

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590488

研究課題名（和文） MAPキナーゼによる炎症制御ネットワークの解析

研究課題名（英文） Regulation of inflammation through Mitogen-activated protein kinases

研究代表者

緒方 正人 (OGATA MASATO)

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60224094

研究成果の概要（和文）：

ERK や p38 などの MAP キナーゼ (MAPK) 分子は、細胞の中で様々なシグナルを伝達することで炎症をはじめとする多様な生命現象を制御すると考えられている。これらの分子の生体内での機能を明らかにするため、ERK や p38 遺伝子を欠損した遺伝子改変マウスを作成し解析した。その結果、ERK や p38 がそれぞれリンパ球の分化や肥満・代謝症候群の進行に関わることが示された。この結果は、MAPK シグナル経路の分子を標的として、免疫制御や慢性炎症に関わる生活習慣病などの改善が計れる可能性を示すものである。

研究成果の概要（英文）：

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) such as ERK and p38 are involved in the regulation of inflammation and various biological phenomena through signal transductions. To elucidate the *in vivo* functions of ERK and p38, we have established ERK2 and p38 α conditional knockout mice. The study of these mice revealed that ERK2 and p38 α are involved in the regulation of lymphocyte development and metabolic syndrome, respectively. These results suggest that signaling molecules in the MAPK pathways are candidate targets to control immune responses and/or chronic inflammation induced by obesity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：免疫学・分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：リンパ球、MAPキナーゼ、ERK、p38、遺伝子改変マウス、慢性炎症

1. 研究開始当初の背景

ERK や p38、JNK などからなる MAP キナーゼ (MAPK) は、シグナル伝達分子として転写因子や他のキナーゼなどをリン酸化して制御する。MAPK は、いわゆる免疫細胞にとどまらず、血管内皮などを含む多様な細胞で働き、それら細胞間の相互作用によって炎症制御

のネットワークを構成すると考えられる。同一 MAPK の下流でも標的分子は細胞によって異なり、それが MAPK の多様な機能につながる。例えば、ERK2 ノックアウトマウスを用いた我々を含む研究では、T 細胞と B 細胞に表現型を認めるが、T 細胞と B 細胞の各々で MAPK 機能につながる標的遺伝子は、似てはい

るが同一ではなかった（未発表データを含む）。

さらに最近では、炎症制御ネットワークの生体内での広がり、従来考えられてきたよりも広範囲の疾患や生命現象にまたがると考えられるようになりつつある。例えば、肥満は、外来抗原なしに弱い持続的な炎症状態、即ち慢性炎症を引き起こす。この慢性炎症には、免疫細胞のマクロファージと代謝に関わる脂肪細胞の間の相互作用が重要であると報告されている。慢性炎症は、がん病態との関連も報告されている。

このように多様な細胞にまたがる炎症制御ネットワークにおいて MAPK 系が果たす役割を生体レベルで解明するには、組織特異的なコンディショナルノックアウトや、コンディショナルな遺伝子発現系を利用し、組織や細胞を限定して MAPK 経路の機能解析を行うアプローチが有効と考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、多様な細胞の相互作用における MAPK 系の生理機能を、遺伝子改変マウスを用いて解析することを目的とする。

我々はもともと ERK2 や p38 α のノックアウトマウスが胎生致死であるため、それを回避して成体での機能解析を可能とする目的でコンディショナルノックアウトマウスを独自に作成し、主にリンパ球での解析を行ってきた。この組織特異的なノックアウトによって、多様な細胞の相互作用における MAPK 系の機能を、空間的に分解して解明することが可能となる。このアプローチによって、多様な細胞の相互作用における MAPK 系の生理機能を解析し、疾患における炎症制御機構の役割を明らかにするための基礎的知見を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

p38 α と ERK2 の遺伝子ノックアウトマウスは、いずれも胎盤形成不全で胎生致死である。この二種の MAPK に焦点を絞り、Cre/loxP システムを用いて組織特異的なコンディショナルノックアウトや変異遺伝子の発現を行う。

(1) Tie2-Cre トランスジェニックマウスを用いて、血管内皮と血液細胞で p38 α や ERK2 を欠くマウスを作成する。

(2) Mx-Cre トランスジェニックマウスを用いて、ERK2 遺伝子の欠損を出生後に誘導する。この方法は、血液細胞の遺伝子変異を効率よく誘導できることが知られており、その解析に有効と考えられる。

