

機関番号：3 2 6 2 0

研究種目：基盤(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590411

研究課題名(和文) NF- κ B 関連分子を標的とした免疫アレルギー疾患の制御研究課題名(英文) Development of strategy to treat immune and allergic diseases targeting molecules associated with NF- κ B activation

研究代表者

中野 裕康 (NAKANO HIROYASU)

順天堂大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：70276476

研究成果の概要(和文)：TNF α により誘導されるアポトーシスの抑制に関与するアダプター分子である TRAF2 と c-FLIP の欠損マウスの解析を行った。その結果 TRAF2 欠損マウスは大腸上皮のアポトーシスが亢進し、さらにその結果引き起こされた二次的な腸内細菌叢の変化や炎症性サイトカインの産生亢進があいまって、重篤な大腸炎を自然発症することが明らかとなった。また、インターフェロン誘導性の肝臓特異的 c-Flip 欠損マウスはインターフェロンの誘導剤である poly I:C の投与により、大量の IL-6 産生を伴う劇症肝炎で死亡する事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： We characterized two deficient mice lacking TRAF2 or c-FLIP, both of which are critically involved in protection of cells from TNF α -induced apoptosis. TRAF2-deficient mice spontaneously developed severe hepatitis through enhanced apoptosis of the colonic epithelial cells and subsequent alterations of the commensal microbiota and upregulation of proinflammatory cytokines. To delete c-Flip gene, we injected poly I:C into interferon-inducible c-Flip-deficient (c-FlipF/F:Mx) mice. Upon poly I:C injection, c-FlipF/F:Mx mice developed severe hepatitis along with upregulation of IL-6, but not TNF α or IL-1 β . Collectively, these results suggest that deletion of adaptor molecules associated with TNF α signalings promotes apoptosis along with inflammation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,100,000	4,800,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：TRAF、腸炎、NF- κ B、アポトーシス、c-Flip、肝炎

1. 研究開始当初の背景

NF- κ B は広範な免疫応答を調節することが明らかにされており、そのなかの一つの機能が TNF α や Fas などにより誘導されるアポトーシスの抑制にある。一方で、個体レベルにおける細胞死の亢進が様々な病態をもたらすことが明らかにされてきている。我々はこれまでに TNF receptor-associated factor (TRAF) と呼ばれるアダプター分子の研究を NF- κ B の活性化という観点と、細胞死抑制という二つの観点から研究を行ってきた。その過程で TNF α 刺激により誘導されるアポトーシスの抑制に関与する TRAF2 欠損マウスが重篤な大腸炎を自然に発症することを見出した。

一方で我々は、NF- κ B による細胞死抑制の新たなメカニズムとして酸化ストレスの抑制という機能があることを明らかにし、その抑制に関与する中心的な分子が cellular FLICE inhibitory protein (c-FLIP) であることを明らかにした。この遺伝子のノックアウトマウスは胎生致死であることから、c-FLIP の生体における機能を明らかにするためにインターフェロン誘導性 (poly I:C を投与することにより) に c-FLIP を欠損させることのできるマウスを樹立した (c-FlipF/F:Mx マウス)。

2. 研究の目的

本研究では、TNF α により誘導されるアポトーシスの抑制に関与する二つのアダプター分子、TRAF2 と c-FLIP の二つの分子に注目する。具体的には細胞死の亢進の見られるこれらのマウスがどのようなメカニズムにより炎症が誘導されるのかを明らかにし、持続する炎症 (慢性炎症) を治療するための標的シグナル伝達経路を同定する。

3. 研究の方法

- (1) Traf2 欠損マウスは非常に重篤な大腸炎を自然に発病し、生後 2~3 週以内に全例が死亡する。そこで、腸の肉眼的所見および HE 染色した組織像を検討し、腸炎の罹患部位が大腸に限局しているのか、あるいは小腸にまで及ぶのかを検討する。さらに各種抗体を用いて免疫染色を行い、炎症局所への浸潤細胞の同定を行う。
- (2) Traf2 欠損マウスの腸より mRNA を調整し、TNF α , IL-6, Ifng, IL-17a, IL-23p19 などのサイトカインの発現を real-time PCR により検討する。
- (3) Traf2 欠損マウスでみられる腸炎が骨髄由来の細胞により惹起されるのか、あるいは非骨髄細胞由来なのかを明らかにするために Traf2 欠損マウスより骨髄細胞を調節し、致死量の放射線を照射した野生型マウスに移入することにより腸炎が発症するかを検討する。
- (4) Traf2 欠損マウスの腸炎の発症が腸管内細菌叢に由来するのかを検討するために抗生物質を投与し、腸炎や生存率が改善するかを検討する。
- (5) 腸管内細菌叢のゲノム解析を行い、腸内細菌叢に変化が認められるかを明らかにする。
- (6) 腸局所において産生の亢進しているサイトカインの欠損マウス (IL-17a 欠損マウスや Tnfr1 欠損マウス) と Traf2 欠損マウスを交配し、大腸炎が改善するかを検討する。
- (7) 樹立した c-FlipF/F:Mx マウスにインターフェロンのインデューサーである poly I:C を投与し c-Flip 遺伝子を欠失

させる。

- (8) poly I:C 投与後経時的に肝臓を摘出し、肝組織抽出液を用いて、c-FLIP がタンパクレベルで消失するかを検討する。また経時的に血中の肝機能 (ALT) や炎症性サイトカインレベルを測定する。
- (9) c-Flip を siRNA 法を用いて培養細胞でノックダウンした細胞や、c-Flip ノックアウトマウス由来の胎児線維芽細胞を用いた実験から、これらの細胞は TNF α や Fas 刺激により強い酸化ストレスが誘導されることを我々は既に明らかにしている。そこで、c-FlipF/F:Mx マウスの肝臓でも poly I:C 投与により酸化ストレスが誘導されるかを肝組織抽出液の還元型 GSH を測定することにより評価する。
- (10) c-FlipF/F:Mx マウスに poly I:C 投与後の炎症性サイトカインの発現を ELISA やトランスクリプトーム解析により検討する。

4. 研究成果

(1) Traf2 欠損マウスに見られる炎症性腸炎のメカニズムの解析。
Traf2 欠損マウスは生後 1 週頃より野生型マウスと比較し、発育や体重増加の不良が

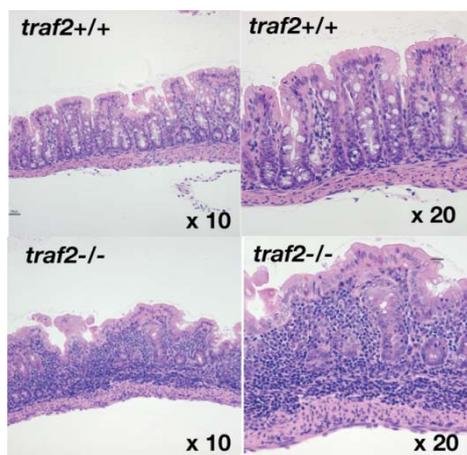


図 1. Traf2 欠損マウスで見られる大腸炎 HE 染色像 (生後 14 日の大腸)

認められ、生後約 3 週以内に全個体が死亡

する。組織学的な検討の結果、小腸には炎症細胞の浸潤は認められず、大腸粘膜および粘膜下への B 細胞の著明な細胞浸潤が認められることが明らかとなった。さらに大腸局所におけるサイトカインの産生を real-time PCR で解析したところ、TNF α , IL-6, IFN- γ , IL-17a などの炎症性サイトカインの発現の上昇が認められた。また、Traf2 欠損マウスでみられる腸炎が骨髄由来の細胞により惹起されるのか、あるいは非骨髄細胞由来なのかを明らかにするために Traf2 欠損マウスより骨髄細胞を調節し、致死量の放射線を照射した野生型マウスに移入する骨髄キメラマウスを作製し、腸炎が発症するかを検討した。Traf2 欠損マウス由来の骨髄を移入した野生型マウスでは、大腸炎が発症しなかったことより、骨髄由来の細胞だけでは腸炎の発症には不十分であることが判明した。大腸炎は生後直後には認められず、5 日目頃から発症することから、腸内細菌の腸炎の発症への役割を検討するために、Traf2 欠損マウスへの抗生物質投与を行った。抗生物質投与により、Traf2 欠損マウスの有為な生存期間の延長および大腸炎の改善が認められ、炎症性サイトカイン発現レベルも野生型のマウスと同程度まで低下した。さらに腸内細菌叢のゲノム解析から、野生型マウスの大腸では偏性嫌気性菌であるクロストリジウム属やバクテロイデス属が優位なのと比較し、Traf2 欠損マウスでは通性嫌気性のエンテロバクテリア属が優位となっていた。これらの結果より、腸内細菌叢の変化も大腸炎の発症に関与している可能性が示唆された。

Traf2 欠損マウスの大腸は、IL-17a や TNF α などの炎症性サイトカインの発現が上昇しており、また IL-17a は炎症性腸炎への関与が示唆されることから、IL-17a 欠

損マウスと Traf2 欠損マウスとを交配したが、腸炎は改善されなかった。次に Tnfr1 欠損マウスと交配したところ、腸炎も劇的に改善し、約半数の Traf2/Tnfr1 二重欠損マウスは数ヶ月も生存することが明らかとなった。組織学的所見では Traf2 欠損マウスで見られた大腸上皮のアポトーシスが Traf2/Tnfr1 二重欠損マウスでは消失し、炎症性サイトカインの発現も低下していた。さらに腸内細菌層のゲノム解析からも、二重欠損マウスは野生型の細菌叢にもどっていることが明らかとなった。以上より、TRAF2 は腸管のホメオスタシスを維持することで、大腸炎の発症を防御していることが初めて明らかとなった (*JBC in press, selected as "Paper of the Week"*)。

(2) インターフェロン誘導性 c-FLIP 欠損マウスの解析。

c-FlipF/F:Mx マウスにインターフェロンのインデューサーである poly I:C を投与したところ、驚いたことに投与後 72 時間以内にすべてのマウスが死亡することが明らかとなった。一方でコントロールの c-FlipF/F マウスでは肝障害は誘導されなかった。投与後約 24 時間後には血清中の

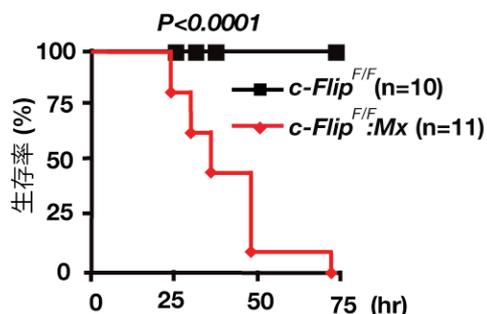


図 2. 生存曲線。poly I:C を一回投与後の生存曲線 P 値は Log Rank テストにより計算。

ALT レベルが約 10,000 IU/L を超え、組織学的には肝臓において広範なアポトーシスが誘導されていることが明らかとなった。肝臓における c-FLIP の発現を Western blot 法により検討したところ、poly I:C 投

与後 10 時間後には減少し始め、24 時間後にはほぼ完全に消失することが明らかとなった。肝臓における酸化ストレスのマーカーとして還元型の GSH を測定したところ、c-FlipF/F:Mx マウスの肝臓では poly I:C 投与 24 時間後には著明に低下しており、アポトーシスに伴い強い酸化ストレスが誘導されていることが示された。

一方で、血清中の TNF α , IL-1 β , IL-6 などの炎症性サイトカインを ELISA 法にて測定したところ、TNF α や IL-1 β は poly I:C 投与後約 6 時間後にピークを示し、24 時間後にはほとんど血清中には検出されず、この経過はコントロールマウスと差は見られなかった。しかしながら、興味深いことに血清中の IL-6 は、投与後 6 時間後ではコントロールマウスと差が認められなかったものの、24 時間後には 6 時間後よりもさらに上昇が見られた。コントロールマウスでは 24 時間後には IL-6 は検出されなかった。現在細胞死に伴い大量の IL-6 が産生されるメカニズムについては検討中である。また、c-FlipF/F:Mx マウスは poly I:C 投与により c-Flip の発現が減少すると同時に、TNF α , Fas L あるいは TRAIL などの肝細胞にアポトーシスを誘導するリガンドの発現が誘導された結果、劇症肝炎で死亡したと考えられる。今後、肝臓内に存在するどの細胞がどのようなリガンドの発現上昇を介してアポトーシス誘導しているかについて、検討して行く予定である。

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 15 件)

