

機関番号：17401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790281

研究課題名（和文） Rhbd13 の機能解析による細胞死研究の新展開

研究課題名（英文） Rhomboid regulates innate immunity via TNF $\alpha$  signaling

研究代表者：

濱田 浩一（HAMADA KOICHI）

熊本大学・エイズ学研究センター・特定事業研究員

研究者番号：00343070

研究成果の概要（和文）：

全身性炎症反応症候群の中心的なメディエーターである TNF $\alpha$  は細胞膜タンパク質として産生されたのち、限定分解をうけることで可溶性の活性化分子として細胞外に放出される。我々は、TNF $\alpha$  による細胞死に耐性を示す新規分子のスクリーニングを行い、細胞膜内プロテアーゼ・ロンボイドファミリー遺伝子の 1 つである RHBDF2 を同定した。本研究は、RHBDF2 が新たな自然免疫反応の制御分子であることを示した研究である。

研究成果の概要（英文）：Innate immune responses are vital for pathogen defense but can result in septic shock when excessive. A key mediator of septic shock is TNF $\alpha$ , which is shed into intercellular spaces after cleavage from the plasma membrane by the protease TACE. Here we report that the rhomboid family member RHBDF2 interacts with TACE and regulates TNF $\alpha$  shedding in vitro and in vivo. Our study has identified RHBDF2 as a novel regulator of innate immunity that may be an important target for modulating sepsis and pathogen defense.

交付決定額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2009 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2010 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：基礎医学・医化学一般

キーワード：細胞増殖、細胞死、セリンプロテアーゼ、炎症

## 1. 研究開始当初の背景

自然免疫反応は病原体防御のために必要不可欠な反応であるが、過剰な生体反応は無秩序なサイトカイン産生を誘発し、その結果細菌感染に伴う全身性炎症反応症候群の悪化を引き起こすことが知られている。全身性炎症反応症候群の中心的なメディエーターである TNF $\alpha$  は細胞膜タンパク質として産生されたのち、膜結合型メタロプロテアーゼであ

る TACE (TNF $\alpha$  converting enzyme) により限定分解をうけ細胞膜から切り離されることにより可溶性の活性化分子として細胞外に放出される。一方、TNF $\alpha$  シグナルは多くの炎症性疾患に関与することが知られているが、TNF $\alpha$  シグナルの制御に関しては、まだ十分に理解されていないのが現状である。そこで申請者は、TNF $\alpha$  による細胞死に耐性を示す新規分子を、サイクリックパッケージ

レスキュースクリーニング法を用いて、TNF $\alpha$ 誘導細胞死に耐性となる新規分子の単離を試みたところ、ロンボイドファミリー遺伝子の1つRHBDF2を同定した。

ロンボイドは、細胞膜内プロテアーゼであり、進化的には原核細胞から保存されている分子である。構造的にはポリペプチド鎖が細胞膜を6回もしくは7回貫通する特徴を有し、膜の脂質二重層内で基質蛋白質を切断するプロテアーゼである。またロンボイドはショウジョウバエでは7個、ヒト、マウスでは9個のロンボイドファミリー分子が同定されており一大分子群を形成している。

## 2. 研究の目的

申請者は、TNF $\alpha$ 刺激による細胞死を回避する遺伝子スクリーニングを行い細胞膜内プロテアーゼであるロンボイド RHBDF2 を同定している。以上のことから本研究は

- (1) RHBDF2がこれまで詳細に検討されている TNF $\alpha$ シグナルにおいて、どのように作用しているのかを明らかにする。
- (2) RHBDF2による細胞死抵抗性は TNF $\alpha$ 刺激だけでなく、その他の細胞死刺激に対しても特異的なのかを明らかにする。
- (3) TNF $\alpha$ が関与する自然免疫反応において RHBDF2 がどのような役割を果たしているのかを詳細に検討する。
- (4) RHBDF2欠損マウスを作成することで、TNF $\alpha$ が関与する感染症に対する反応性を明らかにすることが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

申請者は、サイクリックパッケージングレスキュー法を用いて、TNF $\alpha$ 誘導細胞死に耐性となる新規分子の単離を試みた。すなわち「レトロウイルスによるcDNAライブラリーの導入」「TNFによる細胞死の誘導」「細胞死耐性細胞にgag-pol-envをアデノウイルスで導入し、レトロウイルスを回収」の一連の操作を繰り返すことで、TNF $\alpha$ による細胞死に耐性となる遺伝子の濃縮単離を試み、ロンボイドファミリー遺伝子の1つRHBDF2を同定した。

また RHBDF2の過剰発現細胞を作成することで、どのようなメカニズムで TNF $\alpha$ に対して抵抗性を獲得するのかの検討を行った。

さらに、RHBDF2の欠損マウスを作製することで、*in vivo*における RHBDF2と TNF $\alpha$ シグナルの相互作用、および TNF $\alpha$ が関与

する自然免疫反応における RHBDF2の役割を明らかにした。

## 4. 研究成果：

(1) 細胞死耐性遺伝子ロンボイドの同定  
前述のようにサイクリックパッケージングレスキュー法を5度繰り返すことによって RHBDF2を同定し、RHBDF2過剰発現させた TNF感受性細胞株 L929細胞では、TNF $\alpha$ による細胞死に抵抗性を示すことが明らかとなった(図1)。

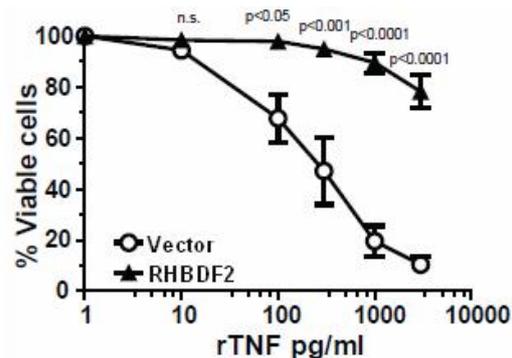


図1. RHBDF2過剰発現による TNF $\alpha$ に対する細胞死抵抗性の獲得

## (2) RHBDF2の作用点

次に RHBDF2における TNF $\alpha$ 抵抗性の分子メカニズムを検討するために、メタロプロテアーゼ阻害剤である BB-2516存在下で TNF $\alpha$ 処理を行なったところ RHBDF2を発現している細胞で見られた TNF $\alpha$ 抵抗性が阻害された(図2)。このことより RHBDF2による TNF $\alpha$ 抵抗性はメタロプロテアーゼ活性に依存していると考えられる。

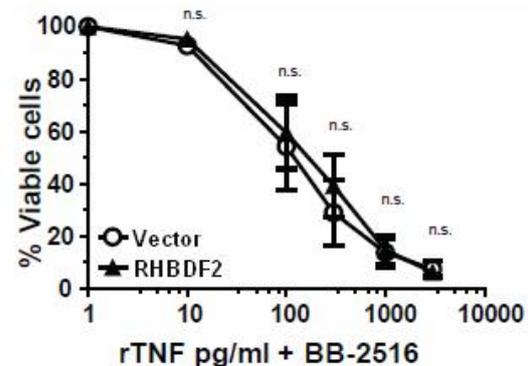


図2. メタロプロテアーゼ阻害剤 BB-2516存在下では RHBDF2過剰発現による TNF $\alpha$ の細胞死抵抗性は抑制される。

(3) RHBDF2 ノックアウトマウスの作成  
*in vivo* における RHBDF2 の TNF  $\alpha$  抵抗性メカニズムを検討するために、RHBDF2 ゲノム遺伝子のエクソン 4-14 を PGKneo カセットに組み替えた ES 細胞を作成し、RHBDF2 ノックアウトマウスを作成した (図 3)。

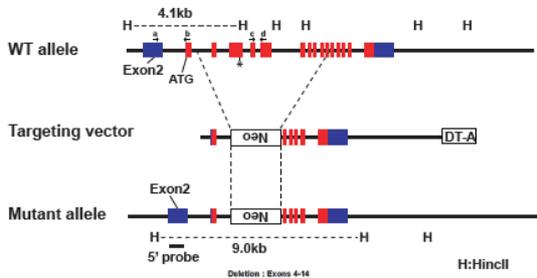


図 3. RHBDF2 ノックアウトマウス作成のための遺伝子構築

(4) RHBDF2 ノックアウトマウスにおける LPS 刺激における TNF  $\alpha$  産生能の検討

作成した RHBDF2 ノックアウトマウスは正常に生まれ、成体まで育ち、生殖能力にも影響は認められなかった。このことより、RHBDF2 遺伝子は個体発生と生存に必須ではないことが明らかとなった。

しかし、TNF  $\alpha$  産生能を検討するために、RHBDF2 ノックアウトマウスに LPS を投与後、3 時間では顕著に TNF  $\alpha$  の産生が抑制されていることがわかった (図 4)。

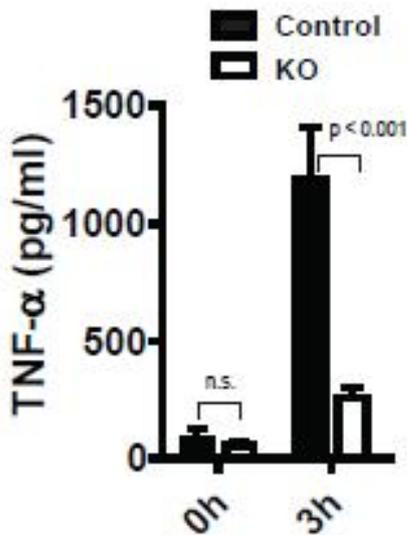


図 4. LPS 投与による血中の TNF  $\alpha$  産生量の検討。LPS 投与なしでは (0h) ではコントロールとは顕著な差がないのに対して、LPS 投与後、3 時間における血中の TNF 濃度は、RHBDF2 ノックアウトマウスで顕著な産生抑制が観察された。

(5) RHBDF2 ノックアウトマウスにおけるエンドトキシンショック耐性能の検討

D-ガラクトサミン (Dgal) は細菌外膜のリポ多糖 (LPS) とともに、マウスに投与すると肝臓に著しい障害が誘導され、24 時間以内に致死が誘導される。このため、エンドトキシンショックモデルとして頻用される。そこでこのモデルを用いて RHBDF2 ノックアウトマウスにおけるエンドトキシンショック耐性能を検討したところ 70% の RHBDF2 ノックアウトマウスが、D-gal と LPS 投与後 48 時間後においても生存していた (図 5)。

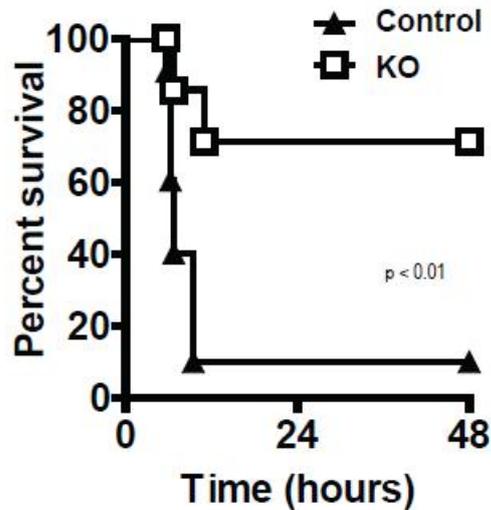


図 5. RHBDF2 ノックアウトマウスにおけるエンドトキシンショック耐性能の検討

(6) RHBDF2 ノックアウトマウスにおけるリステリア菌に対する抵抗性

次に RHBDF2 における TNF  $\alpha$  産生と細菌感染の関与を検討するために、RHBDF2 ノックアウトマウスからチオグリコレート誘導によって得られた腹腔滲出性マクロファージに、リステリア菌を感染させて TNF  $\alpha$  産生能の検討を行なったところ、野性型ではリステリア菌の濃度に依存して明らかな TNF  $\alpha$  増加が観察されたのに対して、RHBDF2 ノックアウトマウスでは顕著に抑制されていた (図 6)。

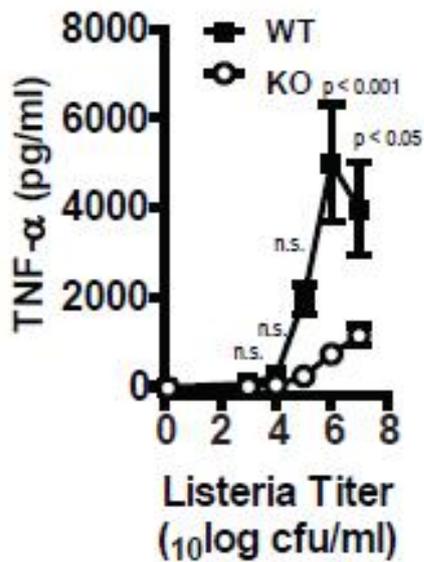


図6. RHBDF2 ノックアウトマウス由来腹腔滲出性マクロファージにおけるリステリア菌に対する TNF $\alpha$  産生能の抑制

以上の結果より自然免疫反応において、RHBDF2 はメタロプロテアーゼ依存的に TNF $\alpha$  産生を直接制御することで、炎症反応を制御する分子である可能性を示唆した。これらの結果は現在論文投稿中である。

#### 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)

特になし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

濱田 浩一 (HAMADA KOICHI)  
 熊本大学・エイズ学研究センター・特定事業研究員  
 研究者番号：00343070

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし