

平成21年5月28日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790680  
 研究課題名（和文）JNKアイソフォームによる相反するIL-12産生制御：RNA干渉を用いた検討  
 研究課題名（英文）JNK1 and JNK2 differently regulate IL-12 production

研究代表者  
 宇津木 光克 (UTSUGI MITSUYOSHI)  
 群馬大学・医学部・医員  
 研究者番号：40396635

研究成果の概要：IL-12はマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞から産生され、Th1分化を誘導する重要なサイトカインである。本研究ではIL-12産生シグナル伝達経路の1つとして、JNK アイソフォームによるIL-12産生制御とそのメカニズムについて検討を行った。その結果、ヒトマクロファージ細胞株、単球由来マクロファージおよび樹状細胞において、JNKアイソフォームによる異なったIL-12産生機構が存在するものの、すべての細胞種において同一の制御機構であったJNK1においてはPI3K p110beta からのシグナル伝達機構が存在することが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：サイトカイン、IL-12、シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

CD4陽性T細胞のサブセットであるTh1とTh2の不均衡によって生じる各種アレルギー疾患・膠原病において、Th1/Th2バランスの制御はこれら疾患の新たな治療戦略と考えられる。一方、IL-12は単球、マクロファージ、樹状細胞などの抗原提示細胞から産生され、Th1細胞の分化誘導、Th1サイトカインであるIFN-gamma産生誘導作用をもち、Th1/Th2バランス制御において最も重要なサイトカインである。私は現在までに、抗原提示細胞からのIL-12産生を介したTh1/Th2バランス

制御という観点から、IL-12産生に関する細胞内シグナル伝達経路の解明や、IL-12産生制御因子について研究を続けている。c-Jun NH2-terminal kinase (JNK)は真核生物に普遍的に存在するセリン/スレオニンキナーゼで、さまざまな外界刺激を伝達する重要なシグナル分子である。JNKを介したシグナル伝達経路は生存促進、ストレス応答、アポトーシス誘導、サイトカイン産生などの細胞応答を制御している。私はヒトマクロファージにおいてJNK経路がIL-12産生を負に制御していることを見出し報告している (J Immunol.

171: 628-635, 2003)。その後、ヒト単球 (Ma W. J Immunol. 172: 318-330, 2004) やヒト樹状細胞 (Nakahara T. Int. Immunol. 16: 1701-1709, 2004) において JNK 経路が IL-12 産生を正に制御していることが報告され、これらは私の報告とは相反するものであった。JNK には偏在的に存在する 2 つのアイソフォーム (JNK1, JNK2) が存在し、従来 JNK1 と JNK2 は一次配列上の相同性が 80% 以上であり、生化学的な性質もほとんど差異がないことから、生体内では同じ機能を果たしていると考えられてきた。しかし最近ノックアウトマウスを用いた検討において、JNK1 と JNK2 が全く異なった作用を持つことが報告された (Sabapathy K. Mol. Cell 15: 713-725, 2004)。このことから、私は IL-12 産生に関する上述の相反する報告の理由として「JNK1 と JNK2 が異なる IL-12 産生制御機構をもつ」という仮説をたて、この仮説を立証するべく研究をすすめている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は抗原提示細胞からの IL-12 産生における JNK1 と JNK2 の産生制御機構の差異を明らかにすることである。私は現在まで一貫してヒト細胞を対象に検討を行っており、ヒト抗原提示細胞における JNK1 および JNK2 の機能解析をそれぞれ別々に行うために、RNA 干渉を用いた検討を行う。すなわち、ヒトマクロファージおよび樹状細胞へ JNK1 および JNK2 の small interference RNA (siRNA) を導入し、細胞内の JNK1 あるいは JNK2 を欠失させる。その後 IL-12 産生を蛋白および mRNA レベルで解析することで、JNK1 と JNK2 の IL-12 産生制御機構の差異が明らかとなる。従来同一の機能を持つといわれていた JNK1 と JNK2 であるが、最近の研究によりそれぞれ異なった機能を有することが明らかとなっている。しかし抗原提示細胞における JNK1 と JNK2 の機能の差異についての報告はない。さらに上記の研究はすべてノックアウトマウスを用いた検討であり、ヒト抗原提示細胞、特にヒト樹状細胞を用いた検討は私の研究が最初であると考えられる。私はヒトマクロファージや樹状細胞における siRNA 導入方法を習得、応用しており (Utsugi M. J Immunol. 177: 4550-4557, 2006)、JNK1 と JNK2 の siRNA を用いることで JNK1 と JNK2 をそれぞれ別個に欠失させることが可能である。

## 3. 研究の方法

(1) ヒトマクロファージおよびヒト樹状細胞への siRNA の導入

細胞はヒト単球細胞株である THP-1 細胞を PMA にて処理し、マクロファージに分化させたものを使用。また健康ボランティアより単球を分離後 M-CSF 存在下で 7 日間培養し単球由来のマクロファージへ、IL-4 と GM-CSF 存在下で 7 日間培養し単球由来の樹状細胞へ分化させた細胞を用いた。

JNK1 および JNK2 の knockdown は siRNA を用いて行った。siRNA は PE Applied 社より購入し、transfection reagent (Mirus 社) を用いて導入した。JNK1 および JNK2 欠失の確認には、siRNA 導入 36~48 時間後に細胞を溶解し、ウエスタンブロット法にて抗 JNK 抗体を用いて行った。

(2) ヒトマクロファージおよびヒト樹状細胞からの IL-12 産生

上記のごとく JNK1 および JNK2 の siRNA を導入後、細胞を LPS にて刺激し、24 時間後の上清中の IL-12 蛋白を ELISA 法にて測定した。IL-12 mRNA 発現については刺激後 8 時間にて mRNA を採取し、定量的 PCR 法を用いて検討した。

(3) JNK1, JNK2 におけるシグナル伝達経路の分子生物学的な解明

JNK の活性化測定は、活性化型である JNK のリン酸化をウエスタンブロットにて定量している。しかしこの方法では JNK1 と JNK2 の活性を別々に測定することは不可能である。そこで私は、細胞を溶解した液を JNK1 あるいは JNK2 の特異的抗体にて免疫沈降を行い、沈降物中の JNK リン酸化を抗リン酸化抗体を用いたウエスタンブロットにて定量することで JNK1 および JNK2 の活性を別々に測定する方法を見出した。研究代表者は過去に IL-12 産生との関連の報告がある phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) に着目し、IL-12 産生のシグナル伝達系における JNK の上流に存在する分子の候補と考えた。そこで、PI3K 阻害剤の前処置や siRNA を導入した後の IL-12 産生を検討し、ヒトマクロファージおよびヒト樹状細胞において PI3K が IL-12 産生に関与していることを確認した。さらに PI3K siRNA を導入した後、上述の如く JNK1 と JNK2 の活性化を別々に測定し、PI3K と JNK1, JNK2 それぞれの関与を検討した。

## 4. 研究成果

ヒトマクロファージ細胞株である THP-1 細胞において、JNK1 siRNA の導入は LPS による

IL-12 p40 産生を抑制したが、JNK2 siRNA の導入は p40 産生を増強した。さらに JNK1、JNK2 siRNA を同時に導入すると、LPS による IL-12 p40 産生は増加した。一方、末梢血単球由来のマクロファージや樹状細胞においては、JNK1 siRNA および JNK2 siRNA のそれぞれの導入は、LPS による IL-12 p40 および p70 の産生、IL-12 p35 および p40 mRNA の発現を抑制した。以上のことからヒトマクロファージ細胞株においては、IL-12 産生は JNK1 による正の制御と JNK2 の負の制御という異なった IL-12 産生制御機構が存在することが判明した。一方、末梢血単球由来のマクロファージや樹状細胞においては、IL-12 産生は JNK1 と JNK2 とともに正の制御を受けることが判明した。従って、過去の報告にある JNK による IL-12 産生制御の相違は、細胞間による JNK2 による制御の相違に起因することが明らかとなった。

