

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460056

研究課題名(和文)炎症反応の質・量・持続性を統御する、チロシンキナーゼTYK2の新たな役割

研究課題名(英文)The role of TYK2 in the modulation of inflammatory responses

研究代表者

室本 竜太 (MUROMOTO, Ryuta)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30455597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はこれまで進めてきた研究に引き続きTYK2欠損マウスを用い、マクロファージ等の細胞機能・動態に着目した解析を進め炎症反応におけるTyrosine kinase 2 (TYK2)の新規役割を明らかにすることを目的とした。TYK2がマクロファージにおいて炎症性ケモカイン発現誘導能の維持に関与することや角化細胞のIL-17応答性に関与することを見出した。これらの機能を通じてTYK2が乾癬等の炎症病態形成に寄与することが示唆され、TYK2阻害は乾癬治療における有望な標的候補となると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We aimed to investigate the role of Tyrosine kinase 2 (TYK2) in the modulation of inflammatory responses. We have found that TYK2 is involved in maintaining the basal expression of chemokine mRNAs in macrophages and in IL-17A-induced activation of keratinocytes. These findings suggest that TYK2 inhibition may be useful as a therapeutic strategy for treating immune-mediated inflammatory diseases such as psoriasis.

研究分野：生物系薬学

キーワード：TYK2 炎症 サイトカイン 乾癬

1. 研究開始当初の背景

生体内における慢性化した炎症反応ががん・自己免疫疾患・生活習慣病を含むさまざまな疾患発症と密接な関連をもつことが、近年注目されている。そこで炎症反応制御の根底にある分子機構についての新知見を見出すことは有用である。本研究では炎症反応における Tyrosine kinase 2 (TYK2) の役割に着目する。

TYK2 は JAK ファミリーに属する非受容体型チロシンキナーゼであり、IL-12、IL-23、インターフェロン(IFN)等のサイトカイン受容体に会合し、それら受容体下流の細胞内シグナル伝達活性化を仲介する。これによりヘルパーT細胞サブセットの分化の方向付けや、ナチュラルキラー細胞からの IFN- γ 産生などに役割をもつことが報告されており、外来抗原に対する免疫応答の局面において重要であることが明らかとされてきた。

我々は TYK2 の新たな生理的役割を同定するために、欠損マウスを用いてさまざまな実験的疾患モデルの解析を行ってきた。その結果、遅延型過敏症・乾癬様皮膚炎・炎症性腸疾患・関節炎等の持続的炎症を伴うさまざまな疾患モデルにおいて、TYK2 が促進的に寄与することを明らかにし、報告した (J Immunol. 2011 187(1):181, Int Immunol. 2011 23(9):575.)。これらの結果は、TYK2 の生理的役割がそれまでに推測されてきた以上に多岐にわたることを示唆するものである。

上述の病態モデルの中で特に、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において、TYK2 欠損による抑制が見られることに啓発された。これらの二つの病態モデルはいずれも、ヘルパーT細胞の機能に依存して発症する他のモデル系とは異なり、成熟T細胞やB細胞をもたない RAG 遺伝子欠損マウスにおいて発症することが報告されており、リンパ球に非依存的な疾患モデルであると考えられている。従って、TYK2 が寄与する未知メカニズムの存在、すなわち、非リンパ球細胞内において TYK2 が炎症促進に寄与し病態形成を担う可能性が推察できる。これは、ヘルパーT細胞サブセットの分化バランス制御といった、現在までに判明している TYK2 の役割とは独立したものであると考えられる。またグラム陽性桿菌 *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) を加熱処理後の死菌を起炎物質として腹腔内に投与し誘発される腹腔内炎症反応において、野生型マウスと比較して TYK2 欠損マウスでは、菌体成分に反応して産生される炎症性サイトカイン産生量や、炎症に伴い腹腔内に遊走する細胞数が有意に抑制されることも見出していた。このような比較的単純な実験系においても、TYK2 欠損による影響が顕著に認められることは、TYK2 が介在する未知の炎症促進機構の存在を示唆すると考えられた。

これら病態誘発マウスの病変部局所においては種々の炎症性ケモカイン遺伝子発現が上昇しているが、TYK2 欠損マウスにおいて有意に

抑制されていたことから、TYK2 は T 細胞機能の調節への関与にとどまらずケモカイン遺伝子発現促進を介して炎症病態形成に寄与することが示唆される。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究ではこれまでの研究に引き続き TYK2 欠損マウスを用い、特に、単球・マクロファージなどリンパ球以外の細胞の機能・動態に着目した解析を進め、炎症反応における TYK2 の新規役割を明らかにす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反応について 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 法で調べ炎症にともなう好中球滲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。マウスにおいてヒト乾癬のマウスモデルとして TLR7 アゴニスト作用を有するイミダゾキノリン誘導体 (イミキモド: IMQ) をマウス皮膚に塗布することで皮膚炎を誘発させ、TYK2 欠損やケモカイン受容体中和抗体の効果を試験した。乾癬病態形成に重要なサイトカイン IL-17A がヒト角化細胞に引き起こす遺伝子発現変化をマイクロアレイを用いて網羅的に同定した。

4. 研究成果

(1) マクロファージの形質を規定する因子としての TYK2 の機能解析

ケモカインは炎症組織への免疫細胞の遊走等に関与し炎症拡大と持続化に重要なタンパク質であり、TYK2 が介在し炎症を促進する分子機構のひとつにはマクロファージでのケモカイン遺伝子発現への寄与が含まれる可能性がある。マウスマクロファージ様細胞株 J774 細胞を *P. acnes* 死菌を用いて刺激し、TYK2 特異的 siRNA 導入細胞とコントロール siRNA 導入細胞とで、既知のケモカイン 38 種類の mRNA 発現変動を定量的 RT-PCR 法で比較した。*P. acnes* 死菌刺激によって多数のケモカイン mRNA が誘導され、そのうち Ccl5、Ccl8、Ccl12、Cxcl9、Cxcl10、Cxcl11 の誘導が TYK2 ノックダウンで有意に低下した。これらのケモカインはいずれも I 型 IFN による発現誘導が報告されておりこの結果はマクロファージにおける I 型 IFN 応答が TYK2 ノックダウンで低下したためと推測された。代表的ケモカイン Cxcl10 の mRNA 量を野生型および TYK2 欠損マウスより調製した骨髄由来マクロファージを用いて解析した結果、未刺激時、*P. acnes* 死菌

刺激時、LPS 刺激時のいずれの条件下でも、Cxcl10 発現は TYK2 欠損で有意に抑制された。マクロファージ様細胞株 J774 細胞において I 型 IFN シグナル伝達構成因子 (Ifnar1, Stat1, Stat3) や NF- κ B 複合体サブユニット (Rela) に対する特異的 siRNA 導入により、未刺激時または *P. acnes* 死菌刺激時のいずれの条件下においても Cxcl10 mRNA 量の有意な低下がみられた。特に I 型 IFN 受容体サブユニット Ifnar1 のノックダウンによる Cxcl10 mRNA 量低下が顕著であり TYK2 ノックダウンによってみられる Cxcl10 mRNA 量の顕著な低下と同等の効果が観察された。培養上清中の Cxcl10 タンパク量を ELISA 法で測定した結果は mRNA 量と同様の傾向を示した。Ifnar1、TYK2 ノックダウンで見られる Cxcl10 mRNA 量の低下は *P. acnes* 死菌を添加しない未刺激条件下においても有意であったことから、J774 細胞は機能する十分量の I 型 IFN を恒常的に産生しておりオートクラインの IFN シグナルが Cxcl10 発現に影響していると考えられた。実際、*P. acnes* 等による刺激を行わない条件下で TYK2 をノックダウンしたマクロファージでは I 型 IFN 誘導性遺伝子 (Irf7, Nos2) の mRNA 量の有意な低下が認められた。また骨髄由来マクロファージを培養する培地への Ifnar1 機能阻害モノクローナル抗体添加により Cxcl10 mRNA 量の減少が認められた。以上よりケモカイン Cxcl10 発現の維持における恒常的 I 型 IFN シグナルの重要性がわかり、Tyk2 はこの I 型 IFN シグナルに役割をもつことがわかった。

(2) イミキド誘導性乾癬病態モデルにおける Cxcl10 遺伝子発現と TYK2 の関与

マクロファージを用いた解析より TYK2 が Cxcl10 遺伝子発現に関与することが示されたことから、次に、*in vivo* の炎症病態モデルにおける Cxcl10 遺伝子発現において TYK2 が役割をもつか否か、皮膚疾患の一種である乾癬に着目して解析を進めた。ヒト乾癬患者皮膚では免疫細胞による IL-17、IFN- γ や TNF- α などの炎症性サイトカイン産生の亢進が見られ、これらの炎症性サイトカインがケラチノサイトの過剰増殖を引き起こすシグナルを伝えることで病態が形成されると考えられている。また、乾癬患者皮膚においては Cxcl10 を含む多数のケモカイン遺伝子の発現亢進が認められることも判明している。

マウスにおいてヒト乾癬に類似した皮膚炎を誘導できる実験モデルとして、TLR7 アゴニスト作用を有するイミダゾキノリン誘導体 (イミキド: IMQ) をマウス皮膚に塗布することで皮膚炎を誘発させる実験系が広く用いられている。マウス皮膚への IMQ 塗布は Cxcl9、Cxcl10、Cxcl11 のケモカイン遺伝子発現を顕著に亢進させることも報告されている。そこで、この IMQ 誘導性乾癬モデルを TYK2 欠損マウスを用いて実施することにより *in vivo* での Cxcl10 発現誘導における TYK2 の関与を検討した。

野生型マウスへ IMQ を連日塗布することにより経時的な耳介の肥厚が認められ皮膚炎が発

症した。一方で TYK2 欠損マウスに IMQ を塗布した場合には耳介の肥厚が認められたがその程度は野生型マウスと比べて有意に減弱していた。乾癬皮膚においてはケラチノサイトの増殖亢進が起こることによって乾癬に特徴的な病態である表皮肥厚が起こると考えられている。そこでケラチノサイトの増殖について皮膚組織中の mRNA 発現を検討したところ、IMQ 処置した野生型マウス皮膚においてケラチノサイトの増殖マーカーである Keratin16 (Krt16) の顕著な発現亢進が認められた。一方で TYK2 欠損マウスでは野生型マウスに対して Krt16 発現の有意な低下が認められた。また乾癬皮膚では、好中球が皮膚に浸潤することが特徴の一つとされる。そこで皮膚への好中球浸潤を皮膚組織中の mRNA 発現により検討した。IMQ 処置した野生型マウス皮膚において好中球特異的エラスターゼ (Elane) の有意な発現亢進が認められた。一方で TYK2 欠損マウスでは野生型マウスに対して Elane 発現の有意な低下が認められた。以上より、IMQ 誘導性の乾癬様皮膚炎において TYK2 がケラチノサイト増殖や好中球浸潤の促進により病態形成に役割をもつことがわかった。

次に、皮膚組織中のケモカイン mRNA 発現を調べた。IMQ 塗布した野生型マウスでは Cxcl10 および Cxcl9 の mRNA 発現が亢進したが Cxcl11 の mRNA 発現亢進は認められなかった。一方 TYK2 欠損マウスでは IMQ 塗布により誘導される皮膚炎において Cxcl10 および Cxcl9 mRNA の有意な発現低下が認められた。また、TYK2 欠損マウスにおける Cxcl10 および Cxcl9 mRNA 発現の低下は IMQ 処置を行わない定常状態の皮膚においても顕著であった。Cxcl10 および Cxcl9 遺伝子発現は炎症性サイトカインである IFN- γ (Ifng) によって誘導されることから、皮膚における Ifng の mRNA 発現を検討した。IMQ 塗布した野生型マウスにおいて Ifng mRNA の顕著な発現亢進が認められた一方で、TYK2 欠損マウスでは有意に発現誘導が抑制されていた。以上の結果より、TYK2 は皮膚組織における Cxcl10 および Cxcl9 mRNA の発現に役割をもつことが示唆された。

TYK2 欠損マウスの皮膚では Ifng や Cxcl10 mRNA 発現低下が認められたとともに IMQ 誘導性乾癬モデルの病態抑制が観察されたことから、IFN- γ や Cxcl10 が病態形成に役割をもつことが示唆された。そこで、IMQ 誘導性乾癬モデルの病態形成における IFN- γ と Cxcl10 の関与を調べるため、それらの機能を中和抗体により阻害する実験を行った。その結果、IMQ 塗布により観察される経時的な耳介肥厚が、コントロール抗体投与に対し抗 IFN- γ 中和抗体投与で有意に抑制された。Cxcl10 および Cxcl9 が病態形成に与える影響の評価にはこれらのケモカインの共通のレセプター Cxcr3 に対する中和抗体を用いて検討した。その結果、コントロール抗体投与に対し抗 Cxcr3 抗体投与によって耳介肥厚の有意な抑制が見られた。これらの結果から TYK2 は、*in vivo* においてケモカイン Cxcl10 および Cxcl9 や IFN- γ の発現誘導を介して炎症

病態形成に関与することが示唆された。

(3) 乾癬における表皮角化細胞活性化のメカニズムと TYK2 関与の解析

IMQ 誘導性皮膚炎において TYK2 欠損では耳介肥厚抑制のみならず、ケラチノサイト増殖の指標である Krt16 mRNA 発現や好中球浸潤のマーカーである Elane mRNA 発現にも有意な抑制が認められた。しかしながら、抗 IFN- γ 中和抗体によっては Krt16 mRNA 発現は抑制されたものの Elane mRNA 発現の抑制が認められず、また、抗 Cxcr3 中和抗体によっては Krt16 mRNA と Elane mRNA 発現のいずれにおいても有意な抑制効果が認められなかった。これらの結果から IMQ 誘導性皮膚炎の病態を構成する要素のうちケラチノサイト増殖や好中球浸潤を指標とする観点では IFN- γ を介する Cxcl10 や Cxcl9 誘導の経路の寄与が大きいことが示唆された。近年、ヒトの乾癬やマウスでの乾癬病態モデルにおけるケラチノサイト増殖や好中球浸潤に対してはサイトカイン IL-17 によるケラチノサイト活性化の重要性が報告されていることから、TYK2 は IL-17 応答に役割をもつことによってケラチノサイト増殖や好中球浸潤に影響をもつことが想定され、乾癬病変部を構成する表皮角化細胞での TYK2 の役割の解析を進めた。ヒト正常角化細胞を用い乾癬で重要なサイトカイン IL-17A が角化細胞を活性化させる際の遺伝子発現変動を網羅的に解析した。その結果 IL-17A により角化細胞内で誘導され IL-17A 応答性遺伝子群の発現誘導を司る転写調節タンパク質として I B- を同定し報告した (Int Immunol. 2016 in press)。この IL-17A 刺激時の I B- mRNA 誘導は TYK2 依存的に起こることも見出し学会発表した。角化細胞で TYK2 は IL-17A 刺激後の I B- 発現誘導を仲介し角化細胞活性化と炎症増幅に関与することが新たに示唆された。以上より TYK2 は乾癬の病態に関わる IFN- γ と IL-17 の少なくとも 2 つの重要なサイトカインの機能に関与するため、TYK2 阻害は乾癬の治療における標的と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 11 件)

- (1) Togi S, Muromoto R, Hirashima K, Kitai Y, Okayama T, Ikeda O, Matsumoto N, Kon S, Sekine Y, Oritani K, Matsuda T. A new STAT3-binding partner, ARL3, enhances the phosphorylation and nuclear accumulation of STAT3. J Biol Chem. 査読有、2016, 印刷中 doi: 10.1074/jbc.M116.724849
- (2) Muromoto R, Hirao T, Tawa K, Hirashima K, Kon S, Kitai Y, Matsuda T. IL-17A plays a central role in the expression of psoriasis signature genes through the induction of I κ B- ζ in keratinocytes. Int Immunol. 査読有、2016, 印刷中 doi: 10.1093/intimm/dxw011
- (3) Togi S, Hatano Y, Muromoto R, Kawanishi E, Ikeda O, Hirashima K, Kon S, Kitai Y, Yasui T, Oritani K, Matsuda T. Caspase-dependent cleavage regulates protein levels of Epstein-Barr virus-derived latent membrane protein 1. FEBS Lett. 査読有、2016, 590(6):808-18. doi: 10.1002/1873-3468.12119.
- (4) Kubo K, Iwakami M, Muromoto R, Inagaki T, Kitai Y, Kon S, Sekine Y, Oritani K, Matsuda T. CCR7 is involved in BCR-ABL/STAP-2-mediated cell growth in hematopoietic Ba/F3 cells. Biochem Biophys Res Commun. 査読有、2015, 463(4):825-31. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.020.
- (5) Togi S, Nakasuji M, Muromoto R, Ikeda O, Okabe K, Kitai Y, Kon S, Oritani K, Matsuda T. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded LANA associates with glucocorticoid receptor and enhances its transcriptional activities. Biochem Biophys Res Commun. 査読有、2015, 463(3):395-400. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.05.080.
- (6) Sekine Y, Togi S, Muromoto R, Kon S, Kitai Y, Yoshimura A, Oritani K, Matsuda T. STAP-2 Protein Expression in B16F10 Melanoma Cells Positively Regulates Protein Levels of Tyrosinase, Which Determines Organs to Infiltrate in the Body. J Biol Chem. 査読有、2015, 290(28):17462-73. doi: 10.1074/jbc.M115.658575.
- (7) Kato M, Muromoto R, Togi S, Iwakami M, Kitai Y, Kon S, Oritani K, Matsuda T. PML suppresses IL-6-induced STAT3 activation by interfering with STAT3 and HDAC3 interaction. Biochem Biophys Res Commun. 査読有、2015, 461(2):366-71. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.04.040.
- (8) Kojima H, Takeda Y, Muromoto R, Takahashi M, Hirao T, Takeuchi S, Jetten AM, Matsuda T. Isoflavones enhance interleukin-17 gene expression via retinoic acid receptor-related orphan receptors α and γ . Toxicology. 査読有、2015, 329:32-9. doi:

- 10.1016/j.tox.2015.01.007.
- (9) Sekine Y, Nishida K, Yamasaki S, Muromoto R, Kon S, Kashiwakura J, Saitoh K, Togi S, Yoshimura A, Oritani K, Matsuda T. Signal-transducing adaptor protein-2 controls the IgE-mediated, mast cell-mediated anaphylactic responses. *J Immunol.* 査読有、2014, 192(8):3488-95. doi: 10.4049/jimmunol.1300886.
 - (10) Ishizaki M, Muromoto R, Akimoto T, Sekine Y, Kon S, Diwan M, Maeda H, Togi S, Shimoda K, Oritani K, Matsuda T. Tyk2 is a therapeutic target for psoriasis-like skin inflammation. *Int Immunol.* 査読有、2014, 26(5):257-67. doi: 10.1093/intimm/dxt062.
 - (11) Muromoto R, Nakajima M, Hirashima K, Hirao T, Kon S, Shimoda K, Oritani K, Matsuda T. Jun activation domain-binding protein 1 (JAB1) is required for the optimal response to interferons. *J Biol Chem.* 査読有、2013, 288(43):30969-79. doi: 10.1074/jbc.M113.485847.

[学会発表] (計 14 件)

- (1) 室本竜太ほか、ケラチノサイトのIL-17応答におけるTYK2による間接的制御 日本薬学会第136年会、2016年3月27-29日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
- (2) Ryuta Muromoto et al., Interleukin-17A plays a fundamental role in the expression of psoriasis signature genes in keratinocytes through the induction of IkappaB-zeta 日本研究皮膚科学会 第40回年次学術大会・総会、2015年12月11-13日、岡山コンベンションセンター(ママカリフォーラム)(岡山県・岡山市)
- (3) MUROMOTO Ryuta et al., The role of TYK2 in IL-17A-induced keratinocyte response 第44回日本免疫学会学術集会、2015年11月18-20日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
- (4) HIRASHIMA Koki et al., Tyk2 mediates induction of CXCR3 ligands during imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation 第44回日本免疫学会学術集会、2015年11月18-20日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
- (5) 小島弘幸ほか、STAT3活性化を介したIL-17A遺伝子発現に及ぼすバイオカニンAの影響 第22回日本免疫毒性学会学術年会、2015年9月10-11日、京都大学百周年時計台記念館国際交流ホール(京都府・京都市)

- (6) 多和佳祐ほか、ケラチノサイトにおけるIL-17AシグナルへのTYK2の関与、日本薬学会北海道支部第142回例会、2015年5月16日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
- (7) 平尾徹ほか、炎症性サイトカイン刺激による角化細胞の活性化とIL-17A特異的なシグナルの解析、日本薬学会北海道支部第142回例会、2015年5月16日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
- (8) 多和佳祐ほか、ケラチノサイトのIL-17応答調節におけるJAKファミリーチロシンキナーゼの役割 日本薬学会第135年会、2015年3月26-28日、兵庫医療大学(兵庫県・神戸市)
- (9) 平島洸基ほか、マクロファージの脂質代謝系制御におけるTyrosine kinase 2 (TYK2)の関与 日本薬学会第135年会、2015年3月26-28日、兵庫医療大学(兵庫県・神戸市)
- (10) MUROMOTO Ryuta et al., Elucidation of unique and clinically meaningful IL-17-driven signaling pathway in keratinocytes 第43回日本免疫学会学術集会、2014年12月10-12日、国立京都国際会館(京都府・京都市)
- (11) 室本竜太ほか、NEDD8化によるインターフェロン応答の調節、第79回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2014年6月19日、北海道大学医学部学友会館「フラテ」(北海道・札幌市)
- (12) 平島洸基ほか、マクロファージのCXCL10産生におけるTyk2関与の分子機構の解析、日本薬学会北海道支部第141回例会、2014年5月24日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
- (13) Ryuta Muromoto et al., A role of neddylation in regulating interferon responses. 第42回日本免疫学会学術集会 2013年12月11-13日、幕張メッセ(千葉県・千葉市)
- (14) 平島洸基ほか、マクロファージ由来ケモカイン発現におけるTyk2関与の分子機構の解析 第36回分子生物学会年会 2013年12月3日-6日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

[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