

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10530

研究課題名(和文)急性炎症の初期免疫応答におけるNFκB経路と生体侵襲の評価

研究課題名(英文) Analysis of the NF-κB pathway in the initial immune response under inflammatory conditions

研究代表者

川前 金幸 (Kawamae, Kaneyuki)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：70254026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子NFκBは、免疫応答や炎症、細胞増殖、細胞生存、癌化等の制御において中心的な役割を担う。本研究では、NFκBを介する炎症応答において細胞内二次メッセンジャー代謝酵素ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)が果たす役割を解析した。その結果、型DGKノックアウト細胞をTNF-α刺激すると、1) NFκB p65サブユニットは迅速に細胞質から核内に移行する、2) p65のリン酸化が増加する、3) NFκB転写活性が亢進する、ことを明らかにした。これらの結果は、DGKはNFκB経路に抑制的に働き、DGKの発現減少により炎症応答が促進する可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Transcription factor NFκB plays a central role in various signaling pathways including immune response, inflammation, cell survival and death, and cancer. In the present study, we examined how zeta isoform of diacylglycerol kinase (DGK) regulates NFκB pathway. We found that after TNF-α stimulation DGKzeta deficiency leads to facilitated nuclear transport of NFκB p65 subunit together with its enhanced phosphorylation, thereby upregulating NFκB transcriptional activity. These results suggest that DGKzeta negatively regulates NFκB pathway and that DGKzeta downregulation may enhance inflammatory response.

研究分野：麻酔科学

キーワード：炎症応答 脂質代謝酵素 転写活性 核内移行 リン酸化

1. 研究開始当初の背景

(1) 外科的手術、種々の要因による人工呼吸管理、および重症肺炎等において集中治療が選択される場合、その過程における生体炎症の程度が病態の予後に大きな影響を与えることが少なくない。現在の周術期モニターシステムは、薬物の投与時間と連動して血圧や血ガス等の変動を経時的にモニタリングすることを可能にしているが、惹起される炎症応答は個体により大きく異なるので、生体細胞を用いて炎症等を定量的に解析することが出来れば、生体急性炎症メカニズムの解明ひいては臨床応用に非常に有用と思われる。

(2) 申請者らの研究グループは細胞内情報伝達機構に関する研究に従事し、細胞内二次伝達物質ジアシルグリセロール (DG) のリン酸化酵素 DG キナーゼ (DGK) に関して、ラットから数種のサブタイプを単離し、DGK ファミリーの分子多様性と生体臓器における機能解析に従事してきた。

(3) 生体侵襲における炎症応答は、損傷部位から生体内に侵入した常在菌に対する生体の自然免疫応答が重要な役割を果たしている。この自然免疫応答は、LPS の受容体とされる TLR (Toll-like receptor) を介する NFkB (Nuclear factor-kappa B) の経路が重要な役割を果たすと考えられる。

(4) NFkB は、様々なストレスやサイトカイン、紫外線等の刺激により活性化され、生体免疫反応において中心的役割を果たす転写因子の一つである。その機能は、急性および慢性炎症反応や細胞増殖、アポトーシスなど多岐に渡っており、NFkB 活性制御の不良はクローン病や関節リウマチなどの炎症性疾患をはじめとし、癌や敗血症性ショックなどの原因となり、悪性腫瘍では多くの場合 NFkB の恒常的活性化が認められる。

(5) しかし、炎症応答での NFkB シグナル制御機構における DGK ファミリーの機能的役割については不明な点が多い。

2. 研究の目的

(1) 生体の炎症応答は、細菌の侵入やストレスに警鐘を発し、生体の修復を促進し細胞の増殖や生存シグナルを産生するための経路である。従って、正常な炎症応答は、生体に有用なものであり、この経路を抑制することは生体の修復を送らせる結果となる可能性もあると考えられる。

(2) DGK ファミリーの中で、ゼータ型 DGK (DGK ζ) は、様々なストレス応答に関与することが報告されており、炎症応答の制御機構にも関与することが示唆されている。

(3) 本研究では、臨床現場における周術期管

理をシミュレートし、急性炎症応答とその後の回復過程を解析するための動物実験を企画し、DGK が炎症応答における NFkB シグナル制御機構にどのような役割を果たすかについて研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞、SV40 により不死化した野生型 (C57BL6) および DGK KO マウス胎児線維芽細胞 (MEF) を用いた。各細胞は、10% ウシ胎児血清 (FBS) 含有の Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 培地中で、37 °C/5% CO₂ 環境下で培養を行った。

(2) 遺伝子導入と薬剤処理

細胞への遺伝子導入には Lipofectamine 2000 を用いた。TNF- α (20ng/ml) および IL-1 β (50ng/ml) による細胞刺激は、FBS の代わりに 0.1% bovine serum albumin (BSA) を含む DMEM 中で 4 時間血清飢餓状態にて培養した後に行った。コントロールとして、これらの薬剤の溶媒として用いた 0.1% BSA を添加した。

(3) 免疫細胞化学解析

継代細胞をカバーガラス上で 24 時間培養後、各々の刺激等を行った。パラホルムアルデヒドにて細胞を固定し、抗 NF- κ B p65 抗体を用いて蛍光染色を行った。

(4) ウェスタンブロット解析

細胞を回収後、以下の抗体を用いて、タンパク質の発現解析を行った: DGK, p65, I κ B, IKK α , IKK β , phospho-p65 Ser536, phospho-p65 Ser468, phospho-IKK α / Ser176/180, phospho-Akt Ser473, phospho-p38 Thr180/Tyr182, p38, phospho-ERK Thr202/Tyr204, ERK, phospho-JNK Thr183/Tyr185, JNK

(5) レポーターアッセイを用いた転写活性の測定

コントロールおよびヒト DGK siRNA を HeLa 細胞に導入した。24 時間後にホタルルシフェラーゼベクター pNF- κ B-Luc (Clontech) 2 μ g の遺伝子導入を行った。その 24 時間後に TNF- α 刺激を行い、8 時間後に細胞を回収しルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。

4. 研究成果

(1) 炎症応答における NFkB の細胞内局在の変化

炎症応答において DGK が NFkB の細胞内動態に及ぼす影響を検討するため、DGK ノックダウン細胞を用いて TNF- α 刺激後の NFkB p65 サブユニットの細胞内局在を免疫細胞化学的に解析した。HeLa 細胞に DGK siRNA を

導入 48 時間後に TNF- を添加し、経時的に NFkB p65 サブユニットの局在を観察した。非刺激状態では p65 サブユニットは細胞質に局在した。そしてコントロール細胞では刺激後 30 分をピークに p65 サブユニットは核内に優位な局在を示し、その後細胞質に再び認められた。

一方 DGK のノックダウンにより p65 は刺激後 15 分で大部分の細胞において核内に優位な局在を示し、60 分まで継続した。この結果は、DGK の発現低下により刺激後の NFkB の核移行が促進され、かつ、細胞質への再移行が遷延する可能性を示唆する。

炎症性の刺激において DGK が NFkB の核移行に及ぼす影響をさらに解析するために、DGK KO MEF を用いて TNF- および IL-1 刺激による p65 の免疫細胞化学的解析を行った。ノックダウン細胞と同様に TNF- 刺激により p65 は迅速な核移行と核内滞在時間の遷延を示した。また、IL-1 による刺激でも同様の結果が得られた。

(2) NFkB 制御機構の分子メカニズムの解析

DGK ノックダウン細胞における NFkB の細胞内動態における IκB の関与を検討するためにウエスタンブロット解析を行った。HeLa 細胞に DGK siRNA を導入 48 時間後に TNF- を添加し、経時的に細胞を解析した。DGK ノックダウン細胞では、コントロールと比較して刺激 15~30 分に IκB のバンドは著しく減少し、IκB の分解が亢進していることが判明した。またコントロールでは 60 分後の発現量は回復傾向にあるが、ノックダウン細胞ではその回復の遅延も生じていた。このような IκB 分解の促進と回復の遅延は DGK KO MEF においてもノックダウン細胞と同様に認められた。

NFkB 制御機構をさらに詳細に解析するため、IκB の調節メカニズムについて検討を行った。野生型 MEF および DGK KO MEF を TNF- にて刺激後、経時的に解析を行った結果、

DGK KO MEF では、野生型 MEF と比較して IκB のリン酸化を担う IKK のリン酸化が亢進することが明らかとなった。また、p65 Ser 536 および p65 Ser 486 のリン酸化レベルも同様に亢進していることが判明し、IKK が IκB のみならず p65 にも作用していると考えられた。

炎症応答における NFkB の活性には PI3K-Akt 経路および mitogen-activated protein kinase (MAPK) の関与が報告されている。PI3K-Akt 経路の活性化により、その下流において IKK あるいは p38 と IKK が活性化されることにより p65 のリン酸化が起こる可能性が示唆されている。extracellular signal-related kinase (ERK) もまた、MSK1/2 を介して p65 のリン酸化を促進する可能性が報告されている。さらに、DGK KO マウスのマクロファージに LPS を投与すると、野生型と比較して ERK のリン酸化および Akt

のリン酸化が増加することが報告されている。しかしながら本研究の実験において、TNF- 刺激による MAPKs および Akt のリン酸化レベルには、いずれにおいても明らかな変化は認められなかった。

(3) NFkB 転写活性の解析

次に DGK の欠失による NFkB 転写活性への影響を検討した。DGK ノックダウン HeLa 細胞を用いてルシフェラーゼレポーターアッセイを施行したところ、コントロール siRNA 導入細胞では TNF- 刺激時に約 5 倍の転写活性増加を示すのに対して、DGK ノックダウン細胞においては 10~20 倍の増加が認められた。この時、RT-PCR 解析を行うと、DGK KO MEF において NFkB の標的遺伝子のひとつである TNF- mRNA の著しい発現増加が認められた。

(4) DGK 結合タンパクによる NFkB 制御メカニズムの解析

さらに、新規 DGK 結合タンパクとして同定した NAP1L1 および NAP1L4 が NFkB 転写活性に対して及ぼす影響を解析した。その結果、NAP1L1 ノックダウン細胞においては、ルシフェラーゼアッセイにて NFkB 転写活性が減少することが明らかとなった。この細胞では、TNA 刺激後、抗アポトーシス作用をもつ Mcl-1 の遺伝子転写が選択的に抑制され、その結果、ミトコンドリア膜電位が減少し、アポトーシスが促進することが判明した。一方で、NAP1L4 ノックダウン細胞では NFkB 転写活性に対する影響は認められなかった。以上の結果は、DGK 結合タンパクは、NFkB 制御機構において、おのおの特有の機能を担う可能性が考えられた。

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 6 件)

- (1) Tanaka T, Hozumi Y, Iino M, Goto K. NAP1L1 regulates NF- B signaling pathway acting on anti-apoptotic Mcl-1 gene expression. *Biochim Biophys Acta Molecular Cell Research*. 2017;1864:1759-1768. (査読有) doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.06.021.
- (2) Iwazaki K, Tanaka T, Hozumi Y, Okada M, Tsuchiya R, Iseki K, Topham MK, Kawamae K, Takagi M, Goto K. DGK Downregulation Enhances Osteoclast Differentiation and Bone Resorption Activity Under Inflammatory Conditions. *J Cell Physiol*. 2017;232:617-624. (査読有) doi: 10.1002/jcp.25461.
- (3) Nakano T, Matsui H, Tanaka T, Hozumi Y, Iseki K, Kawamae K, Goto K. Arachidonoyl-Specific Diacylglycerol

Kinase and the Endoplasmic Reticulum. *Front Cell Dev Biol.* 2016;4:132. (査読有) eCollection 2016.

- (4) Kosawada T, Koizumi T, Ugajin K, Feng Z, Goto K. Novel three-dimensional micro vibration actuator for imposing dynamic stimulations to promote differentiation of iPS cells. *Microsyst Technol* (2016) 22:45-56. (査読有) DOI 10.1007/s00542-015-2644-y
- (5) Tanaka T, Tsuchiya R, Hozumi Y, Nakano T, Okada M, Goto K. Reciprocal regulation of p53 and NF- κ B by diacylglycerol kinase. *Adv. Biol. Regul.* 2016, 60:15-21. (査読有) doi: 10.1016/j.jbior.2015.09.009.
- (6) Tsuchiya R, Tanaka T, Hozumi Y, Nakano T, Okada M, Topham MK, Iino M, Goto K. Downregulation of diacylglycerol kinase enhances activation of cytokine-induced NF- κ B signaling pathway. *Biochim Biophys Acta Mol. Cell Res.* 2015, 1853: 361-9. (査読有) doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.11.011.

[学会発表](計7件)

- (1) 田中俊昭、後藤薫 : DGKzeta 結合蛋白 NAP1-like proteins による p53 アセチル化制御を介した細胞周期およびアポトーシス制御機構の解析. 第 123 回日本解剖学会総会、東京 ; 2018 年 3 月
- (2) Goto K, Regulation of p53 and NF κ B by DGKzeta. 7th DGK meeting, Kobe, Japan: March 2017.
- (3) 田中俊昭、後藤薫 : DGK 結合蛋白 NAP1L1 による NF- κ B 転写調節を介したアポトーシス制御. 第 122 回日本解剖学会総会、長崎 ; 2017 年 3 月
- (4) 秋元亮、田中俊昭、八月朔日泰和、川前金幸、後藤薫 : ゼータ型 DGK によるエネルギーセンサー AMPK の制御. 第 121 回日本解剖学会総会、ビッグパレットふくしま(福島県郡山市); 2016 年 3 月 28-30 日
- (5) 田中俊昭、後藤薫 : DGK 結合蛋白 NAP1L1 による NF- κ B 転写活性制御副腎におけるイノシトールリン脂質代謝関連分子の発現局在解析. 第 121 回日本解剖学会総会、ビッグパレットふくしま(福島県郡山市); 2016 年 3 月 28-30 日
- (6) 後藤薫 : Cellular processes mediated by a lipid-metabolizing enzyme diacylglycerol kinase (DGK) family. 第 120 回日本解剖学会総会、神戸国際会議場(兵庫県神戸市); 2015 年 3 月 21-23 日
- (7) 田中俊昭、後藤薫 : DGK-interacting NAP1-like proteins regulate cell cycle and apoptosis by controlling p53 acetylation. 第 120 回日本解剖学会総会、

神戸国際会議場(兵庫県神戸市); 2015 年 3 月 21-23 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川前 金幸 (KAWAMAE KANEYUKI)

山形大学・医学部・教授

研究者番号 : 70254026

(2) 研究分担者

後藤 薫 (GOTO KAORU)

山形大学・医学部・教授

研究者番号 : 30234975