

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659404

研究課題名（和文） 慢性炎症解除のための標的分子および細胞の探索

研究課題名（英文） Identification of target protein(s) to abrogate chronic inflammation

研究代表者

中野 裕康 (NAKANO Hiroyasu)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70276476

研究成果の概要（和文）：

*Traf2*欠損マウス由来の末梢血および骨髄細胞中に IL-10 を産生する好中球が TNF α 依存性に増加していることを見出した。骨髄キメラマウスの実験から、*Traf2* 欠損マウス由来の骨髄細胞そのものが IL-10 産生を起しやすいい内在性の欠損を有していることが示唆された。さらに抗 TNF α 抗体と抗 IL-10 中和抗体の両者の抗体を併用したところ *Traf2*欠損マウスの長期の生存が認められたことから、IL-10 産生性好中球が免疫抑制的に働いており、*Traf2*欠損マウスで誘導された大腸炎の増悪に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

IL-10-secreting neutrophils accumulated in peripheral blood and bone marrow (BM) cells from *Traf2*^{-/-} mice compared to wild-type mice. Treatment of *Traf2*^{-/-} mice with neutralizing antibody against TNF α or crossing *Traf2*^{-/-} mice with *Tnfr1*^{-/-} mice reduced the percentages of IL-10-secreting neutrophils, suggesting that the development of IL-10-secreting neutrophils largely depended on TNF α signal. Finally, combined treatment of *Traf2*^{-/-} mice with neutralizing antibodies against TNF α and IL-10, but not each antibody alone, substantially ameliorated colitis and prolonged survival. Together, abrogation of immunosuppressive conditions mediated by IL-10-secreting neutrophils might be an alternative strategy to treat chronic inflammatory diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	84,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：TRAF2、腸炎、インターロイキン 10、TNF α 、好中球

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症は生活習慣病やがんなど、様々な疾患の発症あるいは増悪に関与していることが明らかにされつつある。慢性炎症は急性炎症とは質的に異なることが示唆されているが、その分子基盤については不明な点が多く、それに関与する分子を同定することは、生活習慣病などに対する新たな治療法を開発する上で急務である (Nathan *et al* *Cell*, 2010)。一方で、担がん状態や慢性炎症時に Gr-1+CD11b+陽性の未熟な MDSCs と呼ばれる細胞が、増加してくることが明らかにされ、その細胞が T 細胞機能を抑制することが明らかにされているが、その分化過程や増殖のメカニズムについては不明な点が多い (Gabrilovich *et al*, *Nat Rev Immunol* 2009; Ostrand-Rosenberg *et al*, *J Immunol* 2009)。

我々はこれまでに TNF receptor-associated factor (TRAF) ファミリー分子の一つである TRAF5 の遺伝子クローニングおよびそのノックアウトマウスの作製、さらには NF- κ B の活性化に必須の役割を果たす I κ B kinase の活性調節のメカニズムの解析を行ってきた (*J Biol Chem* 1996, 1997, 2001; *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 1999; *Mol Cell* 1999; *Gene Dev* 2003)。その後 NF- κ B の新たな細胞死抑制機能の一つが、TNF α 刺激により誘導される活性酸素 (ROS) の抑制であることを明らかにした (*EMBO J* 2003, 2006; *J Biol Chem* 2005; *EMBO rep* 2005; *Cell Death Differ* 2006)。最近我々は、*Traf2*^{-/-}マウスはパイエル板の低形成が認められること (Piao *et al*, *J Immunol* 2007)、および TNF α による大腸上皮のアポトーシスが亢進し、その結果非常に強い大腸炎が発症することを見いだした (Piao *et al*, *J Biol Chem* 2011)。さらに興味深いことに、このマウスでは担がん状態や慢性炎症状態のマウスで出現してく

る事の知られている IL-10 を産生する Gr-1+CD11b+細胞 (MDSC) s と呼ばれる免疫抑制能を有する細胞集団が骨髄、末梢血、大腸で増加しているという現象を見いだした。

