

SLEにおけるPARP1依存性プログラム細胞死の制御機構

岡山大学学術研究院保健学域検査技術科学分野・准教授

勝山 恵理



【目的】

全身性エリテマトーデス (Systemic Lupus Erythematosus: SLE) は難治性の自己免疫性疾患である。SLEではアポトーシスが増加しているという報告は多く、周知の事実である。実際SLEでは細胞死の亢進による核塵がリンパ節・腎糸球体に多く蓄積している (Nat Genet 1998) が、SLEの病態にどのように関与するかに関しては、マクロファージの貪食能が低下しているという間接的な機序の他にアポトーシス研究は進んでいない。近年、細胞死は新たに「制御された細胞死」とそれ以外 (ネクローシス) に分かれ、制御された細胞死の分類はNomenclature Committee on Cell Death (NCCD) により定期的に改訂されている。ここで我々はPoly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) に制御される新たな細胞死、「PARP1依存性細胞死 (パートナトス)」に着目した。我々がパートナトスに着目した理由は、パートナトスが細胞内のnicotinamide adenine dinucleotide (NAD) を枯渇するまで消費した結果、アポトーシスの500倍の大きさとも言われる大きなDNA断片を形成して細胞死を起こす形態をとる点である。

本研究では、「PARP1依存性プログラム細胞死」のSLE病態への関与を明らかにし、新たな治療標的とする。PARP1の過剰発現がNADを消費・枯渇させ、PARP1依存性プログラム細胞死を誘導することにより粗大なDNAフラグメントを形成し、自己免疫を刺激するという仮説を検証し、PARP1阻害薬のSLEの治療薬としての可能性を明らかにしたい。

【研究成果】

① SLE患者では健常者と比較し、PAR活性とパートナトスが増加している。

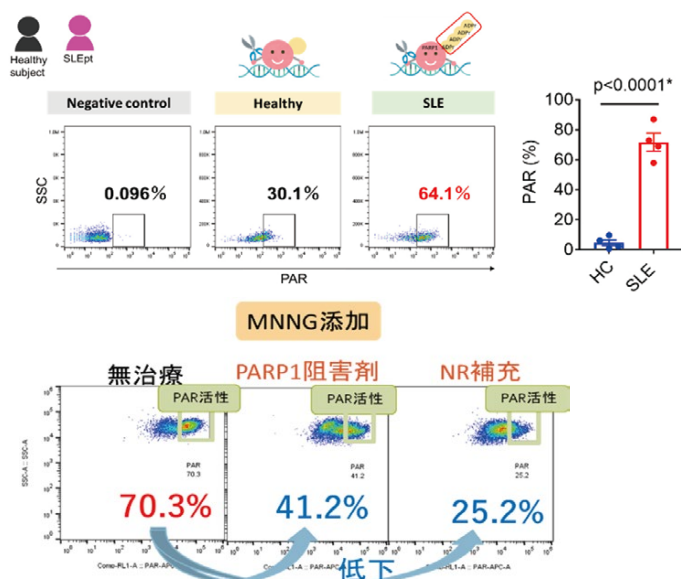


図 1

上) SLE 患者由来 CD4 陽性 T 細胞と健常者を比較した PAR 発現 (=PARP1 活性) のフローサイトメトリー解析。

下) 健常者由来 CD4 陽性 T 細胞に MNNG を添加した上で、PARP1 阻害薬あるいは Nicotinamide riboside (NR) を投与したフローサイトメトリー解析。

AnnexinV染色と死細胞染色 (Zombie) によって区分される4区画のうち、AnnexinV・Zombieのdouble positive区分がパートナトスを観察しているとして知られている。このパートナトス分画が有意にSLE患者で増加している点は計画書に示した。パートナトスはPARP1が活性化し、ポリADPリボシル化 (PAR) を引き起こす。PARP1活性はPAR発現にて確認できるが、このPAR発現はフローサイトメトリーにてSLE患者で著明に増加していた (図1上)。またパートナトス誘導剤であるメチルニトロニトロソグアニジン (MNNG) の刺激で増加したPAR活性はPARP1阻害剤と、興味深いことにNAD前駆体であるNicotinamide riboside (NR) で著明に抑制された (図1下)。本結果より、SLE患者ではPAR活性とともにパートナトスが增強しており、この細胞死はPARP1阻害薬に加えNADの補充でも抑制できる可能性が示唆された。