(3) p38 α 機能を部分的に欠損した変異型 p38 α (sem 型 p38 α) のノックインマウスの解析。p38 α を全身でノックアウトした場合は胎生致死となるが、p38 α の点突然変異である sem 型 p38 α ノックインマウスは生存可能なため、血液細胞や血管以外の表現型も解析可能である。sem 型 p38 α は、一部の基質との結合性を失い、その結果部分的な機能欠損となる。この変異マウスでは、LPS 投与時の炎症性サイトカイン産生が阻害されることを見出している。

(4) ERK1 欠損バックグラウンドのマウスで ERK2 とのダブルノックアウトを行い解析する。ERK には相同性の高い ERK1 と ERK2 の二つの遺伝子があり、機能的な重複があると予想される。ERK1 ノックアウトマウスは生存可能であるが、ERK2 ノックアウトマウスは胎生致死であるため、ERK1 ノックアウトのバックグラウンドで ERK2 を組織特異的にコンディショナルノックアウトする。

以上の遺伝子改変マウスで、炎症制御ネットワークにおける MAPK 機能について、組織ごとに解析する。また、表現型を認めた組織の遺伝子発現をリアルタイム PCR などで調べ、各組織で MAPK の下流で働く標的分子について検討する。

4. 研究成果

(1) ERK1、ERK2 二重欠損マウスの作成と解析 (Mx-Cre トランスジェニックマウスによる解析)

成熟 B 細胞機能については、ERK2 単独のコンディショナルノックアウトマウスで、IgG クラスの抗体産生細胞の減少と血中 IgG 抗体価の低下を認め既に報告している。一方、B 細胞の分化については、ERK1、ERK2 単独のノックアウトマウスでは明らかな異常は認められなかった。

そこで、ERK1 と ERK2 の二重欠損マウスで B 細胞の分化について検討した。ERK1 ノックアウトのバックグラウンドで、Mx-Cre トランスジェニックマウスを用いて ERK2 をコンディショナルノックアウトした。このマウスでは、B リンパ球の分化が pre-BI 細胞の段階でストップしていた。従来から、このポイントを超えて分化するには、pre-BCR からのシグナルが必要なことが知られていたが、pre-BCR を刺激すると ERK の活性化（リン酸化）が認められた。また、未分化な B 前駆細胞に恒常的な活性型の MEK 変異体をレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入すると、pre-BCR からのシグナルが作動しない変異前駆細胞であっても、pre-BI 細胞の段階を超えた分化が認められた。以上から、ERK が

pre-BCR の下流で活性化されることが、pre-BI 細胞の分化または増殖に必要であると考えられた。

次に、ERK の下流で働く標的分子を明らかにするため、pre-BCR 依存的かつ ERK 依存的に発現が変化する遺伝子を網羅的に検索したところ、171 の候補遺伝子を見出した。この中から転写因子遺伝子に焦点を絞り ERK 依存的に発現が変化することを確認したところ、16 の転写因子候補遺伝子を見出した。これらの遺伝子を、ERK を欠いた pro-B 細胞にレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入したところ、Myc、ilf2、Mef2c、Mef2d の 4 遺伝子で細胞増殖が回復することを認めた。従って ERK は、この 4 遺伝子の発現誘導を介して pro-B 細胞の増殖、あるいは分化を制御するものと考えられた。

(2) ERK1、ERK2 二重欠損マウスの作成と解析 (Tie2-Cre トランスジェニックマウスによる解析)

血球細胞や血管内皮で Cre を特異的に発現する Tie2-Cre トランスジェニックマウスを用いて ERK1 ノックアウトのバックグラウンドで ERK2 を欠く二重欠損マウスの作成を試みた。ERK1 単独の欠損マウスは生存可能であるが、Tie2-Cre トランスジェニックマウスを用いて作成した ERK2 とのダブルノックアウトマウスは生存仔が得られず、胎生致死と考えられた。

一方、Mx-Cre トランスジェニックマウスを用いて生後に作成した ERK1、ERK2 ダブルノックアウトマウスは、既に述べたように生存可能であった。この相違の原因としては、ERK が胎生期に生存に重要な働きをしている可能性 (時間的要因)、あるいは、Tie2-cre で遺伝子変異を生じるが Mx-Cre では遺伝子変異を生じない組織がマウスの生存に必要な可能性 (空間的要因) が考えられる。これらのマウスを比較することで、胎児生存に必要な ERK の機能を見いだせる可能性があり、今後の検討課題である。

(3) p38 α ヘテロノックアウトマウスの解析

p38 α に関しては、ホモの遺伝子欠損マウスは胎生致死となるため、まずヘテロノックアウトマウスによる解析を行った。このマウスでは、野生型マウスと比較して、通常食の投与時には体重に明らかな差を認めなかった。しかし、高脂肪食投与後の体重増加は、野生型マウスと比較して抑制されていた。また、高脂肪食投与後の血糖値の上昇についても、p38 α ヘテロノックアウトマウスでは抑制されていた。この結果は、p38 α の機能を部分的に欠損するが生存可能な sem 型 p38 α のノックインマウスの結果と酷似していた。

以上から、p38 α が肥満や代謝症候群の進

行と関わる可能性が示された。

(4) ERK2 ヘテロノックアウトマウスの解析

前期のように p38 α が肥満や代謝症候群と関わることから、ERK2 についても同様な検討を加えた。ERK2 ノックアウトマウスは胎生致死であり、Tie2-Cre トランスジェニックマウスを用いたコンディショナルノックアウトマウスも生存仔数が比較的少数であったため、共にこのような解析は困難であった。

そこで、ERK2 のヘテロノックアウトマウス (生存可能) を用いて、高脂肪食投与による影響を解析した。上記の p38 α コンディショナルノックアウトマウスと異なり、体重増加、血糖値変動ともに野生型マウスと比べ明らかな差を認めなかった。この結果は、肥満や代謝症候群に対し p38 α と ERK2 が機能的に異なることを示唆するものである。しかし、ERK2 のノックアウトで影響が見られなかったといえども、ホモノックアウトではないため ERK2 の関与は否定できず、今後の更なる検討が必要である。

(5) p38 α コンディショナルノックアウトマウスの作成と解析 (Tie2-Cre トランスジェニックマウスによる解析)

p38 α ヘテロノックアウトマウスの解析から、前述のように p38 α が肥満や代謝症候群と関わる可能性が示された。そこで次に、どの組織の p38 α が関与するかについて、p38 α の組織特異的なコンディショナルノックアウトマウスで検討した。

この現象に血球細胞が関与するか否か検討するため、Tie2-Cre トランスジェニックマウスを用いて血液細胞、血管内皮細胞特異的な p38 α コンディショナルノックアウトマウスを作成した。このマウスは、前記の ERK2 の場合とは異なり、十分な数の生存仔が得られた。

このマウスは、通常食では野生型マウスと明らかな相違を認めなかったが、高脂肪食を与えた場合は、野生型マウスと比較して体重増加と血糖値上昇が共に抑制されていた。また、末末血液細胞での炎症性サイトカインの遺伝子発現も低下していたことから、肥満で生じる慢性炎症が抑制されていると考えられた。

以上から、血液細胞において p38 α を介するシグナルが、肥満による慢性炎症の制御を介して代謝症候群の促進にかかわる可能性が明らかになった。

(6) 今後の課題

今回の結果は、p38 α が血液細胞で働くことが、恐らく肥満による慢性炎症の促進を介して代謝症候群の進行にかかわる可能性を示すものである。この結論をより確かなもの

とするには、今後以下のようなさらなる解析が必要と考える。

まず第一は、肥満時に脂肪組織に浸潤し慢性炎症を引き起こすと考えられる血球細胞の解析である。このため、変異マウスと野生型マウスの双方について、肥満時の脂肪組織から血液細胞を回収し、その細胞表面マーカーを解析することが重要であり、既にそれに着手している。また、血液細胞をソーティングによって分離し、機能（炎症を促進したり、逆に抑制する機能を持つ各種遺伝子の発現）についても検討中である。

もう一つの重要な検討課題は、p38 α が働く細胞の一層の絞込みである。Tie2-Cre トランスジェニックマウスでは、血管内皮および広範な血液細胞において p38 α の変異を生じるため、どの細胞における p38 α 機能が重要であるかを確かめることは容易でない。この点について我々は、肥満による代謝症候群の促進に関わるとされている M1 マクロファージ (CD11c 陽性) で特異的に p38 α 遺伝子を変異させるべく、CD11c-Cre トランスジェニックマウスを既に導入し、新たなコンディショナルノックアウトマウスを作成中である。

