

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591465

研究課題名(和文) 膜内蛋白分解酵素により誘導されるTNFの新しい機能の解明と炎症性疾患制御への応用

研究課題名(英文) Identification of the new function of TNF induced by intramembrane proteases and the application to regulate inflammatory diseases.

研究代表者

塚本 浩 (Tsukamoto, Hiroshi)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70304772

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)：本研究ではTumor necrosis factor- (TNF)に対する膜内蛋白分解酵素の作用を明らかにする事が目的である。TNFを産生する細胞株(293T)に種々のシグナルペプチドペプチターゼ様蛋白分解酵素(SPPL)cDNAを遺伝子導入し、細胞溶解後、ウエスタンブロッティングによりTNFのフラグメントを検出したところ、SPPL2aのみがTNF由来細胞内ドメイン形成作用を有することが示された。また遺伝子導入後のウエスタンブロッティングによる解析や上清中のTNF濃度測定によりSPPL3がTNF変換酵素様酵素活性を有する事を初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate the effect of intramembrane proteases such as signal peptide peptidase like proteases (SPPL) on Tumor necrosis factor- (TNF). After SPPLcDNA was transfected into TNF-producing 293T cells, fragments of TNF in cell lysate were analyzed by Western blotting. In this study, we demonstrated that only SPPL2a is able to cleave TNF into TNF-intracellular domain. We also demonstrated that SPPL3 has enzymatic activity like TNF converting enzyme.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膜内蛋白分解酵素 TNF- TNF- 変換酵素 SPPL 細胞内ドメイン 関節リウマチ

### 1. 研究開始当初の背景

Tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF)は炎症や免疫反応において多彩な生物活性を有する代表的な向炎症性サイトカインであり、その過剰な作用は関節リウマチ(RA)やクローン病等さまざまな炎症性疾患の病態形成に關与する事が知られているため、国内外において精力的にその構造や機能に関する研究が行われている。TNF は、前駆体として分子量 26kDa の II 型膜蛋白である膜型 TNF (membrane TNF, mTNF)として TNF 産生細胞の表面に発現し、TNF 変換酵素(TNF- $\alpha$  converting enzyme, TACE)により切断され分子量 17kDa の可溶性 TNF(soluble TNF, sTNF)となる。TNF には分子量 55kDa の I 型 TNF 受容体と分子量 75kDa の II 型 TNF 受容体という 2 種類の受容体が存在し、sTNF と mTNF はともに 3 量体としてこれらの受容体に結合し、様々な細胞内シグナル経路を活性化する。一方、蛋白分解酵素は加水分解によってペプチド結合を切断するため、水性の環境のみで作用すると考えられていたが、近年、疎水性の膜(脂質二重膜)の中で働く蛋白分解酵素が発見され膜内蛋白分解酵素と名付けられた。活性中心にアスパルギン酸(D)を有する膜内蛋白分解酵素は転写因子 Notch 等の I 型膜蛋白を基質とする presenilin と II 型膜蛋白を基質とする SPP(Signal Peptide Peptidase) ファミリー (SPP, SPPL2a, SPPL2b, SPPL2c, SPPL3)に分類される。

### 2. 研究の目的

TNF に関して、TACE により mTNF から sTNF が切断された後に細胞膜に残存する部位についての分解過程や機能については長い間不明だったが、近年この部分は細胞膜内において膜内蛋白分解酵素によって切断され、細胞内ドメイン(intracellular domain, ICD)は核へ移行することが明らかとなり、樹状細胞においては IL-12 が誘導される事が報告された。本研究では TNF 由来の細胞内ドメイン(TNF-ICD)が核に移行後、TNF の新しい機能を発揮する可能性に着目し、その発端となる TNF に対する膜内蛋白分解酵素の作用を明らかにする事が目的である。

### 3. 研究の方法

(1)変異 SPPL の作成:膜内蛋白分解酵素である SPPL は GXGD モチーフのアスパラギン酸(D)を変異させると酵素活性が消失することがわかっているため、Inverse PCR 法を用いて SPPL2a、SPPL2b、SPPL2c 及び SPPL3cDNA に酵素活性部位変異を導入した(GXGD→GXGA、変異 SPPL)。

(2)細胞株における SPPL による ICD 形成の検討: ヒト胎児由来腎臓上皮細胞である 293T 細胞に野生型 TNFcDNA を遺伝子導入することにより TNF を産生する細胞株を作成した。この 293T 細胞にベクターのみ、野生型 SPPLcDNA および変異 SPPLcDNA を

発現ベクター-pcDNA3 を用いて遺伝子導入した。細胞溶解後、ウエスタンブロッティングにより TNF のフラグメントを検出した。

### 4. 研究成果

(1)変異 SPPL の作成:それぞれの膜内蛋白分解酵素 SPPL の特異的酵素活性を評価するため、GXGD モチーフのアスパラギン酸(D)を変異させる事により、酵素活性を持たない変異 SPPL を作成した。

(2)細胞株における膜内蛋白分解酵素 SPPL による ICD 形成の検討: TNF を産生する細胞株(293T)にベクターのみ、野生型 SPPL2a、SPPL2b、SPPL2c、SPPL3cDNA およびそれぞれの変異 SPPLcDNA を発現ベクター-pcDNA3 を用いて遺伝子導入した。細胞溶解後、ウエスタンブロッティングにより TNF のフラグメントを検出したところ、野生型 SPPL2a を遺伝子導入した場合のみ細胞内に ICD が出現した(図)。

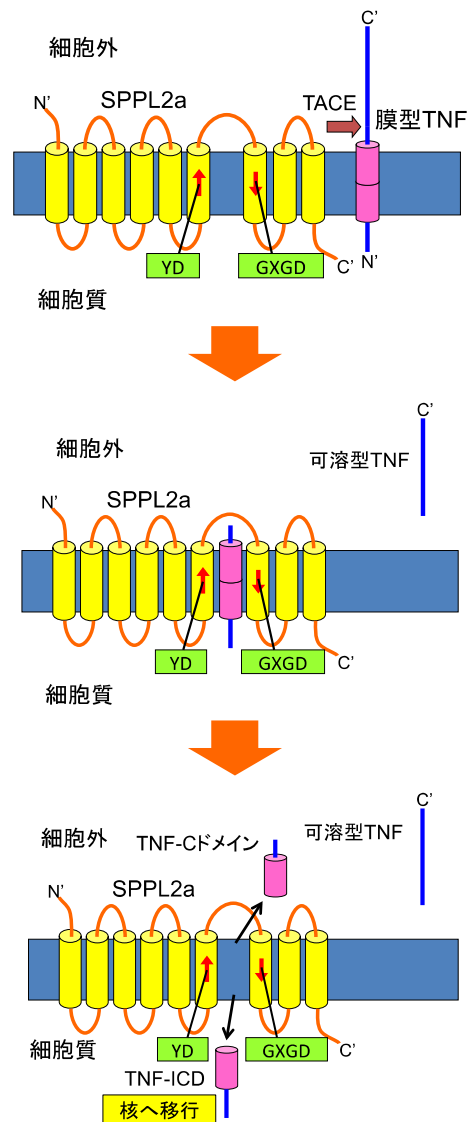


図.SPPL2aによるTNF-ICDの形成

(3)SPPL3 の TACE 様活性の同定: TNF を産生する細胞株(293T)に野生型 SPPL3cDNA を遺伝子導入した際には、TNF が TNF 変換酵素(TACE)様の切断を受ける事を上記ウエスタンブロットングにて見いだした。次に SPPL3cDNA を遺伝子導入した細胞株培養上清中の可溶性 TNF 濃度を測定した所、野生型 SPPL3cDNA を遺伝子導入した際には、ベクターのみや変異 SPPL3cDNA を遺伝子導入した場合に比較し、TNF 濃度は上昇していた。TACE 阻害薬を添加すると、野生型 SPPL3cDNA を遺伝子導入した際の TNF 濃度の上昇は抑制された。以上の結果により、SPPL3 が TACE 様酵素活性を有する事が初めて明らかになった。

#### 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 10 件)

Tanaka A, Tsukamoto H, Mitoma H, Kiyohara C, Ueda N, Ayano M, Ohta S, Kimoto Y, Akahoshi M, Arinobu Y, Niiro H, Tada Y, Horiuchi T, Akashi K: Serum progranulin levels are elevated in dermatomyositis patients with acute interstitial lung disease, predicting prognosis. *Arthritis Res Ther* 査読有 2015, 17: 27.

DOI: 10.1186/s13075-015-0547-z

Ono N, Niiro H, Ueda A, Sawabe T, Nishizaka H, Furugo I, Yoshizawa S, Yoshizawa S, Tsukamoto H, Kiyohara C, Tada Y, Horiuchi T: Characteristics of MPO-ANCA-positive granulomatosis with polyangiitis: a retrospective multi-center study in Japan. *Rheumatol Int* 査読有 2015, 35: 555-9.

DOI: 10.1007/s00296-014-3106-z

Yabuuchi H, Matsuo Y, Tsukamoto H, Horiuchi T, Sunami S, Kamitani T, Jinnouchi M, Nagao M, Akashi K, Honda H: Evaluation of the extent of ground-glass opacity on high-resolution CT in patients with interstitial pneumonia associated with systemic sclerosis: Comparison between quantitative and qualitative analysis. *Clin Radiol* 査読有 2014, 69: 758-64.

DOI: 10.1016/j.crad.2014.03.008

Oryoji K, Kiyohara C, Horiuchi T, Tsukamoto H, Niiro H, Shimoda T, Akashi K, Yanase T: Reduced carotid intima-media thickness in systemic lupus erythematosus patients treated with cyclosporine A. *Mod Rheumatol* 査読有 2014, 24: 86-92.

DOI: 10.3109/14397595.2013.852838

Washio M, Nakano T, Kawaguchi Y,

Takagi K, Kiyohara C, Tsukamoto H, Tokunaga S, Horiuchi T: Tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome (TRAPS) in Japan: a review of the literature. *Mod Rheumatol* 査読有 2013, 23: 210-7.

DOI: 10.1007/s10165-012-0737-3

Ueda N, Tsukamoto H, Mitoma H, Ayano M, Tanaka A, Ohta S, Inoue Y, Arinobu Y, Niiro H, Akashi K, Horiuchi T: The Cytotoxic Effects of Certolizumab Pegol and Golimumab Mediated by Transmembrane Tumor Necrosis Factor alpha. *Inflamm Bowel Dis* 査読有 2013, 19: 1224-31.

DOI:10.1097/MIB.0b013e318280b169

Oshima Y, Tsukamoto H, Tojo A: Association of hepatitis B with antirheumatic drugs: a case-control study. *Mod Rheumatol* 査読有 2013, 23: 694-704.

DOI: 10.1007/s10165-012-0709-7

Furukawa M, Kiyohara C, Horiuchi T, Tsukamoto H, Mitoma H, Kimoto Y, Uchino A, Nakagawa M, Oryoji K, Shimoda T, Harada M, Akashi K: Prevalence and risk factors of vertebral fracture in female Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol* 査読有 2013, 23: 765-73.

DOI: 10.1007/s10165-012-0735-5

Tanaka A, Tsukamoto H, Mitoma H, Kiyohara C, Ueda N, Ayano M, Ohta SI, Inoue Y, Arinobu Y, Niiro H, Horiuchi T, Akashi K: Serum progranulin levels are elevated in patients with systemic lupus erythematosus, reflecting disease activity. *Arthritis Res Ther* 査読有 2012, 14: R244.

DOI: 10.1186/ar4087

Niiro H, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Kikushige Y, Shima T, Noda K, Ota S, Tsuzuki H, Inoue Y, Arinobu Y, Iwasaki H, Shimoda S, Baba E, Tsukamoto H, Horiuchi T, Taniyama T, Akashi K: CIN85 is required for Cbl-mediated regulation of antigen receptor signaling in human B cells. *Blood* 査読有 2012, 119: 2263-73.

DOI: 10.1182/blood-2011-04-351965

##### [学会発表](計 6 件)

Tsukamoto H, Ayano M, Miyamoto T, Niiro H, Arinobu Y, Akahoshi M, Akashi K. Comparison of CD34-selected and unmanipulated autologous hematopoietic stem cell transplantation for systemic sclerosis: Four-year follow-up results. *Annual European*

Congress of Rheumatology. June 12, 2014 Paris, France

塚本 浩、藤健太郎、三苫弘喜、新納宏昭、有信洋二郎、赤星光輝、赤司浩一、北野悦子、畑中道代、北村 肇、堀内孝彦. 感染を繰り返した先天性補体 C3 欠損症の遺伝子解析. 第 51 回補体シンポジウム. 平成 26 年 8 月 22 日、神戸

塚本 浩. 造血幹細胞移植による全身性強皮症の治療. 第 58 回日本リウマチ学会総会平成 26 年 4 月 25 日、東京

Tsukamoto H, Horiuchi T, Miyamoto T, Niiro H, Arinobu Y, Akahoshi M, Ayano M, Tanaka T, Ueda N, Akashi K. Seven-year follow-up of autologous hematopoietic stem cell transplantation for systemic sclerosis. Annual European Congress of Rheumatology. June 13, 2013 Madrid, Spain

塚本 浩、堀内孝彦. 難治性自己免疫疾患に対する自己造血幹細胞移植療法.-その基礎と臨床-. 第 41 回日本臨床免疫学会. 平成 25 年 11 月 29 日、下関

Tsukamoto H, Horiuchi T, Miyamoto T, Niiro H, Arinobu Y, Inoue Y, Ayano M, Tanaka T, Ueda N, Harada M, Akashi K. Long-term follow-up of autologous hematopoietic stem cell transplantation for systemic sclerosis. Annual European Congress of Rheumatology. June 7, 2012. Berlin, Germany

〔図書〕(計 2 件)

中島 衡、三宅勝久、塚本 浩、堀内孝彦、他. メジカルレビュー社、見逃すと怖い膠原病 100 の質問 2014, 230.

田中良哉、渥美達也、塚本 浩、他. 羊土社. 免疫・アレルギー疾患イラストレイテッド 2013, 358.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚本 浩 (TSUKAMOTO HIROSHI)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：70304722

(2) 研究分担者

堀内 孝彦 (HORIUCHI TAKAHIKO)

九州大学・大学病院・教授

研究者番号：90219212

(3) 連携研究者

なし