

機関番号：17102

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：平成 20 年～22 年

課題番号：20591172

研究課題名 (和文) 膜型 TNF の機能解析と自己免疫疾患の病態解明ならびに治療への応用

研究課題名 (英文) Immunological function of transmembrane TNF-alpha

研究代表者

堀内 孝彦 (HORIUCHI TAKAHIKO)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：90219212

研究成果の概要 (和文)：

従来 TNF- α の作用としては、可溶型が重要であると考えられてきたが、近年その前駆体である膜型 TNF- α の作用が注目されている。我々は膜型 TNF- α が T-B 細胞間の細胞接着による免疫応答に重要な分子であることを初めて明らかにしてきた。すなわち活性化 T 細胞上の膜型 TNF- α は i) B 細胞に接着して抗体産生を誘導し、ii) 膜型 TNF- α が刺激を受けることにより T 細胞自身がある種の接着分子やサイトカインの産生を誘導する。本研究の目的は、膜型 TNF- α とその受容体 (TNF- α 受容体) の二つの分子に着目して、それぞれについて機能解析、シグナル伝達機構を明らかにすることにある。

我々は TNF- α 阻害薬の 3 製剤 (抗体製剤であるインフリキシマブ、アダリムマブ、受容体と抗体 Fc 部分の融合タンパクであるエタネルセプト) について、膜型 TNF- α 産生細胞に対する ADCC, CDC, そして我々が見出した新しい機能である内向きシグナルについて、head-to-head で効果の違いを比較検討した。その結果、インフリキシマブ、アダリムマブの抗体製剤は、融合タンパクであるエタネルセプトに比較してはるかに強力で膜型 TNF- α 産生細胞を抑制することが明らかになった。すなわち、インフリキシマブ、アダリムマブでは、ADCC, CDC, 内向きシグナルの 3 つの経路のすべてを介して抑制するが、エタネルセプトは ADCC 活性のみ示した。さらに膜型 TNF- α 産生細胞が cell-to-cell contact を介して TNF- α 受容体産生細胞に伝達する外向きシグナルについてこれら 3 製剤が抑制しうるのかについて細胞障害活性を指標に検討した。その結果、10 μ g/ml 以上の比較的高濃度では差がなかったものの、低濃度ではエタネルセプトが抗体製剤に比べて効果が弱いことが明らかになった。最後に、cDNA アレイによってインフリキシマブ投与によって膜型 TNF- α 産生細胞に細胞内シグナル伝達を惹起し、その結果発現が誘導されるもの、発現が抑制されるものについて解析を加えた。発現亢進するものは 49 個、抑制を受けるものは 240 個認め、さらに定量的 RT-PCR, ウェスタンブロット法で確認した (論文準備中であるため詳細な発表は現時点では控える)。

これらの結果は、TNF- α 阻害薬は抗体製剤であるインフリキシマブ、アダリムマブと融合タンパクであるエタネルセプトとは膜型 TNF に対する作用が異なること、膜型 TNF- α が肉芽腫性の炎症性疾患に関与することが近年報告されてきていることから、膜型 TNF- α への作用の違いがこれら TNF- α 阻害薬の臨床効果の違いに関わっている可能性があることが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：

Transmembrane TNF-alpha, a precursor of soluble form of TNF-alpha (TNF), is expressed on activated macrophages and lymphocytes as well as other cell types. After processed by TNF-alpha-converting enzyme (TACE), soluble form of TNF is cleaved from transmembrane TNF and mediates its biological activities through binding to type 1 and type 2 TNF receptors (TNF-R1, TNF-R2) of remote tissues. Accumulating evidence suggests that not only soluble TNF, but also transmembrane TNF is involved in the inflammatory response. TNF antagonists are the center of attention for their dramatic clinical efficacy in active chronic inflammatory diseases. In rheumatoid arthritis, both infliximab (chimeric anti-TNF antibody), adalimumab (humanized anti-TNF-alpha

antibody) and etanercept (p75 TNF-alpha receptor-IgG Fc fusion protein) are highly effective, while in Crohn's disease, only infliximab and adalimumab can induce clinical remission. In addition, infliximab and adalimumab are more prone to cause granulomatous infections such as tuberculosis. Considering the important role of transmembrane TNF in granulomatous inflammation, analysing the biology of transmembrane TNF and its interaction with TNF antagonists will contribute to understand the bases for differential clinical efficacies of these promising treatment modalities.

Infliximab, adalimumab, and etanercept similarly induced antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) in transmembrane TNF-expressing human T cells, however only infliximab and adalimumab showed complement-dependent cytotoxicity (CDC) and outside-to-inside signal (reverse signal) and etanercept did not. In addition, the function of transmembrane TNF as a ligand detected by cytotoxic activity against TNF receptor-bearing T cells was effectively inhibited by infliximab and adalimumab, but not by etanercept. cDNA array revealed the intracellular signals mediated by infliximab through transmembrane TNF. mRNA of 49 molecules was upregulated, while mRNA of 240 molecules was downregulated.

These results indicate that the difference in the activity against transmembrane TNF among TNF antagonists (infliximab, adalimumab, etanercept) is involved in the differential clinical efficacies of these TNF antagonists.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,900,000	570,000	2,470,000
21年度	1,000,000	300,000	1,300,000
22年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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・感染症内科学

キーワード：TNF、ADCC、CDC、サイトカイン、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

近年、関節リウマチ(RA)やクローン病をはじめとした様々な難治性炎症性疾患に対して、抗TNF療法が大きな効果を示すことが明らかとなり、TNF- α の慢性炎症における重要性が改めて注目されている。従来、TNF- α の作用の中で可溶性TNF- α の働きは詳細に研究されてきたが、対照的に可溶性TNF- α の前駆体である膜型TNF- α の機能はほとんどわかっていなかった。

我々は以前より、前駆体である膜型TNF- α

の生物活性に注目して研究してきた(*J Immunol* 2001など)。またTNF- α 受容体やその下流のアポトーシス関連分子の自己免疫疾患での機能異常もあわせて解析してきた(*Nature Genet* 2001, *Arthritis Rheum* 2000, 2001, 2004, *Blood* 2002など)。その過程で、我々は膜型TNF- α がT-B細胞間の細胞接着による免疫応答に重要な分子であることを初めて明らかにしてきた。すなわち活性化T細胞上の膜型TNF- α は i) B細胞に接着して抗体産生を誘導し、ii) 膜型TNF- α が刺激を受けることに

よりT細胞自身がある種の接着分子やサイトカインの産生を誘導する。言い換えれば、膜型TNF- α はT-B細胞間で両方向にシグナルを伝える新しい膜表面機能分子であり、可溶性TNF- α とはまったく異なる。膜型TNF- α は、それを発現している細胞と標的細胞とが会合すること (cell-to-cell contact) で機能を発揮する分子である。この点が、産生細胞から遠く離れて機能を発揮する可溶性TNF- α と決定的に異なる特徴である。すなわち、膜型TNF- α は炎症局所で機能する分子であるといえる。次に重要なことは、膜型TNF- α は細胞膜表面に存在してリガンドとしてのシグナル (膜型TNF- α を発現した細胞から見ると「外向き」の作用) を伝えるばかりでなく、膜型TNF- α を発現している細胞自身へシグナルを伝える「内向き」の作用をも併せ持った双方向性の分子であることが我々の研究で明らかになってきた点である。さらに興味深いことは、近年脚光を浴びている抗TNF製剤が、従来考えられてきた「可溶性TNF- α の中和」という作用以外に、膜型TNF- α にも働いて機能を発揮している可能性が明らかになりつつある点である。そしてTNF阻害薬間の膜型TNF- α に対する「内向き」作用などの直接の作用が異なるという点が、近年明らかになってきた製剤間の臨床効果の違い、副作用の違いを検討していくうえで大きな手がかりになることがわかってきた。たとえば抗TNF抗体と可溶性TNF受容体融合タンパクはRAに対しては同等の効果を示すにもかかわらず、クローン病、ウェゲナー肉芽腫症やサルコイドシスなどの肉芽腫性疾患では抗体製剤のみが有効でありエタネルセプトは無効である。一方、副作用の面からみると、抗体製剤は、エタネルセプトに比べて結核をより高率に発症する (N Engl J Med 2002)。興味深いことにこれらの疾患では、膜型TNF- α が病態に関与することが報告されている。TNF阻害薬の標的分子としての膜型TNF- α の機能解明は、炎症性疾患の病態解明、新たな作用機作をもつ治療法の開発に役立つ可能性があり意義が大きいと考える。

