

「炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基盤技術の創出」
平成23年度採択研究代表者

H23 年度
実績報告

山本雅之

東北大学大学院医学系研究科・教授

環境応答破綻がもたらす炎症の慢性化機構と治療戦略

§1. 研究実施体制

(1)「山本」グループ

① 研究代表者: 山本 雅之 (東北大学大学院医学系研究科、教授)

② 経時的・非侵襲的な炎症反応の個体モニタリングシステムの構築

- ・HDC-GFP マウスの作製
- ・IL-6-Luc マウスの作製

③ 環境異物・酸化ストレス応答の破綻と炎症の遷延化

- ・ダイオキシン受容体の機能亢進により惹起される慢性皮膚炎の解析
- ・慢性炎症におけるマクロファージにおけるストレス応答系の解析
- ・ストレス応答系の機能破綻がもたらす炎症病態の解析

(2)「田中」グループ

① 主たる共同研究者: 田中 伸幸 (宮城県立がんセンター研究所がん先進治療開発研究部、部長)

② 細胞質ストレスによる生体防御系の活性化と炎症

- ・ESCRT 輸送系不全がもたらす細胞質ストレスと Keap1-Nrf2 ストレス応答系の役割の解析
- ・ESCRT 輸送系不全と慢性炎症病態との関係の解析

(3)「本橋」グループ

① 主たる共同研究者: 本橋 ほづみ (東北大学大学院医学系研究科、准教授)

② 慢性炎症における骨髄応答とその記憶の解析

- ・慢性炎症モデル K14-AhRCA マウスの造血細胞の解析

§2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

(1) 経時的・非侵襲的な炎症反応の個体モニタリングシステムの構築

本提案研究全体で利用する炎症応答の *in vivo* モニタリング系を作出するために、HDC 遺伝子および IL-6 遺伝子の転写活性化を指標とするモニタリングマウスを作製することが、本研究項目のねらいである。

平成 23 年度は、HDC-GFP マウスを作製した。ヒスタミン産生の鍵酵素をコードする HDC 遺伝子の制御領域を含む大腸菌人工染色体(BAC)上で、大腸菌における相同組換えを利用して HDC 遺伝子座に GFP cDNA をノックインした。こうして得られた組換え BAC をマウス受精卵へ導入して、トランスジェニックマウス(HDC-GFP マウス)を得た。HDC-GFP マウスの腹腔内肥満細胞で GFP の発現が観察され、肥満細胞のマーキングができていたことが確認できた。

引き続き、IL-6 遺伝子の制御領域を含む大腸菌人工染色体(BAC)を入手し、相同組換えにより IL-6 遺伝子座にルシフェラーゼ cDNA をノックインする準備をすすめつつある。

(2) 環境異物・酸化ストレス応答の破綻と炎症の遷延化

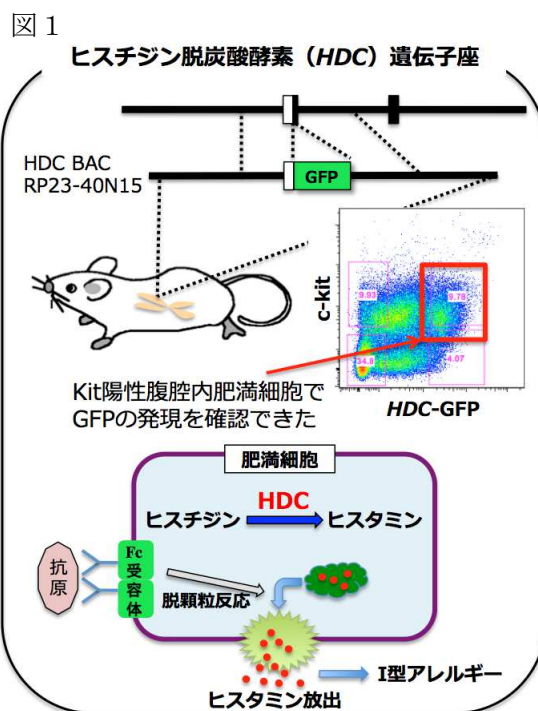
異物代謝第1相反応の鍵因子である AhR と第2相反応を担う Nrf2 の機能亢進、もしくは機能不全が炎症の慢性化にどのように寄与するのかを明らかにすることが、本研究項目のねらいである。

平成23年度は、K14-AhR CA マウスと、Nrf2 欠損マウス、HDC 欠損マウスの交配をすすめ、複合変異マウスの作製を行った。今後皮膚症状の解析、全身の免疫応答状態の解析を実施する。

以前に代表者らは、オートファジー不全が Nrf2 の恒常的安定化をもたらし、肝炎を増悪させることを明らかにした。この結果に基づき、Nrf2 の抑制性因子である Keap1 自身がオートファジーにより分解されていることを見いだした。興味深いことに、親電子性物質により修飾をうけた Keap1 はより速やかに分解されることも明らかになった。

(3) 細胞質ストレスによる生体防御系の活性化と炎症

細胞内の物質輸送系である ESCRT は、外来異物の分解と同時に、オートファジーによる細胞内タンパク質の分解にも重要な役割を果たしており、広い意味での細胞内ストレス抑制機構と考えられる。本研究項目のねらいは、細胞質ストレスによる炎症遷延化の分子基盤を解明し、このメカニ



ズムへの Keap1-Nrf2 制御系の関与を検証することである。

平成 23 年度は、SCRT 不全状態にある条件付き Hrs 欠損マウスと、Nrf2 欠損マウス、Keap1 欠損マウス、Atg7 欠損マウス、p62 欠損マウスとの、それぞれ複合変異マウスの作製をすすめた。複合変異マウスが得られ次第、標的臓器における細胞内ストレスについて、炎症惹起や細胞変性等の観点から解析を実施する。

また、細胞質ストレスとしてのウイルス感染に対する応答についても解析を行った。ウイルス感染は細胞に大きなストレスを与え、炎症反応の惹起を起こす。そこで、C 型肝炎ウイルス感染における ESCRT の役割を検討した。ESCRT 機能が抑制される2種の肝臓細胞株 (Hrs ノックダウン Huh7 細胞、および不活性型 Vps4 発現 Huh7 細胞) では、細胞外へのエクソソーム(Exosome)放出が著明に抑制されており、同時に HCV ウイルス粒子の細胞外放出も低下した。Hrs は HCV のコア抗原と細胞内小胞(MVB 等)上で共局在することから、ウイルス粒子の形成や輸送を担っていることが明らかになった。今後、ウイルス感染ストレスにおける ESCRT の役割についても解析する予定である。

さらに、一方、細胞変性における ESCRT の役割を解析するため、パーキンソン病の発症に関わる α -synuclein の細胞内動態を調べた。神経細胞株において不活性型 Vps4 を発現すると、 α -synuclein はエンドソーム系(MVB)による分解を免れ、細胞外分泌量が顕著に増加した。さらに、パーキンソン病患者検体において Vps4 は脳幹部および大脳皮質の Lewy body と局在が一致した。したがって、ESCRT は細胞生物学的な観点からも神経変性と密接な関係を有することが判明した。神経変性におけるストレスへの関与を、次年度以降解析する予定である。

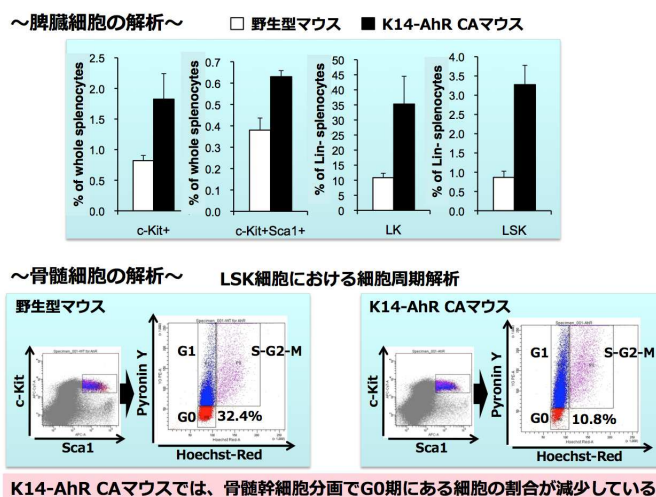
(4)慢性炎症における骨髄応答とその記憶の解析

栄養素、感染、大気汚染物質などの環境要因は、細胞のエピジェネティックな変化をもたらし、遺伝子発現を長期的に変化させるといわれている。炎症によるサイトカインをはじめとする生理活性物質による刺激が慢性的に持続した場合に、それに応答して動態が変化する造血細胞、特に、幹細胞においてエピジェネティックな変化がおこるかどうかが、起こるのであれば、その変化の程度を規定する因子を明らかにすることが本研究のねらいである。

平成 23 年度には、K14-AhR CA マウスの

骨髄細胞、脾臓細胞をフローサイトメリーにより解析した。その結果、骨髄の造血幹細胞では細胞周期にはいつている細胞が増加しており、脾臓に幹細胞分画が多く分布していることが観察された。すなわち、慢性炎症による刺激の持続により、造血幹細胞の活性化と末梢への動員がおこ

図 2



K14-AhR CAマウスでは、骨髄幹細胞分画でG0期にある細胞の割合が減少している

っていることが確認された。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Okada K, Warabi E, Sugimoto H, Horie M, Tokushige K, Ueda T, Harada N, Taguchi K, Hashimoto E, Itoh K, Ishii T, Utsunomiya H, Yamamoto M, Shoda J. Nrf2 inhibits hepatic iron accumulation and counteracts oxidative stress-induced liver injury in nutritional steatohepatitis. *J. Gastroenterol.* 2012 Feb 28. [Epub ahead of print] DOI: 10.1007/s00535-012-0552-9
2. Inoue D, Suzuki T, Mitsuishi Y, Miki Y, Suzuki S, Sugawara S, Watanabe M, Sakurada A, Endo C, Uruno A, Sasano H, Nakagawa T, Satoh K, Tanaka N, Kubo H, Motohashi H, Yamamoto M. Accumulation of p62/SQSTM1 is associated with poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Sci.* 2012 Feb 9. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02216.x. [Epub ahead of print] DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02216.x
3. Yamazaki H, Katsuoka F, Motohashi H, Engel JD, Yamamoto M. Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking all three small Maf proteins. *Mol Cell Biol.* 2012 Feb;32(4):808-16. Epub 2011 Dec 12. DOI: 10.1128/MCB.06543-11