

公益財団法人 中山人間科学振興財団

2021(令和3)年度「感染症と人間」中山賞奨励賞

「敗血症性ショックの病態解明と新規治療法開発」

松本 佳則

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

1. はじめに

敗血症性ショック(エンドトキシンショック)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が異常産生されることで生じるが、その発症機序は不明である。抗生物質の他は保存的加療が中心で、未だ有効な治療法も確立されていない。TLR (Toll-like receptor: Toll 様受容体)は自然免疫制御、サイトカイン産生に不可欠の受容体で、様々な抗原による TLR シグナルの異常活性化は敗血症性ショックなど難治性炎症疾患の病因となることが知られているが、TLR の制御機構や TLR が病態形成に関与する分子生物学的機序は不明である。

2. 3BP2 研究の歴史

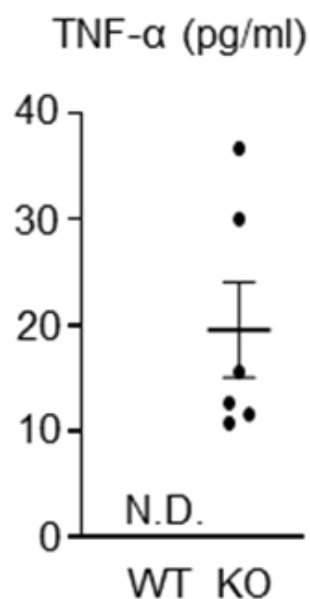
“SH3BP2(3BP2)”は pleckstrin homology (PH) ドメインの他、Src homology 3 (SH3)ドメイン含有タンパクに結合するプロリンリッチ領域や、リン酸化チロシンに結合する SH2 ドメインを有し、受容体と細胞内シグナルを仲介するチロシンキナーゼのアダプタータンパクである。2001 年に 3BP2 のミスセンス変異が、顔面骨の炎症性骨破壊、歯牙の脱落を特徴とする希少遺伝性骨疾患“チェルビズム”の原因であることが報告された⁽¹⁾。その後、トロント大学の Prof. Rottapel 研究室は 3BP2 が poly(ADP-ribose) polymerase (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、分解する経路を発見した^(2,3)。更にチェルビズム変異 3BP2 は Tankyrase に結合出来ず、その結果生じた 3BP2 の代謝障害で蓄積した 3BP2 が破骨細胞を異常活性化し、骨破壊をきたすチェルビズムの発症機序を解明した^(2,3)。

そこで我々は、正常な 3BP2 代謝が恒常性維持に重要と考え、3BP2 代謝に関わる因子の生体内機能を明らかにしてきた。まず 3BP2 の別の基質蛋白である ABL に着目し、3BP2 により活性化した ABL が骨芽細胞の必須転写因子である RUNX2 の転写活性を高めることで、骨芽細胞の分化を促進する機序を報告した⁽⁴⁾。更に RNF146 をマクロファージでノックアウトしたマウスを作製し、同マウスが破骨細胞の異常活性化による骨粗鬆症を呈することを明らかにした他⁽⁵⁾、RNF146 の骨芽細胞でのノックアウトマウスも作製し、これらの新生児は致命的な頭蓋骨欠損や肺胞形成障害を呈することも報告した⁽⁶⁾。

3. 3BP2 と炎症

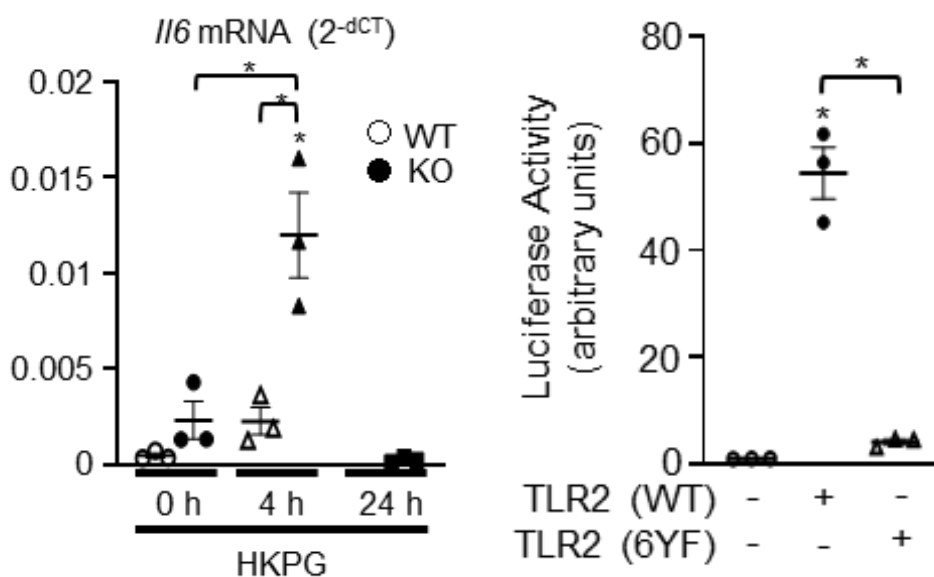
これらの結果を基に我々は、3BP2 を制御する Tankyrase の生体内機能を明らかにしたいと考え、Tankyrase ノックアウト(KO)マウスを作製した。その結果、Tankyrase KO マウスは、TNF- α をは

はじめとする炎症性サイトカインの産生亢進によるサイトカインストームを起し、炎症細胞の多臓器浸潤から敗血症と同様の病態を呈した⁽⁷⁾(右図:野生型(WT)とKOマウスの血清中 TNF- α 濃度)。



4. 3BP2 はチロシンリン酸化を介して TLR を活性化する

それでは 3BP2 はどのように炎症を惹起するのか? その疑問を明らかにするために、サイトカイン産生に極めて重要なマクロファージの TLR シグナル経路に着目して検討を進めた。Tankyrase KO マウスの骨髄より分離したマクロファージを、TLR2 のリガンドであるバクテリア由来の抗原 (Heat Killed *Porphyromonas gingivalis*; HKPG) で刺激して、サイトカインの mRNA 発現量を検討したところ、KO マクロファージはこれらのリガンド刺激により WT と比べて有意にサイトカイン産生が亢進し、3BP2 は TLR の感受性を高めることが示唆された⁽⁷⁾(左下図:マウスマクロファージを HKPG で刺激し、0-24 時間で回収した細胞の *I/6* mRNA 発現量の解析)。

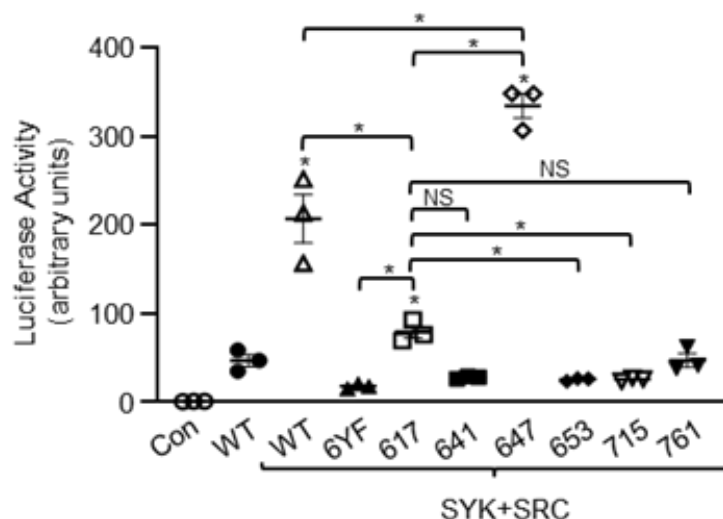


5. 3BP2 による TLR 活性化の機序

TLR2 は膜貫通蛋白で、病原体を認識する細胞外領域、膜貫通領域及びシグナル伝達に関わる細胞内領域から成る。そこで我々はシグナル伝達に関わると予測される 6 つの細胞内チロシン (Y616-Y761) に着目し、6 チロシン全てをフェニルアラニンに置換した TLR2 (6Y \rightarrow F) プラスミドを作製した。これを 293T 細胞に発現させて、NF- κ B 活性を検討したところ、TLR2 (6Y \rightarrow F) は完全に NF- κ B 活性が失われた⁽⁷⁾(右上図:TLR2 強制発現時の NF- κ B 活性)。一方、SRC/Syk が TLR2 のチロシンリン酸化を促進させることを突き止め、TLR2 のチロシンリン酸化により NF- κ B 活性が著明に亢進することを明らかにした⁽⁷⁾。以上の結果から、3BP2 により活性化される SRC/Syk による TLR2 チロシンリン酸化が、TLR2 活性を高め、サイトカイン産生を促進させると考えられた。

6. Y647 が TLR2 のシグナル伝達に重要である

上記 5 より TLR2(6Y→F)は不活性型となることが示された。それでは6つのYのうちどれがシグナル伝達に重要なのか？TLR2(6Y→F)プラスミドのフェニルアラニン1つをチロシンに Add backして6つのプラスミド(F616Y、F641Y、F647Y、F653Y、F715Y、F761Y)を作製し、NF-κB 活性の検討を行ったところ、TLR2(F647Y)がシグナル活性をレスキューさせることを見出した⁽⁷⁾(右図)。



6. さいごに

本研究では、Tankyrase、3BP2 により制御される TLR チロシンリン酸化という新しい概念から自然免疫、サイトカイン産生、炎症に関わる TLRシグナル経路の新たな制御機構を明らかにした。本研究の最終目標は、敗血症の病態改善を可能にする新規薬剤の開発である。3BP2 制御機構の異常が TLRシグナル経路の異常活性化から全身炎症を起こすことを明らかにした我々は、本研究を更に深化させ、敗血症に応用可能な薬剤の開発に取り組んでいる。

本研究のご支援を頂きました中山人間科学振興財団の皆様方に感謝申し上げます。

7. 引用文献

- (1) Ueki Y, Tiziani V, Santanna C, Fukai N, Maulik C, Garfinkle J, Ninomiya C, doAmaral C, Peters H, Habal M, Rhee-Morris L, Doss JB, Kreiborg S, Olsen BR, Reichenberger E. Mutations in the gene encoding c-Abl-binding protein SH3BP2 cause cherubism. *Nature Genetics*. 28(2):125-126, 2001
- (2) 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. Loss of Tankyrase-mediated destruction of 3BP2 is the underlying pathogenic mechanism of cherubism. *Cell*. 147(6):1324-1339, 2011
- (3) Guettler S, LaRose J, Petsalaki E, Gish G, Scotter A, Pawson T, Rottapel R, Sicheri F. Structural basis and sequence rules for substrate recognition by Tankyrase explain the basis for cherubism disease. *Cell*. 147(6):1340-1354, 2011
- (4) Matsumoto Y, La Rose J, Kent OA, Wagner MJ, Narimatsu M, Levy AD, Omar MH, Tong J, Krieger JR, Riggs E, Storozhuk Y, Pasquale J, Ventura M, Yeganeh B, Post M, Moran MF, Grynopas MD, Wrana JL, Superti-Furga G, Koleske AJ, Pendergast AM, Rottapel R. Reciprocal stabilization of ABL and TAZ regulates osteoblastogenesis through transcription factor RUNX2. *The Journal of Clinical Investigation*. 126(12):4482-4496, 2016
- (5) Matsumoto Y, Larose J, Kent OA, Lim M, Changoor A, Zhang L, Storozhuk Y, Mao X, Grynopas MD, Cong F, Rottapel R. RANKL coordinates multiple osteoclastogenic pathways by regulating expression of ubiquitin ligase RNF146. *The Journal of Clinical Investigation*.

127(4):1303–1315, 2017

(6) Matsumoto Y, La Rose J, Lim M, Adissu HA, Law N, Mao X, Cong F, Mera P, Karsenty G, Goltzman D, Changoor A, Zhang L, Stajkowski M, Grynepas MD, Bergmann C, Rottapel R. Ubiquitin Ligase RNF146 Coordinates Bone Dynamics and Energy Metabolism. *The Journal of Clinical Investigation*. 127(7):2612–2625, 2017

(7) 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. Tankyrase represses autoinflammation through the attenuation of TLR2 signaling. *The Journal of Clinical Investigation*. 132(7):e140869, 2022