



Title	SOCS-1 Participates in Negative Regulation of LPS Responses
Author(s)	中川, れい子
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43956">https://hdl.handle.net/11094/43956</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	なか がわ れい子
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 17426 号
学位授与年月日	平成15年1月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	SOCS-1 Participates in Negative Regulation of LPS Responses (SOCS-1によるLPSシグナル伝達経路の制御機構の解析)
論文審査委員	(主査) 教授 山西 弘一 (副査) 教授 川瀬 一郎 教授 長田 重一

#### 論文内容の要旨

##### [目的]

グラム陰性菌外膜の成分である LPS は、エンドトキシンとも呼ばれ、強力な炎症誘導作用を持つ。LPS は、微生物特有の成分を認識する宿主細胞表面上の受容体 Toll-like receptors (TLRs) のうち、TLR4 によって認識される。TLR4 が活性化されると、細胞内シグナル伝達分子である MyD88、IRAK、TRAF6 を介して MAPK family や NF- $\kappa$ B などの転写因子が活性化され、その結果、炎症性サイトカインの発現が誘導される。このような宿主の自然免疫による応答は、初期の感染防御に重要な役割を果たす一方で、エンドトキシンショックとして知られる重篤な病態を引き起こす一因でもある。宿主には過剰な自然免疫応答による障害に対する防御システムが存在するが、その詳細なメカニズムは未だ不明な点が多い。

SOCS-1 (Suppressor of cytokine signaling、別名 SSI-1/STAT induced STAT inhibitor-1、JAB/Jak binding protein) は、サイトカインによって発現が誘導されるシグナル抑制因子として発見された。分子中央には SH2 ドメイン、C 末端領域には SOCS box と呼ばれる配列が存在する。SOCS-1 は、サイトカインの刺激によって発現が誘導されると、Jak と結合することで Jak の活性を質的的に制御する。SOCS-1 は、IFN $\gamma$ をはじめ多くのサイトカインによって誘導され、フィードバック抑制やクロストーク阻害といった複雑な細胞内シグナル伝達の制御に重要な役割を果たしている。

今回、我々は、SOCS-1 が LPS シグナル伝達経路の制御に重要な役割を果たすことを明らかにし、その分子メカニズムを解明する目的で以下の解析を行った。

##### [方法ならびに成績]

SOCS-1KO マウスは生後直後は異常は認められないが、加齢に伴って種々の病変を発症し、生後3週以内にはすべて死亡する。そこで、SOCS-1KO に起因する種々の病態変化が発症しない生後3日目のマウスに対して、LPS を腹腔内投与を行った。その結果、WT では全く変化が見られない投与量で、KO マウスは投与後6時間以内に全て死亡した。LPS 投与2時間後における炎症性サイトカイン TNF $\alpha$ の血中濃度も、KO マウスでは WT の6~7倍に上昇しており、SOCS-1KO マウスでは LPS 感受性が上昇していることが明らかとなった。生後3日目のマウスでは十分

な免疫システムが確立していないために、このような LPS 高感受性を示すことが考えられる。そこで、4 週齢の SOCS-1He マウスについて同様の解析を行った結果、He マウスにおいても LPS 感受性の亢進を認めた。したがって、SOCS-1 が LPS シグナル伝達の制御において何らかの関連がある可能性が示された。

SOCS-1 の過剰発現が LPS シグナル伝達経路にどのような影響を及ぼすのかを検討する目的で、マクロファージ系細胞株 RAW の LPS に応答した NO 産生を検討した。RAW を LPS で刺激すると、LPS シグナル伝達経路を介して NO 合成酵素 iNOS の発現が誘導され、培地中に NO が産生される。しかし、SOCS-1 を安定に強制発現させた細胞株ではこのような NO 産生の誘導は認められなかった。したがって、SOCS-1 は過剰発現系において、LPS のシグナル伝達経路に抑制的に作用することが示された。マウス脾臓由来のマクロファージにおいて LPS 刺激後の SOCS-1 の発現量の変化をノザン解析により検出したところ、LPS 刺激後に SOCS-1 の発現が強く誘導され、その発現は一過的ではなく 24 時間以上維持されていた。この SOCS-1 の発現誘導には、LPS 刺激で分泌された炎症性サイトカインによるものであることが予想される。そこで、LPS シグナル伝達経路を介して SOCS-1 の発現が誘導されるのかを検討するため、RAW にタンパク合成阻害剤シクロヘキシミドによりサイトカインの産生を抑制した条件化で LPS 刺激を加えると、刺激後 60 分以内に SOCS-1 の mRNA が RT-PCR で検出された。従って、SOCS-1 は LPS の刺激によって発現が誘導され、LPS のシグナル伝達経路のネガティブフィードバックファクターとして機能して機能して機能して可能性が示唆された。