2. 研究の目的

慢性炎症や担がん状態で骨髄由来サプレッサー細胞 (MDSCs) と呼ばれる免疫抑制機能を有する細胞が増加してくることが示されているものの、その分化過程は不明な点が多い。我々は TNF シグナルに関与するアダプター分子である *Traf2*^{-/-}マウスの解析の過程で、このマウスに大腸炎が TNFR1 依存性に発症すること、MDSCs が増加するという現象を見いだした。そこで本研究では、*traf2*^{-/-}マウスの大腸炎をモデルとして、これまでに不明な点の多かった MDSCs の分化・増殖のメカニズムを明らかにし、さらにこの細胞を標的とした炎症性腸疾患の治療についての検討を行う。

3. 研究の方法

(1) *Traf2*^{-/-}マウスは骨髄、末梢血、大腸において IL-10 産生をする Gr-1+CD11b+細胞 (いわゆる MDSCs 細胞) が増加しているという現象を見出した。大腸炎は抗生物質を投与することで改善することから、MDSCs の増加が大腸炎の発症や腸炎の維持に関与するかを明らかにするために、*Traf2*^{-/-}マウスに抗生物質を投与し、MDSCs 細胞が減少するかを検討する。

(2) MDSCs の増加が骨髄由来細胞の TRAF2 の欠損の結果なのか、あるいは単に大腸炎が起こっているという周囲の環境によっているかを明らかにするために、野生型マウスに致死量の放射線を照射し *Traf2*^{-/-}マウスより骨髄を野生型マウスに移入する骨髄キメラマウスを作製し、大腸炎を発症しない環境でも *Traf2*^{-/-}マウス骨髄由来の MDSCs 細胞が

増加してくるかを検討する。

(3) *Traf2*^{-/-}マウスは *Tnfr1*^{-/-}マウスと交配することにより大腸炎が改善することを我々は明らかにしている (*Piao et al, J Biol Chem 2011*)。そこで、大腸炎が存在せず、かつ TNFR1 を介するシグナルが存在しない状況の *Traf2*^{-/-}; *Tnfr1*^{-/-}マウスの骨髄中に MDSCs が増加してくるかを明らかにする。

(4) 一度慢性炎症のプログラムが発動した場合には、免疫抑制状態と持続する炎症との悪循環が形成される可能性がある。そこで MDSCs の細胞表面マーカーの一つである Gr-1 に対する抗体を *in vivo* 投与し、MDSCs 細胞を除去した場合に、大腸炎が改善するかを検討する。

(5) また MDSCs が LPS 刺激依存性に IL-10 を産生すること、および IL-10 は IL-10 産生細胞の増殖を促進している可能性があることから、IL-10 に対する中和抗体を *in vivo* 投与することにより、MDSCs が減少するか、また *Traf2*^{-/-}マウスの大腸炎が改善するかを明らかにする。

4. 研究成果

Traf2^{-/-}マウス由来の末梢血および骨髄細胞中に IL-10 を産生する CD11b+Gr-1+Ly-6G+ 細胞(いわゆる好中球)が増加していることを見出した。*Traf2*^{-/-}マウスへの抗 TNF α 中和抗体を投与や、*Traf2*^{-/-}マウスを *Tnfr1* 欠損マウスと交配することにより IL-10 産生好中球は有意に減少する事から、TNF α 依存性のシグナルが関与している事が明らかとなった。また骨髄キメラマウスを用いた実験から、*Traf2*^{-/-}マウス由来の骨髄細胞を移入した野生型マウスでも IL-10 産生好中球が増加することから、*Traf2*^{-/-}マウス由来の骨髄細胞そのものが IL-10 産生を起こしやすい内在性の欠損を有していることが示唆された。

