

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790563

研究課題名（和文） 小胞体ストレスと炎症に関する研究

研究課題名（英文） The study of ER stress pathway and inflammation

研究代表者

遠藤 元誉（ENDO MOTYOSHI）

熊本大学・大学院医学薬学研究部・産学官連携研究員

研究者番号：40398243

研究成果の概要：本研究は、炎症と小胞体ストレスの関連を分子レベルで明らかにすることを目的とした。今回、我々は炎症誘導によって活性化される小胞体ストレス経路と直接的な小胞体ストレス誘導刺激によって活性化される経路は異なっており、小胞体ストレス経路の活性化動態は、炎症刺激の場合には細胞死を抑制する機構の働きが大きいことを明らかにした。また、IL-1 の成熟・分泌に関与している caspase-11 mRNA は、典型的な小胞体ストレス誘導剤によって誘導された場合には炎症時と異なり、alternative splicing により 2 種類の caspase-11 mRNA が誘導されることを明らかにした(caspase-11 & caspase-11s)。小胞体ストレス時に誘導される Caspase-11s は、発現ベクターを用いて過剰発現させても蛋白として検出することが困難であり、非常に不安定な蛋白であったため、caspase-11 は非炎症性の小胞体ストレス下ではほとんど機能していない可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：呼吸器病学

1. 研究開始当初の背景

重篤な全身性敗血症などに続発する急性呼吸促迫症候群(ARDS)は、進行性かつ重症の低酸素血症を呈し、死亡率は 30～60%にものぼる。したがって敗血症状態において肺の機能低下を防ぐことは、治療戦略上きわめて重要

である。しかし、重症感染時における肺機能障害は治療抵抗性であることが多い。そのため、予後改善のためには病態改善への新しいアプローチの提唱が求められている。

2. 研究の目的

小胞体は、分泌タンパク質や膜タンパク質が、その立体構造を整える場であるとともに、ストレスを感知するオルガネラとしてもきわめて重要な働きをしている。細胞に異常タンパク質が蓄積するような刺激（活性酸素、虚血、低酸素、熱ショック、アミノ酸飢餓など）が加わると、小胞体ストレス応答によって異常タンパク質蓄積による小胞体機能の破綻を回避するような機構が活性化される。第一の応答はタンパク質の翻訳を抑制することで、それ以上異常タンパク質が産生されないようにさせる。第二の応答は小胞体シャペロン遺伝子の発現を誘導して、異常タンパク質の折り畳み能力を増強する。第三の応答は異常タンパク質をサイトゾルへ排出し、分解処理する能力を増進させる。しかし、細胞に強度のストレスが生じ、上記の一～三の経路では処理できなくなった場合、第四の応答としてアポトーシスが誘導され、ストレスによって障害を受けた細胞が除去される。この小胞体ストレス誘導性アポトーシスには、転写因子 CHOP (C/EBP homologous protein) が関与している。当教室では、小胞体ストレスと CHOP を介したアポトーシスの関係について、さまざまなことを明らかにしてきた。従来、一酸化窒素 (NO) によるアポトーシスは、DNA 障害-p53 誘導経路を介すると考えられてきた。ところが、当教室において、p53 ノックアウト細胞を用いた実験でも、NO によるアポトーシスが生じることが明らかとなり、p53 経路以外の関与が考えられた。脾臓ラ氏島細胞由来細胞、ミクログリア細胞およびマクロファージ系細胞において、NO が小胞体ストレス経路を活性化し、転写因子 CHOP が誘導されることを示した。これらの細胞の NO によるアポトーシスは、*Chop* ノックアウトマウスにおいて抑制されたため、CHOP 依存性であると考えられる。疾患モデルでは、脳虚血再還流の際に生じる脳障害において、小胞体ストレス経路の活性化、CHOP によるアポトーシスが生じることを明らかにした。また、応募者は、LPS を全身投与したマウスの肺において、小胞体シャペロンが誘導されており、CHOP を介したアポトーシスが生じていることを見いだした。脳虚血モデル、LPS 全身投与モデルとも *Chop* ノックアウトマウスではアポトーシスが抑制され、病態の軽減が生じることから、小胞体ストレスを介した CHOP の誘導はこれらの病態に深く関与していることが考えられる。なお、CHOP はアポトーシスを誘導する転写因子として知られているが、その詳細な機構については未だ明らかでない。LPS を全身投与したマウスの肺では、マクロファージ、気道上皮細胞、血管内皮細胞などさまざまな細胞が CHOP を発現していることが明らかになったため、応募者は CHOP

がアポトーシス以外の機能を果たしている可能性を考えた。無刺激のマクロファージにおいては、炎症に關与する caspase-11 の誘導発現はみられず、LPS などの炎症刺激が加わったときに速やかに誘導され、IL-1 の成熟に關与していると考えられる。ところが、我々は、典型的な小胞体ストレス応答を惹起するタブシガルギン、ツニカマイシンといった薬剤でも、caspase-11 mRNA の誘導、発現を確認しており、このことも小胞体ストレスと炎症に深い関係があることを示している。当教室では、小胞体ストレスが炎症病態に直接関与していることを世界に先駆けて明らかにした。本研究では、小胞体ストレス経路の炎症病態への関与機構の解明を目的とした。慢性的な炎症や、未だ原因のはっきりしない炎症疾患などに、小胞体ストレスが関与している可能性もある。本研究において、炎症と小胞体ストレスの関連が明らかにされれば、今後小胞体ストレス経路を標的とする新しい治療法の開発につながることを期待された。

3. 研究の方法

応募者は、小胞体ストレスを惹起するような薬剤 (タブシガルギン、ツニカマイシンなど) により、caspase-11 の誘導発現が生じることを明らかにしている。Toll like receptor を介する炎症経路ではなく小胞体ストレス経路でも caspase-11 が誘導、発現することはきわめて興味深い。小胞体ストレスが炎症カスケードの制御に關与しているとするならば、炎症の新たな治療ターゲットにもなりうる。そこで小胞体ストレス応答と炎症カスケードの関係を、細胞レベルで明らかにするため、マウスマクロファージ系細胞株 RAW264.7 細胞を、LPS および小胞体ストレス誘導剤であるタブシガルギン、ツニカマイシンにて刺激し、炎症関連分子のメッセージ誘導、タンパクの発現について解析する。また小胞体ストレスの程度と炎症の程度についても解析を行う。

4. 研究成果

(1) 炎症誘導における小胞体ストレス経路の活性化。マウスマクロファージ系 RAW264.7 細胞にリポポリサッカライド (LPS)、小胞体ストレス誘導剤であるタブシガルギン (Tg) およびツニカマイシン (Tm) を投与し、小胞体ストレス経路の活性化の時間経過と、その結果誘導されたシグナルについて解析を行った。RAW 細胞を LPS にて刺激したところ、小胞体内でのタンパクの正常な折りたたみを促進する小胞体分子シャペロン BiP の誘導や、正しく折りたためられなかったタンパクを

分解へと導く ERAD 関係の遺伝子誘導を早期に認めた。BiP および ERAD 関係の遺伝子は、小胞体膜上に存在する3つのセンサータンパクのうち、ATF6 および IRE1 が主に関与していることが報告されているが、本実験において活性型 IRE1 によって生じる Spliced XBP1 mRNA の誘導も認められた。一方、もう一つのセンサータンパクである PERK の活性化は認められず、LPS 刺激による小胞体ストレス経路の活性化は、主に IRE1 および ATF6 経路を介して誘導されることが明らかとなった。また、転写因子 CHOP も、BiP などにやや遅れて誘導がみられたが、細胞のアポトーシスはほとんど認めなかった。Tg、Tm 刺激では、PERK の活性化がみられ、さらに、BiP、ERAD 関係遺伝子、CHOP の誘導がほぼ同時に認められ、LPS 刺激と比べると細胞のアポトーシスも数多く認められた。LPS 刺激では、ほとんどアポトーシスが生じず、また Tg、Tm 刺激ではアポトーシスが多数生じた理由の一つとして、小胞体膜センサータンパクの感受性の違いが、BiP などの細胞保護的に働く分子シャペロンとアポトーシスを誘導する CHOP などの誘導バランスに違いをもたらしている可能性が考えられた。これらの結果より、炎症誘導によって生じる小胞体ストレス経路の活性化と直接的な小胞体ストレス誘導刺激による活性化は異なっており、小胞体ストレス経路の活性化動態は、炎症刺激の場合には細胞死を抑制する機構の働きが大きいことが明らかとなった。

(2) Short form Caspase-11 の発現とその解析。転写因子 C/EBP ファミリーに属する CHOP は小胞体ストレスによって誘導される。以前申請者は、炎症時に CHOP が caspase-11 誘導を介し、炎症性サイトカインである IL-1 の成熟・分泌に関与していることを明らかにした。Caspase-11 mRNA は炎症以外の小胞体ストレス誘導刺激によっても CHOP 依存的に誘導されるが、その意義は不明であった。今回申請者は、小胞体ストレス誘導剤によって誘導された場合には炎症時と異なり、alternative splicing により2種類の caspase-11 mRNA が誘導されることを明らかにした (caspase-11 & caspase-11s)。Caspase-11s は、発現ベクターを用いて過剰発現させても、蛋白として検出することが困難であり、非常に不安定な蛋白であることが示唆された。また、caspase-11s の意義をより明らかにするために、炎症と小胞体ストレスが共存する状態において実験を行った。マウスマクロファージ系細胞 RAW264.7 細胞を LPS と DTT あるいは Tm とで同時に刺激したところ、caspase-11 蛋白の発現が抑制され、成熟型 IL-1 も減少していた。以上の結果より、小胞体ストレス時には、caspase-11 は short

form が発現するが、速やかに分解されるため、実際にはほとんど機能を果たしていないことが明らかとなった。

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3件)

Namba T, Tanaka K, Ito Y, Ishihara T, Hoshino T, Gotoh T, Endo M, Sato K, Mizushima T., Positive role of CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein, a transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response in the development of colitis. *Am. J. Pathol.*, 174(5):1786-1798, 2009, 査読あり

Hato T, Kimura Y, Morisada T, Koh GY, Miyata K, Tabata M, Kadomatsu T, Endo M, Urano T, Arai F, Araki K, Suda T, Kobayashi K, Oike Y., Angiopoietins contribute to lung development by regulating pulmonary vascular network formation., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 381(2):218-223, 2009, 査読あり

Suyama K, Ohmuraya M, Hirota M, Ozaki N, Ida S, Endo M, Araki K, Gotoh T, Baba H, Yamamura K., C/EBP homologous protein is crucial for the acceleration of experimental pancreatitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 367(1):176-182, 2008, 査読あり

[学会発表](計2件)

遠藤元誉、中山陽一郎、森正敬、尾池雄一、後藤知己、小胞体ストレス時に誘導される short form caspase-11 の意義解明、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会、2008年12月11日、神戸ポートアイランド

中山陽一郎、遠藤元誉、宮田敬士、尾池雄一、後藤知己、炎症時に誘導される小胞体ストレス経路の特徴と意義、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会、2007年12月14日、パシフィコ横浜

6 . 研究組織

(1)研究代表者

遠藤 元誉 (ENDO MOTYOSHI)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・産学官

連携研究員

研究者番号：40398243

(2)研究分担者

(3)連携研究者