

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790689  
 研究課題名（和文） 自然免疫および破骨細胞分化に及ぼすCDK4／6の新規機能の解析  
 研究課題名（英文） Effect of CDK4/6 on innate immunity and osteoclastgenesis.  
 研究代表者  
 村上 洋介（MURAKAMI YOSUKI）  
 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・メディカルフェロー  
 研究者番号：30415319

研究成果の概要（和文）：マクロファージの炎症性サイトカイン産生に対する p16<sup>INK4a</sup> 強制発現の効果を検討した。p16<sup>INK4a</sup> はマクロファージからの IL-6 発現を抑制することを見出した。この抑制はプロテアソーム依存 IRAK1 分解亢進することにより AP-1 活性を抑制した結果であることを明らかにした。また、内因性 p16<sup>INK4a</sup> 誘導負荷をかけたマクロファージに p16<sup>INK4a</sup> に対する siRNA で p16<sup>INK4a</sup> をノックダウンしたところ、IL-6 産生が増強した。従って、p16<sup>INK4a</sup> 発現による IL-6 阻害は、生理的意義をもつものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study was conducted to investigate how p16<sup>INK4a</sup> expression modulates inflammatory cytokine production from macrophages in relation to simple CDK4/6 kinase inhibition. Forced expression of p16<sup>INK4a</sup> in macrophages suppressed LPS-induced expression of IL-6. The p16<sup>INK4a</sup> expression accelerated LPS-induced IRAK1 degradation, and suppressed AP-1 pathway. The accelerated IRAK-1 degradation should be mediated by proteasomal degradation because a proteasome inhibitor restored AP-1 activation in p16<sup>INK4a</sup>-expressing macrophage. Also, IRAK1 overexpression restored IL-6 production in p16<sup>INK4a</sup>-expressing macrophage. Finally, p16<sup>INK4a</sup> knock down with siRNA enhanced IL-6 production from senescent macrophage that expressed endogenous p16<sup>INK4a</sup>. These results showed that p16<sup>INK4a</sup> suppressed IL-6 production from macrophages in a CDK4/6-independent manner. This was due to proteasome-mediated IRAK1 degradation and following suppression of the AP-1 pathway. Thus, p16<sup>INK4a</sup> could exert anti-inflammatory effects on synovial macrophages.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 膠原病・アレルギー内科学

キーワード：CDK4/6, macrophage, IRAK1, p16<sup>INK4a</sup>, IL-6

## 1. 研究開始当初の背景

サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 (CDKI) である p16<sup>INK4a</sup> は、CDK4/6 を阻害することで細胞増殖を停止させる分子である。我々は p16<sup>INK4a</sup> が関節リウマチ(RA)患者由来の滑膜線維芽細胞 (RSF) においてのみ誘導されることを見出し、p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子をアデノウイルスベクターで RA のモデル動物の関節に強制発現させると、関節炎の病態を抑制した。この病態改善は滑膜細胞の増殖抑制だけでなく、炎症性サイトカイン産生が抑制されていることを *in vivo* で明らかにした。 *In vitro* の解析で、p16<sup>INK4a</sup> は RSF の増殖を抑制するだけでなく、MMP-3 や MCP-1 の炎症性メディエーター産生を CDK4/6 依存・非依存的に抑制することを報告してきた。しかしながら、*in vivo* で観察された炎症性サイトカイン抑制は RSF を用いた実験では認められなかったことから、p16<sup>INK4a</sup> が他の細胞へ作用していることが考えられた。

## 2. 研究の目的

生物学的製剤に代表される免疫抑制的な抗リウマチ薬に加え、作用機序の異なる治療薬を開発し、併用することが、安全かつ究極的な骨破壊抑制に寄与すると考えられる。我々はアデノウイルスによる炎症関節への p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子導入が、滑膜細胞の増殖を抑制し、RA 動物モデルに著効することを見いだした。その効果の一部は、低分子CDK4/6 阻害薬で代替可能であったが、p16<sup>INK4a</sup> には固有の作用もあり、滑膜細胞選択的に p16<sup>INK4a</sup> を発現させる治療法もまた開発を考慮する余地がある。これ迄の研究で、p16<sup>INK4a</sup> は RSF からの MCP-1 や MMP-3 の産生は抑制することを見いだしたが、本研究では、マクロファージの炎症性サイトカイン産生に対する p16<sup>INK4a</sup> 強制発現の効果を検討した。

## 3. 研究の方法

DBA/1J マウスの骨髓細胞を M-CSF 存在下で培養して、骨髓由来マクロファージ(BMM)を得た。また、THP-1 細胞を PMA で刺激し、マクロファージに分化誘導した。RSF は RA 患者滑膜組織から分離した。p16<sup>INK4a</sup> ないし IRAK1 遺伝子のレトロウイルス発現ベクター、CDK4 および IRAK1 に対する short hairpin RNA (shCDK4, shIRAK1) のレトロウイルス発現ベクターを構築し、マクロファージに導入した。RSF への p16<sup>INK4a</sup> の遺伝子導入にはアデノウイルスベクターを用いた。遺伝子発現は定量的 PCR 法、IL-6 産生は ELISA 法、シグナル伝達分子発現とリン酸化は Western blot 法で検討した。AP-1、NF- $\kappa$ B の結合活性は、ゲルシフトアッセイで測定した。

## 4. 研究成果

p16<sup>INK4a</sup> 発現により、LPS 刺激下の BMM からの TNF $\alpha$  mRNA 発現は変動せず、IL-6 mRNA およびタンパクの発現が著減した。この抑制は、選択的 CDK4/6 阻害薬や、shCDK4 による CDK4 をノックダウンによって細胞増殖を抑制しても影響を受けず、CDK4/6 活性低下に依存しなかった。また、RSF では p16<sup>INK4a</sup> を強制発現させても IL-6 産生に影響がなかった。LPS 受容体である TLR4 下流分子では、p16<sup>INK4a</sup> 発現 BMM で IRAK1 分解亢進が認められ、p16<sup>INK4a</sup> 発現 RSF では認められなかった。刺激した BMM における IRAK1 下流シグナルを検討したところ、p38MAPK および JNK のリン酸化、AP-1 結合活性の低下があり、AP-1 経路が抑制されていた。さらに、プロテアソーム阻害薬を投与したところ、p16<sup>INK4a</sup> による IRAK1 の分解亢進は解除され、それに伴い p38MAPK、JNK のリン酸化抑制が回復した。一方で、p16<sup>INK4a</sup> 発現は IKK リン酸化、I $\kappa$ B 分解、NF- $\kappa$ B の結合活性のいずれにも影響を与えず、NF- $\kappa$ B 経路は保持されていた。次に、IRAK1 分解亢進を模倣す

るために、shIRAK1 で IRAK1 をノックダウンしたところ、やはり AP-1 結合活性低下が認められ、一方、I $\kappa$ B 分解は保持されていた。また、p16<sup>INK4a</sup> 発現した THP-1 (ヒトマクロファージ) 細胞では、BMM と同様に LPS 誘導 IL-6 産生が抑制され、この IL-6 産生低下は、IRAK1 追加強制発現によって解除された。以上の結果は、p16<sup>INK4a</sup> 発現はマクロファージにおいて、IRAK1 分解を亢進させ、AP-1 経路を抑制して IL-6 産生を低下させることを示す。なお、細胞老化を誘導するため、増殖停止まで培養して内因性 p16<sup>INK4a</sup> 誘導負荷をかけた BMM を LPS 刺激して IL-6 を産生させる際に、p16<sup>INK4a</sup> に対する siRNA で p16<sup>INK4a</sup> をノックダウンしたところ、IL-6 産生が増強した。従って、p16<sup>INK4a</sup> 発現による IL-6 阻害は、生理的意義をもつものと考えられる。

p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子は、CDK4/6 非依存的に IL-6 産生を抑制することが明らかとなった。CDK4/6 を除いた p16<sup>INK4a</sup> の標的分子としては、HeLa 細胞において NF- $\kappa$ B の構成分子である p65 に結合することが示されており、NF- $\kappa$ B の活性化を阻害することが報告されている。また MEF に UV 照射し p16<sup>INK4a</sup> を発現させた研究では、p16<sup>INK4a</sup> は JNK に結合し、JNK のリン酸化を阻害することなく、JNK が c-Jun との結合を阻害して AP-1 活性化を抑制することが報告されている。これら線維芽細胞系を用いて示された p16<sup>INK4a</sup> の作用機序とは異なり、p16<sup>INK4a</sup> 発現マクロファージでは IRAK1 分解亢進により、p38MAPK および JNK のリン酸化を抑制し、AP-1 活性を阻害した結果 IL-6 産生が抑制されたと考えられる。一方、NF- $\kappa$ B 経路が阻害されなかったのは分解亢進により IRAK1 が減少しても NF- $\kappa$ B 経路を活性化できることが考えられる。IRAK1 の分解機序は、MEF を用いた研究でユビキチン化依存でないことが報告されているが、我々の知見と同様に単球/マクロファージでは、プロテアソーム阻害剤により、IRAK1 の分解が抑制されることが示され

ている。このことから、p16<sup>INK4a</sup> は細胞特異的にプロテアソーム依存・非依存的に IRAK1 分解を制御していることが考えられる。

p16<sup>INK4a</sup> を滑膜細胞選択的に発現させることができれば CDK4/6 阻害薬にはない治療効果も期待される。低分子 CDK4/6 阻害薬と合わせて開発を進めたい。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村上 洋介 (MURAKAMI YOSUKI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・メディカルフェロー

研究者番号：30415319

### (2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者  
なし