

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591424

研究課題名(和文)白血球におけるG-CSFとATPによるTLRシグナルの負の制御機構の解明

研究課題名(英文)Negative regulation of TLR signaling by G-CSF and ATP in leukocytes

研究代表者

北川 誠一(KITAGAWA, Seiichi)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50133278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト白血球(好中球および単球)には様々なToll様受容体が発現し、自然免疫において重要な役割を果たしている。Toll様受容体を介する細胞の活性化機構については多くのことが明らかになってきたが、この機構を「正または負に制御する機構」についての研究は進んでいない。特に、炎症や組織傷害を制御する観点から生理的因子による「負の制御機構」の解明は極めて重要である。私達は、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子、インターフェロン およびインターフェロンによる「正の制御機構」と顆粒球コロニー刺激因子およびATP(アデノシン三リン酸)による「負の制御機構」を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Various Toll-like receptors are expressed on human leukocytes such as neutrophils and monocytes, and play an important role in the innate immunity. Although the molecular mechanisms of Toll-like receptor-mediated cell activation have been increasingly understood, the positive and negative regulatory mechanisms on this system remain to be elusive. To elucidate the negative regulatory mechanisms by physiological molecules is particularly important for possible treatment of inflammation and tissue damage. We found that this system was positively regulated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interferon-alpha and interferon-gamma, and was negatively regulated by granulocyte colony-stimulating factor and ATP (adenosine tri-phosphate).

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：好中球 単球 リポポリサッカライド 腫瘍壊死因子 顆粒球コロニー刺激因子 ATP インターフェロン IL-8

1. 研究開始当初の背景

白血球(好中球および単球)は自然免疫を担当する細胞であり、細菌感染および感染に伴う炎症において最も重要な役割を果たしている。白血球はその表面に様々な Toll 様受容体(Toll-like receptor; TLR)を発現し、この分子(受容体)を介して細菌の菌体成分を認識している。細菌の菌体成分であるリポポリサッカライド(LPS)がその受容体である TLR4 に結合すると様々な炎症性サイトカインが産生され、炎症および免疫反応を制御している。

私達はヒト白血球(好中球および単球)機能の制御機構に関してこれまで多くの研究成果を報告してきた。リポポリサッカライドによって誘導されるヒト好中球および単球からの腫瘍壊死因子の産生が造血因子である G-CSF(顆粒球コロニー刺激因子)によって抑制されることを明らかにし、その制御の分子機構も明らかにした。すなわち、G-CSFは JAK2/STAT3の活性化を介して転写レベルで腫瘍壊死因子の産生を抑制することを明らかにした。一方、リポポリサッカライドによって誘導されるヒト好中球からの腫瘍壊死因子の産生は GM-CSF(顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子)によって増強され、GM-CSFの増強作用は G-CSFによって抑制されることを明らかにした。

G-CSFおよび GM-CSFは好中球系前駆細胞の増殖と分化を促進して好中球数を増加させると共に好中球機能を亢進させることにより、細菌感染に対する生体の防御能を増強させることをすでに私達は明らかにしている。したがって、これまでの研究から、G-CSFや GM-CSFなどのサイトカインには、好中球数の増加やその機能の亢進を介して細菌感染に対する生体防御能を増強させると共にリポポリサッカライド刺激により誘導されるサイトカインの産生を正または負に制御することによって炎症反応や免疫応答を様々な制御していると考えられた。興味深いことに、これらの延長線上における研究から、ATP(アデノシン三リン酸)が、G-CSFと同様に、リポポリサッカライド刺激により誘導されるヒト好中球からの腫瘍壊死因子の産生を抑制することを見出した。細胞質内に存在する ATP は、細胞の崩壊によるばかりでなく、様々な刺激に反応して積極的に細胞外に放出されることが知られている。本研究課題は、これらの予備的実験結果に立脚し、さらに発展させることを目的とした。

2. 研究の目的

白血球(好中球および単球)には様々な Toll 様受容体(TLR)が発現し、自然免疫において重要な役割を果たしている。Toll 様受容体を介する細胞の活性化機構については多くのことが明らかになってきたが、この機構を「正または負に制御する機構」についての研究は進んでいない。特に、炎症や組織傷害を

