

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790253

研究課題名（和文） ATP及びSTAT3によるヒト白血球の負の制御機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism of negative regulation of human leukocytes by ATP and STAT3

研究代表者

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：50343413

研究成果の概要（和文）：白血球（好中球及び単球）には様々な 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。TLR を介する細胞活性化機構は多くの知見が得られているが、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。ヒト好中球及び単球で LPS 刺激により TNF- α 及び IL-8 を産生するが、G-CSF は JAK2/STAT3 依存性に抑制する。TNF- α 及び IL-8 遺伝子のプロモーター領域の部分欠失コンストラクトを作成し、ATP、G-CSF、Dibutyryl cyclic AMP による制御領域が転写開始点近くにあることを見出した。

研究成果の概要（英文）：Leukocytes (neutrophils and monocytes) express various TLR(s) and have played the important role in the innate immune system that defense against invading bacteria, fungi. Although there are many insights about the cell activation mechanism through TLR, there are few researches on "the mechanism controlled TLR-signaling positively or negatively". Upon LPS stimulus human neutrophils and monocytes produce TNF- α and IL-8, and G-CSF suppresses these responses via JAK2/STAT3. We constructed partial deletion mutants of the promoter region of TNF- α and IL-8 gene, and we found out that the control domain by ATP, G-CSF, and Dibutyryl cyclic AMP was near the transcription start site.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：受容体・細胞内シグナル伝達・自然免疫・白血球・炎症性サイトカイン・Toll-like receptor・ATP

1. 研究開始当初の背景

白血球（好中球及び単球）には様々な TLR (Toll-like receptor) が発現し、自然免疫において重要な役割を果たしている。TLR 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ており、その機構も好中球と単球では細胞特異的な相違が認められている。TNF- α や IL-8 などの炎症性サイトカインの産生に関しては NF- κ B の重要性

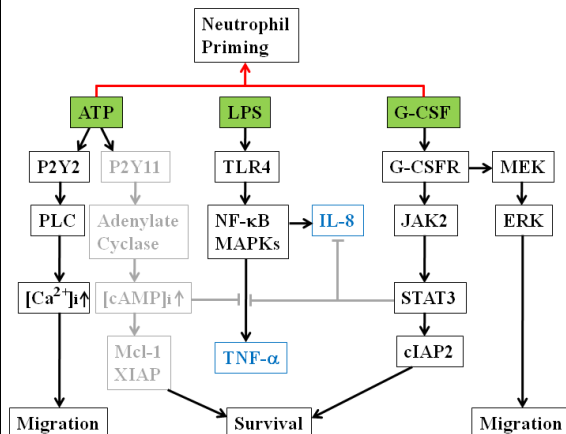
が明らかになっている。申請者が属する研究グループは、NF- κ B に加え MAPK (ERK、p38 及び JNK) も炎症性サイトカインの産生に重要な役割を果たしていることを明らかにしている。しかし、この機構を「正または負に制御する機構」についての研究は進んでいない。特に、炎症や組織傷害を制御する観点から生理的因子による「負の制御機構」の解明は極めて重要である。

白血球（好中球及び単球）には様々な TLR (Toll-like receptor) が発現し、自然免疫において重要な役割を果たしている。TLR 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ており、その機構も好中球と単球では細胞特異的な相違が認められている。TNF- α や IL-8 などの炎症性サイトカインの産生には NF- κ B が重要な役割を果たしている。申請者が属する研究グループは、NF- κ B に加え MAPK (ERK、p38 及び JNK) も炎症性サイトカインの産生に深く関与することを明らかにしているが、NF- κ B と MAPK のクロストークについては不明な点が多い (Am. J. Physiol. Cell Physiol. 286:C1302, 2004; Arch. Biochem. Biophys. 495:144, 2010)。

自然免疫を活性化するダメージ関連分子パターン (DAMP) が自身の細胞内に存在し、細胞損傷により放出されることがある。DAMP のひとつである 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、パラクリン及びオートクリン機構によって多くの細胞機能を制御している。好中球においては、走化性因子の刺激によって運動の先端部で ATP が放出され、ATP は P2Y2 受容体を介して運動の方向性の制御に関与している (Science 314:1792, 2006)。また、ATP は P2Y11 受容体を介して細胞内 cyclic AMP (cAMP) を増加させることによって好中球の生存を維持している (J. Immunol. 179:8544, 2007)。さらに、ATP はヒト好中球をプライミングして、活性酸素の産生を亢進することが知られている。そこで、LPS 刺激によって誘導されるヒト好中球からの TNF- α と IL-8 産生に及ぼす ATP の作用を解析した。予想に反して、ATP が LPS 刺激によって誘導される TNF- α 産生を極めて強く抑制することが判明した。

G-CSF は造血前駆細胞に作用して好中球系細胞への増殖・分化を特異的に促進し、さらに好中球の機能を亢進する造血因子と考えられてきた。しかし、最近の研究から G-CSF には免疫制御作用もあり、生体に投与すると Th2 優位になることが明らかになっている。ヒト単球に対しては、G-CSF が LPS (TLR4 agonist) 刺激によって誘導される TNF- α の産生を JAK2/STAT3 依存性に抑制することを明らかにしている (Am. J. Physiol. Cell Physiol. 286:C1302, 2004)。また、ヒト好中球においても、G-CSF が LPS 及び Pam3CSK4 (TLR2 agonist) 刺激によって誘導される TNF- α 及び IL-8 の産生を JAK2/STAT3 依存性に抑制することを明らかにしている (Arch. Biochem. Biophys. 495:144, 2010)。さらに、JAK2/STAT3 は好中球の生存維持にも重要であることを明らかにしている (J. Leukoc. Biol., 78:301,

2005)。これらの結果は、G-CSF には多面的な作用があること、すなわち、好中球数を増加させ、また、好中球の貪食・殺菌能を亢進することによって細菌感染に対する生体防御能を増強させると共に、TLR 刺激による炎症性サイトカインの産生を抑制することによって炎症を負に制御していることを示している。一般に、STAT3 の活性化は免疫系に抑制的に作用することが知られているが、STAT3 活性化の下流で生じる反応については多くの系において不明な点が多く、炎症性サイトカインの産生抑制機構についてはほとんど明らかになっていない。興味深いことに、ATP は G-CSF と異なり、LPS 刺激により誘導される IL-8 の産生には影響を与えず、TNF- α の産生を特異的に抑制した。また、ATP と G-CSF を併用すると相加的に TNF- α の産生を抑制した。このことは、ATP と G-CSF の作用機構が異なることを示している。予備的な実験から、ATP の抑制作用は P2Y11 受容体及び細胞内 cAMP の増加を介していると考えている。さらに、GM-CSF 同様 (Arch. Biochem. Biophys. 495:144, 2010)、IFN- α と IFN- γ が LPS 刺激によって誘導される TNF- α 産生を強く増強し、この増強作用が ATP 及び G-CSF により阻害されることを見出した。



上図 G-CSF と ATP による TLR シグナルの負の制御：まだ明らかになっていない灰色の部分の部分を解明することを目的とする。

生理的因子による TLR シグナルの「負の制御機構」の解明は、病態の理解のみならず急性炎症による組織傷害の防御手段の開発に重要である。また、「負の制御機構」の破綻が炎症の慢性化の基礎にあると考えられ、本研究課題は慢性炎症への進展に対する防御手段（治療薬剤）の開発にも重要である。さらに、本研究課題はマウスではなくヒトの系を用いる点にも特徴がある。

2. 研究の目的

本研究課題では、ヒト白血球（好中球及び単球）における G-CSF/STAT3 及び ATP/P2Y による TLR シグナルの負の制御機構を明ら

かにすることを目的とする。

(1) G-CSF/STAT3 の活性化は TNF- α と IL-8 の産生を共に抑制する。一方、ATP/P2Y11/cAMP は TNF- α の産生を強く抑制するが、IL-8 の産生には影響を与えない。このことは、TNF- α と IL-8 の産生制御機構に明らかな相違が存在することを示している。そこで、TNF- α と IL-8 遺伝子のプロモーターを詳細に解析し、STAT3 と cAMP によるこれらの遺伝子の活性化制御機構の相違を明らかにする。その上で、STAT3 と cAMP による TLR シグナルの「負の制御機構」を明らかにする。