2. 研究の目的

本研究では、膜型 TNF- α とその受容体 (TNF- α 受容体) の二つの分子に着目して機能解析を行うとともに、TNF 阻害療法との関わりを解明する。具体的には、膜型 TNF- α とその受容体との相互作用によって生じる生理的な免疫応答を、サイトカイン産生、細胞増殖、アポトーシスなどについて検討し、それを担う細胞内シグナル伝達分子も解析する。この相互作用には膜型 TNF- α から TNF- α 受容体を有する細胞へ伝わる外向き作用と膜型 TNF- α を発現している細胞自身が受け取る内向きの作用とがある。次に、膜型 TNF- α を介した外向き作用、内向き作用 (ADCC、CDC そして我々が見出した reverse signal) に対して、3 種類の TNF 阻害薬 (インフリキシマブ、アダリムマブ、エタネルセプト) がそれぞれいかなる効果を有するか、そして効果の違いは何か、を検討する。最後に膜型 TNF- α から reverse signal によって細胞内に伝達される細胞内シグナルに関与する分子について、cDNA アレイを用いて網羅的に遺伝子解析を行う。

3. 研究の方法

T細胞やマクロファージ表面上の膜型TNF- α は、TNF- α 受容体を発現した標的細胞との相互作用を通じて炎症に関与する。その際、リガンドとして標的細胞に作用する一方で (外向き作用)、逆に膜型TNF- α を発現した細胞自身に機能を生じさせる (内向き作用)。こうした両方向性の膜型TNF- α の生物活性について、膜型TNF- α を安定して発現したT細胞株 (ヒト Jurkat T細胞)、健常人ならびにRA患者から得たT細胞やマクロファージを用いて生理活性を解析し、シグナル伝達に必須の分子を同定し、さらには疾患との関連を解析する。また、この実験系にTNF阻害薬を加えることによって、膜型TNF- α の機能がいかなる修飾を受けるかを解析する。

膜型TNF- α 発現細胞の作製については既報済みである (*J Immunol* 2001)。膜型TNF- α 発現細胞を標的として、血清の存在下

(CDC)、PBMC 存在下 (ADCC)、非働化血清、PBMC なしの状態 (内向きシグナル、outside-to-inside signal) で各 TNF 阻害薬を添加して TNF- α 発現細胞が破壊されるかを Annexin V/Propidium Iodide (PI) で染色して FACS で検討した。また内向きシグナルを検討する時に細胞周期についても FACS で検討した。cDNA アレイについては Affimetrix 社のシステムを用いて color swap 法にて検討した。有意に変化したものについては定量的 RT-PCR 法、ウェスタンブロット法にてさらに検討した。

4. 研究成果

1) TNF 阻害薬の膜型 TNF- α 発現細胞に対する ADCC 活性

インフリキシマブ、アダリムマブ、エタネルセプトはいずれの effector/target 比においてもほぼ同様の細胞障害活性を呈した。したがってこれら TNF 阻害薬の間に差を認めなかった。

2) TNF 阻害薬の膜型 TNF- α 発現細胞に対する CDC 活性

ヒト血清の存在下で、インフリキシマブやアダリムマブは CDC による細胞障害を呈したが、エタネルセプトは極めて弱い活性 (1000 分の 1) しか示さなかった。

3) 内向きシグナルによる膜型 TNF- α 発現細胞への細胞障害

ADCC, CDC のない状態で TNF 阻害薬を加えて内向きシグナルを検討したところ、インフリキシマブ、アダリムマブではアポトーシスを呈したがエタネルセプトは全く示さなかった。またアポトーシスに至らず生き残った細胞は細胞周期が G0/G1 期で停止していた。

以上から、膜型 TNF- α 発現細胞にたいして抗体製剤はエタネルセプトに比べてはるかに強く細胞障害性を発揮することがわかった。

4) 膜型 TNF- α 発現細胞のリガンドとしての作用、すなわち TNF 受容体発現細胞への細胞障害活性への TNF 阻害薬の作用

cell-to-cell contact による細胞障害活性は、3 種類の TNF 阻害薬の存在下で抑制された。しかしながら 10 μ g/ml 以上の高濃度では差がなかったが、1 μ g/ml という生理活性では抗体製剤に比べてエンブレルが有意に弱かった。

