

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590949

研究課題名(和文)腫瘍壊死因子前駆体と産生酵素に介在する膜蛋白機能解析と新規抑制法の開発

研究課題名(英文)Development of membrane protein function analysis and the new suppression mediated by the tumor necrosis factor precursor and producing enzyme

研究代表者

城 卓志 (Joh, Takashi)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30231369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：大腸上皮細胞、単球細胞で多く発現がみられるARP 36-2に着目した。大腸上皮細胞株および単球細胞株をIL-1、TPA刺激すると、培養液中のTNF濃度が経時的に増加した。さらに、KB-R7785、siRNAによりADAM17を欠失すると、大腸上皮細胞、単球細胞でのIL-1、TPA刺激時TNF sheddingによる濃度上昇が、有意に抑制された。さらに、siRNAによりARP36-2を欠失しても、同様にIL-1、TPA刺激時TNF sheddingによる濃度上昇が、有意に抑制された。ARP36-2は、TNF sheddingを制御する炎症性腸疾患新規治療ターゲットになりうると思われた。

研究成果の概要(英文)：Colon epithelial cells, many expressed in monocyte cells I was paying attention to the ARP 36-2 seen. When IL-1 stimulates colon epithelial cell line, TNF concentration in the culture solution in over time increased but TPA, LPS, increase was observed. On the other hand, when the monocytic cell line TPA stimulation, TNF concentration in the culture solution is increased, IL-1, the stimulation with TPA, increase was observed. Further, when the deletion of the ADAM17 by KB-R7785, siRNA, colon epithelial cells, IL-1 in the monocyte cell, the concentration increase due to TPA stimulation during TNF shedding, was significantly inhibited. Furthermore, even if lacking the ARP36-2 by siRNA, similarly concentration rise due to IL-1, TPA stimulus during TNF shedding has been significantly suppressed. ARP36, it seemed to be made in inflammatory bowel disease novel therapeutic target to control the TNF shedding.

研究分野：消化器内科学

キーワード：ADAM17 ARP36-2 TNF 新規治療ターゲット 炎症性腸疾患

1. 研究開始当初の背景

(1) .ADAM17 介在蛋白の同定に関する背景と成果

ADAM17 は TNF α 産生酵素(TACE)としてよく知られている。しかし、同時に amphiregulin(AR)や HB-EGF など複数の膜蛋白を酵素基質とするが、これら基質を選択するメカニズムは全く分かっていない。申請者らは、ADAM17 の基質がアミノ酸配列の方向(C末端とN末端の方向)が逆である I 型 (AR や HB-EGF) および II 型 (TNF α) 膜蛋白のいずれにも及んでいることから、特別な結合蛋白の介在を想定し、まずは AR の放出時に AR と細胞膜上で複合体を形成する蛋白の同定を試みた。すなわち、AR 前駆体の切断が不能となる変異遺伝子を調整し HT1080 細胞に導入、TPA 刺激で切断シグナルを入れたところ、AR の免疫染色で細胞膜上に粗大な顆粒状の複合体が出現した(図 1)。この顆粒状複合体を抗 AR 抗体で免疫沈降、電気泳動で精製、Mass 解析を行ったところ新規 ARP36 を同定することができた。ARP36 は 12 個の類似体をもつファミリーで、AR の shedding 活性に重要な役割をもつ事実(日本分子生物学会 2010 発表、投稿 revise 中)を見出したことから、TNF α の shedding にも関わる可能性をいち早く推定することができた。

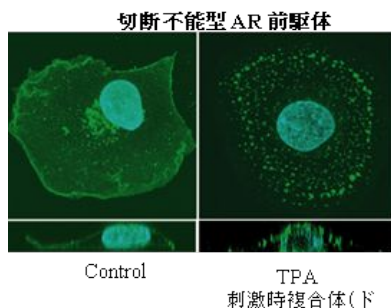


図 1 ット状形成

(2) . TNF α 放出の測定系の確立と成果

申請者らは、実験を進めるため、内因性 TNF α を分泌する大腸癌細胞 (HT29 など) と単球細胞 (U937) を見出し、IL-1 β 、LPS、TPA 刺激で培養液中に放出される TNF α の量を測定する実験系を確立した。さらに、TNF α の shedding を効率よく解析するために、新しい TNF α 強制発現系を開発した。すなわち、ヒト胎盤耐熱性アルカリフォスファターゼ (AP) で標識した TNF α 前駆体発現プラスミドベクターを作製した。このプラスミドを細胞株にトランスフェクションし、安定的に発現する細胞株を樹立した。AP-TNF α 発現細胞株は、各種サイトカインや炎症惹起物質(IL-1 β 、LPS、TPA)の刺激に反応し、培養液中に AP-TNF α