1. Tokunaga, F., T. Nakagawa, M.

- Nakahara, Y. Saeki, M. Taniguchi, S. Sakata, K. Tanaka, H. Nakano, and K. Iwai. 2010. Sharpin is a component of the NF- κ B activating linear ubiquitin chain assembly complex. *Nature* in press.
2. Ushio, H., T. Ueno, Y. Kojima, M. Komatsu, S. Tanaka, A. Yamamoto, Y. Ichimura, J. Ezaki, K. Nishida, S. Komazawa-Sakon, F. Niyonsaba, T. Ishi, T. Yanagawa, E. Kominami, H. Ogawa, K. Okumura, and H. Nakano. 2010. Crucial role for autophagy in degranulation of mast cells. *J Allergy Clin Immunol* in press.
 3. Piao, J.H., M. Hasegawa, B. Heissig, K. Hattori, K. Takeda, Y. Iwakura, K. Okumura, N. Inohara, and H. Nakano. 2011. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)2 controls homeostasis of the colon to prevent spontaneous development of murine inflammatory bowel disease. *J Biol Chem* (selected as "Paper of the Week") in press.
 4. Nakano, H., and H. Ushio. 2011. An unexpected role for autophagy in degranulation of mast cells. *Autophagy* in press.
 5. Missiou, A., P. Rudolf, P. Stachon, D. Wolf, N. Varo, P. Aichele, C. Colberg, N. Hoppe, S. Ernst, C. Munkel, C. Walter, B. Sommer, I. Hilgendorf, H. Nakano, C. Bode, and A. Zirlik. 2010. TRAF5 deficiency accelerates atherogenesis in mice by increasing inflammatory cell recruitment and foam cell formation. *Circ Res* 107:757-766.
 6. Masszi, A., P. Speight, E. Charbonney, M. Lodyga, H. Nakano, K. Szaszi, and A. Kapus. 2010. Fate-determining mechanisms in epithelial-myofibroblast transition: major inhibitory role for Smad3. *J Cell Biol* 188:383-399.
 7. Ando, K., K. Hasegawa, K. Shindo, T. Furusawa, T. Fujino, K. Kikugawa, H. Nakano, O. Takeuchi, S. Akira, T. Akiyama, J. Gohda, J. Inoue, and M. Hayakawa. 2010. Human lactoferrin activates NF- κ B through the Toll-like receptor 4 pathway while it interferes with the lipopolysaccharide-stimulated TLR4 signaling. *FEBS J* 277:2051-2066.
 8. Tanaka, S., and H. Nakano. 2009. NF- κ B2 (p100) limits TNF-alpha-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 119:2879-2881.
 9. Kraus, Z.J., H. Nakano, and G.A. Bishop. 2009. TRAF5 is a critical mediator of in vitro signals and in vivo functions of LMP1, the viral oncogenic mimic of CD40. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:17140-17145.
 10. Blackwell, K., L. Zhang, G.S. Thomas, S. Sun, H. Nakano, and H. Habelhah. 2009. TRAF2 phosphorylation modulates tumor necrosis factor alpha-induced gene expression and cell resistance to apoptosis. *Mol Cell Biol* 29:303-314.
 11. Sebe, A., A. Masszi, M. Zuly, T. Yeung, P. Speight, O.D. Rotstein, H. Nakano, I. Mucsi, K. Szaszi, and A. Kapus. 2008. Rac, PAK and p38 regulate cell contact-dependent

- nuclear translocation of myocardin-related transcription factor. *FEBS Lett* 582:291-298.
12. Sawada, T., C. Nishiyama, T. Kishi, T. Sasazuki, S. Komazawa-Sakon, X. Xue, J.H. Piao, H. Ogata, J. Nakayama, T. Taki, Y. Hayashi, M. Watanabe, H. Yagita, K. Okumura, and H. Nakano. 2008. Fusion of OTT to BSAC Results in Aberrant Up-regulation of Transcriptional Activity. *J Biol Chem* 283:26820-26828.
 13. Nakajima, A., H. Kurihara, H. Yagita, K. Okumura, and H. Nakano. 2008. Mitochondrial Extrusion through the cytoplasmic vacuoles during cell death. *J Biol Chem* 283:24128-24135.
 14. Nakajima, A., Y. Kojima, M. Nakayama, H. Yagita, K. Okumura, and H. Nakano. 2008. Downregulation of c-FLIP promotes caspase-dependent JNK activation and reactive oxygen species accumulation in tumor cells. *Oncogene* 27:76-84.
 15. Hasegawa, M., Y. Fujimoto, P.C. Lucas, H. Nakano, K. Fukase, G. Nunez, and N. Inohara. 2008. A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF- κ B activation. *EMBO J* 27:373-383.

以上全て査読あり。

[学会発表] (計 8 件)

1. Nakano et al. Downregulation of c-FLIP promotes caspase-dependent ROS and JNK activation in tumor cells. 12 th International TNF conference (2009 年 4 月 26-29 日, Madrid, Spain)
2. Ushio et al. A crucial role for

- constitutive autophagy in degranulation of mast cells. 第 39 回日本免疫学会総会 (第 39 回日本免疫学会総会, 大阪)
3. Piao et al. Spontaneous development of severe inflammatory bowel disease in *traf2*^{-/-} mice. 第 39 回日本免疫学会総会 (第 39 回日本免疫学会総会, 大阪)
 4. Nakano H. Hepatocyte-specific c-Flip-deficient mice uncover a causal link between oxidative stress and tissue repair. 8 th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (June 14-18, 2010, Kyoto, Japan) (招待講演)
 5. 中野 裕康. TRAF2 による腸管内ホメオスタシスの制御. 第 19 回日本 Cell Death 学会学術集会 (2010 年 7 月 31 日-8 月 1 日, 名古屋) (招待講演)
 6. 中野 裕康. 酸化ストレスと組織修復を仲介する因子の同定. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学大会合同大会 (2010 年 12 月 7 日-10 日, 神戸)
 7. Nakano et al. Hepatocyte-specific deletion of c-Flip gene reveals a crucial role in protection of hepatocytes from apoptosis. 14 th International Congress of Immunology (August 22-27, 2010, Kobe, Japan)
 8. 仁科 隆史他. A crucial role in c-FLIP in preventing TNF alpha- and Concanavalin A-induced hepatitis. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学大会合同大会 (2010 年 12 月 7 日-10 日, 神戸)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 裕康 (NAKANO HIROYASU)

順天堂大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号 : 70276476

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし