

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591464

研究課題名(和文) TNFの細胞表面への輸送機構の解明と炎症性疾患制御への応用

研究課題名(英文) Clarification of the mechanisms of intracellular trafficking of TNF

研究代表者

堀内 孝彦 (Horiuchi, Takahiko)

九州大学・大学病院・教授

研究者番号：90219212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではTNFが産生、分泌されるための重要なステップである「TNFの細胞表面への輸送」について検討した。ヒト由来細胞株を用いてマウスで関連があるとされたSNAREファミリー分子について順次RNAiや発現実験を通じてTNF発現、分泌に対する効果を解析した結果、STX4、VAMP3、Vti1bが関連していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we studied the mechanisms for intracellular trafficking of TNF, which is a crucial step for TNF production and secretion. By using human-derived cell lines, the effects of the inhibition and/or overproduction of the members of SNARE family on the TNF production and secretion was analyzed. STX4, VAMP3 and Vti1b were involved in the intracellular trafficking of TNF.

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：TNF

1. 研究開始当初の背景

TNF は、感染や異物などの炎症トリガーによってマクロファージやリンパ球から産生、放出される。この際、TNF 産生細胞から放出された可溶性 TNF が、さまざまな標的細胞の 1 型あるいは 2 型 TNF 受容体に結合することにより、多彩な生物活性を發揮し炎症反応が惹起される。我々は以前より可溶性 TNF の前駆体である膜型 TNF の機能に着目して研究を行っており、リガンドとしての作用のみならず、膜型 TNF 発現細胞自身への内向きシグナルが伝達されること、さらにそのシグナル伝達経路についても明らかにし、膜型 TNF 発現細胞が炎症性疾患の病態に関与することを示唆してきた (J Immunol 2001, Gastroenterology 2004, 2005, Arthritis Rheum 2008)。また膜型 TNF に抗 TNF 製剤が結合することによって膜型 TNF 発現細胞すなわち TNF 産生細胞を破壊、抑制する作用があること、この作用が抗 TNF 製剤の中でもインフリキシマブ、アダリムマブの抗体製剤に強く、一方 TNF 受容体融合タンパクのエタネルセプトでは弱いことを明らかにした (Arthritis Rheum 2008, Rheumatology 2010)。抗体製剤もエタネルセプトも可溶性 TNF を同じように中和するが、膜型 TNF に対する阻害効果、すなわち TNF 産生細胞の抑制効果には大きな違いがあり、その違いがクローン病などの肉芽腫性疾患では抗体製剤は有効であるのに、エタネルセプトは効果がない事実を説明しうることが明らかになったのである。実際、国外の研究で肉芽腫性疾患では膜型 TNF の関与が大きいことが近年マウスを使った実験で示されている。こうした一連の研究結果は、炎症性疾患を広くかつ強力に制御するためには、可溶性 TNF のみならず膜型 TNF も同時に制御することが重要であることを示唆している。そこで私どもは、TNF の作用を考えた時に最も上流に位置する TNF 産生のステップを制御することが広く炎症を制御する上で重要であると考えた。

TNF の産生とその後の標的細胞での作用を考えた時に次の一連のステップが存在する。

1) TNF 遺伝子からの mRNA 転写、2) mRNA

から TNF タンパクへの翻訳、3) 作成された TNF タンパクの TNF 産生細胞表面への輸送 (trafficking)、4) 細胞膜表面に出出した TNF 前駆体 (膜型 TNF) の切断と可溶性 TNF の放出、5) 可溶性 TNF の TNF 受容体への結合、6) TNF 受容体へのシグナル伝達分子の結合と細胞内へのシグナル伝達、7) TNF による標的細胞での生物活性發揮、などであり、従来の研究では、3) のステップ以外は、詳細に検討されてきた。ところが 3) のステップ、すなわち、細胞内で産生された TNF 前駆体が、いかなる細胞内分子の関与を経て、どのような経路をたどって細胞表面まで輸送されて膜型 TNF となるかについては、国内外を問わず研究がほとんど進んでいなかった。すなわち小胞体 (ER) で産生された TNF 前駆体タンパクは、ゴルジ体から小胞あるいはエンドゾームを経て細胞膜表面に到達するとされているが詳細は不明である。またその他の TNF ファミリー分子の細胞内輸送についての研究は現在のところ皆無である。

