

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591765

研究課題名（和文） TACE の骨代謝，炎症性疾患における機能解析

研究課題名（英文） Studies of TACE in bone biology and inflammatory diseases

研究代表者

堀内 圭輔 (HORIUCHI KEISUKE)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：30327564

研究成果の概要：TNF converting enzyme (TACE)は膜型前駆蛋白として産生される TNF を切断・可溶化する酵素として同定されたが，その後数多くの膜蛋白がその標的分子として同定されている．本研究では研究代表者が作成した TACE 遺伝子改変マスおよびその細胞を利用し TACE が *in vivo* の病態モデルにおいても TNF の可溶化に中心的な役割を担うこと，さらに TACE を広く欠損したマウス作成し，TACE の生体における様々な機能を明らかにした．また生化学的手法を用いて膜型 CSF-1 および Flt3 リガンドに TACE が関与していることを解明した．

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨・軟骨代謝学

1. 研究開始当初の背景

骨は一見静的であるが他の臓器と同様に活発な代謝を行っている臓器である．その関連疾患として骨粗鬆症，転移性骨腫瘍，リウマチ・変形性関節症に伴う骨関節破壊など多数挙げられるが，それらの病態・病因のメカニズムの解明は未だ発展途上であり，治療法の確立を考える上でそれらの理解は欠かせない．膜型蛋白は細胞間の情報伝達に中心的な役割を担っており，骨代謝，免疫などの分野においても様々な局面で重要な機能を有していることが知られている．こうした膜型蛋白の機能は分子生物学的手法をもとに極めて詳細な研究がなされているが，一方でこう

した分子の翻訳後活性調節に関しては十分理解されていない．翻訳後機能調節には様々な機構が存在するが，膜蛋白においては細胞膜上での細胞外領域の切断 (ectodomain shedding) が翻訳後活性調節機構の一つとして注目されている．本研究で注目している TNF converting enzyme (TACE) はもともと膜型前駆蛋白として産生される tumor necrosis factor (TNF) を切断・可溶化する酵素として同定されたが，その後数多くの膜蛋白がその標的分子として同定され，生体における ectodomain shedding の中心的な分子であることが示唆されていた．しかしながら，TACE 欠損マウスが致死性であったた

め TACE の生体における機能は十分に理解されていない状態であった。

2. 研究の目的

前述のごとく TACE ノックアウトマウスは周産期で死亡するため、これまで成体マウスを用いた TACE の生理的機能解析および病態モデルを利用した研究の障害となっていた。本研究ではこの問題点を回避し、TACE の生体および病態における役割・機能の解明を目的としている。本研究の第一段階の目標は“Cre-LoxP を用いたコンディショナル TACE ノックアウトマウスの確立”である。このコンディショナル TACE ノックアウトマウスは研究代表者が 2005 年より開発に着手しており、本研究課題ではこの TACE 遺伝子改変マウスを利用し特に骨代謝および免疫における TACE の機能の解明を目指している。また第二の目標は“TACE 遺伝子改変マウスを利用した病態モデルの開発と解析”であり、敗血症性ショックや慢性関節リウマチなどの病態における TACE の関与を検討する予定である。またこれらの vivo の研究と並行して、TACE の活性調節機構解明および TACE の新規標的分子同定を目標に in vitro の解析を行う計画である。

3. 研究の方法

TACE の生体における機能は上述の TACE 遺伝子改変マウスへの病的負荷および無刺激下の表現系解析を主に行う。また in vitro における TACE の標的分子同定（今回の研究では血球細胞分化に関わる CSF-1 と Flt3 リガンドを TACE の標的分子として同定している）は TACE 遺伝子改変マウス由来の細胞を利用し生化学的手法を用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) 敗血症性ショックモデルにおける TACE の役割の解明：TNF は関節リウマチ、クローン病などで中心的な役割を担う炎症性サイトカインであり、このことから近年 TNF をターゲットとした治療法が注目されている。興味深いことに TNF はまず細胞膜に結合した膜型蛋白として合成され、その後蛋白分解作用を受けて可溶型となる。近年の研究からこの可溶型の TNF が炎症の惹起に必須であることが明らかにされており、このことから TNF の可溶化の阻害によって TNF の活性を抑制する可能性が示唆されている。この膜型 TNF の蛋白分解 (ectodomain shedding) にはこれまで複数の酵素が関与することが示唆されているが、その中でも TACE が有力候補として挙げられていた。しかしながら TACE 欠損マウスが周産期致死性であるため、成獣および病的環境下における TACE の機能解析の障害となっていた。本研究では

Cre-LoxP を利用したコンディショナル TACE ノックアウトマウス（以下 *Tace^{fllox/fllox}*）を基に、in vivo における TACE の機能を敗血症性ショックモデルを用いて検証した。

まず作成した *Tace^{fllox/fllox}* マウスにおいて Cre 酵素による TACE の excision が誘導されるかを検討するため、*Tace^{fllox/fllox}* マウスを E11.5 Cre マウス（Cre 酵素を胎生初期から発現する Cre トランスジェニックマウス）と交配し TACE 欠損マウス（以下 *Tace^{null/null}*）を作成した。*Tace^{null/null}* は従来報告されている TACE 活性部位欠損マウスと同様に心発生、上皮などに異常を認め周産期致死性であった。このことから Cre の発現によって TACE が設計通り不活化されることが確認された。

次に in vivo における TNF の shedding を評価するために *Tace^{fllox/fllox}* を MX1-Cre, LysM-Cre トランスジェニックマウスと交配し、血球系細胞・肝臓などを中心に TACE を不活化したマウス (*Tace^{fllox/fllox}/MX1-Cre* マウス) とマクロファージ・単球系細胞のみにおいて TACE を不活化したマウス (*Tace^{fllox/fllox}/LysM-Cre* マウス) を作成した。また TNF の活性化を評価する実験系として lipopolysaccharide (LPS) 腹腔内注入による敗血症モデルを利用した。野生型マウスのほぼすべてが LPS 注入後 10 時間以内にショック状態となり死亡したのに対し、*Tace^{fllox/fllox}/MX1-Cre* マウスは LPS に対し高い抵抗性を示しその多くが最後まで生存した。血中 TNF 濃度を測定したところ、これらの遺伝子改変マウスは野生型に比較して有意に低値であった。TNF の供給源として好中球やマクロファージが重要な枠割を果たすことから、*Tace^{fllox/fllox}/LysM-Cre* マウスを利用し同様の実験を試みた。そうしたところこれらの遺伝子改変マウスにおいても血中 TNF 濃度が有意に低値でありショックに対し極めて高い抵抗性を示すことが明らかとなった。これらの知見から TACE は in vivo においても TNF の可溶化に必須の酵素であり、TNF が中心的な役割を果たす病態において TACE が治療ターゲットとなる可能性が示唆された。（論文 参照）

(2) 膜型 CSF-1 の転写後機能修飾の解析：単球・マクロファージの分化・活性維持に必須の分子である CSF-1 (M-CSF) は選択的スプライシングによって可溶型および膜結合型のアイソフォームとして産生されることが知られている。この膜型 CSF-1 自体も活性を有するが、さらに細胞膜上で切断され細胞膜から放出されることが報告されている。この切断酵素は長らく不明であったが、上記の遺伝子改変マウス由来の細胞を利用し、膜型 CSF-1 が TACE により切断を受けることを示した。また併せて、切断を受けなかった膜型

CSF-1がエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれることを明らかにした。これらの結果から、膜型CSF-1がTACEによるectodomain shedding、およびエンドサイトーシスという二つのメカニズムから細胞膜上の発現量が調節されているという仮説を提唱した(論文, 参照)。

(3) TACEがFLT3リガンドの可溶性酵素であることの同定: FLT3リガンド(以下FLT3L)はCSF-1およびKitリガンドと相同性を有する分子であり、hematopoietic stem cellや樹状細胞の分化・増殖に重要な役割のあることが報告されている。FLT3Lはまずは膜型蛋白として産生され、その後細胞膜表面にて蛋白分解作用を受け可溶性蛋白として放出されるが、その分解酵素はこれまで不明であった。本研究プロジェクトでは生化学的手法およびTACE遺伝子改変マウスを利用してTACEがFLT3Lのsheddingの主要な酵素であることを明らかにした。これまで膜型CSF-1およびKitリガンドのsheddingにもTACEが関わっていることを示しており、本プロジェクトの結果はTACEがtype III tyrosine kinase receptorのリガンドファミリーの機能をsheddingを介して制御していることを示唆するものであった(論文 参照)。

(4) 造血・骨代謝におけるTACEの機能解析: TACE欠損マウスが周産期致死性であるため成獣におけるTACEの機能は十分に理解されていない。その中でも血球系細胞に関してはTACE欠損マウスの胎児から採取した脾臓細胞を他のマウスに移植することにより、TACEの血球系細胞における機能の解析が試みられている。しかしながら、TACEを広範囲に不活化したマウスの解析はこれまでのところ報告がない。そこで、*Tace^{fllox/fllox}*とSox9プロモーター下でCreを発現するトランスジェニックマウス(*Sox9/Cre*)を交配し、比較的広範にTACEを欠損した変異マウス(以下*Tace/Sox9*マウス)を作成した。Sox9は骨・軟骨細胞をはじめとして、皮膚、内臓、神経組織などに広く発現するが、血球系細胞には発現しないことが知られている。作成した*Tace/Sox9*マウスの大多数は4カ月以上生存したが、成長障害、皮膚異常、生殖異常など多彩な表現系を呈することが観察された。これらの表現系の中でも特に骨、および造血の異常を中心に解析を行った。

*Tace/Sox9*マウスの骨の表現系として 出生 - 8週頃まで; 成長軟骨の肥厚、および長管骨の短縮、8週以降; 骨量の著明な低下(骨粗鬆症)が観察された。骨形態計測を行ったところ骨芽細胞、破骨細胞ともに活性が上昇しており、高回転型の骨粗鬆症を呈していることが明らかとなった。また骨

髄は脂肪細胞に置き換わることなく、常に骨髓細胞で占められていることが観察された。さらに*Tace/Sox9*マウスの脾臓および肝臓において髄外造血が認められ、骨髓では造血幹細胞数が増加していることが確認された。

これまで様々なサイトカインが骨代謝および造血幹細胞の調節にかかわっていることが報告されているが、その中でもG-CSFは骨代謝・造血の双方に深く関与していることが知られている。G-CSFは顆粒球の増殖を刺激するだけでなく、破骨細胞の分化を促進する作用のあることが報告されており、このことからG-CSFの産生異常が*Tace/Sox9*マウスに認められた表現系(骨代謝異常(破骨細胞活性上昇、骨量低下)および造血系異常)の原因である可能性が推測された。そこで血清G-CSF濃度をELISAにて評価したところ、*Tace/Sox9*マウスのG-CSF血中濃度は野生型のおよそ1.3倍以上高値であり、さらにG-CSFの上流に位置するIL-17もやはり極めて高い値であることが観察された(図5)。これらの結果からTACEがIL-17/G-CSFの発現調節に関与しており、TACEを欠損することによりその負の調節機構が破綻しIL-17/G-CSFによるシグナリングに異常を来し、*Tace/Sox9*マウスで観察された骨組織および造血系の表現系を呈するものと推測された。(論文 参照)

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 7件)

Horiuchi, K., H. Morioka, H. Takaishi, H. Akiyama, C. P. Blobel and Y. Toyama. 2009. Ectodomain shedding of FLT3 ligand is mediated by TACE. *J Immunol* (in press). (査読有り)

Le Gall, S. M., P. Bob, K. Reiss, K. Horiuchi, D. Lundell, D. R. Gibb, D. Conrad, P. Saftig and C. P. Blobel. 2009. ADAMs 10 and 17 are differentially regulated components of a general shedding machinery for TGF β , TNF and other membrane proteins. *Mol Biol Cell* 20. 1785-1794. (査読有り)

Horiuchi, K., T. Kimura, T. Miyamoto, K. Miyamoto, H. Akiyama, H. Takaishi, H. Morioka, T. Nakamura, Y. Okada, C. P. Blobel and Y. Toyama. 2009. Conditional inactivation of TACE by a

Sox9 promoter leads to osteoporosis and increased granulopoiesis via dysregulation of IL-17 and G-CSF. J Immunol 182: 2093-2101. (査読有り)

Swendeman, S., K. Mendelson, G. Weskamp, K. Hoiruchi, U. Deutsch, P. Scherle, A. Hooper, S. Rafii, and C. P. Blobel. 2008. VEGF A stimulates ADAM17-dependent shedding of VEGFR2 and crosstalk between VEGFR2 and ERK signaling. Circ Res 103:916-918. (査読有り)

Horiuchi, K., T. Miyamoto, H. Takaishi, A. Hakozaiki, N. Kosaki, Y. Miyauchi, M. Furukawa, J. Takito, H. Kaneko, K. Matsuzaki, H. Morioka, C. P. Blobel, and Y. Toyama. 2007. Cell surface colony stimulating factor 1 can be cleaved by TNF-alpha converting enzyme or endocytosed in a clathrin-dependent manner. J Immunol 179:6715-6724. (査読有り)

Horiuchi, K., T. Kimura, T. Miyamoto, H. Takaishi, Y. Okada, Y. Toyama, and C. P. Blobel. 2007. Cutting Edge: TNF-converting Enzyme (TACE/ADAM17) Inactivation in Mouse Myeloid Cells Prevents Lethality from Endotoxin Shock. J Immunol 179:2686-2689. (査読有り)

Hoiruchi, K., and Y. Toyama. 2008. Posttranslational Regulation of Cell Surface Colony Stimulating Factor 1. Crit Rev Immunol 28:215-227. (査読有り)

[学会発表](計 5件)

堀内圭輔, SOX9プロモーターにより TACE を不活化したマウスでは IL-17・G-CSF の発現に異常を呈し、骨粗鬆症、造血異常を生じる。日本骨代謝学会。2008年10月29日。大阪。

箱崎 彰裕, RANK は ADAM17 により Shedding を受け可溶型となる。日本骨代謝学会。2008年10月29日。大阪。

堀内圭輔, SOX9プロモーターにより TACE の不活化したマウスでは成長障害と骨粗鬆症を生じる。日本整形外科基礎学術集会。2008年10月24日。京都。

堀内圭輔, 敗血症性ショックにおける TACE/ADAM17 の機能解析。日本整形外科基礎学術集会。2007年10月25日。浜松。

堀内圭輔, TACE は in vivo において TNF の可溶化に必須の分子である。日本骨代謝学会。2007年7月19日。大阪。

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀内 圭輔 (HORIUCHI KEISUKE)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 30327564

(2) 研究分担者

戸山 芳昭 (TOYAMA YOSHIAKI)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 40129549

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

木村 徳宏 (KIMURA TOKUHIRO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 40445200

岡田 保典 (OKADA YASUNORI)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 00115221

宮本 健史 (MIYAMOTO TAKESHI)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号: 70383768