

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 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790067

研究課題名（和文） 自然・獲得両免疫系の連携における TYK2 の役割の解明

研究課題名（英文） The role of TYK2 in innate and acquired immune system

研究代表者

室本 竜太（MUROMOTO RYUTA）

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：30455597

研究成果の概要（和文）：本研究は炎症性免疫疾患における JAK チロシンキナーゼ Tyk2 の役割解明を目指し Tyk2 遺伝子欠損マウスを用い種々の病態モデル解析を行った。ヘルパーT細胞のサブセット Th1 細胞や Th17 細胞と関連する炎症病態(メチル化 BSA 誘導性遅延型過敏症、イミキモド誘導性乾癬様皮膚炎症、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸誘導性大腸炎、デキストラン硫酸ナトリウム誘導性大腸炎、等)の形成に Tyk2 が寄与することが判明した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the in vivo involvement of Tyk2 in several IL-12/Th1- and IL-23/Th17-mediated models of experimental diseases, including methylated BSA injection-induced footpad thickness, imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation, and dextran sulfate sodium-induced colitis. In these disease models, Tyk2 deficiency influenced the phenotypes in immunity and/or inflammation.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

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：免疫学、炎症、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

成体防御の中心を担う免疫応答系は、自然免疫系と獲得免疫系とに大別され、それぞれ、様々な機能をもつ多くの担当細胞によって構成される。マクロファージ等の自然免疫細胞は Toll 様受容体(TLR) ファミリーや、NOD 様受容体、細胞内 DNA センサーなど、細胞内外に発現する異物認識機構を介して速やかな応答を引き起こす。これらの自然免疫受容体は特有のアダプター分子と NF- κ B など転写因子からなるシグナル伝達系の活性化を介して、サイトカインを迅速に産生して炎症を促進し、獲得免疫系リンパ球の活性化、動員を行う。獲得免疫の中核を担うヘル

パーT細胞は自然免疫系細胞によって産生されたサイトカインによって Th1、Th2、Th17 などの異なる役割をもつサブセットに分化誘導されそれぞれがエフェクターサイトカインを産生して機能を発揮する。これらは異物・病原体を効率的に排除するために巧妙に構築されたシステムであり、この自然・獲得両免疫系の連携において、サイトカインは橋渡し役としてきわめて重要な働きをしている。

サイトカイン受容体の下流で活性化される細胞内シグナル伝達経路は、非受容体型チロシンキナーゼ JAK ファミリーと転写因子 STAT から構成される。この「JAK-STAT系」は特に免疫系の制御・恒常性維持に重要

な役割をもち、その制御の破綻がリンパ腫や骨髄増殖性疾患、あるいは免疫不全症の発症につながるものが現在までに明らかにされている (Ghoreschi ら、*Immunological Reviews* 2009;228:273-)。JAK ファミリーキナーゼのひとつである Tyrosine kinase 2 (TYK2)の遺伝子欠損マウスでは IL-12 受容体下流のシグナル伝達が起こらないため T 細胞や NK 細胞からの IFN- γ 産生が抑制され、Th1 型細胞への分化に支障をきたし、免疫応答バランスに異常をきたす結果、アレルギーを起こしやすくなることが明らかとされている。またヒトにおける TYK2 遺伝子の欠損が IL-12 やインターフェロンを含む様々なサイトカインシグナル伝達に異常をきたす結果、高 IgE 症候群と呼ばれる免疫不全疾患を引き起こすことも報告された (Minegishi ら、*Immunity* 2006;25:745-)。

これらは TYK2 がさまざまな病原体排除のために重要な役割をもつことを示しており、種々の免疫異常状態の改善を成し遂げるためには TYK2 に対する人為的機能調節がひとつのポイントとなりうることを示唆する。TYK2 の機能解析はこれまでサイトカイン受容体下流のシグナル伝達への関与の検証がほとんどであり、TYK2 が自然免疫系細胞において果たす役割については不明点が多く残されていた。

2. 研究の目的

本研究では一連の解析を通し炎症性免疫疾患における TYK2 のあらたな役割を同定し、さらに TYK2 機能に対する制御機構を解明することにより、アレルギーや感染症に対する新しい治療戦略の考案につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

In vivo における Tyk2 の役割を解析するため研究には BALB/c マウスおよび当研究室所有の BALB/c 背景 Tyk2 欠損マウスを用いた。本研究ではまず種々の Th1/Th17 関連病態モデル (メチル化 BSA 誘導性遅延型過敏症、イミキモド誘導性乾癬様皮膚炎症、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸誘導性大腸炎、デキストラン硫酸ナトリウム誘導性大腸炎、抗 II 型コラーゲン抗体誘発関節炎) について、Tyk2 の関与を調べた (原著論文 7, 8)。

また本研究ではグラム陽性菌 *P. acnes* 死菌をマウスに腹腔内投与することで誘発される急性炎症応答について、Tyk2 欠損による影響を調べた。腹腔内急性炎症反応の指標として、炎症性サイトカイン TNF- α 並びに IL-6 産生を ELISA 法で調べた。炎症にともなう好中球浸出は好中球特異的細胞表面抗原に対