5) 内向きシグナルによる細胞内シグナル伝達分子の動態の検討

cDNA アレイによる検討では、膜型 TNF- α 発現 T 細胞にインフリキシマブを作用させると、49 個の分子が有意に発現亢進した。一方、240 個の分子の発現が低下した。たとえば活性化マーカーとなる細胞表面分子 CD69 は定量的 RT-PCR、FACS による確認でも発現亢進していた。その他の分子ではアポトーシスやキナーゼ関連分子が定量的 RT-PCR でさらに確認された。投稿準備中であるため詳細の発表は控えたい。

以上から、TNF 阻害薬のうち、抗体製剤は強力に膜型 TNF- α 発現細胞を抑制した。膜型 TNF 発現細胞は肉芽腫性炎症の形成に大きくかかわっていることから、抗体製剤が肉芽腫を形成するクローン病に効果があること、一方では抗体製剤が肉芽腫性の感染症 (結核など) を引き起こしやすいこと、の原因の一つであることが明らかになった。さらに重要なことは、今後新たに開発されてくるであろう TNF 阻害薬の効果や副作用を予想する上で、我々が樹立した膜型 TNF- α 発現細胞は、大変有用なツールになることが明らかになった。

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)

1. Miyagawa H, Yamai M, Sakaguchi D, Kiyohara C, Tsukamoto H, Kimoto Y, Nakamura T, Lee J-H, Tsai C-Y, Chiang B-L, Shimoda T, Harada M, Tahira T, Hayashi K, Horiuchi T: Association of polymorphisms in complement component C3 gene with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 47: 158-164, 2008

2. Kikuchi Y, Koarada S, Nakamura S, Yonemitsu N, Tada Y, Haruta Y, Morito F, Ohta A, Miyake K, Horiuchi T, Nagasawa K: Increase of RP105-lacking activated B cells in the peripheral blood

and salivary glands in patients with Sjogren's syndrome. Clin. Exp. Rheumatol. 26(1): 5-12, 2008

3. Tamimoto Y, Horiuchi T, Tsukamoto H, Otsuka J, Mitoma H, Kimoto Y, Nakashima H, Muta K, Abe Y, Kiyohara C, Ueda A, Nagasawa K, Yoshizawa S, Shimoda T, Harada M : A dose-escalation study of rituximab for treatment of systemic lupus erythematosus and Evans' syndrome: Immunological analysis of B cells, T cells and cytokines. Rheumatology (Oxford) 47: 821-827, 2008

4. Mitoma H, Horiuchi T, Tsukamoto H, Tamimoto Y, Kimoto Y, Uchino A, To K, Harashima S, Hatta N, Harada M : Mechanisms for cytotoxic effects of anti-TNF agents on transmembrane TNF-expressing cells: comparison among infliximab, etanercept and adalimumab. Arthritis Rheum. 58(5): 1248-1257, 2008

5. Kobayashi S, Ikari K, Kochi Y, Inoue H, Kaneko H, Yamamoto K, Shimane K, Nakamura Y, Itakura M, Hamada D, Yasui N, Tao K, Yasutomo K, Horiuchi T, Toyama Y, Mochizuki T, Tsukahara S, Kawaguchi Y, Terai C, Hara M, Tomatsu T, Yamanaka H, Okamoto H, Kamatani N, Momohara S : Association of *STAT4* with susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in Japanese. Arthritis Rheum. 58(7): 1940-1946, 2008

6. Harashima SI, Kondo H, Nabeshima A, Shimoda M, Yamaji K, Horiuchi T, Shimono N, Ikematsu H : The relationship between the daily dosage of the carbapenem MEPM and MEPM-resistant *P. aeruginosa*. J Infect. Chemother. 14(3): 219-222, 2008

7. Kiyohara C, Washio M, Horiuchi T, Tada Y, Asami T, Ide S, Takahashi H, Kobashi G, and the Kyushu Sapporo SLE (KYSS) Study Group: Cigarette smoking, N-acetyltransferase 2 polymorphisms and systemic lupus erythematosus in a Japanese population. Lupus 18(7): 630-638, 2009.