Stow らのグループが、マウスのマクロファージにおいて初めて TNF の輸送に関与する機構の一部を明らかにした (Science 2005, Nat Rev Immunol 2006)。TNF は小胞体 (ER) で翻訳され、ゴルジ体を経て、ゴルジ体から分離された小胞 (vesicle) に乗って細胞膜まで輸送されて細胞表面に出す。Stow らは、インスリン分泌などに関与することが明らかとなっている SNARE (Soluble N-ethyl maleimide-sensitive factor attachment receptor) ファミリー分子に着目し、小胞側の分子 (v-SNARE) として VAMP3、細胞膜側の分子 (t-SNARE) の一つとして Syntaxin 4 を見出し、これらの分子の会合が小胞の細胞膜との融合、TNF 前駆体の TNF 産生細胞膜の表面への出現、に関与することを報告した。しかしながら、これらの所見は、マウス以外では証明されていないこと、したがってヒトでの TNF 輸送に関与するタンパクは全く不明であること、この知見はマクロファージでの結果であるがその他の TNF 産生細胞で普遍的に見られるかは不明であること、ヒトの炎症性疾患でのこれら分子の動態も不明であること、他にもいくつかの分子が関与することが強

く推測されることなど、解明されるべき点が数多く残されていた。

2. 研究の目的

本研究では、TNF が産生、分泌されるために極めて重要なステップである「TNF の細胞表面への輸送」のメカニズムについて解明し、その結果を TNF 産生細胞の制御へと応用することを目的とする。

本研究は TNF 産生細胞の中で産生された TNF が細胞表面にいかにかに輸送されるかについてほとんど解明されていないが、このメカニズムを明らかにすることは、炎症の最も初期の段階つまり TNF 産生細胞が TNF を放出する前に炎症を制御する研究へと展開しうる点で大きな意義がある。

3. 研究の方法

(1)膜型 TNF 産生細胞の樹立

ヒト細胞株 (Jurkat T 細胞、HeLa 細胞、293T 細胞) に膜型 TNF を安定して発現させる系を樹立する目的で pCXN2 に TNF cDNA を subcloning してエレクトロポレーションによって導入し Neomycin 添加によって選択した。

(2)SNARE ファミリー分子の knock out (KO)

30 以上に及ぶ SNARE ファミリー分子について順次その RNA に対して antisense (siRNA) を amaxaR にて導入し RNAi を行った。メッセージの抑制については定量的 PCR (qPCR) で確認した。

(3)SNARE ファミリー分子の強発現

SNARE ファミリー分子を発現ベクター pCXN2 に subcloning し electroporation 法により遺伝子導入して強発現させる。

(4)ELISA による TNF の分泌の確認

市販の ELISA を用いて培養上清中の TNF を測定する。

(5)TNF タンパクの確認

Western blot 法で培養上清中の TNF を確認する。

(6)Flowcytometry による確認

膜型 TNF 発現細胞の確認は、抗 TNF 抗体を用いた Flowcytometry にて行った。

4. 研究成果

SNARE ファミリー分子には 40 近くの分子がふくまれている。小胞表面に存在するタンパク群 v-SNARE (v; vesicle) と、細胞表面の t-SNARE (t; target membrane) の大きく 2 つに分類される。これら v-SNARE と t-SNARE の相互作用によって TNF 前駆体が細胞表面に輸送されることが予想される。この系を解析するためにまず TNF を安定して発現する細胞株を樹立した。

(1) 膜型 TNF を発現する細胞株の樹立

ヒト T 細胞株 Jurkat 細胞に発現ベクターに subcloning された TNF 前駆体 (膜型 TNF) をトランスフェクションし、Neomycin で選択した。その結果膜型 TNF を安定して発現する細胞株を得た。発現の程度によって高発現細胞 (tmTNF-Jurkat H)、中発現細胞株 (tmTNF-Jurkat M)、低発現細胞株 (tmTNF-Jurkat L) の 3 群の細胞株を得た。これらの発現は Flowcytometry によって行った。

次に膜型 TNF をヒト接着細胞である HeLa 細胞で行った。Jurkat T 細胞の場合と同様に発現ベクターに subcloning された膜型 TNF をトランスフェクションすることによって膜型 TNF を安定して発現する細胞株を樹立した。Jurkat T 細胞に比べて Flowcytometry 上では発現の程度が低かったが、コントロール HeLa 細胞と比べて明らかに膜型 TNF を細胞表面に発現していた。同様に 293T 細胞についても膜型 TNF を安定して発現する細胞株を樹立することに成功した。

(2) SNARE ファミリー分子の knock out (KO) による膜型 TNA 発現細胞での TNF 分泌抑制の検討

SNARE ファミリー分子は VAMP1, VAMP2, VAMP3, STX1, STX2, STX3, STX4, STX5, STX6, SNAP23, SNAP25 をはじめとして 40 分子近く存在する。これらの中からマウスでの実験から有望と考えられた 6 分子 (VAMP3, STX4, STX6, STX7, SNAP23, Vti1b) を選択し、それぞれの分子を RNAi にて KO した。まず対象の細胞株を tmTNF-Jurkat H とした。RNAi 後 72 時間にはこれら分子の発現をほぼ完全に抑制することを qPCR で確認した。48~72 時

間後において培養上清中の TNF 濃度を ELISA 法で確認した。その結果 VAMP3, STX4, STX6, STX7, SNAP23, Vti1b をそれぞれ KO した場合コントロールを 100%とすると、それぞれ順に 68.2%、54.9%、86.3%、101.0%、95.4%、75.5%であった。すなわち VAMP3、STX4、Vti1b では有意に TNF 分泌が低下していた。一方、細胞内の TNF 産生については Western blot 法で確認したが、これら 6 分子の KO では低下を認めず、また分子間で差を認めなかった。この結果から SNARE ファミリー分子である VAMP3、STX4、Vti1b はヒトにおいて細胞内の TNF の細胞表面、細胞外への分泌に関わる分子であることが初めて示唆された。

次に TNF 発現 HeLa 細胞株についても同様の実験を行った。TNF 発現の程度が JurkatT 細胞ほど顕著ではないため有意な差は出なかったが、VAMP3, STX4, STX6, STX7, SNAP23, Vti1b をそれぞれ KO した場合にやはり VAMP3、STX4、Vti1b では TNF 分泌が低下する傾向を認めた。

(3) SNARE ファミリー分子の強発現によるヒト細胞株での TNF 分泌の検討

JurkatT 細胞において VAMP3、STX4、Vti1b をそれぞれ単独で強発現させて TNF 分泌が亢進するかを検討した。単独の分子の強発現では TNF 分泌の有意な亢進を認めなかった。次にこれら 3 分子のうち 2 分子を同時にトランスフェクションし高発現させた実験では、VAMP3+STX4 では有意ではないものの培養上清中への TNF 分泌は上昇する傾向にあった。しかしながら VAMP3+Vti1b、STX4+Vti1b を同時に高発現させた場合には TNF 分泌亢進を認めなかった。

以上より、VAMP3、STX4 は TNF の産生にはかわらないが、産生された細胞内の TNF を細胞表面に輸送し分泌させる働きがあることが示唆された。ヒトにおける TNF の細胞内輸送について初めての研究である。今後、これらの分子を修飾することによって TNF 分泌の抑制、ひいては炎症性疾患の制御に役立つ。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 20 件)

Tanaka A, Tsukamoto H, Mitoma H, Kiyohara C, Ueda N, Ayano M, Ohta SI, Inoue Y, Arinobu Y, Niiro H, Horiuchi T, Akashi K. Serum progranulin levels are elevated in patients with systemic lupus erythematosus, reflecting disease activity. *Arthritis Res. Ther.* 査読有 2012 Nov 11 [Epub ahead of print]

Kiyohara C, Washio M, Horiuchi T, Asami T, Ide S, Atsumi T, Kobashi G, Takahashi H, Tada Y; the Kyushu Sapporo SLE (KYSS) Study Group: The modifying effect of NAT2 genotype on the association between systemic lupus erythematosus and consumption of alcohol and caffeine-rich beverages. *Arthritis Care Res.* (Hoboken). 査読有 2014 Jan 27. [Epub ahead of print]

Kiyohara C, Horiuchi T, Takayama K, Nakanishi Y: Genetic polymorphisms involved in the inflammatory response and lung cancer risk: a case-control study in Japan. *Cytokine* 査読有 65(1):88-94, 2014

Moroi R, Endo K, Kinouchi Y, Shiga H, Kakuta Y, Kuroha M, Kanazawa Y, Shimodaira Y, Horiuchi T, Takahashi S, Shimosegawa T: FCGR3A-158 polymorphism influences the biological response to infliximab in Crohn's disease through affecting the ADCC activity. *Immunogenetics* 査読有 65(4): 265-271, 2013

Ueda N, Tsukamoto H, Mitoma H, Ayano M, Tanaka A, Ohta S-I, Inoue Y, Arinobu Y, Niiro H, Akashi K, Horiuchi T: The cytotoxic effects of certolizumab pegol and golimumab mediated by transmembrane tumor necrosis factor. *Inflamm. Bowel Dis.* 査読有 19(6): 1224-1231, 2013

Furukawa M, Kiyohara C, Horiuchi T, Tsukamoto H, Mitoma H, Kimoto Y, Uchino A, Nakagawa M, Oryoji K, Shimoda T, Harada M, Akashi K: Prevalence and risk factors of vertebral fracture in Japanese females with systemic lupus erythematosus. *Mod. Rheumatol.* 査読有 23(4):765-773, 2013

Niiro H, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Kikushige Y, Shima T, Noda K, Ota S-I,

- Tsuzuki H, Inoue Y, Arinobu Y, Iwasaki H, Shimoda S, Baba E, Tsukamoto H, Horiuchi T, Taniyama T, Akashi K: CIN85 is required for Cbl-mediated regulation of antigen receptor signaling in human B cells. *Blood* 査読有 119(10): 2263-2273, 2012
- Tada Y, Suematsu E, Ueda A, Nagano S, Sawabe T, Nishizaka H, and Horiuchi T: Clinical factors to predict a poor prognosis and refractory disease in patients with polymyositis and dermatomyositis associated with interstitial lung disease. *Clin. Exp. Rheumatol.* 査読有 30(3): 450, 2012
- 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, alcohol consumption and the risk of systemic lupus erythematosus: a case-control study in a Japanese population. *J. Rheumatol.* 査読有 39(7): 1367-1370, 2012
- Suematsu R, Ohta A, Matsuura E, Takahashi H, Fujii T, Horiuchi T, Minota S, Ishigatsubo Y, Ota T, Takei S, Soejima S, Inoue H, Koarada S, Tada Y, Nagasawa K: Therapeutic response of patients with adult Still's disease to biologic agents; multicenter results in Japan. *Mod. Rheumatol.* 査読有 22(5): 712-719, 2012
- Okada Y, Shimane K, Kochi Y, Tahira T, Suzuki A, Higasa K, Takahashi A, Horita T, Atsumi T, Ishii T, Okamoto A, Fujio K, Hirakata M, Amano H, Kondo Y, Ito S, Takada K, Mimori A, Saito K, Kamachi M, Kawaguchi Y, Ikari K, Mohammed OW, Matsuda K, Terao C, Ohmura K, Myouzen K, Hosono N, Tsunoda T, Nishimoto N, Mimori T, Matsuda F, Tanaka Y, Sumida T, Jamanaka H, Takasaki Y, Koike T, Horiuchi T, Hayashi K, Kubo M, Kamatani N, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K: A genome-wide association study identified AFF1 as a susceptibility locus for systemic lupus erythematosus in Japanese. *PLoS Genetics* 査読有 8(1): e1002455, 2012
- Yamamoto T, Horiuchi T, Miyahara H, Yoshizawa S, Maehara J, Shono E, Takamura K, Machida H, Tsujioka K, Kaneko T, Uemura N, Suzawa K, Inagaki N, Umegaki N, Kasamatsu Y, Hara A, Arinobu Y, Inoue Y, Niino H, Kashiwagi Y, Harashima SI, Tahira T, Tsukamoto H, Akashi K: Hereditary angioedema in Japan: Genetic analysis of 13 unrelated cases. *Am. J. Med. Sci.* 査読有 343(3): 210-214, 2012
- 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: Risk modification by CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms in the association of cigarette smoking and systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Scand. J. Rheumatol.* 査読有 41(2): 103-109, 2012
- Horiuchi T, Ohi H, Ohsawa I, Fujita T, Matsushita M, Okada N, Seya T, Yamamoto T, Endo Y, Hatanaka M, Wakamiya N, Mizuno M, Nakao M, Okada H, Tsukamoto H, Matsumoto M, Inoue N, Nonaka M, Kinoshita T: Guideline for Hereditary Angioedema (HAE) 2010 by the Japanese Association for Complement Research. *Allergol. Int.* 査読有 61(4):559-562, 2012
- Yoshida K, Komai K, Shiozawa K, Mashida A, Horiuchi T, Tanaka Y, Nose M, Hashiramoto A, Shiozawa S: Role of the MICA polymorphism in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 査読有 63(10): 3058-3066, 2011
- Tsukamoto H, Nagafuji K, Horiuchi T, Mitoma H, Niino H, Arinobu Y, Inoue Y, To K, Miyamoto T, Iwasaki H, Teshima T, Harada M, Akashi K: Analysis of immune reconstitution after autologous CD34+ stem/progenitor cell transplantation for systemic sclerosis: predominant reconstitution of Th1 CD4+ T cells. *Rheumatology (Oxford)* 査読有 50(5): 944-952, 2011
- Furukawa M, Kiyohara C, Tsukamoto H, Mitoma H, Kimoto Y, Uchino A, Nakagawa M, Oryoji K, Nakashima H, Akashi K, Harada M, Horiuchi T: Prevalence of and risk factors for low bone mineral density in Japanese female patients with systemic lupus erythematosus.

Rheumatol. Int. 査読有 31(3): 365-376, 2011

Harashima S, Wang Y, Horiuchi T, Seino Y, Inagaki N: Purkinje cell protein 4 positively regulates neurite outgrowth and neurotransmitter release. *J. Neurosci. Res.* 査読有 89(10): 1519-1530, 2011

Kiyohara C, Horiuchi T, Takayama K, Nakanishi Y: Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and interaction with smoking and alcohol consumption in lung cancer risk: a case-control study in a Japanese population. *BMC Cancer* 査読有 11: 459-468, 2011

Yabuuchi H, Matsuo Y, Tsukamoto H, Sunami S, Kamitani T, Sakai S, Hatakenaka M, Nagafuji K, Horiuchi T, Harada M, Akashi K, Honda H: Correlation between pretreatment or follow-up CT findings and therapeutic effect of autologous peripheral blood stem cell transplantation for interstitial pneumonia associated with systemic sclerosis. *Eur. J. Radiol.* 査読有 79(2): e74-79, 2011

〔学会発表〕シンポジウム抜粋(計 件)

塚本浩、堀内孝彦：難治性自己免疫疾患に対する造血幹細胞移植療法 - その基礎と臨床 - . 第 41 回日本臨床免疫学会総会 平成 25 年 11 月 29 日、下関

堀内孝彦：我が国における TRAPS (TNF 受容体関連周期性症候群) の特徴 . 第 116 回日本小児科学会学術集会 . 平成 25 年 4 月 20 日、広島

堀内孝彦：全身性エリテマトーデス病態解明と治療の最近の進歩 . 第 27 回日本臨床リウマチ学会総会 . 2012 年 11 月 24 日、神戸

堀内孝彦：難治性炎症性疾患の画期的治療薬 - 抗 TNF 製剤の基礎と臨床 - . 第 40 回日本免疫学会学術集会 . 2011 年 11 月 29 日、千葉

堀内孝彦：全身性エリテマトーデスの病態解明と治療 - 最近の進歩 - . 第 55 回日本リウマチ学会総会 .

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://create2011.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者
堀内 孝彦 (HORIUCHI, Takahiko)
九州大学病院・別府病院・教授
研究者番号：90219212

(2)研究分担者
田平 知子 (TAHIRA, Tomoko)
九州大学・生体防御医学研究所・講師
研究者番号：50155230

塚本 浩 (TSUKAMOTO, Hiroshi)
九州大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：70304772

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