

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目： 基盤研究（C）
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 19590075
 研究課題名（和文） TNF 受容体関連因子 6 のアポトーシスならびにサイトカイン産生における役割解析
 研究課題名（英文） Role of TNF receptor-related factor 6 (TRAF6) in the apoptosis induction and cytokine receptor signaling

研究代表者

笠原 忠 (KASAHARA TADASHI)
 慶應義塾大学・薬学部・教授
 研究者番号：60049096

研究成果の概要：

TNF 受容体を介するシグナル系は、細胞死と生存という相反する作用があり、その作用に対する明快な説明がない。そこで、我々は TNF シグナリングの解析を行ってきた。TRAF6 欠損細胞を用いた研究から、1) TRAF6 は TNF シグナリングにおいて、負の制御をしている。2) IL-33 に低反応であり、そのシグナル系に TRAF6 が重要な役割を持つこと。その他の関連研究から、TNF シグナル系における TRAF6 の役割を解析し、TNF の多彩な生理作用を明らかにする有意義な結果が得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：(1) TNF 受容体 (2) TNF シグナリング (3) TRAF6

(4) セレコキシブ (5) IL-33 (6) NF- κ B 活性化 (8) TRAF6 遺伝子欠損

1. 研究開始当初の背景

TNF は炎症の惹起やショックの誘導、感染防御、関節リウマチでの関節破壊など、免疫・炎症において多彩な生理活性を示すサイトカインであり、TNF の中和抗体や受容体アンタゴニストは、クローン病や関節リウマチの新たな抗体医薬としてすでに、その有効性が注目されている。しかしながら、TNF とその 2 種類の受容体 TNFR1、TNFR2 によって、一方では細胞死を、他方では細胞生存を誘導

するという相反する作用の機序に対する明快な説明はない。この理由を明らかにすることは、炎症や免疫の制御を考える上で極めて重要であると考えた。

2. 研究の目的

TNF シグナリング系の解析は重要かつ、魅力的な研究テーマである。我々のこれまでの研究結果より、TRAF 分子が TNF シグナリングにおいて、正負の制御をしている可能性が想

定され、研究を企画した。TNF スーパーファミリーは、細胞死と生存、炎症の惹起やショックの誘導、感染防御、関節リウマチなど、免疫・炎症において多彩な生理活性を示すサイトカインである。TNF の 2 種類の受容体 TNFRI、TNFRII は、一方では細胞死を、他方では細胞生存を誘導する相反する作用があるが、その作用に対する明快な説明はなされていない。従来から、TNF シグナリングにおいては、TRAF6 の関与はないとされてきたが、我々は最近、TRAF6 欠損細胞での TNF シグナリングにおいて、TRAF6 が負の制御をしている可能性を見出した。そこで、TNF シグナリングにおける TRAF6 の役割を解析するし、TNF の生理作用を明らかにすることをめざした。

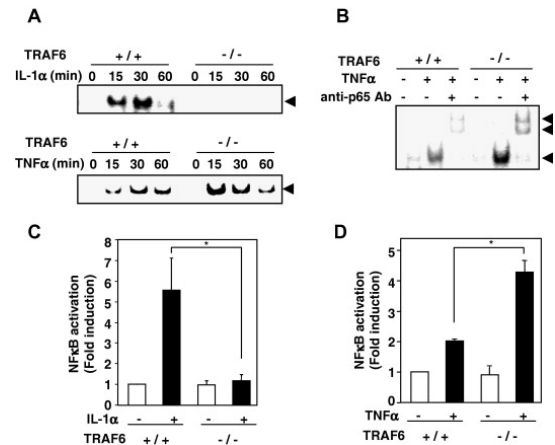
3. 研究の方法

- (1) TRAF6 -/- MEF での TNF 誘導細胞障害性の解析: TRAF6 上流分子の会合や局在をみるために、TRAF6 -/- MEF でのサイトカイン産生の解析の解析ならびに MSCV-TRAF6 遺伝子レトロベクターのノックインを行い、TRAF6 領域のどの部位が重要であるか、詳細な mutagenesis を行い検討する。
- (2) TRAF6 -/- MEF でのサイトカイン産生の解析: TRAF6 -/- MEF で TNF 誘導により GM-CSF などの発現を検討した。GM-CSF のプロモーター Luc コンストラクトの作成して、ルシフェラーゼアッセイならびにゲルシフトで TRAF6 -/- MEF 細胞核中の DNA 結合タンパクの同定を進めた。また、NF- κ B, AP-1, NF-IL-6 などの転写因子結合部位の関与ならびに、NF-GM 転写因子の CK-1, CK-2 結合部位が負の制御に関与するのか否かを検討した。
- (3) FAK, TRAF6 と IL-33 シグナリング系との関わり、ならびに種々の薬物が及ぼす効果の検討を行った。

