

平成 30 年 5 月 19 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04640

研究課題名(和文) TRAF5による炎症サイトカインシグナル制御

研究課題名(英文) Regulation of inflammatory cytokine signaling by TRAF5

研究代表者

宗 孝紀 (SO, TAKANORI)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・教授

研究者番号：60294964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：インターロイキン-17 (IL-17) を産生するCD4+ ヘルパーT細胞 (Th17細胞) は、感染防御のみならず自己免疫応答の増悪に關与するヘルパーT細胞の一集団であり、その分化には炎症性サイトカイン IL-6 とその受容体のシグナル伝達が必要になる。本研究では、ナイーブ CD4+ T細胞膜に発現する IL-6 受容体シグナル伝達分子 gp130 に細胞内タンパク質である TRAF2 や TRAF5 が結合し、IL-6 受容体シグナルの強度が調節される分子機構を初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：IL-17-producing helper CD4+ T cells, Th17 cells, control not only host defense against pathogens but also immune pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases. Th17 cells differentiate from antigen-primed naive CD4+ T cells in response to IL-6, and the IL-6-receptor signaling plays a dominant role for the development of Th17 cells. In this study, we found that TRAF2 and TRAF5 associated with the signal-transducing receptor gp130 expressed by naive CD4+ T cells differentially regulated the instructive IL-6-receptor signaling that is needed for the development of Th17 cells.

研究分野：免疫学

キーワード：炎症 サイトカイン TNF

1. 研究開始当初の背景

TRAF5 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 5) は、TNF 受容体型分子群 (TNF 受容体スーパーファミリー) の細胞内ドメインに結合する細胞内タンパク質として発見され、NF- κ B などの炎症シグナルの促進因子として機能することが明らかにされてきた。申請者は、TRAF5 の CD4⁺ T 細胞 (ヘルパー T 細胞、Th 細胞) における機能を解析した結果、TRAF5 が炎症性 CD4⁺ T 細胞の分化に対し阻害的にはたらくことを見いだした。一連の研究結果から、炎症性サイトカインであるインターロイキン-6 (IL-6) の受容体のシグナル伝達分子である gp130 に TRAF5 が結合することで IL-6 受容体シグナル伝達における STAT3 の活性化が抑制されるという TRAF5 の抗炎症的な機能を発見した。この結果に対応して、IL-6 受容体シグナルに依存して分化する IL-17 産生 Th17 CD4⁺ T 細胞の分化が TRAF5 の欠損により亢進することを明らかにした。さらに、*Traf5*^{-/-} マウスで病原性 Th17 細胞の分化が亢進することで、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) が増悪することを明らかにした (引用文献 1)。この TRAF5 による新たなシグナル機構は、これまでに TRAF ファミリー分子群で明らかにされてきた従来の TRAF 機能と以下の 3 点で一線を画する。(1) IL-6 受容体シグナルを抑制する意味で、抗炎症的な分子機構であること、(2) TNF 受容体でなくインターロイキン受容体の制御に関係すること、(3) リガンド結合に依存的な結合でなく、TRAF5-gp130 間の恒常的な結合によりシグナル伝達が阻害されることである。

<引用文献>

(1) Nagashima H, Y. Okuyama, A. Asao, T. Kawabe, S. Yamaki, H. Nakano, M. Croft, N. Ishii, T. So. 2014. The adaptor TRAF5 limits the differentiation of inflammatory CD4⁺ T cells by antagonizing signaling via the receptor for IL-6. *Nat Immunol* 15: 449-456.

2. 研究の目的

哺乳類の TRAF ファミリータンパク質は、C 末端側にタンパク質間相互作用に關与する特徴的な TRAF ドメインをもつ 6 種類の分子、TRAF1 から TRAF6 から構成される。これまでに、TRAF ドメインを介して TRAF5 が gp130 に結合し、その阻害活性が発現することを明らかにした (引用文献 1)。

本研究では、(1) TRAF5 以外の TRAF ファミリー分子に gp130 シグナルに対する抑制作用があるかについて、(2) IL-6 受容体シグナル伝達における JAK-STAT 活性化経路のどの部分に TRAF が阻害作用を示すかについて明らかにすることを目的にして研究を行った。

3. 研究の方法

(1) Ba/F3 細胞を用いたバイオアッセイによる評価

gp130 を細胞表面に発現する Ba/F3 細胞 (Ba/F3-gp130 細胞) を IL-6-IL-6R で刺激することにより、IL-6 シグナルの強度を細胞増殖能として評価できるバイオアッセイ系を確立した。この実験系を利用することで TRAF 分子群の機能を解析した。具体的には、Ba/F3-gp130 細胞に 6 種類の TRAF ファミリー分子をそれぞれ過剰発現させた細胞株を樹立し、これらの Ba/F3-gp130 細胞の IL-6-IL-6R 刺激に対する増殖能が TRAF 分子の発現によりどのように影響を受けるかを測定した。本実験により、TRAF5 以外の TRAF 分子に、IL-6 受容体シグナルに対する抑制作用が認められるかどうかを評価した。

(2) Th17 細胞分化実験による評価

正常マウス CD4⁺ T 細胞に TRAF ファミリー分子を過剰発現させること、あるいは shRNA によるノックダウンにより発現量を低下させることで Th17 細胞の分化がどのように影響を受けるかを評価した。具体的には、野生型ナイーブ CD4⁺ T 細胞をマウス脾臓より精製し、抗 CD3/CD28 抗体で刺激することで活性化した。12 時間後、レトロウイルス感染によりそれぞれの異なる *Traf* 遺伝子あるいは TRAF に対する shRNA を細胞内に導入した。36 時間後、IL-6-IL-6R および TGF- β を培地に加えることで Th17 細胞の分化を誘導した。108 時間後、CD4⁺ T 細胞を PMA/Ionomycin で再刺激することで誘導される IL-17 の細胞内発現レベルにより Th17 細胞の分化能を評価した。本実験により、TRAF5 以外の TRAF ファミリー分子が、Th17 細胞分化を抑制作用するかどうかを評価した。

(3) TRAF 分子の発現量解析

TRAF5 タンパク質および mRNA は、ナイーブ CD4⁺ T 細胞に高く発現するが、抗原受容体 TCR/CD3 の刺激によりその発現レベルが有意に低下することが示唆された。他の TRAF ファミリー分子に関して、どのような発現動態を示すかを評価した。本実験により、TRAF ファミリー分子が T 細胞の活性化に伴いどのように発現し、TRAF5 の発現が他の TRAF とどのように異なるかを評価した。

(4) IL-6 受容体の JAK-gp130-STAT シグナル軸における TRAF5 の阻害作用の解析

TRAF5 と gp130 の結合により、IL-6 刺激に依存的な STAT3 の活性化が阻害される。TRAF5 の E3-リガーゼ活性に關わる N 末端の RING ドメインは、この阻害作用に關与しない (引用文献 1)。この TRAF5 の抑制作用が、IL-6 受容体シグナルの初期活性化反応のどの部分に対して生じるかが不明であった。

本研究では、Ba/F3-gp130 細胞に発現する gp130 を免疫沈降し、TRAF5 による阻

害作用の分子機構を解析した。すなわち、IL-6-IL-6R 刺激前後における、gp130 における STAT3 結合量、JAK および gp130 のチロシンリン酸化の程度が TRAF の発現レベルによりどのように影響を受けるかを解析し、TRAF による IL-6 受容体シグナルの抑制機構に関して解析した。

JAK が活性化されるためには、gp130 が IL-6-IL-6R 刺激依存的に近接することで、gp130 の細胞内領域に結合する JAK も同時に近接し、JAK-JAK 間で自己リン酸化反応が誘導される必要がある。この初期反応が STAT の活性化に重要になる。ルシフェラーゼタンパク質を途中で分断し、N 末端側と C 末端側それぞれのルシフェラーゼタンパク質のドメイン (LucN および LucC) を JAK1 の C 末端側に配置させたタンパク質 (JAK1-LucN および JAK1-LucC) を HEK293T 細胞内に一過性に発現させることで、gp130 に結合した JAK1 の近接化に依存してルシフェラーゼの活性構造が再構築されることがわかった。すなわち、ルシフェラーゼの酵素活性を指標に JAK の近接化反応を評価できることがわかった。TRAF 分子の存在下で IL-6-IL-6R 刺激に依存的なルシフェラーゼの酵素活性を計測することで、TRAF の発現が JAK1 の近接化反応をどのように阻害するかを評価した。

4. 研究成果

(1) Ba/F3 細胞を用いたバイオアッセイによる評価

TRAF1 から TRAF6 をそれぞれ発現する Ba/F3-gp130 細胞を樹立し、これらの細胞を IL-6-IL-6R で刺激した。その結果、TRAF5 のみならず TRAF2 も IL-6 受容体シグナルに依存的な細胞増殖応答を抑制した。IL-3 刺激に依存的な細胞増殖には影響がなかったことから、TRAF5 と同様に TRAF2 が IL-6 受容体シグナルを抑制することが初めて明らかになった。この結果に対応して、IL-6-IL-6R 刺激に依存した STAT3 のリン酸化が TRAF2 や TRAF5 の発現により抑制された。以上の結果から、TRAF5 のみならず TRAF2 に IL-6 受容体シグナルに対する抑制活性を同定することができた (雑誌論文 2)。