する抗体を用いフローサイトメトリーにより計測した。*P. acnes* 死菌で刺激されたマクロファージ内での mRNA 発現は逆転写反応および定量 PCR 法で解析した。

4. 研究成果

Tyk2 欠損マウスを用い現在までに国内外で未検討であった種々の病態モデルについて解析し、ヘルパー T 細胞のサブセット Th1 細胞や Th17 細胞と関連するさまざまな炎症病態 (メチル化 BSA 誘導性遅延型過敏症、イミキモド誘導性乾癬様皮膚炎症、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸誘導性大腸炎、デキストラン硫酸ナトリウム誘導性大腸炎、抗 II 型コラーゲン抗体誘発関節炎) の形成に Tyk2 が寄与することが明らかとなった。この成果は炎症促進における Tyk2 の役割がこれまで推定されていた以上に多岐にわたることを示唆する。

さらに耳介への IL-23 投与で誘発される乾癬様皮膚炎症モデルを用い、皮膚炎症促進における Tyk2 の役割の解析を進めた。野生型マウスと比べ Tyk2 欠損マウスでは IL-23 誘導性の表皮肥厚や炎症細胞の浸潤が抑制され、IL-17 や IL-22 等サイトカインや抗菌ペプチド産生も減弱した。また、Tyk2 欠損マウスでは IL-22 直接投与で誘発される表皮肥厚も抑制されたことから、この実験系において Tyk2 は IL-23 投与後の IL-22 産生に寄与するのみならず IL-22 によるシグナル伝達にも役割をもつことがわかった。以上の結果から乾癬病態形成への Tyk2 の寄与が示唆された。

上述のデキストラン硫酸ナトリウム誘導性大腸炎やマウス抗 II 型コラーゲン抗体誘発関節炎モデルはリンパ球機能に非依存的な疾患モデルであるとの報告もあることから、Tyk2 が自然免疫細胞内において炎症促進に寄与する未知メカニズムの存在が示唆される。本研究では、グラム陽性菌 *P. acnes* 死菌をマウスに腹腔内投与することで誘発される以下の炎症応答が Tyk2 欠損マウスで抑制されることを見出した。すなわち *P. acnes* 投与後の腹腔内急性炎症反応 (炎症性サイトカイン TNF- α 並びに IL-6 産生、好中球浸出)、血清中 IFN- γ 増加、肝臓内肉芽種形成反応が抑制された。さらに炎症に役割をもつマクロファージ機能に着目し Tyk2 の役割を調べた結果、単球走化性因子 Monocyte Chemoattractant Protein-1 (Mcp-1) 等、数種のケモカイン mRNA 量が、野生型に比べ Tyk2 欠損マウス由来骨髄マクロファージで有意に低下していることを見出した。ケモカインタンパク群は炎症組織への免疫細胞の遊走や細胞間の情報のやりとりに関与することが報告されていることから、Tyk2 が炎症を促進する分子機構のひとつとしてケモカイン遺伝子発現への寄

与が含まれることが示唆された。

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 9 件)

- (1) Muromoto R. Death domain-associated protein (DAXX)-mediated regulation of transcription and cell death. *Yakugaku Zasshi*. 査読有、2012, 132(9):979-984.
DOI: 10.1248/yakushi.132.979
- (2) Sekine Y, Yamamoto C, Kakisaka M, Muromoto R, Kon S, Ashitomi D, Fujita N, Yoshimura A, Oritani K, Matsuda T. Signal-transducing adaptor protein-2 modulates Fas-mediated T cell apoptosis by interacting with caspase-8. *J Immunol*. 査読有、2012, 188(12):6194-6204.
DOI: 10.4049/jimmunol.1103467
- (3) Kojima H, Muromoto R, Takahashi M, Takeuchi S, Takeda Y, Jetten AM, Matsuda T. Inhibitory effects of azole-type fungicides on interleukin-17 gene expression via retinoic acid receptor-related orphan receptors α and γ . *Toxicol Appl Pharmacol*. 査読有、2012, 259(3):338-345.
DOI: 10.1016/j.taap.2012.01.011
- (4) Sekine Y, Ikeda O, Mizushima A, Ueno Y, Muromoto R, Yoshimura A, Kanakura Y, Oritani K, Matsuda T. STAP-2 interacts with and modulates BCR-ABL-mediated tumorigenesis. *Oncogene*. 査読有、2012, 31(40):4384-4396.
DOI: 10.1038/onc.2011.604
- (5) Tanaka T, Yamamoto Y, Muromoto R, Ikeda O, Sekine Y, Grusby MJ, Kaisho T, Matsuda T. PDLIM2 inhibits T helper 17 cell development and granulomatous inflammation through degradation of STAT3. *Sci Signal*. 査読有、2011, 4(202):ra85.
DOI: 10.1126/scisignal.2001637
- (6) Kamitani S, Togi S, Ikeda O, Nakasuji M, Sakauchi A, Sekine Y, Muromoto R, Oritani K, Matsuda T. Krüppel-associated box-associated protein 1 negatively regulates TNF- α -induced NF- κ B transcriptional activity by influencing the interactions among

STAT3, p300, and NF- κ B/p65. *J Immunol*. 査読有、2011, 187(5):2476-83.