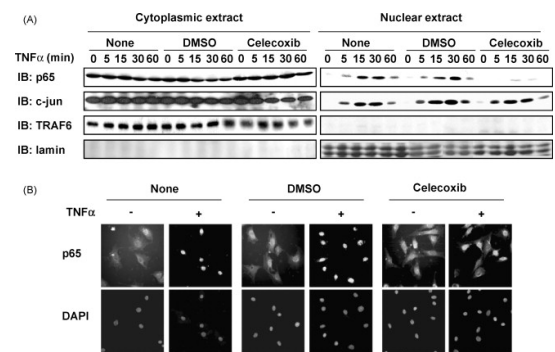
4. 研究成果

我々は TNF シグナリングの解析をとくに、TNF 受容体下流のアダプター分子である TRAF6 欠損細胞を用いて解析を行い、以下のような結果を得た。

(1) TRAF6 は TNF シグナリングにおいて、負の制御をしている可能性を見出した。すなわち、TRAF6 -/- MEF では TNF 誘導により GM-CSF, IL-6, MCP-1 の発現が増加している。また、GM-CSF の産生は MSCV-TRAF6 遺伝子のノックインで、TRAF6+/+MEF のレベルに戻る。この制御には TRAF6 による NF- κ B 転写因子の関与によることを明らかにした (Funakoshi-Tago et al. *Cytokine* 2009)。

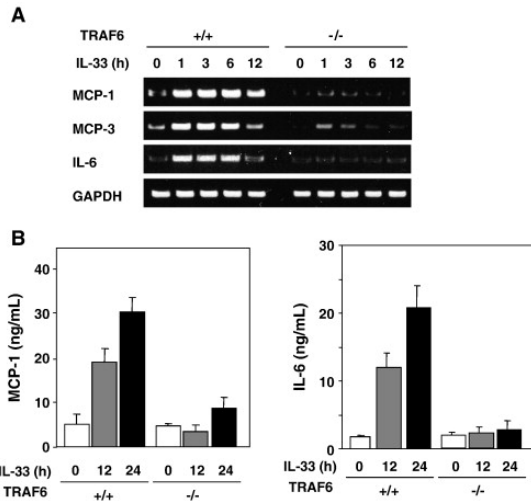


(図 1) TRAF6 は、TNF により誘導される NF- κ B の活性化を増強することがわかった。(2) 抗炎症剤セレコキシブは TNF による NF- κ B の活性化を抑制して、IL-6 や CXCL1 や CCL2 などのサイトカインやケモカインの産生はの遺伝子発現を抑制するが、完全型 TRAF6 を導入することにより、正常域にまで回復した。TRAF6 抑制の機序の解析を行ったところ、セレコキシブは IKK の活性化や I κ B / β の分解には作用せず、NF- κ B p65 サブユニットの核への移行を選択的に抑制することがわかった (Funakoshi-Tago et al. *Biochemical Pharmacol.* 2008)。

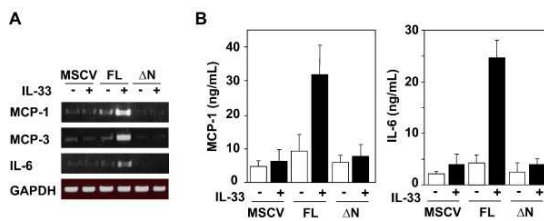


(図 2) セレコキシブは、TNF で誘導される NF- κ B の核内移行を特異的に阻害した。

(3) IL-33 は ST2L のリガンドとして作用するが、TRAF6 欠損した細胞では、IL-33 によるケモカイン産生が誘導できなかった。すなわち、ST2L を介するシグナル伝達系に TRAF6 が重要な役割を持つことを明らかにした (*Cellular Signalling*, 2008)。

