

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：37604

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07365

研究課題名（和文）非アルコール性脂肪性肝炎の免疫プロテアソームの役割の解明：新規予防・治療法の開発

研究課題名（英文）Role of the immunoproteasome in nonalcoholic steatohepatitis

研究代表者

木村 博昭（Kimura, Hiroaki）

九州保健福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：70593622

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、有効な治療法の開発が望まれている非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）の病態における免疫プロテアソームの役割の解明である。

免疫プロテアソームのそれぞれ酵素活性が異なるLMP2とLMP7欠損マウスを利用して、NASH病態発症における各分子の役割を検討したところ、LMP7は発症初期に促進的に、LMP2は発症初期にプロテクティブに働くことがわかった。それぞれ、肝組織に浸潤している細胞が異なる可能性を見出した。一方で細胞レベルでの実験では、肝細胞の脂肪蓄積に免疫プロテアソームが関与していることは見出せなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の結果は、学術的にはおもしろい発見であるといえる。以前に橋本病モデルでも得られたのだが、LMP2とLMP7の役割が正反対であった。これらの分子は、プロテアソームに組み込まれる前に前駆体として存在し、自身の酵素活性で自己切断する。つまり、プロテアソームに組み込まれる前にも酵素活性を持っていることから何かしらユニークな制御があると考えられる。また、社会的にも、貢献できる可能性がある。LMP7がNASH発症に誘導的に働くことから、予防として阻害剤の利用が可能かどうか調べることによって、新規予防/治療法の可能性を見出したと言える。

研究成果の概要（英文）：The goal of the study is to unveil the role of the immunoproteasome enzyme subunits, LMP2 and LMP7 in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). We used LMP2 and LMP7 knockout mice, because the enzymatic activity between LMP2 and LMP7 is different. When we induced NASH in the mice, we found differences of the disease grade between those mice. LMP7 had promotive role in the early stage of the NASH pathogenesis. On the other hand, LMP2 had protective role in the early stage of the NASH pathogenesis. Both mice developed similar level of steatosis and mononuclear cell (MNCs) infiltrations. However, the population of MNCs seemed different. The detail of the population should be identified. We assessed if the immunoproteasome influences lipid accumulation in hepatocytes in vitro using inhibitors and gene-knockout technology. However we found the immunoproteasome didn't influence the accumulation.

研究分野：内分泌学・炎症・免疫学

キーワード：免疫プロテアソーム LMP2 LMP7 非アルコール性脂肪性肝炎 NASH 炎症

1. 研究開始当初の背景

本研究の基盤となった研究は、自己免疫疾患かつ慢性炎症性疾患でもある橋本病において、その病態発症に免疫プロテアソームが関与することを見出したことである。橋本病は、内分泌器官である甲状腺に起こり、炎症性サイトカインの IFN- γ の作用が関与する疾患である。橋本病の疾患モデルマウスの免疫プロテアソームの LMP2 を欠損させると炎症病態が改善し、甲状腺機能も正常値に戻った。橋本病患者の甲状腺にも LMP2 発現が更新していることもわかった。このことから、免疫プロテアソームが内分泌関連の炎症性疾患に関与するという仮説をたて、高脂肪食による肥満・高血糖・高脂血症誘導や、インスリン感受性においても免疫プロテアソームの関与を調査した。免疫プロテアソーム LMP2, LMP7 のいずれの欠損によっても、肥満・高血糖・高脂血症誘導の抑制やインスリン感受性の改善がみられたため、その他のメタボ関連の疾患にも効果があるのではと考え、有効な治療法の開発が望まれている非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) に着目した。マウス NASH 病態に免疫プロテアソームの発現を確認したことから、NASH 病態発症・進展に免疫プロテアソームが関与するという仮説を立て、本研究を計画した。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、NASH の病態における免疫プロテアソームの役割の解明である。免疫プロテアソームの酵素サブユニットは 3 つあり、それぞれ酵素活性が異なる。そのうち LMP2 と LMP7 欠損マウスを所持しているため、その二つの酵素について役割を調査することが実際の目的である。さらに具体的には、NASH 誘導食餌による野生型マウスと免疫プロテアソーム欠損マウスの NASH 病態を病理学的、生化学的に比較し、なぜ違いが出るのかその作用機序を解明することにより、免疫プロテアソーム各酵素の役割が明らかになると予想された。

(2) 本研究のもう一つの目的は、NASH 病態における免疫プロテアソーム発現様式の同定である。肝臓組織には肝細胞以外に、マクロファージ、血管内皮細胞、星細胞などが存在し、また、炎症時には炎症性のマクロファージが浸潤するため、どの細胞に免疫プロテアソームが発現しているのかを解明することを目的とした。また、肝細胞への脂肪の蓄積に免疫プロテアソームが関与しているかどうかを免疫プロテアソームサブユニットの阻害剤を用いて、影響を明らかにすることも目的とした。

3. 研究の方法

【動物モデル】

野生型マウスと免疫プロテアソームサブユニットの LMP7 もしくは LMP2 欠損マウス (7~10 週齢) を実験に使用した (系統 C57BL/6J)。食餌には、コリン欠乏メチオニン減量高脂肪食餌 (CDAHFD) (リサーチダイエツ社: A06071302) を使用し、1 週間・2 週間・4 週間と摂餌期間を変え、各フェノタイプのマウス群の血液や臓器等を回収した。組織の一部はホルマリン固定後にパラフィンブロック作製した。切片作成後にヘマトキシリン & エオシン染色した。また一部の組織は、mRNA、タンパク質抽出用に凍結、さらに一部の組織は凍結切片用に OCT に包埋した。凍結切片はオイルレッド O などの脂肪染色用に用いた。凍結組織からは、mRNA 抽出し、逆転写後にリアルタイム PCR で遺伝子発現を定量した。

【細胞】

肝細胞内への脂肪蓄積に免疫プロテアソームが関与するかどうかを、ヒト肝細胞株 HepG2 細胞、マウス肝細胞株 Hepa1-6 細胞の培養液にオレイン酸等の脂質を加え、阻害剤や遺伝子欠損株作成により、その影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 免疫プロテアソーム酵素サブユニット LMP7 の役割に関する調査

野生型マウスと免疫プロテアソーム酵素サブユニットの LMP7 欠損マウス (雌雄 8 週目) それぞれに通常食、高脂肪食、CDAHFD を投与し、NASH の肝臓炎症マーカーである AST と ALT を測定した。この計画の最初の実験として、雄のマウスで一般に多くの論文で行われている 4 週間 CDAHFD 投与を行い、AST, ALT の測定や組織の回収を行った。1 回目のグループでの実験では差が出たが、マウスの数を増やすとその有意差は消失した (図 1: 4 週データ)。通常食や高脂肪食では AST 値, ALT 値の上昇はみられなかった。雌マウスでも同様に実験を行ったが有意差は得られなかった。そこで、病態の差が出る時間を見逃しているのではないかと考え、雄マウスを利用して CDAHFD 投与 2 週や 1 週において差が出るかどうか検討した。組織像を確認したところ、1 週ですでに脂肪の蓄積がみられ、AST と ALT も上昇していた (図 1: NC は通常食のネガティブコントロール)。CDAHFD 投与 1 週では、LMP7 欠損マウスの方が AST, ALT 値が有意に低く、組織像での脂肪の蓄積が少ないことがわかった (図 1: 1 週データ)。その脂肪蓄積は、H&E 染色では、野生

型の方が多く見えたが、凍結切片を利用したオイルレッドO染色で、脂肪を染色しても有意差は計測されなかった。

(2) 免疫プロテアソーム酵素サブユニット LMP2 の役割に関する調査

LMP7 欠損マウスでは、CDAHFD 投与 1 週間において軽減されていたことがわかったため、LMP2 についても検討した。その理由として、甲状腺の橋本病マウスモデルでは、LMP2 欠損では病態の改善がみられ、LMP7 欠損では改善されなかったため、逆の現象が見られる可能性があると考えたからである。LMP2 については、littermates を使用した。野生型マウス (LMP2+/+) と免疫プロテアソーム酵素サブユニットの LMP2 ヘテロマウス (LMP2+/-)、LMP2 欠損マウス (LMP2-/-) (雄 8 週目) それぞれに通常食、CDAHFD を投与し、NASH の肝臓炎症マーカーである AST と ALT を測定した。LMP2 欠損マウスでも、1 週目ですでに有意差が現れることがわかったが、逆に悪化していることがわかった (図 2)。同様に CDAHFD 投与 1 週間で、肝臓への脂肪の蓄積が観察されたが、組織像をよく観察すると、LMP2 欠損マウスの肝臓における単核球が多く見られ、かつ炎症細胞が集積している画像が見られた。また、AST、ALT の有意差も顕著で、LMP2 が欠損すると炎症が激しくなっている可能性が考えられた。そこで、肝臓の mRNA を抽出し、肝臓全体の CD45 細胞を mRNA レベルの発現で比較してみた。LMP2+/+ や LMP2+/- と比較して、LMP2-/- の CD45 の発現が顕著に高く、さらにマクロファージマーカー *Emr1* (F4/80) や好中球マーカーの *Ly6g* の発現も高かったため、組織病変のどの部分に多いのか免疫染色確認する必要がある。

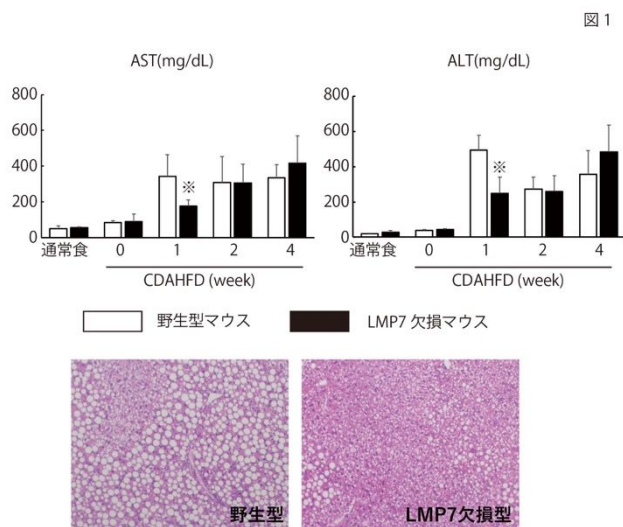


図 1

野生型マウス (LMP2+/+) と免疫プロテアソーム酵素サブユニットの LMP2 ヘテロマウス (LMP2+/-)、LMP2 欠損マウス (LMP2-/-) (雄 8 週目) それぞれに通常食、CDAHFD を投与し、NASH の肝臓炎症マーカーである AST と ALT を測定した。LMP2 欠損マウスでも、1 週目ですでに有意差が現れることがわかったが、逆に悪化していることがわかった (図 2)。同様に CDAHFD 投与 1 週間で、肝臓への脂肪の蓄積が観察されたが、組織像をよく観察すると、LMP2 欠損マウスの肝臓における単核球が多く見られ、かつ炎症細胞が集積している画像が見られた。また、AST、ALT の有意差も顕著で、LMP2 が欠損すると炎症が激しくなっている可能性が考えられた。そこで、肝臓の mRNA を抽出し、肝臓全体の CD45 細胞を mRNA レベルの発現で比較してみた。

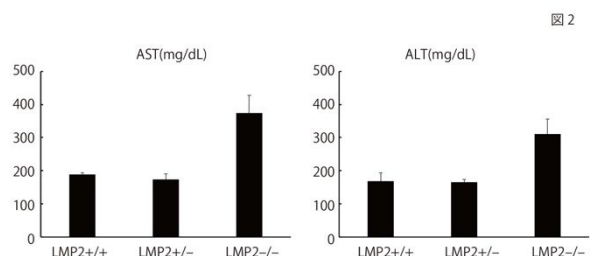


図 2

(3) NASH 誘導時の免疫プロテアソーム発現細胞の同定

野生型マウスの通常食と NASH 誘導食 (CDAHFD) 投与のマウスの肝臓組織を酵素処理して、シングル細胞分画から CD45 陽性細胞を濃縮し、免疫プロテアソーム酵素サブユニットの LMP2、LMP7 の発現を検討したところ、両方とも発現が高かった (図 3)。CD45 陰性細胞では差が認められなかった。(2) の結果から、CD45 陽性細胞中のマクロファージや好中球を分離してさらに解析を進めていく。

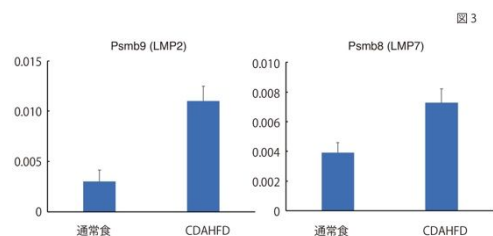


図 3

(4) 肝細胞の脂肪蓄積における免疫プロテアソームの関与について

(1) で初期に肝臓組織においては、脂肪蓄積に差があるように見えたので、ヒトやマウスの肝細胞株と免疫プロテアソーム阻害剤や免疫プロテアソーム酵素サブユニット欠損細胞を利用して、肝細胞の脂肪蓄積に免疫プロテアソームが関与するかどうか検討したが、有意な差はみとめられなかった (図 4)。したがって、肝細胞における免疫プロテアソームは、脂肪蓄積に影響を及ぼしていないと考えられた。

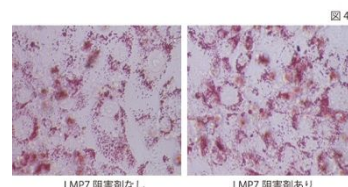


図 4

(5) まとめ

本研究では、自己免疫疾患や炎症病態で一般に病態を悪くする免疫プロテアソームが NASH 病態での発現が増加していることから、免疫プロテアソーム酵素サブユニットを欠損させることにより病態が良くなるという仮説のもとに開始した。LMP7 は初期の病態発現に関与していることがわかった。一方、LMP2 欠損では、初期に悪化することがわかった。炎症細胞の浸潤が激しく、炎症状態が悪化していることから、LMP2 は NASH 病態の進行に対してプロテクティブに働いていることがわかった。その作用機序として、炎症細胞がなぜ多いのか、現在もケモカインの発現などを調べて、詳細な機構を調査しているところである。マウスの繁殖トラブルやコロナ禍もあって、予定通り研究が進まなかったため、最終的なまとめをできていないが、現在行っている実験を進めて、早々に論文にする予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Inaba Hidefumi, Morita Shuhei, Kosugi Daisuke, Asai Yuki, Kaido Yosuke, Ito Saya, Hirobata Tomonao, Inoue Gen, Yamamoto Yuki, Jinnin Masatoshi, Kimura Hiroaki, Ota Masao, Okudaira Yuko, Nakatani Hiroyasu, Kobayashi Tomoko, Iwama Shintaro, Arima Hiroshi, Matsuoka Takaaki	4. 巻 14
2. 論文標題 Amino acid polymorphisms in human histocompatibility leukocyte antigen class II and proinsulin epitope have impacts on type 1 diabetes mellitus induced by immune-checkpoint inhibitors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2023.1165004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inaba Hidefumi, Kaido Yosuke, Ito Saya, Hirobata Tomonao, Inoue Gen, Sugita Takakazu, Yamamoto Yuki, Jinnin Masatoshi, Kimura Hiroaki, Kobayashi Tomoko, Iwama Shintaro, Arima Hiroshi, Matsuoka Takaaki	4. 巻 37
2. 論文標題 Human Leukocyte Antigens and Biomarkers in Type 1 Diabetes Mellitus Induced by Immune-Checkpoint Inhibitors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Endocrinology and Metabolism	6. 最初と最後の頁 84 ~ 95
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3803/EnM.2021.1282	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shiraishi Yasuyuki, Kimura Atsushi, Kimura Hiroaki, Ohmori Tsukasa, Takahashi Masafumi, Takeshita Katsushi	4. 巻 26
2. 論文標題 Deletion of inflammasome adaptor protein ASC enhances functional recovery after spinal cord injury in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Science	6. 最初と最後の頁 487 ~ 493
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jos.2020.04.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe Sachiko, Usui-Kawanishi Fumitake, Komada Takanori, Karasawa Tadayoshi, Kamata Ryo, Yamada Naoya, Kimura Hiroaki, Dezaki Katsuya, Ohmori Tsukasa, Takahashi Masafumi	4. 巻 531
2. 論文標題 ASC regulates platelet activation and contributes to thrombus formation independent of NLRP3 inflammasome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 125 ~ 132
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.07.063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito Homare, Kimura Hiroaki, Karasawa Tadayoshi, Hisata Shu, Sadatomo Ai, Inoue Yoshiyuki, Yamada Naoya, Aizawa Emi, Hishida Erika, Kamata Ryo, Komada Takanori, Watanabe Sachiko, Kasahara Tadashi, Suzuki Takuji, Horie Hisanaga, Kitayama Joji, Sata Naohiro, Yamaji-Kegan Kazuyo, Takahashi Masafumi	4. 巻 205
2. 論文標題 NLRP3 Inflammasome Activation in Lung Vascular Endothelial Cells Contributes to Intestinal Ischemia/Reperfusion-Induced Acute Lung Injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1393 ~ 1405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2000217	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Sachiko, Usui Kawanishi Fumitake, Karasawa Tadayoshi, Kimura Hiroaki, Kamata Ryo, Komada Takanori, Inoue Yoshiyuki, Mise Nathan, Kasahara Tadashi, Takahashi Masafumi	4. 巻 235
2. 論文標題 Glucose regulates hypoxia induced NLRP3 inflammasome activation in macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 7554 ~ 7566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.29659	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Naoya, Karasawa Tadayoshi, Wakiya Taiichi, Sadatomo Ai, Ito Homare, Kamata Ryo, Watanabe Sachiko, Komada Takanori, Kimura Hiroaki, Sanada Yukihiro, Sakuma Yasunaru, Mizuta Koichi, Ohno Nobuhiko, Sata Naohiro, Takahashi Masafumi	4. 巻 20
2. 論文標題 Iron overload as a risk factor for hepatic ischemia reperfusion injury in liver transplantation: Potential role of ferroptosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Transplantation	6. 最初と最後の頁 1606 ~ 1618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ajt.15773	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kimura Hiroaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Immunoproteasome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLS (encyclopedia of Life Sciences)	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/9780470015902.a0026244	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	The Johns Hopkins Medical Institutions		