② パータナトスによる炎症惹起経路の検討

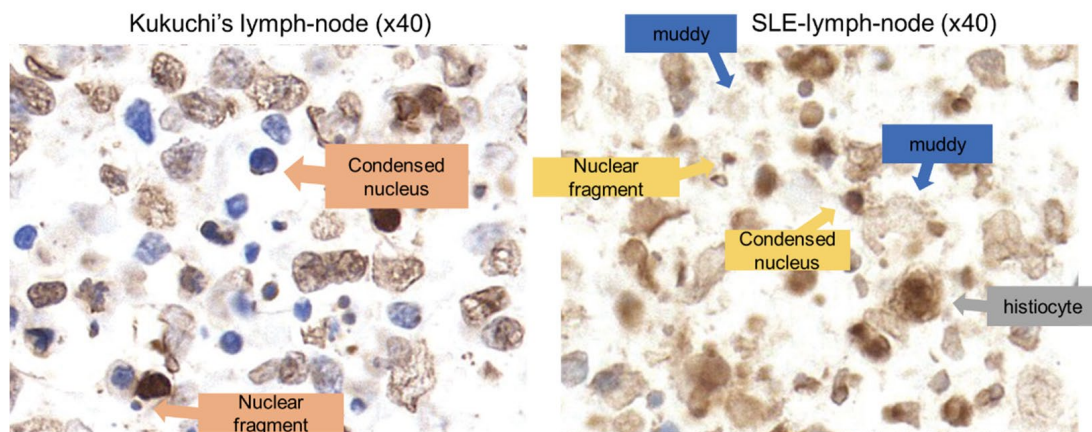
SLEにおいてPARP1が活性化し、パータナトスの亢進を確認した後は、パータナトスがどの経路においてSLEの自己免疫を活性化しているかを検討する必要がある。パータナトスによる細胞死が、マクロファージに適切に貪食されているのか、また自然免疫・獲得免疫の刺激による炎症性サイトカインを放出させるのかを確認した。

まずはTHP-1細胞（ヒト単球細胞株）と健常者由来末梢血単核球をそれぞれマクロファージへ分化させた。その後、同一健常者の末梢血単核球をパータナトス誘導剤であるメチルニトロニトロソグアニジン（MNNG）にて刺激し、その上清を回収して上記の分化させたマクロファージと共培養した。現在この実験に関しては条件検討中である。

③ SLE患者由来あるいは健常者由来血清中のDNA断片の検討

SLE患者でパータナトスが増強しているのであれば、健常者と比較し血清に巨大なDNA断片が同定できる可能性がある。これに関しては血清からDNAを抽出し、電気泳動にて断片サイズを確認中である。アポトーシスは100bp程度のDNA断片であるのに対し、パータナトスは50kpbの断片となるため巨大なDNAサイズを同定できるパルスフィールド電気泳動での条件検討を行っている。

④ SLE患者由来リンパ節ではコントロール群（菊池病患者）と比較しPAR陽性断片が増加している。



SLE患者と、比較対象として菊池病患者から採取されたリンパ節でのPARP1活性を比較した。免疫組織化学染色にてPARを染色し、DABで発色した。上図の通り、菊池病・SLE患者双方で凝集核や核塵が目立ったが、SLEでは菊池病と比較し核塵が高率にPAR陽性であった。菊池病は組織球性壊死性リンパ節炎とも呼ばれ、高熱とリンパ節腫脹を伴うが基本的には自然軽快する良性疾患である。菊池病患者のリンパ節の病理所見はアポトーシスが増加し、壊死したリンパ球を貪食した組織球が多数みられる。SLE患者では菊池病患者と同等あるいは増加したアポトーシスと組織球がみられ、これらがPAR強陽性であったことから、リンパ組織においてもPARP1依存性細胞死による細胞死が増加している可能性が示唆された。

【まとめ】

SLE患者の血中・リンパ組織でパータナトスが増強し、PAR活性を抑制することでパータナトスを抑制できることが分かった。現在はパータナトスにより放出されたDNA断片がいかにマクロファージを刺激するかを明らかにすべく注力している。パータナトスほどの巨大な断片を取り込む機構が、通常の貪食で行われるのかどうか、あるいは自己抗体産生の抗原となるのかを明らかにできれば、パータナトスの新規病的意義を明らかにできる。またマウスモデルへのPARP1阻害薬を今年投与開始する予定であり、in vivoでの病態改善に寄与できるかを明らかにする。

最後に、本研究に多大なご支援をいただいた難病医研究財団の皆様、審査員の先生方に深く感謝を申し上げます。