

50. アダプター蛋白に着目した炎症性腸疾患発症機序の解明

岡山大学学術研究院医歯薬学域腎・免疫・内分泌代謝内科学 研究准教授 松本 佳則

概要

“3BP2”はチロシンキナーゼを活性化するアダプター蛋白で、2001年に3BP2のミスセンス変異が、顔面骨の炎症性骨破壊を特徴とする遺伝性骨疾患“ケルビズム”の原因であると報告された。本研究では、3BP2がpoly(ADP-ribose) polymerase (PARP)メンバーである“Tankyrase”に結合してADPリボシル化された部位に、E3-ubiquitin ligaseのRNF146が結合し、3BP2をユビキチン化、分解する経路に着目し、炎症性腸疾患の病態を呈するTankyraseノックアウト(KO)マウスの解析から、タンパクAが炎症性腸疾患の新規治療標的となるエビデンス構築を目指した。その結果、タンパクA KOマウスでは炎症性腸疾患が改善することを見出し、組織学的にも炎症が軽減することを示した。本研究の最終目標は、治療困難な炎症性腸疾患に苦しむ患者様の病態改善を可能にする新規薬剤の開発である。本研究成果により、“タンパクAの細胞内特異的阻害薬の開発”を通して、炎症性腸疾患を我々の世代で克服するために必要なエビデンスを構築することが出来た。本研究をご支援頂いた三菱財団の皆様方に感謝申し上げます。

背景および目的

炎症性腸疾患、関節リウマチをはじめとする自己免疫性炎症性疾患は、腸内常在菌や自己または外来抗原に対する異常な免疫応答により活性化された炎症細胞から、サイトカインやケモカインが異常産生されることで生じる。近年、サイトカイン阻害薬が炎症性疾患の主な治療法の1つとなっているが、その効果は十分でなく、サイトカイン異常産生の機序も明らかになっていない。これらの機序を解明することは、治療ターゲットとなる新たな因子の発見に繋がり、疾病と遺伝的・環境的素因の関係を明らかにする上でも重要である。

“3BP2”はチロシンキナーゼを活性化するアダプター蛋白で、2001年に3BP2のミスセンス変異が、顔面骨の炎症性骨破壊を特徴とする遺伝性骨疾患“ケルビズム”の原因であると報告された。Tankyraseはpoly(ADP-ribose) polymerase (PARP) familyのメンバーで、基質蛋白と結合しこれをADPリボシル化することで、基質蛋白の活性や分解を制御している。トロント大学、Prof. Robert Rottapel研究室はこれまで、Tankyraseが3BP2に結合、ADPリボシル化する事を発見し、これが標識となってE3リガーゼのRNF146にユビキチン化された3BP2が、プロテアソームで分解されるメカニズムを解明した(1)。更に我々は、Tankyrase KOのバックグラウンドでTankyrase2を単球・マクロファージ分画のみでKOするコンディショナル KOマウスの作製に成功し、消化管の組織学的検討では、胃から直腸まで広範囲に炎症細胞の浸潤を認め、炎症性腸疾患を想起させるびらん性・潰瘍性病変が見られた(2)。またTankyrase下流でTLRシグナルを活性化し、炎症を惹起する因子を同定した。Tankyrase KO細胞でTankyraseの基質蛋白である3BP2の著明な増加を認めたため、Tankyrase-RNF146により分解制御される3BP2に着目し、Tankyraseと3BP2のダブルKO *Tnks^{-/-}Tnks2fl/flSh3bp2fl/fl LysM-Cre* (DKO)マウスを作製したところ、DKOマウスではKOマウスにて認めた消化管の炎症が完全に消失した。

本研究では劇的に展開したこれまでの我々の研究成果を基に、タンパクAが炎症性腸疾患の病態形成に関与する分子生物学的機序を解明する。更に炎症性腸疾患の新規治療ターゲットとしてのタンパクAの意義を評価する。

方法

本研究では遺伝子改変マウスであるタンパク A KO マウスとタンパク A の制御に関わるタンパク B KO マウスを作製し、DSS 腸炎モデルで炎症性腸疾患の臨床的評価を行った。

結果および考察

1. 生体内のタンパク A 増加、タンパク C チロシンリン酸化が自然免疫を破綻させる機序の解明

1-1) チロシンリン酸化によるタンパク C 活性化機構の解明

代表研究者はタンパク C とタンパク A は結合していることを見出した。タンパク C は膜貫通蛋白で、細胞外領域、膜貫通領域及びシグナル伝達に関わる細胞内領域からなる。そこでシグナル伝達に関わると予測される 8 つの細胞内チロシン全てをフェニルアラニンに置換したタンパク C (8YF) プラスミドを作製した。これを HEK293T 細胞に強制発現させて NF- κ B luc 活性を検討したところ、タンパク C (8YF) は NF- κ B 活性が完全に失われた。更にタンパク C (8YF) は野生型に比して蛋白発現量が低下することを見出した。以上の結果からタンパク C チロシンリン酸化がシグナル伝達に必須であることを見出した。現在タンパク C(8YF)と野生型をマスペクトメトリーで解析し、蛋白結合の差異からタンパク C シグナルに必須のタンパク A 下流タンパクの同定や、タンパク C (8YF) のフェニルアラニン 1 つをチロシンに add back し、シグナル必須のチロシンを同定して、同チロシンのリン酸化によるタンパク C の半減期や下流因子との結合能の解析を進めている。

1-2) タンパク C シグナル必須モチーフの同定及び機能解析

代表研究者はあるアミノ酸配列のモチーフがタンパク C でヒトも含む全ての種で保存されていることを見出した。このペプチドがシグナルを制御する最小単位の共通モチーフであると考えられる。それを明らかにするため、同領域の変異プラスミドを作製し、タンパク C の活性やチロシンリン酸化の有無を in vitro で検討している。

2. タンパク A は炎症性腸疾患の治療ターゲットになり得るのか？

1) タンパク A KO/増加マウスにおける DSS 誘導性腸炎マウスの解析

DSS 誘導性炎症性腸疾患モデルマウスを用いて、炎症性腸疾患の病態形成及び活動性亢進におけるタンパク A の機能を明らかにした。タンパク A KO マウスを作製し、DSS を経口摂取させて腸炎を発症させたところ、興味深いことにタンパク A KO マウスでは野生型に比して腸炎が組織学的にも軽減し、体重減少率が低下した。一方タンパク A が骨髄系細胞で増加するモデルであるタンパク B KO マウスを作製し、DSS を経口摂取させて腸炎を発症させたところ、タンパク B KO マウスでは腸炎が激しく発生し、野生型と比して著しい体重減少が見られた。以上の結果から、タンパク A は炎症性腸疾患の発症及び病態の悪化に関与し、炎症性腸疾患の治療標的となることが明らかとなった。

本研究の先に見据える目標は、難治性炎症性腸疾患に対する“タンパク A ブロック”という画期的新規治療法の開発である。タンパク A 阻害薬の開発が進んでおり、本研究成果から、炎症性腸疾患に対するタンパク A 阻害薬の非臨床試験に発展させていく予定である。

本研究をご支援頂いた三菱財団の皆様方に改めて感謝申し上げます。

(完)

引用文献

- 1) Levaot N, Voytyuk O, Dimitriou I, Sircoulomb F, Chandrakumar A, Deckert M, Krzyzanowski PM, Scotter A, Gu S, Janmohamed S, Cong F, Simoncic PD, Ueki Y, La Rose J, Rottapel R. Cell. 147(6):1324-1339, 2011
- 2) Matsumoto Y, Dimitriou ID, La Rose J, Lim M, Camilleri S, Law N, Adissu HA, Tong J, Moran MF, Chruscinski A, He F, Asano Y, Katsuyama T, Sada KE, Wada J, Rottapel R. J Clin Invest. 132(7):e140869, 2022