以上の解析を行うことによって、p38 α が肥満における慢性炎症と代謝症候群の進行にどのように関わるかを明らかにし、治療につながる新たな標的分子が見いだされることが期待される。

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)

①Kumanogoh, A. and Ogata, M. (2010). The study of cytokines by Japanese researchers: a historical perspective. *Int Immunol* 22:341-5. 査読無

②Fukumi-Tominaga, T., Mori, Y., Matsuura, A., Kaneko, K., Matsui, M., Ogata, M., and Tominaga, M. (2009). DIP/WISH-deficient mice reveal Dia- and N-WASP-interacting protein as a regulator of cytoskeletal dynamics in embryonic fibroblasts. *Genes Cells* 14, 1197-1207. 査読有

③Yasuda, T., Sanjo, H., Pages, G., Kawano, Y., Karasuyama, H., Pouyssegur, J., Ogata, M., and Kurosaki, T. (2008). Erk kinases link pre-B cell receptor signaling to transcriptional events required for early B cell expansion. *Immunity* 28, 499-508. 査読有

[学会発表] (計 10 件)

① Sadatsugu Ookuma, Kazuto Sugimura, Masato Ogata, Contribution of p38 α in Blood Cells to the Regulation of Obesity and Blood Glucose Level. 9th International Conference on Protein Phosphatases, Feb. 1, 2011, Tokyo, Japan.

②金岡秀明、杉村和人、緒方正人、奥村克純、DNA 複製ストレスに応答したセントロメア周辺ヘテロクロマチンの転写活性化、第 33 回日本分子生物学会年会第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010)、2010 年 12 月 9 日、神戸

③ Kazuto Sugimura, Kenta Sugiura, Hirota Nakabayashi, Kenji Kuriya, Masato Ogata, Katsuzumi Okumura, UHRF1 is involved in DNA damage induction after DNMT1 knockdown、第 33 回日本分子生物学会年会第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010)、2010 年 12 月 9 日、神戸

④ Sadatsugu Ookuma, Takahiko Fujikawa, Kazuto Sugimura, Toshiyuki Yamane, Hidetoshi Yamazaki, Kinya Otsu, Masato Ogata, Involvement of p38 α in blood cells in the regulation of obesity and blood glucose level、第 33 回日本分子生物学会年会第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010)、2010 年 12 月 9 日、神戸

⑤ Sadatsugu Ookuma, Kazuki Tauchi, Takahiko Fujikawa, Kazuto Sugimura, Kinya Otsu, Masato Ogata, Roles of p38 α in blood cells in the regulation of blood sugar and obesity. 14th International Congress of Immunology (ICI 2010), Aug. 23, 2010, Kobe, Japan.

⑥Sadatsugu Ookuma, Masato Ogata, Roles of p38 α in blood cells in the regulation of blood glucose level、第 39 回日本免疫学会総会学術総会、2009 年 12 月 4 日、大阪

⑦大隈貞嗣、田内一樹、藤川隆彦、大津欣也、緒方正人、血糖値制御における p38 α MAP キナーゼの機能、第 4 回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会、2009 年 11 月 13 日、熊本

⑧ Sadatsugu Ookuma, Kazuki Tauchi, Takahiko Fujikawa, Kinya Otsu, Masato Ogata, Roles of p38 α in the regulation of blood glucose level、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 24 日、神戸

⑨大隈貞嗣 藤川隆彦 緒方正人、MAP キナーゼによるマウスのエネルギー代謝制御、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 (BMB2008)、2008年12月11日、神戸

⑩ Sadastugu Ookuma, Takahiko Fujikawa, Masato Ogata, MAPK regulates energy metabolism of muscle. 8th International Conference on Protein Phosphatases, Nov. 12, 2008, Maebashi, Japan.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：代謝活性化物質のスクリーニング方法、及び新規代謝活性化物質、代謝亢進モデルマウスの作成方法

発明者：大隈貞嗣、緒方正人、藤川隆彦

権利者：国立大学法人三重大学

種類：特許

番号：特願 2008-289212

出願年月日：平成20年11月11日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

緒方 正人 (OGATA MASATO)

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60224094