制御する観点から生理的因子による「負の制御機構」の解明は極めて重要である。申請者らは、生理的に重要な系として G-CSF/STAT3による負の制御機構を明らかにしてきた。さらに、ATPも P2Y 受容体を介して負の制御を示すことを見出している。本研究課題では、ヒト白血球(好中球および単球)における G-CSF/STAT3および ATP/P2Yによる Toll 様受容体シグナルの負の制御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) インフォームドコンセントを得た上でヒト末梢血を採取し、好中球および単球を単離した。好中球はデキストラン沈降、フィコール・コンレイ比重遠心法および溶血操作を行って単離した。単球はエルトリエーターを用いて単離した。

(2) 単離したヒト好中球および単球を RPMI1640 に浮遊させて培養した。培養液にリポポリサッカライド、G-CSF、GM-CSF、インターフェロン、インターフェロン、ATPなどを添加し、必要時間培養後、培養液中のサイトカイン(腫瘍壊死因子、インターロイキン 8(IL-8))を ELISA 法で測定した。mRNA は real time PCR 法を用いて定量的に解析した。

(3) 細胞内刺激伝達分子の活性化はウエスタンブロット法で解析した。

4. 研究成果

(1) ヒト好中球はリポポリサッカライド刺激に反応して腫瘍壊死因子を産生した。インターフェロン およびインターフェロンはリポポリサッカライド刺激によって誘導される好中球からの腫瘍壊死因子の産生を増強し、その作用はインターフェロン > インターフェロンであった。リポポリサッカライドまたはインターフェロン + リポポリサッカライド刺激によって誘導される好中球からの腫瘍壊死因子の産生は、G-CSF(顆粒球コロニー刺激因子)、ATPおよび BzATP(benzoylbenzoyl-ATP)によって抑制され、UTPでは抑制されなかった。インターフェロン、インターフェロン、G-CSF、ATPおよび BzATPによる腫瘍壊死因子産生の制御は mRNA レベルで生じていた。

G-CSFは JAK2/STAT3の活性化を介してリポポリサッカライド刺激により誘導されるヒト好中球および単球からの腫瘍壊死因子産生を抑制することを私達はすでに明らかにしている。一方、いくつかの ATP アナログを用いた解析から、ATPは P2Y11 受容体に作用して細胞内 cyclic AMP を増加させることにより、リポポリサッカライドまたはインターフェロン + リポポリサッカライド刺激によって誘導されるヒト好中球からの腫瘍壊死因子の産生を抑制すると考えられた。事実、G-CSFと ATPを

併用すると相加的に抑制作用が強くなった。このことは、G-CSFとATPがそれぞれ異なる分子機序を介して抑制作用を示すことを示唆している。

ヒト単球においても、好中球におけると同様、インターフェロン はリポポリサッカライド刺激によって誘導される腫瘍壊死因子の産生を増強した。リポポリサッカライドまたはインターフェロン +リポポリサッカライド刺激によって誘導される単球からの腫瘍壊死因子の産生はATPおよびBzATPによって抑制され、UTPでは抑制されなかった。

これらの結果は、リポポリサッカライド刺激によって誘導されるヒト好中球および単球からの腫瘍壊死因子の産生がインターフェロン およびインターフェロン によって正に制御され、顆粒球コロニー刺激因子およびATPによって負に制御されていることを示している。

(2) ヒト好中球および単球はリポポリサッカライド刺激に反応してケモカインであるIL-8を産生した。GM-CSF(顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子)、インターフェロン およびインターフェロン はリポポリサッカライド刺激によって誘導されるヒト好中球からのIL-8の産生を増強した。一方、リポポリサッカライド刺激により誘導される好中球からのIL-8の産生はG-CSFで抑制され、ATPおよびBzATPによって亢進した。興味深いことに、ATPおよびBzATPはヒト単球に作用してIL-8の産生を直接誘導し、リポポリサッカライド刺激によって誘導されるIL-8の産生には影響を与えなかった。これらの因子によるIL-8産生の制御はmRNAレベルで生じていた。これらの結果は、ヒト好中球および単球におけるIL-8産生の制御機構は、腫瘍壊死因子産生の制御機構とは異なり、また、炎症性サイトカインやATPによって異なる制御を受けていることを示している。

(3) 敗血症や心血管疾患などの様々な炎症性疾患の臨床経過には性差が認められている。例えば、敗血症の予後においては、更年期前の女性の予後が男性よりも良好であることがこれまでの研究から示されている。そこで、若い男性と若い女性の末梢血好中球を用いて、リポポリサッカライドおよびインターフェロン 刺激により誘導される好中球からの腫瘍壊死因子の産生における性差について検討した。女性の好中球に比べ、男性の好中球はリポポリサッカライド刺激に反応して多くの腫瘍壊死因子を産生した。また、男性の好中球ではTLR4の下流で活性化される細胞内刺激伝達分子(MAPキナーゼやPI3キナーゼ)のより強い活性化が認められた。これらの分子のなかでERK、p38およびPI3Kが腫瘍壊死因子の産生に関与すると考えられた。すでに上で明らかにしたように、リポポリサッカライド刺激によって誘導

される腫瘍壊死因子の産生は、細胞をインターフェロン で前処理することによって増強される。この増強作用(インターフェロンのプライミング作用)は男性の好中球でより強く認められた。また、TLR4は男性の好中球でより強く発現しており、その発現はインターフェロン またはインターフェロン とリポポリサッカライドの共刺激によってさらに強くなった。一方、インターフェロン 受容体の発現に性差は認められなかった。これらの結果は、男性の好中球が女性の好中球よりもリポポリサッカライドおよびインターフェロン 刺激に対する反応性が高いことを示しており、リポポリサッカライドおよびインターフェロン に対する好中球の反応性における性差が敗血症における臨床経過の性差に部分的に関与していることを示唆している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

1. Takada Y, Mizobuchi A, Kato T, Kasahara E, Ito C, Watanabe H, Kanzaki K, Kitagawa S, Tachibana T, Azuma M. Isolation of diploid baker's yeast capable of strongly activating immune cells and analyses of the cell wall structure. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* in press, 2014. 査読有
2. Aomatsu M, Kato T, Kasahara E, Kitagawa S. Gender difference in tumor necrosis factor- production in human neutrophils stimulated by lipopolysaccharide and interferon- . *Biochem Biophys Res Commun* 441: 220-225, 2013. 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.042.
3. Watanabe N, Kato T, Fujita H, Kitagawa S. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q is a novel substrate of SH2 domain-containing phosphatase-2. *J Biochem* 154: 475-480, 2013. 査読有. doi: 10.1093/jb/mvt078.
4. Kashiwagi S, Onoda N, Asano Y, Noda S, Kawajiri H, Takashima T, Ohsawa M, Kitagawa S, Hirakawa K. Adjunctive imprint cytology of core needle biopsy specimens improved diagnostic accuracy for breast cancer. *Springerplus* 2: 372, 2013. 査読有. doi: 10.1186/2193-1801-2-372.
5. Kashiwagi S, Onoda N, Asano Y, Noda S, Kawajiri H, Takashima T, Ohsawa M, Kitagawa S, Hirakawa K. Clinical significance of the sub-classification of 71 cases mucinous breast carcinoma. *Springerplus* 2:481, 2013. 査読有 .

- doi: 10.1186/2193-1801-2-481.
6. Xiao S, Wang L, Kimura M, Kojima H, Kunimoto H, Nishiumi F, Yamamoto N, Nishio K, Fujimoto S, Kato T, Kitagawa S, Yamane H, Nakajima K, Inoue A. S1-1/RBM10: Multiplicity and cooperativity of nuclear localization domains. *Biol Cell* 105: 162-174, 2013. 査読有. doi: 10.1111/boc.201200068.
 7. 北川誠一. 食細胞の機能とサイトカイン. 臨床免疫・アレルギー科. 57 [Suppl. 21]: 698-706, 2012. 査読無. 依頼原稿.
 8. Fujita H, Kato T, Watanabe N, Takahashi T, Kitagawa S. Stimulation of human formyl peptide receptors by calpain inhibitors: Homology modeling of receptors and ligand docking simulation. *Arch Biochem Biophys* 516: 121-127, 2011. 査読有. doi: 10.1016/j.abb.2011.09.017.
 9. Yamamoto M, Kato T, Hotta C, Nishiyama A, Kurotaki D, Yoshinari M, Takami M, Ichino M, Nakazawa M, Matsuyama T, Kamijo R, Kitagawa S, Ozato K, Tamura T. Shared and distinct functions of the transcription factors IRF4 and IRF8 in myeloid cell development. *PLoS ONE* 6: e25812, 2011. 査読有. doi: 10.1371/journal.pone.0025812.
 10. Fujita H, Kato T, Watanabe N, Takahashi T, Kitagawa S. Calpain inhibitors stimulate phagocyte functions via activation of human formyl peptide receptors. *Arch Biochem Biophys* 513: 51-60, 2011. 査読有. doi: 10.1016/j.abb.2011.06.007.

〔学会発表〕(計 2 1 件)

1. 青松恵美、加藤隆幸、笠原恵美子、北川誠一. LPSおよびIFN- γ 刺激により誘導されるヒト好中球からのTNF- α 産生における性差. 第106回近畿生理学談話会. 2013年11月2日. 奈良県立医科大学, 奈良.
2. 加藤隆幸、青松恵美、笠原恵美子、藤田寿一、北川誠一. Regulation of G-CSF/IFN/ATP on LPS-induced TNF-production in human neutrophils. 第75回日本血液学会学術集会. 2013年10月11日~13日. 札幌市教育文化会館, 札幌. (優秀ポスター賞)
3. Kasahara E, Sekiyama A, Hori M, Chida D, Okamura H, Inoue M, Kitagawa S. Role of the HPA-axis and mitochondria in LPS-induced septic shock. 6th Joint Meeting of the Societies for Free Radical Research. Sept. 12-14, 2013. Mercure Sydney Hotel, Sydney, Australia. (招待講演)
4. 藤田寿一、加藤隆幸、渡邊哲史、高橋達治、北川誠一. Activation of human formyl

- peptide receptors by calpain inhibitors. 第74回日本血液学会学術集会. 2012年10月19日~21日. 京都国際会館, 京都. (優秀ポスター賞)
5. Fujita H, Kato T, Watanabe N, Takahashi T, Kitagawa S. Stimulation of human formyl peptide receptors by calpain inhibitors. 5th Anniversary of Protein and Peptide Conference (PepCon-2012) March 25, 2012, Beijing, China. (招待講演)
 6. 藤田寿一、加藤隆幸、渡邊哲史、高橋達治、北川誠一. ヒト・フォルミルペプチド受容体を介したカルパイン阻害剤による細胞機能の活性化. 第73回日本血液学会学術集会. 2011年10月14日~16日. 名古屋国際会議場, 名古屋.
 7. 笠原恵美子、関山敦生、堀美香、松本壮吉、佐藤英介、岡村春樹、井上正康、北川誠一. マクロファージのLPS応答におけるミトコンドリアの役割. 第84回日本生化学会. 2011年9月21日~24日. 京都国際会館, 京都.
 8. Kato T, Fujita H, Watanabe N, Kitagawa S. Negative regulation of G-CSF on TLR agonist-induced TNF production in human monocytes and neutrophils. 13th International TNF Conference (TNF2011) May 16, 2011, Hyogo, Japan.

〔図書〕(計 2 1 件)

1. Kitagawa S, Kato T, Kitagawa M, Aomatsu M, Fujita H. Biological Effects of Calpain Inhibitors on Human Phagocyte Functions. In: Enzymes and Enzyme Activity. Chapter V. ed. E.M. Lashinski, pp.121-144, 2013. Nova Science Publishers, Inc. NY. (総ページ数 185)
2. 北川誠一. 「血液細胞の産生」(p.508-511)、「鉄の代謝」(p.522-523)、「白血球の生理学」(p.525-531)、「血小板の生理学と凝固機能」(p.538-540)、「血液型」(p.541-543). 「標準生理学. 第8版」医学書院. 小澤静司、福田康一郎 監修. 2013. 東京. (総ページ数 1140)
3. 北川誠一. 「免疫、感染、炎症」(p.77-96)「ギャング生理学. 原書 2 4 版」丸善出版. 岡田泰伸 監訳. 2013. 東京. (総ページ数 860)
4. Kitagawa S. Visual Basic Medicine, 2nd edition, Vol. 10. Blood, 2011. Institute of A-V Medical Education, Inc., Tokyo. (DVD Text)

6. 研究組織

- (1)研究代表者
北川 誠一 (KITAGAWA, Seiichi)
大阪市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 5 0 1 3 3 2 7 8

(2)研究分担者

加藤 隆幸 (KATO, Takayuki)
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：5 0 3 4 3 4 1 3