

生活習慣病の発症基盤である免疫炎症反応の解析： メタボリック症候群における免疫プロテアソームの役割

自治医科大学 分子病態治療研究センター
バイオイメージング研究部
木村 博昭

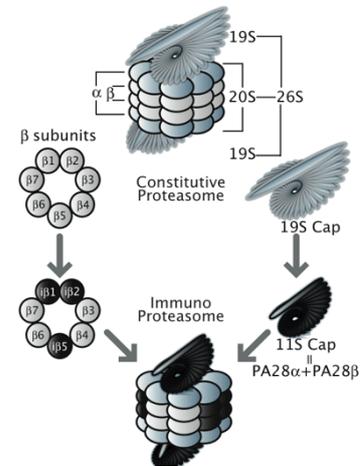
1. はじめに

緒言

免疫炎症反応は、感染症や自己免疫、アレルギー疾患だけでなく、糖尿病や肥満等を含むメタボリック症候群のような生活習慣病、脳神経系疾患など、多岐の病態に関与しており、免疫炎症反応に関わる分子の重要性が提唱されている。しかし、その全体像はまだ明らかではなく、どのような免疫分子が病態に関与しているのかを詳細に明らかにしていく必要がある。

背景・目的

申請者は、昨年まで所属していたジョーンズホプキンス大学において、自己免疫疾患の研究に携わっていた。主に自己免疫性甲状腺炎である橋本病の病態発現機構についてマウスモデルを利用して研究を行っていた。橋本病は自己免疫性の病態以外に、慢性甲状腺炎ともよばれ、慢性炎症の病態を示す。マウスの自己免疫性甲状腺炎のモデルでは橋本病に見られる甲状腺機能低下が見られないが、炎症性サイトカインのIFN γ を甲状腺特異的に発現するマウスでは、甲状腺組織に慢性的な炎症反応が起こり、甲状腺機能低下が見られた。申請者は、遺伝子発現のプロファイル等を行い、炎症性サイトカインで誘導される免疫プロテアソームが内分泌器官である甲状腺の機能低下に関与していることを明らかにしている (PLoS One 4(11): e7857, 2009)。本研究計画で標的とするタンパク分解酵素複合体の免疫プロテアソーム(特にLMP7サブユニット)は、MHC class I によって抗原提示される抗原のプロセッシングに重要であり (Science. 26:265(5176):1234, 1994)、炎症に大きく関わっていることから、近年、大きな注目を集めている。プロテアソームは蛋白質の分解を行う巨大な酵素複合体で、プロテアーゼ活性を持つ筒状の20Sプロテアソームの両側に19S Capが結合し、26Sプロテアソームが形成される(右図)。免疫プロテアソームは、細胞周期関連の蛋白質からストレス蛋白質まで、多種多様なユビキチン標識蛋白質を分解する。この26Sプロテアソームの19S Capやタンパク分解酵素活性がある β サブユニットが、IFN γ やTNF α などの炎症性サイトカインの刺激によって発現誘導されるサブユニットに置換されたものが免疫プロテアソームである。タンパク分解酵素活性のあるLMP2, 7, 10により、効率的にタンパク分解が進むと考えられている



申請者が現在所属している自治医科大学・分子病態治療研究センター・バイオイメージング研究部では、高橋将文教授を筆頭に、自然免疫や初期炎症反応で重要な因子であるインフラマソームを中心に活発な研究を行っている。インフラマソームは複数のタンパク質からなるタンパク複合体で、細胞内異物(尿酸結晶等)を danger signal として、Nod-like receptors に分類される NLRP3 等で認識し、apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) を介して、非活性型の pro-caspase-1 を活性型の caspase-1 (Casp1) にする。活性化された Casp1 は IL-1 β 前駆体を切断して活性化型に変え、炎症反応が活性化される。当研究室では、所持している ASC や Casp1 欠損マウスを利用して、様々な病態モデルを作製している。特に生活習慣病に的を絞って、動脈硬化や肥満、脂肪肝などのマウスモデルを利用して、その発病機構や慢性病態の解析を行い、興味深い知見を得ている。私は、すでに存在しているこれらのモデルを利用して、免疫プロテアソームの発現を検討し、免疫プロテアソームが関与している可能性のある病態モデルを見いだすことが、当研究を発展させる近道と考えた。

当研究の最終目的は、炎症の関わる生活習慣病の病態発現に免疫プロテアソームが関与するか検討

し、阻害剤等を利用した予防・治療法を開発することとした。
 本研究で基礎となる病態における炎症反応の概念

- 初期：インフラマソームの関与
- 慢性期：免疫プロテアソームの関与

2. 方法

動物モデル

ApoE KO マウスに西洋型（コレステロール含有）食餌負荷（12 週間）を行った動脈硬化モデル
 正常なレプチンを発現できない ob/ob 肥満マウス（4-5 週齢）の脂肪肝モデル

Oil Red O 染色

動脈硬化巣や脂肪肝の病変部位に蓄積した脂肪を染色し、可視化した。

Real Time PCR

病変部位の組織から mRNA を抽出し、免疫プロテアソームやその他の遺伝子発現を解析した。
 β -actin の発現量で補正定量した。

免疫染色

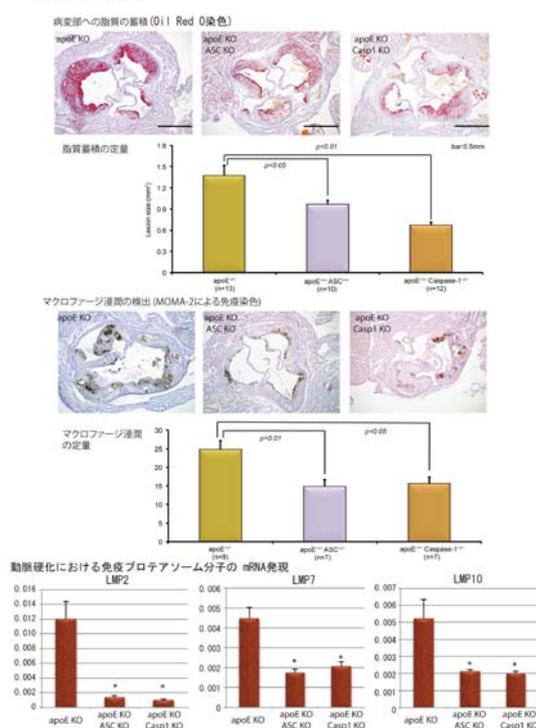
免疫プロテアソームのタンパクレベルでの発現を解析した。

3. 研究成果

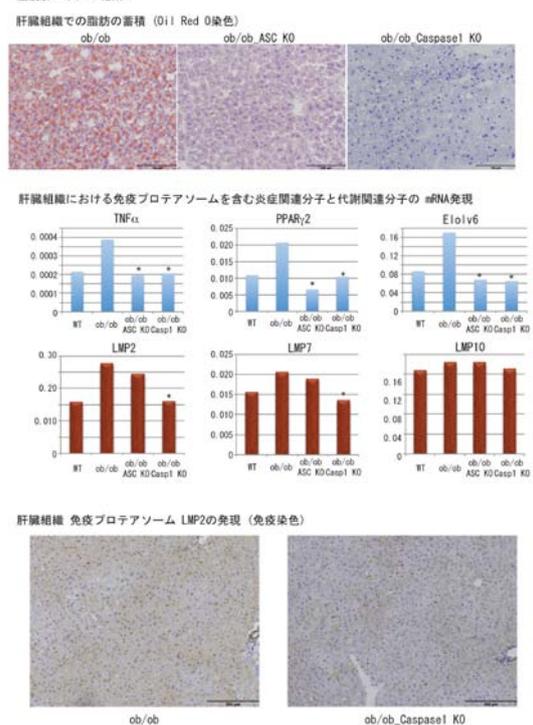
動脈硬化モデル

動脈硬化は、先進国で問題となっている生活習慣病の一つで、動脈が肥厚・硬化し、進行するとさらに生命の危険へとつながる。我々は、12 週間西洋型食餌負荷を行った ApoE (apolipoprotein E) KO マウス（動脈硬化モデル）を利用して、病態の発現機構と免疫プロテアソームの発現を検討した。初期炎症に重要なインフラマソームの KO マウスでは、大動脈起始部の脂質の蓄積（Oil Red O 染色）が抑制され、慢性炎症病態への進行が改善されていた。病変部へのマクロファージ浸潤（マクロファージ特異的抗体 MOMA-2 抗体による免疫染色）も抑制されていた。これらのことから、動脈硬化発現に、インフラマソームが関与していることがわかった。この慢性炎症時の病変部位における免疫プロテアソーム各分子の mRNA レベルでの発現を検討したところ、病態が改善されているマウス群では、免疫プロテアソームの発現が著明に減少していた。動脈硬化モデルは慢性炎症状態で、病態を解析しており、今後、免疫プロテアソーム KO マウスや阻害剤での実験でその役割を明らかにしていく。

動脈硬化モデルの結果



脂肪肝モデルの結果



脂肪肝モデル

脂肪肝は主に、アルコール性・非アルコール性に大別され、最近、非アルコール性脂肪肝 (NAFLD: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease) が、生活習慣病として注目されている。脂肪肝は非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH: Non-Alcoholic Steato Hepatitis)、肝硬変や肝癌へと進行することが知られ、効果的な予防・治療法の開発が期待されている。我々は、正常なレプチンを発現できない ob/ob 肥満マウスを利用して、肝臓組織における免疫プロテアソームの発現を検討した。通常の ob/ob マウスでは 4-5 週齢ですでに脂肪肝になっており、初期炎症に重要なインフラマソーム欠損により、脂肪肝形成 (Oil Red O 染色) が抑制された。肝臓での遺伝子発現を検討したところ、炎症性サイトカインの TNF α や脂肪肝マーカーの PPAR γ 2、脂肪合成の代謝系で重要な Elo1v6 等が、脂肪肝になっている ob/ob の肝臓で発現が亢進し、脂肪肝形成が抑制されているインフラマソーム KO マウスでは、それが抑制されていた。ここで、それらの肝臓における免疫プロテアソームサブユニットの LMP2 のタンパク質レベルでの発現を免疫染色で検討したところ、Casp1 欠損で LMP2 の発現は減少しており、脂肪蓄積と関連していた。今後、このモデルでも、免疫プロテアソーム欠損や阻害剤の効果を検討していく。

4. 考察・まとめ

本研究結果より、生活習慣病の動脈硬化や脂肪肝の病態形成においてインフラマソームが関与することが明らかとなった。さらに、病変部位において免疫プロテアソームの発現が亢進していることが明らかとなった。これらの結果は、さらに免疫プロテアソームの各サブユニットの欠損マウスを利用して、その関与を確かめる必要があるが、その発現が炎症反応において重要な役割を果たすマクロファージで亢進していることから、さらなる解析を進めることによって、新規の予防・治療法の開発へつながる可能性があると考えられた。

5. 発表論文

発表論文

なし