri S, Law N, Adissu HA, Tong J, Moran MF, Chruscinski A, He F, Asano Y, Katsuyama T, Sada KE, Wada J, Rottapel R.

J Clin Invest. 2022 Apr 1;132(7):e140869. doi: 10.1172/JCI140869.

PMID: 35362478

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

該当無し

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当無し

(2)研究協力者

研究協力者氏名：浅野洋介

ローマ字氏名：Asano Yosuke

所属研究機関名：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

部局名：腎・免疫・内分泌代謝内科学

職名：大学院生

研究協力者氏名：Fang He

ローマ字氏名：Fang He

所属研究機関名：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

部局名：腎・免疫・内分泌代謝内科学

職名：大学院生

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。