次に JNK の上流に存在する分子の同定を試みた。PI3K の 1 つのサブセットである PI3K p110beta は、マウスにおいては IL-12 産生を制御することが知られている。研究代表者はヒトマクロファージ細胞株、単球由来マクロファージと樹状細胞へ PI3K p110beta および他のサブセットである p110alpha の siRNA を導入した。その結果、PI3K p110beta siRNA の導入はすべての細胞種において LPS による IL-12 産生を抑制した。一方、PI3K p110alpha siRNA はヒトマクロファージ細胞株においては LPS による IL-12 産生に変化を及ぼさなかったが、ヒト単球由来マクロファージと樹状細胞においては IL-12 産生を抑制した。一方、mRNA レベルの検討では、ヒト単球由来マクロファージでは PI3K p110alpha siRNA は IL-12 p35 および p40 mRNA の発現を抑制したが、ヒト樹状細胞では IL-12 p35 および p40 mRNA の発現に影響を及ぼさなかった。以上のことから PI3K のサブセット間で IL-12 産生制御に相違がみられること、すなわち PI3K p110beta は IL-12 産生を正に制御すること、また PI3K p110alpha はヒトマクロファージ細胞株、ヒト単球由来マクロファージと樹状細胞それぞれの細胞腫によって、IL-12 産生制御機構が異なっていることが考えられた。最後に PI3K p110beta と alpha の JNK 活性化への影響を検討した。その結果、PI3K p110beta siRNA はすべての細胞腫において LPS による JNK 活性化を抑制したが、ERK、p38 MAPK の活性化には影響を及ぼさなかった。一方、PI3K p110alpha siRNA はすべての細胞腫において LPS による JNK、ERK、p38 MAPK 活性化とともに変化を与えなかった。さらに JNK1 と JNK2 の活性化を個々に測定した所、PI3K p110beta siRNA は LPS による JNK1 の活性化を抑制したが、JNK2 の活性化には影響を及ぼさなかった。以上のことから PI3K p110beta

の下流には JNK が存在するが、これは JNK1 のみで JNK2 の関連はないと考えられた。上述の結果から考えられる結論は以下の如くである。ヒトマクロファージ細胞株、単球由来マクロファージおよび樹状細胞において、JNK アイソフォームによる異なった IL-12 産生機構が存在する。すなわち、ヒトマクロファージ細胞株においては、IL-12 産生は JNK1 による正の制御と JNK2 の負の制御を受けるが、末梢血単球由来のマクロファージや樹状細胞においては、IL-12 産生は JNK1 と JNK2 とともに正の制御を受けている。加えて、すべての細胞種において同一の IL-12 産生制御機構が存在する JNK1 においてはその上流に PI3K p110beta からのシグナル伝達機構が存在する。以上である。

#### 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 2 件)

① Mitsuyoshi Utsugi, Kunio Dobashi, Akihiro Ono (他 8 名 1 番目)、PI3K p110beta positively regulates LPS-induced IL-12 production in human macrophages and dendritic cells and JNK1 plays a novel role, *Journal of Immunology*, 182 巻、5225-5231、2009、査読有

② Akihiro Ono, Mitsuyoshi Utsugi, Ken Masubuchi (他 7 名 2 番目)、Glutathione redox regulates TGF-beta-induced fibrogenic effects through Smad3 activation, *FEBS Letters*, 583 巻、357-362、2009、査読有

[学会発表] (計 3 件)

① 宇津木光克、PI3K p110beta positively regulates LPS-induced IL-12 production in human macrophages and dendritic cells and JNK1 plays a novel role、第 38 回日本免疫学会総会、2008. 12. 2、京都

② 宇津木光克、ヒトマクロファージ・樹状細胞からの IL-12 産生は PI3K p110beta による正の制御を受ける、第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会、2008. 11. 27、東京

③ 宇津木光克、JNK isoform によるヒトマクロファージからの異なった IL-12 産生制御、第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会、2007. 11. 1、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇津木 光克 (UTSUGI MITSUYOSHI)

群馬大学・医学部・医員

研究者番号：40396635