また IL-10 産生好中球は野生型マウス由来の好中球を LPS や Pam3CS(K)4 などの Toll

様受容体 (TLR)4 や TLR2 などのリガンドで刺激することによっても生じ、さらにそれは抗

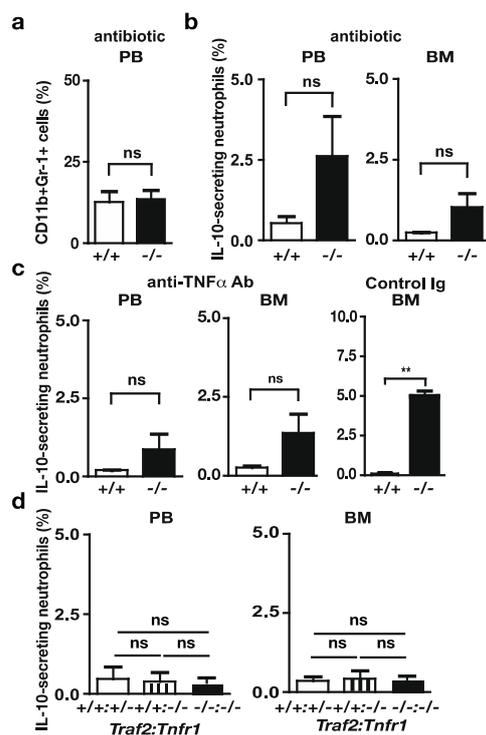


図1. IL-10産生好中球は抗生物質や抗TNF α 抗体投与により現象する

TNF α 中和抗体で部分的に抑制されたことから、IL-10 産生好中球の増加は *Traf2*^{-/-}マウスでしか見られない現象ではなく、なんらかの炎症時に誘導されてくる可能性が示唆された。

そこで、最後に IL-10 産生好中球の病理的な役割を明らかにするために、*Traf2*^{-/-}マウスに抗 TNF α 抗体と抗 IL-10 中和抗体を投与したところ、両者の抗体を併用した群で大腸炎の改善とともに、*Traf2*^{-/-}マウスの長期の生存が認められたことから、IL-10 を産生する好中球が免疫抑制的に働いており、*Traf2*^{-/-}マウスで誘導された大腸炎の増悪に関与している可能性が示唆された。

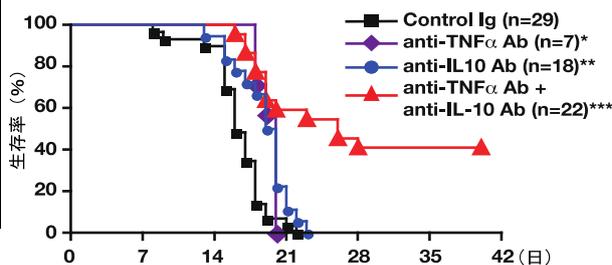


図2. 抗TNF α 抗体および抗IL-10抗体の併用により大腸炎が改善し、*Traf2*欠損マウスは長期生存する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 14 件)