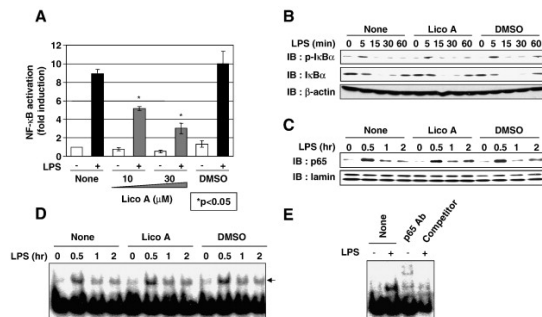


(図3) TRAF6 欠損 MEF においては、IL-33 による MCP-1, IL-6 の産生に欠陥があった。

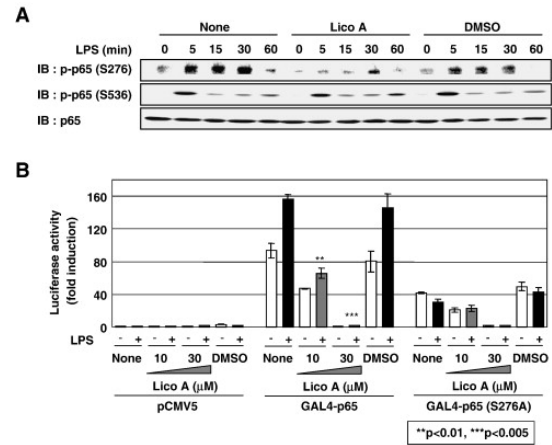


(図4) TRAF6 欠損 MEF におけるサイトカイン産生の低下は、完全型 TRAF6 の導入により、正常にまで回復した。

(4) 甘草由来 Licochalcone A は、TNF および LPS 誘導 NF- κ B 活性化を抑制したが、その機序は異なっていた。TNF 刺激に対しては I κ B α の活性を抑制するのに対して、LPS 系では NF- κ B p65 の Ser276 のリン酸化を特異的に抑制した。



(図5) リコカルコン A は、LPS 刺激マクロファージでの NF- κ B 活性化を阻害した。



(図6) リコカルコン A の NF- κ B 活性化の抑制は、p65 のリン酸化の抑制とそれに引き続く、核への移行を阻害した。

以上の研究は、TNFシグナリングにおける TRAF6の役割を解析したものであり、TNFの多彩な生理作用を明らかにしたことができた。とくに、本研究では TRAF6欠損マウス由来の細胞を用いた解析を行うことにより、従来から明確な結果が得ることが難しかった現象に明快で、有意義な結果と考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11件)

1. Funakoshi Tago M, Tago K, Hayakawa M, Tominaga S-I, Ohshio T, Sonoda Y, Kasahara T. TRAF6 is a critical signal transducer in IL-33 signaling pathway. *Cell Signaling* 20(9):1679-86, 2008
2. Sonoda Y, Hada N, Kaneda T, Suzuki T, Ohshio T, Takeda T, Kasahara T. A synthetic glycosphingolipid-induced antiproliferative effect in melanoma cells is associated with suppression of FAK, Akt, and Erk activation. *Biol Pharm Bull.* 31(6):1279-83, 2008
3. Kaneda T, Sonoda Y, Ando K, Suzuki T, Sasaki Y, Ohshio T, Funakoshi Tago M, Kasahara T. Mutation of Y925F in focal adhesion kinase (FAK) suppresses melanoma cell proliferation and metastasis. *Cancer Lett.* 270(2):354-61 2008