DOI: 10.4049/jimmunol.1003243

- (7) Ishizaki M, Muromoto R, Akimoto T, Ohshiro Y, Takahashi M, Sekine Y, Maeda H, Shimoda K, Oritani K, Matsuda T. Tyk2 deficiency protects joints against destruction in anti-type II collagen antibody-induced arthritis in mice. *Int Immunol*. 査読有、2011, 23(9):575-82.
DOI: 10.1093/intimm/dxr057
- (8) Ishizaki M, Akimoto T, Muromoto R, Yokoyama M, Ohshiro Y, Sekine Y, Maeda H, Shimoda K, Oritani K, Matsuda T. Involvement of tyrosine kinase-2 in both the IL-12/Th1 and IL-23/Th17 axes in vivo. *J Immunol*. 査読有、2011, 187(1):181-189.
DOI: 10.4049/jimmunol.1003244
- (9) Peng DJ, Zeng M, Muromoto R, Matsuda T, Shimoda K, Subramaniam M, Spelsberg TC, Wei WZ, Venuprasad K. Noncanonical K27-linked polyubiquitination of TIEG1 regulates Foxp3 expression and tumor growth. *J Immunol*. 査読有、2011, 186(10):5638-5647.
DOI: 10.4049/jimmunol.1003801

[学会発表] (計 15 件)

- (1) 相馬悠樹ほか、ケモカイン産生における Tyk2 の役割の解析 日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 27-30 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
- (2) 小島弘幸ほか、核内受容体 ROR α / γ 依存的 IL-17 産生に及ぼすイソフラボン類の影響 日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 27-30 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
- (3) ISHIZAKI Masayuki et al. Tyk2 has a critical role in psoriasis-like skin inflammation in mice、第 41 回日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 5-7 日、神戸国際会議場 (神戸市)
- (4) TOGI Sumihito et al. An RNA binding protein, Y14 regulates TNF- α -induced NF- κ B activation and IL-6 expression、第 41 回日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 5-7 日、神戸国際会議場 (神戸市)
- (5) TAKAHASHI Miki et al. A plant-derived isoflavone, Biochanin A enhances IL-17 production in T cells、第 41 回日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 5-7 日、神戸国際会議場 (神戸市)
- (6) Ryuta Muromoto et al. An RNA binding protein Y14 is a regulator of

TNF- α -induced NF- κ B activation and IL-6 expression. International Endotoxin and Innate Immunity Society Meeting 2012 (IEIIS2012) October 23 - 26, 2012, National Center of Sciences Building, Tokyo, Japan

- (7) 高橋美妃ほか、炎症性サイトカイン IL-17 産生に及ぼす Biochanin A の影響に関する研究、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 28-31 日、北海道大学 (札幌市)
- (8) 大城裕也ほか、*P. acnes* 死菌誘導性実験的腹膜炎における Tyk2 の関与、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 28-31 日、北海道大学 (札幌市)
- (9) 研澄仁ほか、KAP1/STAT3 による TNF- α 誘導性 IL-6 発現経路の制御機構、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 28-31 日、北海道大学 (札幌市)
- (10) 高橋美妃ほか、炎症性サイトカイン IL-17 遺伝子発現に及ぼすバイオカニン A の影響に関する研究、日本薬学会北海道支部第 137 回例会、2011 年 12 月 3 日、北海道大学学術交流会館 (札幌市)
- (11) ISHIZAKI Masayuki et al. Involvement of Tyrosine Kinase-2 in both the IL-12/Th1 and IL-23/Th17 Axes In Vivo、第 40 回日本免疫学会学術集会、2011 年 11 月 27-29 日、幕張メッセ (千葉市)
- (12) TOGI Sumihito et al. Kruppel-associated box-associated protein 1 regulates TNF- α -induced IL-6 expression via STAT3、第 40 回日本免疫学会学術集会、2011 年 11 月 27-29 日、幕張メッセ (千葉市)
- (13) MUROMOTO Ryuta et al. Involvement of Tyrosine kinase 2 in inflammatory responses induced by heat-killed *Propionibacterium acnes*、第 40 回日本免疫学会学術集会、2011 年 11 月 27-29 日、幕張メッセ (千葉市)
- (14) 小島弘幸ほか、ROR γ t 依存的な IL-17 遺伝子発現誘導に対するイソフラボン類の影響、第 18 回日本免疫毒性学会学術大会、2011 年 9 月 8 日、千葉大学けやき会館 (千葉市)
- (15) 高橋美妃ほか、T 細胞によるインターロイキン-17 産生に影響する化学物質の探索、日本薬学会北海道支部第 136 回例会、2011 年 5 月 21 日、札幌コンベンションセンター (札幌市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/org/eisei01.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

室本 竜太 (MUROMOTO RYUTA)
北海道大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：30455597

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし