

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390418

研究課題名(和文) 口腔領域炎症性疾患における小胞体ストレスの役割の解明

研究課題名(英文) The role of ER stress in oral inflammatory diseases

研究代表者

西頭 英起 (Nishitoh, Hideki)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：00332627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：口腔領域の粘膜は、常に温熱などの物理的ストレスや酸・アルコールなどの化学的ストレスに曝されており、そのストレスに応答するためのシステムが備わっている。中でもマクロファージの役割は重要で、その破綻は炎症性疾患の発症さらにはがん化につながる場合もある。細胞内のストレス応答として最も有名なものの一つが小胞体ストレスである。本研究では、マクロファージを用いて菌体由来の毒素の一つであるLPSによるストレス応答について検討した結果、マクロファージの機能と小胞体ストレスが密接に関連していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Mucosa of the oral cavity region is constantly exposed to physical stress, such as acid and alcohol, and chemical stress, such as heat. Our body possesses the system to response to these stresses. Among them, the role of macrophages is important and its dysfunction may lead to cancer by its exacerbation of inflammatory diseases. One of the most famous as a stress response in the cells is the endoplasmic reticulum stress. In this study, we investigated the stress response by LPS, which is one of the toxin from bacteria, in macrophages. Our study revealed that ER stress is closely related to the function of macrophage.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ストレス シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の細胞内には様々な小器官が存在し、それぞれの品質が保証されることで正しい機能が発揮され、細胞として、さらには臓器として機能することが可能になる。なかでも研究代表者らは、様々な分泌タンパク質、膜タンパク質の合成の場である小胞体に着目して研究を進めてきた。小胞体内のタンパク質の品質管理は極めて厳密に制御されていることが近年明らかにされている。すなわち、分子シャペロンの発現誘導による折りたたみ、小胞体内腔への更なるタンパク質合成を軽減するための翻訳抑制、不良タンパク質の分解(小胞体関連分解)である。しかし、これらのいずれかが破綻したり、不良タンパク質が過剰に産生されるような負荷が細胞にかかった場合、小胞体ストレス誘導性細胞死が誘導される。

このような細胞内ストレス応答については、口腔領域での検討はまだなされていなかった。とくに、口腔内の疾患に関連する粘膜炎症との関係解明が課題であった。

2. 研究の目的

口腔領域の疾患では、その組織学的な特徴から炎症性の疾患が多く、なかでもマクロファージの役割解明は重要である。しかし、マクロファージと小胞体ストレス応答に関する検討報告は少ないことから、本研究ではマクロファージを中心とした解析を行うこととし、その分化と活性化における小胞体ストレス応答分子の役割について検討することで、小胞体ストレスが発信する「生存・機能」と「アポトーシス」の両シグナルの炎症における重要性を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) マクロファージの活性化における小胞体ストレス誘導の検討

小胞体ストレスによって活性化される受容体 IRE1 の下流でスプライシングされる機構を応用した、小胞体ストレスモニタリングプローブ(ERAI コンストラクト)などを用いて、細菌毒素 LPS によるマクロファージの活性化の際に小胞体ストレスが惹起されるか、また、その際の細胞形態および機能変化について検討した。

(2) マクロファージの活性化における小胞体ストレスシグナルの必要性の検討

小胞体品質管理に重要な分子 Derlin-1 と、小胞体ストレス誘導性アポトーシスに重要な ASK1 の欠失細胞とマウスを用いて、LPS におけるその必要性と役割を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト単球性白血病細胞株(THP-1)お

よびマクロファージ細胞(RAW246.7)を用いて、LPS による細胞形態の変化を指標とした活性化を検討した結果、いずれの細胞でも接着面積の増加を示した。また、Iba1 抗体による細胞免疫染色により、活性化を定量化することに成功した。このような刺激にともなう、小胞体ストレス受容体 IRE1 と PERK の活性化が時間依存的、濃度依的に活性化されることが明らかとなった。小胞体ストレスは、小胞体内腔に不良タンパク質が蓄積することにより惹起されることから、その指標となる小胞体シャペロン分子 BiP の発現誘導を確認したところ、意外にも誘導は強くなかったことから、細菌感染(LPS)による小胞体ストレス誘導は、不良タンパク質の蓄積以外のメカニズムによることが示唆された。

(2) 小胞体ストレス依的に活性化されアポトーシスを誘導するストレス応答性 MAP キナーゼ ASK1 の粘膜を含む上皮組織炎症における役割を検討した結果、創傷治癒過程において ASK1 は関与しないことが示唆された。しかし、炎症惹起にかかわる炎症性細胞の浸潤には関与することが示された。

一方、小胞体品質管理に必須の分子である小胞体膜タンパク質 Derlin-1 について検討したところ、ストレスを与えない状態から表皮の菲薄化と炎症像が観察され、経年的に表現型が悪化することが示された。Derlin-1 の必要性を細胞レベルで検証するために、Cas9/CRISPR システムを用いてマクロファージで遺伝子欠失細胞を作製することを試みたが、マクロファージの遺伝子導入効率の低さの原因により困難であった。そこで、上皮系細胞での Derlin-1 遺伝子欠失細胞を作製することに成功した。この細胞を用いて、異物貪食や LPS による小胞体ストレス誘導などについて検討し、その必要性を示すことに成功した。

以上の結果より、小胞体の品質管理システムがマクロファージおよび上皮組織の機能と維持に必要であることが強く示唆された。

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12件)