4. Funakoshi Tago M, Tago K, Kasahara T, Parganas E, Ihle JN. Negative regulation of Jak2 by its auto phosphorylation at tyrosine 913 via the Epo signaling pathway. *Cell Signaling* 20(11):1995-2001, 2008
 5. Funakoshi Tago M, Shimizu T, Tago K, Nakamura M, Itoh H, Sonoda Y, Kasahara T. Celecoxib potently inhibits TNF α -induced nuclear translocation and activation of NF κ B. *Biochemical Pharmacol.* 76(5): 662-71, 2008
 6. Funakoshi Tago M, Kamada N, Shimizu T, Hashiguchi Y, Tago K, Sonoda Y, Kasahara T. TRAF6 negatively regulates TNF α -induced NF κ B activation. *Cytokine* 45(2):72-9, 2009
 7. Furusawa JI, Funakoshi Tago M, Tago K, Mashino T, Inoue H, Sonoda Y, Kasahara T. Licochalcone A significantly suppresses LPS signaling pathway through the inhibition of NF κ B p65 phosphorylation at serine 276. *Cell Signaling* 21(5):778-85, 2009
 8. Oshio T, Sasaki Y, Funakoshi Tago M, Yokota E, Sonoda Y, Matsuoka H, Kasahara T. Dermatophagoides farinae extract induces severe atopic dermatitis in NC/Nga mice, which is effectively suppressed by the administration of tacrolimus ointment. *Int Immunopharmacol.* 9(4):403-11, 2009.
 9. Abe M, Funakoshi Tago M, Tago K, Kamishimoto J, Aizu-Yokota E, Sonoda Y, Kasahara T. The polycythemia vera-associated Jak2 V617F mutant induces tumorigenesis in nude mice. *Int Immunopharmacol.* 2009 Mar 24. [Epub ahead of print]
 10. Furusawa J, Funakoshi Tago M, Mashino T, Tago K, Inoue H, Sonoda Y, Kasahara T. Glycyrrhiza inflata-derived chalcones, Licochalcone A, Licochalcone B and Licochalcone D, inhibit phosphorylation of NF κ B p65 in LPS signaling pathway. *Int Immunopharmacol.* 9(4):499-507, 2009
 11. Funakoshi Tago M, Tago K, Sumi K, Abe M, Aizu-Yokota E, Oshio T, Sonoda Y, Kasahara T. The acute lymphoblastic leukemia-associated Jak2 L611S mutant induces tumorigenesis in nude mice. *J Biol Chem.* 284(19):12680-90, 2009
- [学会発表](計10件)
1. Yoshida N, Sonoda Y, Kasahara T. Production and regulation of eotaxin 2/CCL24 in a differentiated human leukemic cell line, HT93. 第16回日本免疫学会総会, 東京都, 講演要旨集 p.187, 2007/11
 2. 阿部美雪, 多胡めぐみ, 園田よし子, 笠原忠. 真性赤血球増加症由来 JAK2 の点変異(V617F)による抗アポトーシス作用の解析. 第80回日本生化学会大会, 横浜市, 講演要旨集 1P-0572, 2007/12
 3. 多胡めぐみ, 多胡憲治, 早川盛貞, 富永眞一, 園田よし子, 笠原忠. IL-33 シグナル伝達経路における TRAF6 の役割の解析. 第80回日本生化学会大会, 横浜市, 講演要旨集 2P-02292007/12
 4. 古澤純一, 多胡めぐみ, 谷藤章太, 谷香世子, 岩田進, 笠原忠. 甘草由来 LicochalconeA 及びその誘導体の一酸化窒素(NO)酸性経路に及ぼす影響. 第80回日本生化学会大会, 横浜市, 講演要旨集 4P-0468, 2007/12
 5. 谷藤章太, 吉田直美, 多胡めぐみ, 横田恵理子, 園田よし子, 岩田進, 笠原忠. LicochalconeD によるマスト細胞脱顆粒反応抑制機序の解析. 日本薬学会第128年会, 横浜市, 講演要旨集-3 p10, 2008/03
 6. 安達玲子, 櫻井智子, 笠原忠, 鈴木和博, 手島玲子. 破骨細胞における中間径フィラメントの役割について. 日本薬学会第128年会横浜市, 講演要旨集-3 p96, 2008/03
 7. 阿部美雪, 多胡めぐみ, 園田よし子, 笠原忠. Anti-apoptotic effect of activated JAK2 with the V617F point mutation. 第80回日本生化学会, 横浜市, 1P-0572, 2007/12

8. 清水妙子, 多胡めぐみ, 園田よし子, 中村元洋, 多胡憲治, 伊東広, 笠原忠. TNF - シグナル伝達における celecoxib の作用について. 日本薬学会第 128 年会, 横浜市, 講演要旨集 -3 p812008/03
9. 鎌田智之, 橋口雄輔, 市川大樹, 多胡めぐみ, 横田恵理子, 園田よし子, 井上純一郎, 笠原忠. TNF シグナル系における TNF Receptor Associated Factor 6 の役割. 日本薬学会第 128 年会, 横浜市, 講演要旨集 -3 p87, 2008/03
10. 割田雅子, 多胡めぐみ, 園田よし子, 笠原忠. プロテオリピドプロテインのメラノーマ転移誘導の解析. 日本薬学会 129 年会, 講演要旨集, 2009/03 ほか

【図書】(計 3 件)

1. 笠原 忠, 大川智子. 免疫のしくみ・アレルギー-免疫疾患とその服薬指導. 共立薬科大学, 東京, 1-89, 2008/01
2. 笠原 忠. 「スタンダード免疫学」 小林芳郎編, 改訂第 3 版. 丸善, 東京, 143-222, 2008/02
3. 笠原 忠. 創薬における薬剤師の役割. からだの科学, 増刊, 52-54, 2009/01

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠原 忠 (KASAHARA TADASHI)
慶應義塾大学・薬学部・教授
研究者番号: 60049096

(2) 研究分担者

多胡 めぐみ (TAGO MEGUMI)
慶應義塾大学・薬学部・助教
研究者番号: 30445192

(3) 連携研究者

該当なし