以下の論文はすべて査読あり

1. Wang, L., Y. Lu, H. Guan, D. Jiang, Y. Guan, X. Zhang, H. Nakano, Y. Zhou, Y. Zhang, L. Yang, and H. Li. 2013. Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 5 is an Essential Mediator of Ischemic Brain Infarction. *J Neurochem*. in press.
2. Shindo, R., H. Kakehashi, K. Okumura, Y. Kumagai, and *H. Nakano. 2013. Critical contribution of oxidative stress to TNF α -induced necroptosis downstream of RIPK1 activation. *Biochem Biophys Res Commun*. in press.
3. Ly, D.L., F. Waheed, M. Lodyga, P. Speight, A. Masszi, H. Nakano, M. Hersom, S.F. Pedersen, K. Szaszi, and A. Kapus. 2013. Hyperosmotic stress regulates the distribution and stability of myocardin-related transcription factor, a key modulator of the cytoskeleton. *Am J Physiol Cell Physiol* 304:C115-127.
4. Ashida, H., H. Nakano, and C. Sasakawa. 2013. Shigella IpaH0722 E3 ubiquitin ligase effector targets TRAF2 to inhibit PKC-NF- κ B activity in invaded epithelial cells. *PLoS Pathogens*. in press.
5. Piao, X., S. Komazawa-Sakon, T. Nishina, M. Koike, J.H. Piao, H. Ehlken, H. Kurihara, M. Hara, N. Van Rooijen, G. Schutz, M. Ohmuraya, Y. Uchiyama, H. Yagita, K. Okumura, Y.W. He, and *H. Nakano. 2012. c-FLIP Maintains Tissue Homeostasis by Preventing Apoptosis and Programmed Necrosis. *Sci Signal* 5:ra93.
6. Piao, J.H., H. Yagita, K. Okumura, and *H. Nakano. 2012. Aberrant accumulation of interleukin-10-secreting neutrophils in TRAF2-deficient mice. *Immunol Cell Biol* 90:881-888.
7. Nishina, T., S. Komazawa-Sakon, S. Yanaka, X. Piao, D.M. Zheng, J.H. Piao, Y. Kojima, S. Yamashina, E. Sano, T. Putoczki, T. Doi, T. Ueno, J. Ezaki, H. Ushio, M. Ernst, K. Tsumoto, K. Okumura, and *H. Nakano. 2012. Interleukin-11 links oxidative stress and compensatory proliferation. *Sci Signal* 5:ra5.
8. Minami, T., K. Kuwahara, Y. Nakagawa, M. Takaoka, H. Kinoshita, K. Nakao, Y. Kuwabara, Y. Yamada, C. Yamada, J. Shibata, S. Usami, S. Yasuno, T. Nishikimi, K. Ueshima, M. Sata, H. Nakano, T. Seno, Y. Kawahito, K. Sobue, A. Kimura, R. Nagai, and K. Nakao. 2012. Reciprocal expression of MRTF-A and myocardin is crucial for pathological vascular remodelling in mice. *EMBO J* 31:4428-4440.
9. Ushio, H., T. Ueno, Y. Kojima, M. Komatsu, S. Tanaka, A. Yamamoto, Y. Ichimura, J. Ezaki, K. Nishida, S. Komazawa-Sakon, F. Niyonsaba, T. Ishii, T. Yanagawa, E. Kominami, H. Ogawa, K. Okumura, and *H. Nakano. 2011. Crucial role for autophagy in degranulation of mast cells. *J Allergy Clin Immunol* 127:1267-1276 e1266.
10. Tokunaga, F., T. Nakagawa, M. Nakahara, Y. Saeki, M. Taniguchi, S. Sakata, K. Tanaka, H. Nakano, and K. Iwai. 2011. SHARPIN is a component of the NF- κ B-activating linear ubiquitin chain assembly complex. *Nature* 471:633-636.
11. 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* 286:17879-17888.
12. *Nakano, H., and H. Ushio. 2011. An unexpected role for autophagy in degranulation of mast cells. *Autophagy* 7:657-659.
13. Kojima, Y., M. Nakayama, T. Nishina, H. Nakano, M. Koyanagi, K. Takeda, K. Okumura, and H. Yagita. 2011. Importin beta1 Protein-mediated Nuclear Localization of Death Receptor 5 (DR5) Limits DR5/Tumor Necrosis Factor (TNF)-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL)-induced Cell Death of Human Tumor Cells. *J Biol Chem* 286:43383-43393.
14. Charbonney, E., P. Speight, A. Masszi, H. Nakano, and A. Kapus. 2011. beta-catenin and Smad3 regulate the activity and stability of myocardin-related transcription factor during epithelial-myofibroblast transition. *Mol Biol Cell* 22:4472-4485.
- [学会発表] (計 20 件)
- ① 中野裕康, 酸化ストレスと組織修復を連結する因子の同定, 第 20 回日本 Cell Death 学会学術集会 (招待講演), 2011 年 7 月 29 日, 東京大学薬学総合研究棟講堂 (東京都) .
- ② 中野裕康, 酸化ストレスと組織修復を連結する因子の同定, 第 54 回日本放射線影響学会 (招待講演), 2011 年 11 月 18 日, 神戸商工会議所会館 (神戸市) .
- ③ 中野裕康, Interleukin 11 links oxidative stress and compensatory proliferation, 第 40 回日本免疫学会総会、2011 年 11 月 27 日, 幕張メッセ (千葉市) .
- ④ Nishina et al, Interleukin 11 links oxidative stress and compensatory proliferation, 13th International TNF Conference, 2011 年 5 月 15~18 日, 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県) .
- ⑤ Piao et al, TRAF2 controls homeostasis of the colon to prevent spontaneous development of murine inflammatory bowel disease, 13th International TNF Conference, 2011 年 5 月 15~18 日, 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県) .
- ⑥ 仁科隆史 他, 酸化ストレスにより誘導される IL-11 は代償性増殖に関与する, 第 20 回日本 Cell Death 学会学術集会, 2011 年 7 月 29 日, 東京大学薬学総合研究棟講堂 (東京都) .
- ⑦ 朴将虎他, TRAF2 controls homeostasis of the colon to prevent spontaneous development of inflammatory bowel disease, 第 20 回日本 Cell Death 学会学術集会, 2011 年 7 月 29 日, 東京大学薬学総合研究棟講堂 (東京都) .
- ⑧ Xuehua Piao et al, An essential role for cellular FLICE inhibitory protein in the postnatal development and protection of hepatocytes from Necrosis and apoptosis, 第 40 回日本免疫学会総会、2011 年 11 月 29 日, 幕張メッセ (千葉市) .
- ⑨ Jiang-Hu Piao et al, Aberrant accumulation of IL-10-producing Gr1+CD11b+ neutrophils in *Traf2*^{-/-} mice, 第 40 回日本免疫学会総会、2011 年 11 月 29 日, 幕張メッセ (千葉市) .
- ⑩ 仁科 隆史他, Interleukin 11 links oxidative stress and compensatory

proliferation、第 34 回日本分子生物学会
年会、2011 年 12 月 15 日、パシフィコ横
浜（横浜市）。

- ⑪ Takashi Nishina et al, Interleukin 11 links Oxidative Stress and Compensatory Proliferation、Symposium on Biological Complexity: Immunity and Inflammation, 2012 年 1 月 18-20 日, Salk Institute, San Diego, USA.
- ⑫ Hiroyasu Nakano et al, An Indispensable Role for c-FLIP in Postnatal Survival of Hepatocytes by Preventing Apoptosis and Necrosis, 2012 年 1 月 18-20 日, Salk Institute, San Diego, USA.
- ⑬ 中野裕康 他, 酸化ストレスにより誘導される IL-11 が肝細胞の代償性増殖を誘導する, 第 19 回肝細胞研究会・シンポジウム, 平成 24 年 6 月 29 日～30 日, 札幌医科大学臨床教育研究棟, 札幌.
- ⑭ 中野裕康, c-FLIP maintains tissue homeostasis by preventing apoptosis and necroptosis, 第 35 回日本分子生物学会年会・ワークショップ (招待講演)、平成 24 年 12 月 11～14 日, 福岡マリンメッセ.
- ⑮ 仁科隆史他, 親電子分子による IL-11 産生機構の解明, 35 回日本分子生物学会年会・ワークショップ, 平成 24 年 12 月 11～14 日, 福岡マリンメッセ.
- ⑯ 朴雪花他, c-FLIP maintains tissue homeostasis by preventing apoptosis and necroptosis, 第 41 回日本免疫学総会, 平成 24 年 12 月 5～7 日, 神戸交際会議場.
- ⑰ Hiroyasu Nakano, Interleukin 11 links Oxidative Stress and Compensatory Proliferation, The 33rd NAITO

Conference on Oxygen Biology: Hypoxia, Oxidative Stress and Diseases, 平成 24 年 6 月 26～29 日, Sapporo, Japan.

- ⑱ Xuehua Piao et al, An essential Role for c-FLIP in maintaining homeostasis of the intestine and the liver by preventing apoptosis and programmed necrosis, The 12th Biennial International Endotoxin & Innate Immunity Society (IEIIS) meeting, 平成 24 年 10 月 23～26 日, Tokyo, Japan.
- ⑲ Takashi Nishina et al, Interleukin 11 links Oxidative Stress and Compensatory Proliferation, The 12th Biennial International Endotoxin & Innate Immunity Society (IEIIS) meeting, 平成 24 年 10 月 23～26 日, Tokyo, Japan.
- ⑳ Hiroyasu Nakano, Oxidative stress maintains tissue homeostasis by inducing compensatory proliferation, International Symposium 2012 on Signaling Functions of Reactive Oxygen Species (招待講演), 平成 24 年 12 月 17 日, Fukuoka, Japan.

[その他]

ホームページ ;
<http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/meneki/home.html>

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