これまでにサイトカインのシグナル制御において、SOCS-1 のターゲットが Jak/STAT 経路であることは多数報告されている。また、iNOS の発現誘導には STAT1 が重要であることから、LPS 下流において SOCS-1 が STAT1 の活性の制御に作用していることが予想された。そこで、RAW における LPS 刺激後の STAT1 の活性におよぼす SOCS-1 の影響を検討した結果、SOCS-1 発現 RAW では STAT1 の Ser-727、Tyr-701 両残基のリン酸化は抑制されていた。この LPS 刺激による STAT1 のリン酸化は、MyD88KO マウス由来のクッパー細胞においても WT と同等に認められた。従って、SOCS-1 は MyD88 非依存的経路を介した STAT1 のリン酸化経路を阻害すると考えられる。SOCS-1 KO マウスにおける LPS 感受性の亢進は、この STAT1 の活性制御機構が欠落することで、LPS のシグナルが過剰に流入するに生ずるのではないかと予想される。そこで、SOCS-1 と STAT1 のダブル KO マウスを作成し、このマウスの LPS 感受性を検討した。その結果、DKO マウスは SOCS-1 単独の KO マウスに比べ LPS 高感受性が回復し、やはり SOCS-1 が STAT1 の活性を制御することで LPS シグナル伝達に重要な役割を果たしていると考えられた。しかし、WT と同等にまでは回復しないことから、SOCS-1 KO による LPS 感受性の亢進には、STAT1 以外の要因も関与している可能性が示唆された。

LPS の下流において、iNOS や炎症性サイトカインの誘導には MyD88 依存的経路を介して活性化される NF- $\kappa$  B も重要である。そこで、LPS 刺激に対する NF- $\kappa$  B の活性化における SOCS-1 の影響を、RAW を用いたルシフェラーゼアッセイにより検討した。その結果、SOCS-1 の発現量に依存して NF- $\kappa$  B の活性化は阻害された。MyD88 依存的経路の制御にはその下流で働く IRAK の活性の制御が重要であるとの報告がある。そこで COS7 細胞における過剰発現系を用いて IRAK と SOCS-1 の相互作用を検討したところ、SOCS-1 は SH2 ドメインを介して IRAK と結合していることが明らかとなった。これまでに、SOCS-1 は SH2 ドメインを介して Jak と結合し、C 末の SOCS-box を介して導かれるビキチソープテアソーム系によって、Jak の分解に働くことが報告されている。IRAK と SOCS-1 の相互作用が、MyD88 依存的経路の制御にどのような役割を果たしているのかは未だ不明であるが、Jak/STAT 経路と同様に IRAK を分解することで、シグナル伝達を阻害するのではないかと予想し、現在解析中である。

マウスには、エンドトキシンショックから生体を防御するために、LPS トレランスと呼ばれる現象が存在する。これは致死量以下の LPS の刺激を受けた後では、次に致死量の刺激に対して耐性をしめすという現象である。今回我々が明らかにした SOCS-1 による抑制メカニズムが、LPS トレランスに何らかの関連があるのではないかと予想し、SOCS-1 KO および He マウスにおける LPS トレランスの現象を検討した。その結果、いずれのマウスにおいても LPS トレランスが消失していた。先に述べたとおり、LPS 刺激後誘導された SOCS-1 の発現は一過的ではなく長時間持続していることもあわせて考えると、SOCS-1 が LPS トレランスを担う分子の一つではないかと予想された。LPS トレランスの詳細な分子メカニズムは未だ不明な点が多く、今後の展開が期待される。

LPS の刺激後の細胞では、種々の炎症性サイトカインのシグナル伝達が阻害されるということが知られている。こ

れは、LPS 刺激により発現が誘導された SOCS-1 がサイトカインのシグナル伝達経路をブロックするためと考えられる。したがって、LPS 刺激後に発現が誘導された SOCS-1 は、LPS のシグナル伝達経路だけでなく、LPS によって誘導される炎症性サイトカインのシグナルをも二重に抑制することで、LPS に対する過剰な応答をから生体を防御しているのではないかと考えられる。

#### [総括]

今回、我々は、SOCS-1 が LPS シグナル伝達経路を介して発現が誘導され、その経路に抑制的に作用することを明らかにした。このメカニズムは、LPS 刺激後、SOCS-1 が LPS シグナル伝達経路に対して抑制的に働くだけでなく、LPS によって誘導された炎症性サイトカインのシグナルをもブロックすることで、LPS による過剰な応答から生体を防御するものと考えられる。SOCS-1 の MyD88 依存的ならびに非依存的経路に対する阻害作用のメカニズムは、未だ不明な点が多い。今後、詳細な分子メカニズムが解明されることで、エンドトキシンショックなど重篤な感染症に対する新たな治療法の開発への応用が期待される。

#### 論文審査の結果の要旨

SOCS-1 は、サイトカインの刺激によって発現が誘導され、JAK-STAT 経路を阻害する因子として発見された。本論文において、グラム陰性菌の外膜成分である LPS を認識する TLR4 のシグナル伝達経路を介して SOCS-1 の発現が誘導され、フィードバック阻害作用を担う因子として働くことが明らかにされた。さらに、SOCS-1 による LPS シグナル伝達の制御機構は、LPS トランスと呼ばれる LPS に対する耐性現象とも関連が深い可能性を示唆した。この SOCS-1 による LPS シグナリングの制御機構は、エンドトキシンショックとして知られるような LPS に対する過剰な応答による障害から、生体を防御するシステムとして重要であると考えられ、重症感染症の新たな治療法の標的としての可能性を示唆するものである。以上のことより、本論文は学位の授与に値するものと考える。