Kikuchi H., Nakayama M., Kuribayashi F., Imajoh-Ohmi S., Nishitoh H., Takami Y., Nakayama T. GCN5 is involved in regulation of immunoglobulin heavy chain gene expression in immature B cells. *Gene* 544:19-24 (2014), 査読有

Kikuchi H., Nakayama M., Kuribayashi F., Imajoh-Ohmi S., Nishitoh H., Takami Y., Nakayama T. Protein kinase C gene expression is oppositely regulated by GCN5 and EBF1 in immature B cells. *FEBS Lett.* 588:1739-1742

(2014), 査読有
Matsui M., Fukuno N., Kanda Y., Kantoh Y., Chida T., Nagaura Y., Suzuki O., Nishitoh H., Takeda K., Ichijo H., Sawada Y., Sasaki K., Kobayashi T., Tamura S. The expression of Fn14 via mechanical stress-activated JNK contributes to apoptosis induction in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 289:6438-6450 (2014), 査読有
Kikuchi H., Nakayama M., Kuribayashi F., Imajoh-Ohmi S., Nishitoh H., Takami Y., Nakayama T. GCN5 is essential for IRF-4 gene expression followed by transcriptional activation of Blimp-1 in immature B cells. *J. Leukoc. Biol.* 95:399-404 (2014), 査読有
Homma K., Fujisawa T., Tsuburaya N., Yamaguchi N., Kadowaki H., Takeda K., Nishitoh H., Matsuzawa A., Naguro I., Ichijo, H. SOD1 as a molecular switch for initiating the homeostatic ER stress response under zinc deficiency. *Mol. Cell* 52:75-86 (2013), 査読有
Kadowaki H., Nishitoh H. Signaling Pathways from the Endoplasmic Reticulum and their Role in Diseases. *Genes* 4:306-333 (review article) (2013), 査読有
Yamaguchi K., Takeda K, Kadowaki H., Ueda I., Namba Y., Ouchi Y., Nishitoh H., Ichijo H. Involvement of ASK1-p38 pathway in the pathogenesis of diabetes triggered by pancreatic β cell exhaustion. *Biochim. Biophys. Acta.* 1830:3656-3663 (2013), 査読有
Naguro I., Umeda T., Kobayashi Y., Maruyama J., Hattori K., Shimizu Y., Kataoka K., Kim-Mitsuyama S., Uchida S., Vandewalle A., Noguchi T., Nishitoh H., Matsuzawa A., Takeda K., Ichijo H. ASK3 responds to osmotic stress and regulates blood pressure by suppressing WNK1-SPAK/OSR1 signaling in the kidney. *Nat. Commun.* 3:1285 (2012), 査読有
Fujisawa T., Homma K., Yamaguchi N., Kadowaki H., Tsuburaya N., Naguro I., Matsuzawa A., Takeda K., Takahashi Y., Goto J., Tsuji S., Nishitoh H., Ichijo H. A novel monoclonal antibody reveals a conformational alteration shared by amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants. *Ann. Neurol.* 72:739-749 (2012), 査読有
Kikuchi H., Kuribayashi F., Imajoh-Ohmi S., Nishitoh H., Takami Y., Nakayama T. GCN5 protects vertebrate cells against

UV-irradiation via controlling gene expression of DNA polymerase . *J. Biol. Chem.* 287:39842-39849 (2012), 査読有

Sato T., Sako Y., Sho M., Momohara M., Suico M.A., Shuto T., Nishitoh H., Okiyoneda T., Kokame K., Kaneko M., Taura M., Miyata M., Chosa K., Koga T., Morino-Koga S., Wada I., Kai H. STT3B-dependent posttranslational N-glycosylation as a surveillance system for secretory protein. *Mol. Cell* 47:99-110 (2012), 査読有
Nishitoh H. CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response. *J. Biochem.* 151:217-219 (review article) (2012), 査読有
山口奈美子, 西頭英起, タンパク質の品質管理. 「イラストで徹底理解するシグナル伝達キーワード辞典」羊土社, 194-202 (2012), 査読無

〔学会発表〕(計6件)

西頭英起, 第36回九州シンポジウム, SOD1の構造変化により惹起される小胞体ストレスの生理的・病理的意義, 2012.9.6, 宮崎

西頭英起, 第7回小胞体ストレス研究会, 新規小胞体品質管理システムの分子機構の解明, 2012.11.9, 広島

西頭英起, 第86回日本生化学会大会, Derlinファミリーを介した小胞体品質管理システム, 2013.9.11, 横浜

西頭英起, 第65回日本細胞生物学会大会, 新規小胞体品質管理システムの分子機構解明, 2013.6.21, 名古屋

Nishitoh H., EMBO Conference, Derlin family proteins control protein loading into the endoplasmic reticulum via substrate-specific cotranslational rerouting from translocation to degradation, 2014.10.26, バルセロナ

西頭英起, 第9回小胞体ストレス研究会, 小胞体品質管理におけるDerlinの生理的意義の解析, 2014.7.4, 徳島

〔図書〕(計0件)

〔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:

<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/2bio/#>

6. 研究組織

(1)研究代表者
西頭 英起 (NISHITOH, Hideki)
宮崎大学・医学部・教授
研究者番号：00332627

(2)研究分担者
該当なし

(3)連携研究者
該当なし