を放出するため AP 活性測定することにより、放出 TNF α 量を簡便に定量できるようになった。

申請者らは、加えて ARP36 ファミリーの 12 分子の siRNA を合成、この実験系でそれぞれの細胞に導入した結果、ARP36-2 の発現をノックアウトした際に、内因性 TNF α および強制発現 TNF α (図 2) のいずれの放出も劇的に阻害されることを確認した。

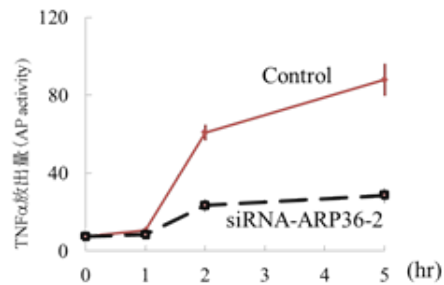


図 2

この結果は、ARP36 ファミリーが介在蛋白として TNF α の shedding を制御していること強く示していると同時に、細胞膜上で ARP36 分子と ADAM17 あるいは TNF α との複合体の形成を阻害することで、TNF α 産生を阻害できる可能性を強く示している(図 3)。

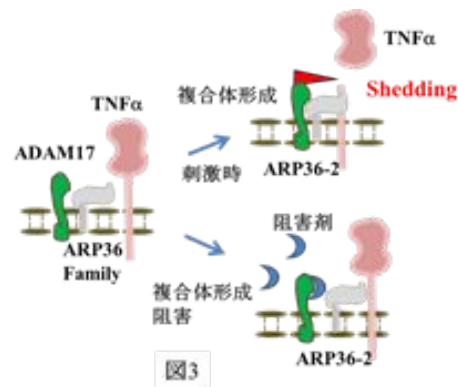


図 3

2. 研究の目的

炎症性腸疾患は、遺伝的背景や外的因子に対する過剰免疫反応が腸管粘膜傷害を起こす。TNF α はその病態において中心的役割を果たす。抗 TNF α 抗体治療は、有効な治療であるが、無効例や二次無効が存在する。膜結合型 TNF α は、ADAM17 により可溶性 TNF α に切断・放出される。ADAM17 が放出する蛋白は 2 型膜蛋白 TNF α のほか、1 型膜蛋白の AR、HB-EGF などがある。しかしながら、1 型、2 型膜蛋白の ADAM17 を介した細胞膜から放出の詳細なメカニズムは明らかになっていない。そこで、ADAM17 を介した 1 型、2 型

膜蛋白放出のメカニズムを明らかにし、抗 TNF α 抗体治療に代わる TNF α 抑制に關与する標的分子の発見、機能解析を研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 質量分析器を使った AR 結合蛋白の網羅的解析

AR が細胞膜から(すでに明らかにされている)切り出される部位に Flag tag を挿入し、shedding されない AR を発現するベクター(ucFlag-AR)を作成した(現在 Blood 誌投稿中)。大腸上皮細胞株 HT29 にトランスフェクションし安定的に発現する細胞株を樹立した。この細胞株を 8 倍容量の低張性バッファー(5mM Tris-HCl, pH7.4)に混合し、ホモジェネートした。さらに、compensation buffer(20mM Tris-HCl, 0.95M sucrose, 0.15M NaCl, pH7.4)を混合し、50000rpm の超遠心後細胞膜成分を分離した。RIPA buffer(25mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1%NP40, 0.1%SDS, 1% sodium deoxycholate)にて、細胞膜成分溶液を調整した。抗 Flag 抗体にて免疫沈降後、MALDI-TOFMS(島津製作所製)にて質量分析し、MASCOT(Mitrix Sciences, USA)解析システムにて網羅的に同定した。6 種類の新規分子(MCF2 cell derived transforming-like2, ARP36 など)を得た。これら新規分子が単球系細胞株(U937)やほかの大腸上皮細胞株(HT29, HCT116)でも検出されるか解析した。

(2) 大腸上皮および単球細胞株における TNF α 受容体と ADAM17 の存在スクリーニングと ADAM17 と ARP36-2 および TNF α と ARP36-2 の結合の解析

TNF- α 受容体(TNF- α R1, TNF- α R2)および ADAM17 の mRNA、蛋白発現レベルを、real time PCR と western 解析ですでに確認済み。大腸上皮細胞株(HCT116, HT29,) 単球細胞株(U937)において、ADAM17 と ARP36-2、さらには TNF α と ARP36-2 の結合を免疫沈降にて確認する。

