

エキソン接合部複合体の機能不全を基軸とした生活習慣病発症機構の解明

宮崎拓郎

昭和大学医学部 生化学講座

【研究の背景】

糖尿病、脂質異常症、肥満に代表される生活習慣病は動脈硬化症を増悪化させ、心筋梗塞や脳卒中等の致命的な病態をもたらす。生活習慣病の個々の病態は互いのリスクを増大させることから、病態間の相互作用を含めた包括的な理解が求められる。申請者は、生活習慣病を制御する極めてユニークな機構として、細胞内プロテアーゼ「カルパイン」ファミリーを検証してきた。カルパインファミリーは哺乳類で 15 のホモログを有するストレス応答性のタンパク質プロセッシング機構であるが、申請者は従来型アイソザイムの「カルパイン-2」が動脈硬化症の発症に寄与すること⁸⁾、ならびに非プロテアーゼ型サブタイプである「カルパイン-6」が CWC22-mRNA スプライシング機構に干渉し、マクロファージを動脈硬化性の形質に導くことを解明した⁵⁾。

【目 的】

本研究では、カルパイン-6 によるマクロファージ形質転換が生活習慣病全般に波及するとの作業仮説を立て、遺伝子改変マウスを駆使して肥満・糖尿病における上記機構の挙動に焦点を当てる。

【方 法】

野生型およびカルパイン-6 欠損マウスに高脂肪食(HFD32、粗脂肪含量約 32%)を 12 週間負荷し、食餌誘発性肥満症モデルを作製した。同モデルにて肥満症関連の表現型解析を行った。

【結 果】

高脂肪食誘発性の体重増加は、カルパイン-6 の欠損に伴い抑制された。欠損マウスにおいては皮下脂肪組織と比較して内臓脂肪組織(生殖腺脂肪組織)において顕著な脂肪容量の減容が認められた。一方、糖負荷試験ならびにインスリン耐性試験では、カルパイン-6 欠損による影響は認められなかった。全身の代謝関連組織におけるカルパイン-6 発現を検討したところ、同分子は肥満症マウスの骨格筋および生殖腺脂肪間質血管細胞群(SVF)に高発現することが明らかとなった。免疫組織化学的検討を行ったところ、カルパイン-6 は生殖腺脂肪組織においては F4/80 陽性マクロファージに局在することが明らかとなった。また、カルパイン-6 欠損マウスの脂肪間質マクロファージの多くで CWC22 の核局在が検出されたが、これは野生型では認められなかった。生殖腺脂肪 SVF より total RNA を抽出し、次世代シーケンスによりターゲット遺伝子の絞り込みを行ったところ、複数の mRNA スプライシング関連遺伝子およびマクロファージ形質関連遺伝子において、イントロン残存、エキソンスkip および選択的スプライシングに特徴付けられるスプライシング異常が検出された。そこで、ゲノム編集技術を用いて CWC22 欠損マウスの作出を試みたところ、ヘテロ欠損マウス(CWC22+/-)の作出には成功したが、ホモ接合体は少なくとも E9.5 以前の胎生致死の表現型を呈した。CWC22+/-マウスにおいてアドレナリン β 3 受容体アゴニスト誘発性脂肪融解実験を行ったところ、野生型マウスと比較して脂肪融解の低下が認められた。

【考 察】

カルパイン-6 は、肥満症においてもマクロファージ mRNA スプライシングに干渉し、病態を悪化させる可能性が高い。次世代シーケンスにより検出されたターゲット遺伝子の多くは骨髄系細胞に局在する分子であることを確認しており、カルパイン-6 は脂肪組織微小環境において骨髄細胞系列の mRNA スプライシングに広範囲に干渉する可能性も示唆される。今後はカルパイン-6 欠損マウスおよび CWC22^{+/+}-カルパイン-6^{-/-}マウスにおいて肥満症の表現型解析を続けると共に、マクロファージにおけるターゲット遺伝子の機能についても精査したい。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

選択的スプライシングに代表される mRNA の転写後制御はゲノムワイドに解析されており、肥満症および糖尿病についてもすでに複数の責任遺伝子座が同定されている。このような遺伝子制御異常は新たな創薬・治療シーズと位置付けられるが、実用化にはこれら遺伝子制御の組織特異性や上流の制御機構を解明する必要がある。CWC22 ならびに eIF4AIII (RNA ヘリカーゼ)、MLN51、Y14 および Magoh により構成されるエキソン接合部複合体が mRNA スプライシングに大きく影響することが近年初めて示されたが⁷⁾、病態生理学上の意義は全く分かっていなかった。本研究を通して、上記機構の病態生理学的意義が初めて明らかとなった。

【参考・引用文献】

1. Miyazaki T, Miyazaki A. Impact of dysfunctional protein catabolism on macrophage cholesterol handling. *Curr Med Chem*, in press. (invited review article)
2. Miyazaki T, Miyazaki A. Dysregulation of calpain proteolytic systems underlies degenerative vascular disorders. *J Atheroscler Thromb*, in press. (invited review article)
3. Miyazaki T, Miyazaki A. Defective protein catabolism in atherosclerotic vascular inflammation. *Front Cardiovasc Med*.4: 79, 2017. (invited review article)
4. Miyazaki T, Miyazaki A. Emerging roles of calpain proteolytic systems in macrophage cholesterol handling. *Cell Mol Life Sci*. 74: 3011-3021, 2017. (invited review article)
5. Miyazaki T et al. Calpain-6 confers atherogenicity to macrophages by dysregulating pre-mRNA splicing. *J Clin Invest*.126:3417-3432, 2016.
6. Miyazaki T et al. Calpastatin counteracts pathological angiogenesis by inhibiting suppressor of cytokine signaling 3 degradation in vascular endothelial cells. *Circ Res*. 116:1170-1181, 2015.
7. Steckelberg AL et al. CWC22 connects pre-mRNA splicing and exon junction complex assembly. *Cell Rep*. 2: 454-461, 2012.
8. Miyazaki T et al. m-Calpain induction in vascular endothelial cells on human and mouse atheromas and its roles in VE-cadherin disorganization and atherosclerosis. *Circulation*. 124:2522-2532, 2011.