(2) Th17 細胞分化実験による評価

Ba/F3-gp130 細胞で得られた上記の結果の普遍性に関して評価した。すなわち、正常な野生型マウスに由来する CD4⁺ T 細胞を用いて TRAF2 や TRAF5 の発現の影響について評価した。TRAF2 や TRAF5 を CD4⁺ T 細胞に過剰発現させることにより Th17 細胞の分化が抑制された。この結果に対応して、STAT3 のリン酸化が TRAF2 や TRAF5 の過剰発現により抑制された。

また、shRNA による TRAF2 のノックダウンにより Th17 細胞の分化が反対に亢進した。

Traf5^{-/-} ナイーブ CD4⁺ T 細胞の分化過程で TRAF2 をノックダウンすることにより、*Traf5*^{-/-} CD4⁺ T 細胞で認められる Th17 細胞の分化亢進が、さらにより顕著になることがわかった。

以上の結果から、野生型マウス CD4⁺ T 細胞が IL-6 受容体シグナル依存的に Th17 細胞へ分化する過程で、TRAF2 と TRAF5 の両分子が IL-6 受容体シグナルを抑制し、Th17 細胞の分化を制限する機構を明らかにした (雑誌論文 2)。

(3) TRAF 分子の発現量解析

野生型 CD4⁺ T 細胞を抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で刺激したところ、TRAF1、TRAF3、TRAF4、TRAF6 の mRNA 発現量が増加すること、TRAF2 の発現量はほとんど変化しないこと、TRAF5 の発現量が減弱することがわかった。すなわち、6 種の TRAF ファミリー分子が CD4⁺ T 細胞内で異なる発現制御を受けることがわかった。特に、TRAF5 の mRNA およびタンパク質の発現量変化は 4 時間以内に急激に低下するものであった。従って、TRAF2 とは対照的に TRAF5 は活性化したナイーブ CD4⁺ T 細胞内でその発現量が負に調節されることがわかった。従って、TRAF2 と TRAF5 が異なる形で CD4⁺ T 細胞における IL-6 受容体のシグナル伝達を制御することが強く示唆された (雑誌論文 2)。

(4) IL-6 受容体の JAK-gp130-STAT シグナル軸における TRAF5 の阻害作用の解析

Ba/F3-gp130 細胞に内在性に発現する TRAF2 あるいは TRAF5 をノックダウンした細胞を IL-6-IL-6R でそれぞれ刺激し、gp130 への STAT3 の結合量を評価した。その結果、これらの TRAF 分子の発現量の低下により STAT3 の gp130 への結合量が増加することがわかった (雑誌論文 2)。また、TRAF5 の過剰発現により IL-6 刺激に依存的な gp130 のチロシンリン酸化量が低下することがわかった。

Traf5^{-/-} ナイーブ CD4⁺ T 細胞を IL-6-IL-6R で刺激することで、JAK1 のチロシンリン酸を測定することで、TRAF5 の発現が JAK1 の活性化に及ぼす影響を評価した。その結果、TRAF5 の欠損により JAK1 のリン酸化量が増加することがわかった。これとは対照的に、Ba/F3-gp130 細胞に TRAF5 を過剰発現させることで、IL-6-IL-6R 刺激に依存的な JAK1 のリン酸化量が減少することがわかった。以上から、TRAF5 の発現が JAK1 の活性化に対し阻害的に働くことがわかった。

HEK293T 細胞内に gp130、JAK1-LucN、JAK1-LucC を発現させた後に、IL-6-IL-6R で刺激することで 5 分以内にルシフェラーゼ活性の上昇を検出した。これに対応して、JAK1-LucN と JAK1-LucC の JAK1 におけるチロシンリン酸化量が増加した。TRAF2 あるいは TRAF5 を共発現させること

により、このルシフェラーゼ活性の発現が有意に抑制された。この TRAF2 や TRAF5 によるルシフェラーゼ活性の抑制には、N 末端の RING やジンクフィンガードメインは必要なく、C 末端の TRAF ドメインが重要になることがわかった。これと合わせて、gp130 の細胞内に存在する TRAF 結合領域であるアミノ酸番号 774 番から 798 番を欠失させることで、TRAF 分子のルシフェラーゼ活性発現に対する抑制能が消失することがわかった。

これらの結果から、gp130 に結合する TRAF2 や TRAF5 が、同じく gp130 の別の部位に結合する JAK の近接化を未知の機構で抑制することで、JAK キナーゼの活性化が阻害され、JAK の活性化に引き続いて起こる gp130 のリン酸化、STAT3 の gp130 への結合、STAT3 のリン酸化という一連の IL-6 受容体シグナルの活性化反応が制限される新たな分子機構の存在が初めて明らかになった。

(5) 今後の展望

本研究により、CD4⁺ T 細胞の分化過程で TRAF2 および TRAF5 が IL-6 受容体シグナルを抑制することで炎症性 T 細胞の分化が制限される分子機構の詳細を明らかにすることができた。

Traf5^{-/-} マウスを用いて肺や腸組織に起こる炎症病態を解析した結果、上記の CD4⁺ T 細胞の IL-6 受容体シグナルにおける TRAF5 の機能では説明できない予想に反する予備知見を得た。すなわち、IL-6 と同様に gp130 を介してシグナルを伝達する OSM (oncostatin M) を鼻腔内に投与することにより誘導される好酸球依存的な炎症応答が、*Traf5*^{-/-} マウスで減弱した。また、DSS (dextran sulfate sodium) を含む飲料水を投与することで誘導する急性腸炎の炎症病態が *Traf5*^{-/-} マウスで減弱したことである。このような組織炎症において、TRAF5 が従来の TNF 受容体型分子のシグナル伝達を制御することで、このような表現型が観察されたことが推察される。より生理的な炎症環境下で、どのような細胞のどのような受容体シグナルにおいて、TRAF5 の機能が発現するかについて、今後継続して研究を進めていきたい。

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6件)以下すべて査読あり。

(1) Nagashima, H., Y. Okuyama, T. Fujita, T. Takeda, Y. Motomura, K. Moro, T. Hidaka, K. Omori, T. Sakurai, T. Machiyama, L.C. Ndhlovu, C. Riccardi, T. So, N. Ishii. 2018. GITR signal in ILC2s controls allergic lung inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, in press. doi: 10.1016/j.jaci.2018.01.028.

(2) Nagashima, H., Y. Okuyama, T. Hayashi, N.

Ishii, and T. So. 2016. TNFR-Associated Factors 2 and 5 Differentially Regulate the Instructive IL-6 Receptor Signaling Required for Th17 Development. *J Immunol* 196:4082-4089. doi: 10.4049/jimmunol.1501610.

(3) Nakamura, H., T. Ohkuri, T. So, and T. Ueda. 2016. Relationship between the magnitude of IgE production in mice and conformational stability of the house dust mite allergen, Der p 2. *Biochim Biophys Acta* 1860:2279-2284. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.04.014.

(4) Kawabe, T., N. Suzuki, S. Yamaki, S.L. Sun, A. Asao, Y. Okuyama, T. So, Y. Iwakura, and N. Ishii. 2016. Mesenteric lymph nodes contribute to proinflammatory Th17-cell generation during inflammation of the small intestine in mice. *Eur J Immunol* 46:1119-1131. doi: 10.1002/eji.201545907.

(5) Shibahara, I., R. Saito, R. Zhang, M. Chonan, T. Shoji, M. Kanamori, Y. Sonoda, T. Kumabe, M. Kanehira, T. Kikuchi, T. So, T. Watanabe, H. Takahashi, E. Iwabuchi, Y. Tanaka, Y. Shibahara, H. Sasano, N. Ishii, and T. Tominaga. 2015. OX40 ligand expressed in glioblastoma modulates adaptive immunity depending on the microenvironment: a clue for successful immunotherapy. *Mol Cancer* 14:41. doi: 10.1186/s12943-015-0307-3.

(6) So, T., H. Nagashima, and N. Ishii. 2015. TNF Receptor-Associated Factor (TRAF) Signaling Network in CD4(+) T-Lymphocytes. *Tohoku J Exp Med* 236:139-154. doi: 10.1620/tjem.236.139.

[学会発表](計11件)

(1) Kimura, M., H. Nagashima, N. Ishii, T. So. TRAF2 and TRAF5 binding to the signal transducing receptor gp130 inhibit JAK1 activation in the IL-6-receptor signaling complex. 第46回日本免疫学会学術集会. 仙台. 2017.12.12-14.

(2) So, T., H. Nagashima, Y. Okuyama, Y. Motomura, K. Moro, L.C. Ndhlovu, C. Riccardi, N. Ishii. Early activation of group 2 innate lymphoid cells in the lung is critically controlled by the TNFR superfamily molecule GITR. 第46回日本免疫学会学術集会. 仙台. 2017.12.12-14.

(3) Phung, H.T., H. Nagashima, Y. Okuyama, S. Kobayashi, A. Asao, N. Ishii, T. So. TNF receptor-associated factor 5 expressed in non-hematopoietic cells augments acute colonic damage induced by dextran sulfate sodium. 第46回日本免疫学会学術集会. 仙台.

2017.12.12-14.

(4) Okuyama, Y., H. Nagashima, M. Ushio-Fukai, M. Croft, N. Ishii, T. So. A new regulator of OX40 co-signaling controls autoimmune neuroinflammation mediated by CD4⁺ T cells. 第 46 回日本免疫学会学術集会. 仙台. 2017.12.12-14.

(5) 宗孝紀, 長島宏行, 藤田剛, 武田武生, 奥山祐子, 本村泰隆, 茂呂和世, 大森公貴, Ndhlovu Lishomwa C., Carlo Riccardi, 石井直人. TNF 受容体型分子 GITR による 2 型自然リンパ球制御機構. 第 3 回日本骨免疫学会. 石垣. 2017.6.27-29.

(6) Okuyama, Y., H. Nagashima, T. Machiyama, M. Ushio-Fukai, M. Croft, N. Ishii, T. So. OX40 binding and regulation of T cell activation by the scaffolding IQGAP1 protein. 第 45 回日本免疫学会学術集会. 沖縄. 2016.12.5-7.

(7) Suzuki, N., K. Murata, Y. Okuyama, A. Asao, T. So, N. Tanaka, N. Ishii. Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate is required for T cell development and survival. 第 44 回日本免疫学会学術集会. 札幌. 2015.11.18-20.

(8) Nagashima, H., Y. Okuyama, T. Hayashi, N. Ishii, T. So. TRAF2 and TRAF5 have redundant but unequal inhibitory roles in Th17 differentiation mediated by IL-6. 第 45 回日本免疫学会学術集会. 沖縄. 2016.12.5-7.

(9) Asao, A., T. Fujita, T. So, T. Hoshino, N. Ishii. OX40-mediated susceptibility to imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation is dependent on IL-13. 第 44 回日本免疫学会学術集会. 札幌. 2015.11.18-20.

(10) Nagashima, H., Y. Okuyama, T. Hayashi, N. Ishii, T. So. TRAF2 and TRAF5 limit the differentiation of Th17 cells mediated by IL-6. 第 44 回日本免疫学会学術集会. 札幌. 2015.11.18-20.

(11) Okuyama, Y., H. Nagashima, M. Ushio-Fukai, M. Croft, N. Ishii, T. So. IQGAP1 regulates OX40 co-signaling in CD4⁺ T cells. 第 44 回日本免疫学会学術集会. 札幌. 2015.11.18-20.

〔図書〕(計 3 件)

(1) 宗孝紀. 2018. 第 6 章 多様性獲得機構. 79-90. 分担. 植田正, 前仲勝実 編集 薬系免疫学, 改訂第 3 版. 南江堂.

(2) 宗孝紀. 2018. 第 15 章 3 節 免疫寛容. 252-260. 分担. 植田正, 前仲勝実 編集 薬

系免疫学, 改訂第 3 版. 南江堂.

(3) 宗孝紀, 石井直人. 2015. 第 4 章 TNF スーパーファミリー. 分担. 宮園浩平, 秋山徹, 宮島篤, 宮澤恵二 編集 サイトカイン・増殖因子キーワード事典. 羊土社.

〔その他〕

(1) 宗孝紀. 2015. TRAF5 は IL-6 シグナルを制御することで Th17 分化を制御する. 臨床免疫・アレルギー科 63: 396-400.

(2) 宗孝紀, 石井直人. 2015. TRAF5 を介したシグナル伝達. 分子消化器病 12: 399-403.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

宗 孝紀 (SO, Takanori)

東北大学・医学系研究科・准教授

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・教授

研究者番号 : 6 0 2 9 4 9 6 4

(2) 研究分担者

石井 直人 (ISHII, Naoto)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号 : 6 0 2 9 1 2 6 7

(3) 研究分担者

奥山 祐子 (OKUYAMA, Yuko)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号 : 5 0 6 2 4 4 7 5