具体的には、10 センチ培養皿に 90%コンフルエントまで培養し、48 時間 FBS(-)メディアに交換後、TNF α の shedding を誘導する TPA(60 nM), IL-1 β (10ng/ml)や LPS(10ng/ml)にて 15-240 分間刺激したあと、Lysis buffer(BC200;200mMNaCl, 0.2%NP-40, 25mMTris-HCl pH7.8, 10%glycerol, 1.0mM EDTA pH8.0)にて氷上で溶解後、遠心にて lysate のみとする。

ADAM17 に対する特異的認識モノクローナル抗体(1:500)または、抗 TNF α 抗体(1:500)を加え、2 時間 4 冷蔵庫内にて振盪後、セファロースビーズ G を加えさらに 2 時間振盪し、免疫沈降後、SDS-PAGE にて electrophoresis を行う。ニトロセルロース膜に転写後、抗 ARP36-2 抗体にて blot して確認する。さらに残りの細胞株においても TNF α 受容体および ADAM17 の発現レベルを確認し、ADAM17 と ARP36-2 および TNF α と ARP36-2 との結合を免疫沈降にて確認した。

(3) AP-TNF- α 前駆体発現細胞を使用し ARP36-2 ノックダウンによる TNF α shedding 抑制効果の解析

一過性 AP-TNF α を強発現させた大腸上皮細胞株(HCT116, HT29)および単球細胞株(U937)で TNF α shedding が、起こることを確認した。次に ARP36-2 ノックダウンの系で TNF α shedding が抑制されるかどうかを確認するため、ARP36-2 を siRNA で欠失させ、TNF α shedding が抑制されるか検討した。

4. 研究成果

大腸上皮細胞、単球細胞で ARP36-2 の発現を確認した。大腸上皮細胞株を IL-1 β 刺激すると、培養液中の TNF α 濃度が経時的に増加したが TPA, LPS では、増加はみられなかった。一方、単球細胞株を TPA 刺激すると、培養液中の TNF α 濃度が増加し、IL-1 β , TPA による刺激では、増加はみられなかった。さらに、KB-R7785, siRNA により ADAM17 を欠失すると、大腸上皮細胞、単球細胞での IL-1 β , TPA 刺激時 TNF α shedding による濃度上昇が、有意に抑制された。さらに、siRNA により ARP36-2 を欠失しても、同様に IL-1 β , TPA 刺激時 TNF α shedding による濃度上昇が、有意に抑制された。以上の結果から ARP36-2 は、TNF α shedding を制御する炎症性腸疾患新規治療ターゲットになりうると思われる。

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1件)

Tsukamoto H, Tanida S, Ozeki K, Ebi M,

Mizoshita T, Shimura T, Mori Y, Kataoka H,

Kamiya T, Fukuda S, Higashiyama S, Joh T.

Annexin A2 regulates a disintegrin and

metalloproteinase 17-mediated ectodomain shedding of pro-tumor necrosis factor- α in monocytes and colon epithelial cells. *Inflamm Bowel Dis.* ;19(7):1365-73, 2013 査読:有
doi:10.1097/MIB.06013e318281f43a

〔学会発表〕(計 2 件)

塚本宏延、谷田諭史、尾関啓司、溝下 勤、森 義徳、片岡洋望、神谷 武、城 卓志. 大腸上皮および単球細胞における amphiregulin-regulating protein (ARP) 36 による TNF α 放出制御機構 JDDW (ポスター) 2012. 10.11 神戸国際会議場 (神戸市)

Tsukamoto H, Tanida S, Ozeki K, Mizoshita T, Shimura T, Kataoka H, Kamiya T, Joh T. Amphiregulin-regulating protein 36 is required for ADAM17-mediated TNF α shedding in colon epithelial cells and monocytes. DDW. 5/21/2012 San Diego (USA.)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：炎症性疾患治療薬のスクリーニング方法、並びに炎症性疾患の治療及び検査

発明者：城 卓志、谷田諭史、塚本宏延、東山繁樹

権利者：城 卓志、谷田諭史、塚本宏延、東山繁樹

種類：特許権

番号：特願 2012-247963

出願年月日：2012.11.11

国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

城 卓志 (JOH Takashi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30231369

(2) 研究分担者

谷田 諭史 (TANIDA Satoshi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：30528782

(3) 連携研究者

東山 繁樹 (HIGASHIYAMA Shigeki)
愛媛大学大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60202272