

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590310

研究課題名(和文)

小胞体ストレス誘導性転写因子の病態への新たな関与機構

研究課題名(英文)

Analysis of the pathological roles of ER stress-induced transcriptional factors

研究代表者

後藤 知己 (GOTOH TOMOMI)

熊本大学・教育学部・教授

研究者番号：20264286

研究成果の概要(和文)：

小胞体ストレス経路は、細胞内外からの様々なストレスを受けて誘導され、細胞保護・アポトーシス誘導・炎症誘導などの様々な働きを示す。本研究において我々は、小胞体ストレス誘導刺激の種類によって、小胞体膜上の小胞体ストレスセンサーの活性化に差があり、そのことが反応経路全体の差を招き、さらには小胞体ストレス誘導性転写因子 CHOP の誘導時間と果たす役割の差となることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：

ER stress pathway is induced by various stresses from both inside and outside the cells. In this study, we found that the activation patterns of ER stress sensors differ depending on the nature of inducing-stimuli. Then, the ER stress response pathway including the ER stress induced-transcription factor CHOP differ and play different roles, such as preventing cells, inducing apoptosis and inducing inflammation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：分子病態学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：小胞体ストレス、マクロファージ、アポトーシス、炎症、動脈硬化

## 1. 研究開始当初の背景

小胞体は、分泌タンパク質や細胞膜タンパク質の合成・成熟の場である。合成されたタンパク質は、正しい修飾や立体構造形成を完了しなければ、ゴルジ体以降に送られず、小胞体内に蓄積、あるいは分解される。このように小胞体内では、常に複雑なタンパク質合成過程が行われているため、細胞内外からの様々なストレスによって容易に小胞体機能が障害される。これをそのまま放置すれば、タンパク質合成に障害をきたし、やがては細

胞全体に悪影響をおよぼして、細胞の生存をも危うくする。そのため、細胞は、小胞体ストレス応答とよばれる一連の反応を誘導し、小胞体機構の改善、維持を図る。この反応経路の誘導は、小胞体膜上に存在する、三種類の小胞体ストレスセンサーによる小胞体機能障害の探知と活性化によって開始される。しかし、小胞体機能の障害が強く、回復困難な場合には、小胞体ストレス誘導性転写因子 CHOP の誘導などのアポトーシス経路が誘導され、細胞全体が処理される。また、最近、

我々は、小胞体ストレス誘導刺激の種類によっては、CHOP がサイトカイン分泌促進を介して、炎症誘導に働く場合もあることを明らかにしていた。しかし、このような刺激の種類や強度・持続時間の違いによる小胞体ストレスの多様な機能の切り替えが、どのような分子機構によっているかは、不明であった。また、その際、CHOP や XBP1 などの小胞体ストレス誘導性転写因子群の役割がどのように調整され、変化するのか、についても系統だった研究は行われていなかった。

## 2. 研究の目的

小胞体ストレス応答系は、上述したように、誘導刺激の種類、強度、持続時間などの違いによって細胞保護、アポトーシス誘導、炎症誘導といった異なった結果を細胞にもたらす。アポトーシスによる細胞の喪失や炎症反応が強い場合には、組織・臓器の機能障害を招く。そのため、元来は、細胞を保護し、細胞機能が回復困難な状態の時には、細胞全体をアポトーシスによって処理し、周囲組織、個体への悪影響を防止するための機構であると考えられる小胞体ストレス経路は、様々な病態の形成に関与している。そこで、小胞体ストレス応答系が、どのような分子機構で細胞保護から細胞に障害を及ぼす方向に切り替わるのかを明らかにできれば、小胞体ストレスが病態に中心的に関与する疾患において、その切り替え機構を標的とした新たな治療法開発への道を開くことが期待できる。そこで本研究では、未だ不明の点が多い小胞体ストレス応答経路の全貌、とくに誘導刺激の違いによる小胞体ストレス誘導性転写因子群の誘導や機能の切り替えの分子機構を明らかにすることを目的とした。また、小胞体ストレスが、炎症病態に関与していることについては、解明が遅れていたため、急性あるいは慢性の炎症が関与する種々の疾患において、小胞体ストレスの関与について解析を行うことを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 様々な病態において病態形成に深く関与するマクロファージにおいて、刺激の種類や強度によって、細胞保護、アポトーシス誘導、炎症誘導という全く異なった小胞体ストレス応答系が誘導されることを、既に以前、我々は明らかにしていた。そこで、マクロファージ由来細胞株を使用して、種々の小胞体ストレス誘導刺激を与え、小胞体ストレスセンサーの活性化から最終的にアポトーシスによる細胞死などの、細胞の運命を決定する段階までの分子機構を比較・解析した。

(2) 一酸化窒素 NO は、様々な炎症の場にお

いて誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) によって大量に合成され、殺菌や腫瘍細胞の障害に働くが、過剰な NO 産生が持続した場合には、宿主の細胞を障害しアポトーシスを誘導する。我々は、この NO 誘導性アポトーシスが小胞体ストレス転写因子 CHOP 誘導をかいするものであることを以前、明らかにしていた。しかし、少量の NO は逆に細胞保護に働く等、NO と小胞体ストレス、炎症病態との関係には不明の点が多く残されていた。そこで、マクロファージ系細胞に、種々の iNOS 誘導刺激や NO 放出剤投与、さらには NO 消去剤投与を行い、NO と小胞体ストレスとの関係を分子レベルで解析した。

(3) 慢性炎症が様々な疾患の病態に深く関与していることが近年明らかにされてきている。今日、メタボリック症候群において致命的な疾患を招く主な原因とされ、医学的、社会的に大きな問題となっている動脈硬化においても、その本態は、過剰な血液中脂質が動脈壁内に侵入し惹起した慢性炎症であると考えられている。そこで、マウスを使用して動脈硬化モデルを作製し、動脈硬化の各形成過程における小胞体ストレス発現の有無を明らかにするとともに、小胞体ストレス誘導性転写因子 CHOP ノックアウトマウスを使用して、動脈硬化病態への小胞体ストレス経路の関与機構について解析した。

## 4. 研究成果

(1) マクロファージ由来培養細胞株 RAW 細胞を、アポトーシスを誘導する典型的な小胞体ストレス誘導剤タブシガーギンやツニカマイシンで刺激した場合には、三種類の小胞体膜上の小胞体ストレスセンサー (Perk、IRE1、ATF6) は、いずれも活性化され、小胞体ストレス誘導性転写因子 CHOP mRNA の誘導も刺激後 3 時間という早い時間に認められた。細胞保護に働く小胞体ストレス関連因子の誘導に重要な小胞体ストレス誘導性転写因子 XBP1 の活性化も同様に刺激後 3 時間に認められ、その下流にある因子の誘導も早期に認められた。これに対して、小胞体ストレス経路を活性化するもののアポトーシスは誘導せず、炎症系サイトカイン分泌促進を介して炎症誘導に働く LPS (大腸菌リポポリサッカライド) 刺激の場合には、三種類の小胞体ストレスセンサーのうち Perk の活性化 (自己リン酸化) は、認められなかった。CHOP mRNA の誘導は認められたものの誘導開始は、刺激後 12 時間とかなり遅かった。CHOP の誘導には、三種類の小胞体ストレスセンサーいずれもが関与しているが、そのうち Perk 経路の関与がもっとも大きい。そのため、三種類の小胞体ストレスセンサーとも活性化される、

典型的な小胞体ストレス誘導刺激の場合には、CHOP は短時間で誘導され、XBP1 や ATF6 の働きで誘導される、BiP を始めとする防御系の分子の誘導が間に合わないため、アポトーシスに至ると判断した。ところが、炎症誘導刺激の場合には、Perk が活性化しないため CHOP の誘導が遅れ、誘導された時点では、既に BiP 等の小胞体機能保護分子が十分に誘導されているため、アポトーシスは抑制されるものと考えられる。これに対して、小胞体機能や細胞保護に働く因子の誘導に重要な転写因子 XBP1 の活性化はタブシガーゲン同様に早期から認められた。タブシガーゲンの投与量を減らし、アポトーシスを誘導できない量にした場合にも、CHOP mRNA の誘導は、投与後 3 時間という早期から認められ、アポトーシスを誘導する場合の小胞体ストレス応答と、炎症を誘導する場合の小胞体ストレス応答とが、本質的に異なるものであると結論づけられた。CHOP の発現は、pro-apoptotic な Bcl2 ファミリータンパク質 Bax の活性化およびミトコンドリア移行を介して、細胞にアポトーシスを誘導する。しかし、遺伝子導入により小胞体機能保護に働く小胞体分子シャペロン BiP を発現させておくと CHOP 発現によるアポトーシスは抑制された。CHOP のアポトーシス誘導には、CHOP による小胞体内異常構造タンパク質蓄積促進作用も関与していると考えられている。小胞体機能保護に関与する BiP を始めとする分子群は、CHOP の、小胞体に働いて、小胞体内構造異常タンパク質を増加させ小胞体ストレスを悪化させる作用を抑制するものと考えられる。そのため CHOP の誘導が遅れる炎症誘導刺激では、アポトーシスが抑制される者と考えられる。

(2) 一酸化窒素 NO は、小胞体ストレス経路を活性化し、CHOP の誘導を介して、アポトーシスをおこす。しかし、我々は同じく炎症誘導に働く刺激でありながら、RAW 細胞を LPS で刺激した場合には、アポトーシスは誘導されず、LPS+IFN $\gamma$  で刺激した場合には、アポトーシスがおきることを見出した。この時、小胞体ストレス関連分子群の誘導をみると、LPS 刺激では CHOP の誘導は 12 時間以後であるのに対して、LPS+IFN $\gamma$  で刺激した場合には、6 時間以内で CHOP の誘導がおこった。さらに、NO 除去剤を投与することにより LPS+IFN $\gamma$  で刺激しても、早期の CHOP 誘導やアポトーシス誘導がおこらなくなった。このことより、NO が、CHOP を早期に誘導し、アポトーシスをおこす主な原因であると判断された。実際 NO 放出剤である SNAP を投与することにより、早期の CHOP 誘導やアポトーシス誘導が認められた。炎症巣における NO 産生は、殺菌に働くと考えられているが、過剰な NO が持続的に産生された場合には、種々

の炎症生疾患の原因となると考えられている。我々の研究結果は、過剰な NO 産生が、種々の病態に関与する際に、小胞体ストレス-CHOP 経路が重要な役割を演じており、これら疾患の新たな治療標的として小胞体ストレス経路が有望であることを示している。

(3) 動脈硬化は、血液中の過剰なリポタンパク質、とくに LDL が酸化などにより変性し、動脈壁内に侵入することを始まりとし、これに対してマクロファージやリンパ球が浸潤、活性化された血管壁の慢性炎症が病態の本態である。動脈壁内に浸潤したマクロファージは、スカベンジャーレセプターを介して、変性 LDL を取り込み、細胞内に LDL 由来のエステル化コレステロールを充満させ、泡沫化細胞となる。泡沫化細胞は血管平滑筋からも生じ、やがて病変が進行するとともに、泡沫化細胞は、細胞死をおこし、あとにコレステロールの沈着を残して、動脈硬化プラークが形成されてゆく。このようにして、動脈硬化は進展し、徐々に内腔の狭小化が進んでゆくが、最終的に内腔が閉塞し、心筋梗塞等を生じるのは、プラークが破綻し、その部位に血栓が形成されるためである、と考えられている。そのため、この最終段階の動脈硬化プラークの不安定化の機序の解明が臨床的に重要である。動脈硬化の進展とともに、泡沫化細胞内に蓄積したコレステロールは、それまでのエステル化型から、しだいに遊離型が増加してゆく。我々は、この遊離コレステロールが、エステル型とは、細胞内分布を異にし、小胞体内に蓄積することを確認した。また、エステル化阻害剤を投与することにより、細胞内に遊離コレステロールを蓄積させたマクロファージでは、小胞体ストレス-転写因子 CHOP 経路が誘導されることを見出した。この誘導された CHOP は、Bax 活性化を介してアポトーシス経路を活性化した。実際、CHOP ノックアウトマウスを使用した頸動脈カフ留置によるプラーク破綻モデルでは、野生型と比較してプラーク破綻の抑制を認めた。また、野生型マウスに CHOP ノックアウトマウス由来の骨髄を移植したところ、プラーク破綻が認められたことから、マクロファージにおける、遊離コレステロール蓄積を介した小胞体ストレス誘導性アポトーシスが、プラーク不安定化の原因であると考えられた。

#### 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 8 件)

- ① H. Tsukano, T. Gotoh\*, M. Endo, K. Miyata, H. Tazume, T. Kadomatsu, M.

- Yano, T. Iwawaki, K. Kohno, K. Araki, H. Mizuta & Y. Oike. (\*corresponding author) The Endoplasmic Reticulum Stress-CHOP Pathway-mediated Apoptosis in Macrophages Contributes to the Instability of Atherosclerotic Plaques. (査読あり)  
**Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 30: 1925-1932 (2010)
- ② M. Wehling-Henricks, M.C. Jordan, T. Gotoh, W.W. Grody, K.P. Roos & J.G. Tidball. Arginine metabolism by macrophages promotes cardiac and muscle fibrosis in mdx muscular dystrophy. (査読あり)  
**PLoS One**. 5: e10763. (2010)
- ③ Y. Nakayama, M. Endo, H. Tsukano, M. Mori, Y. Oike & T. Gotoh (\*corresponding author) Molecular mechanisms of the LPS-induced non-apoptotic ER stress-CHOP pathway. (査読あり)  
**J. Biochem.**, 147: 471-483 (2010)
- ④ I.B. Debats, T.G. Wolfs, T. Gotoh, J.P. Cleutjens, C.J. Peutz-Kootstra & R.R. van der Hust. Role of arginine in superficial wound healong in man. (査読あり)  
**Nitric Oxide** 21: 175-183 (2009)
- ⑤ K. Kawahara, A. Yoshida, K. Koga, S. Yokoo, A. Kuniyasu, T. Gotoh, M. Sawada & H. Nakayama. Marked induction of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- $\alpha$  in rat CD40+ microglia by comparison to CD40- microglia. (査読あり)  
**J. Neuroimmunol.**, 208: 70-79 (2009)
- ⑥ T. Namba, K. Tanaka, Y., Ito, T. Ishihara, T. Hoshino, T. Gotoh, M. Endo, K. Sato & T. Mizushima. Positive role of CHOP, a transcription factor involved in the ER stress response in the development of colitis. (査読あり)  
**Am. J. Pathol.**, 174: 1786-1798 (2009)
- ⑦ S. A. Villalta, H. X. Nguyen, B. Deng, T. Gotoh & J. G. Tidball. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. (査読あり)  
**Hum. Mol. Genet.**, 18:482-496 (2009)
- ⑧ K. Suyama, M. Ohmuraya, M. Hirota, N. Ozaki, S. Ida, M. Endo, K. Araki, T. Gotoh, H. Baba & K. Yamamura. C/EBP Homologous Protein Is Crucial for the Acceleration of Experimental Pancreatitis. (査読あり)  
**Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 367: 176-182 (2008)
- [学会発表] (計 6件)
- ① 後藤知己、東野寛人、宮田敬士、田爪宏和、矢野正人、遠藤元蒼、尾池雄一  
一般演題:「動脈硬化病態における小胞体ストレス-CHOP経路の関与」  
第19回日本Cell Death学会学術集会(名古屋市愛知県産業労働センター)2010年8月1日
- ② 後藤知己、東野寛人、宮田敬士、田爪宏和、矢野正人、遠藤元蒼、尾池雄一  
一般演題:「動脈硬化病態における小胞体ストレス-CHOP経路の関与」  
第82回日本生化学会大会(神戸市神戸国際展示場)2009年10月23日
- ③ 後藤知己、遠藤元蒼、中山陽一郎、東野寛人、森 正敬、尾池雄一  
一般演題:「小胞体ストレス-CHOP経路のアポトーシス誘導と非誘導経路の解析」  
第18回日本アポトーシス研究会学術集会(長崎市長崎大学坂本キャンパス)2009年8月1日
- ④ 後藤知己、中山陽一郎、遠藤元蒼、東野寛人、森 正敬、尾池雄一  
一般演題:「炎症病態における小胞体ストレス-CHOP経路の特異性」  
第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年会 合同年会(神戸市神戸国際会議場)2008年12月11日
- ⑤ 後藤知己、中山陽一郎、遠藤元蒼、森 正敬、尾池雄一  
一般演題:「小胞体ストレス-CHOP経路のアポトーシス誘導と炎症誘導の二面性の分子機序」  
第17回日本アポトーシス研究会学術集会(京都市メルパルク京都)2008年8月1日
- ⑥ 後藤知己、中山陽一郎、遠藤元蒼、森 正敬、尾池雄一  
一般演題:「小胞体ストレス-CHOP経路を介するLPS誘導性炎症病態の解析」  
第8回日本NO学会学術集会(仙台市仙台国際センター)2008年5月10日
- [その他]  
ホームページ等  
<http://molegene.kumamoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 知己 (GOTOH TOMOMI)  
熊本大学・教育学部・教授  
研究者番号：20264286

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

遠藤 元誉 (ENDO MOTYOYOSHI)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教  
研究者番号：40398243