8. Horiuchi T, Washio M, Kiyohara C, Tsukamoto H, Tada Y, Asami T, Ide S, Kobashi G, Takahashi H, and the Kyushu Sapporo SLE (KYSS) Study Group: Combination of TNF-RII, CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms and the risk of Japanese SLE: findings from the KYSS study. Rheumatology (Oxford) 48: 1045-1049, 2009

9. Kiyohara C, Washio M, Horiuchi T, Tada Y,

Asami T, Ide S, Atsumi T, Kobashi G, Takahashi H, and the Kyushu Sapporo SLE (KYSS) Study Group: Cigarette smoking, *STAT4* and *TNFRSF1B* polymorphisms, and systemic lupus erythematosus in a Japanese population. J. Rheumatol. 36(10): 2195-2203, 2009

10. Horiuchi T, Miyasaka N, Inoue K, Abe T, Koike T ; Rising study: Impact of trough serum level on radiographic and clinical response to infliximab plus methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: results from the RISING study. Mod. Rheumatol. 19(5): 478-87, 2009.

11. Kohno K, Nagafuji K, Tsukamoto H, Horiuchi T, Takase K, Aoki K, Henzan H, Kamezaki K, Takenaka K, Miyamoto T, Teshima T, Harada M, Akashi K: Infectious complications in patients receiving autologous CD34-selected hematopoietic stem cell transplantation for severe autoimmune diseases. Transpl. Infect. Dis. 11: 318-323, 2009

12. Nishimoto K, Kochi Y, Ikari K, Yamamoto K, Suzuki A, Shimane K, Nakamura Y, Yano K, Iikuni N, Tsukahara S, Kamatani N, Okamoto H, Kaneko H, Kawaguchi Y, Hara M, Toyama Y, Horiuchi T, Tao K, Yasutomo K, Hamada D, Yasui N, Inoue H, Itakura M, Yamanaka H, Momohara S: Association study of TRAF1-C5 polymorphisms with susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in Japanese. Ann. Rheum. Dis. 69(2): 368-373, 2010

13. Uchino A, Tsukamoto H, Nakashima H, Yoshizawa S, Furugo I, Mitoma H, Takahashi M, Oryoji K, Yoshizawa S, Shimoda T, Niuro H, Otsuka T, Tada Y, Nagasawa K, Yano T, Nonaka T, Oishi R, Akashi K, Horiuchi T : Safety and potential efficacy of tacrolimus for treatment of lupus nephritis with persistent proteinuria. Clin. Exp. Rheumatol. 28(1): 6-12, 2010

14. Kiyohara C, Horiuchi T, Takayama K, Nakanishi Y: *IL1B* C3954T polymorphism, cigarette smoking, alcohol use, and lung cancer risk in a Japanese population. J. Thorac. Oncol. 5(3): 299-304, 2010

15. Kiyohara C, Horiuchi T, Miyake K, Takayama K, Nakanishi Y: Cigarette smoking, TP54 Arg72Pro, TP53BP1 Asp353Glu and the risk of lung cancer in a Japanese population. Oncol. Rep. 23(5): 1361-1368, 2010

16. Kimoto Y, Horiuchi T, Tsukamoto H,

Kiyohara C, Mitoma H, Uchino A, Furugo I, Yoshizawa S, Ueda A, Harashima S, Sawabe T, Tahira T, Hayashi K, Yoshizawa S, Shimoda T, Akashi K, Harada M: Association of killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL5 with systemic lupus erythematosus and accompanying infections. *Rheumatology (Oxford)* 49(7): 1346-1353, 2010

17. Kukita Y, Yahara K, Tahira T, Higasa K, Sonoda M, Yamamoto K, Kato K, Wake N, Hayashi K. A definitive haplotype map as determined by genotyping duplicated haploid genomes finds a predominant haplotype preference at copy number variation events. *Am J Hum Genet* 86(6): 918-28, 2010

18. Umeno J, Matsumoto T, Esaki M, Tahira T, et al. Impact of group IVA cytosolic phospholipase A2 gene polymorphisms on phenotypic features of patients with familial adenomatous polyposis. *Int J Colorectal Dis* 25(3): 293-301, 2010

19. Kondo H, Kusaka S, Yoshinaga A, Uchio E, Tawara A, Hayashi K, Tahira T: Mutation in TSPAN12 gene in Japanese patients with familial exudative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol* in press.

〔雑誌論文〕（計 15 件）

〔学会発表〕（計 50 件）

〔図書〕（計 2 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.1nai-collagen-disease.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者：

堀内 孝彦

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：90219212

(2) 研究分担者：

田平 知子

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：50155230

(3) 連携研究者：なし