(2) GM-CSF、IFN- α 及び IFN- γ は LPS 刺激によって誘導されるヒト好中球からの TNF- α 産生を強く増強する。しかし、この「正の制御機構」についてもその分子機序は不明であり、STAT3 と cAMP による「負の制御機構」との関連も全く不明である。そこで、これらのサイトカインによる「正の制御機構」を明らかにし、「負の制御機構」との関連（クロストーク）を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) TNF- α と IL-8 遺伝子のプロモーター解析：hTLR4a、MD2、CD14 及び G-CSFR/gp130 キメラ受容体（G-CSF 刺激で STAT3 が特異的に活性化）を発現させた HEK293 細胞

(293-hTLR4A-MD2-CD14-G-CSFR/gp130 細胞) を用いて、STAT3 と cAMP による TLR シグナルの「負の制御」、並びに TNF- α と IL-8 遺伝子のプロモーター活性の制御機構とその相違を明らかにする。

(2) ヒト好中球を用いて、G-CSF/STAT3 及び ATP/P2Y11/cAMP による TLR4 シグナルの「負の制御」と炎症性サイトカイン産生抑制との関連を明らかにする。

(3) ヒト好中球及び上記の HEK293 細胞を用いて、GM-CSF、IFN- α 及び IFN- γ による TLR4 シグナルの「正の制御」と炎症性サイトカイン産生増強との関連を明らかにする。その上で、正と負の制御機構の関連を明らかにする。

4. 研究成果

白血球（好中球及び単球）には様々な 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。TLR を介する細胞活性化機構は多くの知見が得られているが、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。ヒト好中球及び単球で LPS 刺激により TNF- α 及び IL-8 を産生するが、G-CSF は JAK2/STAT3 依存性に抑制する。一方、ATP は TNF- α 産生を抑制したが IL-8 産生は抑制しなかった。また、ATP は単独で IL-8 産生を誘導した。この ATP の作用は Dibutyryl cyclic AMP で再現出来るので、P2Y 受容体を介した制御機構の関与が示唆される。サイト

カイン産生の制御は mRNA レベルで生じているので、TNF- α 及び IL-8 遺伝子のプロモーター領域の解析を行った。293-hTLR4A-MD2-CD14 細胞での LPS 刺激による NF- κ B の活性化を検出し、TLR4 からのシグナル伝達を確認した。TNF- α 及び IL-8 遺伝子のプロモーター領域により発現制御される Luciferase 遺伝子を持つコンストラクトを作成し、上記細胞での LPS による Luciferase 活性の誘導を検出した。各プロモーター領域の部分欠失コンストラクトを作成し、ATP、G-CSF、Dibutyryl cyclic AMP による制御領域が転写開始点近くにあることを見出した。本研究業績がヒト白血球（好中球及び単球）における G-CSF/STAT3 及び ATP/P2Y による TLR シグナルの負の制御機構の解明につながることを期待している。

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 4 件）

① Xiao S, Wang L, Kimura M, Kojima H, Kunimoto H, Nishimura 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*, 査読有、105 巻、2013、162-174
DOI: 10.1111/boc.201200068

② 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*, 査読有、516 巻、2011、121-127
DOI: 10.1016/j.abb.2011.09.017

③ Yamamoto M, Kato T, 他 12, Shared and Distinct Functions of the Transcription Factors IRF4 and IRF8 in Myeloid Cell Development, *PLoS One*, 査読有、6 巻、2011、e25812
DOI: 10.1371/journal.pone.0025812

④ 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*, 査読有、513 巻、2011、51-60
DOI: 10.1016/j.abb.2011.06.007

〔学会発表〕（計 4 件）

① 藤田寿一、加藤隆幸、渡邊哲史、高橋達

研究者番号：50343413

治、北川誠一、カルパイン阻害剤はヒト・フォルミルペプチド受容体と直接相互作用して細胞機能を活性化する、第105回 近畿生理学談話会、2012年09月29日、関西医科大学、滝井学舎1号館、大阪

(2)研究分担者
なし

② 藤田寿一、加藤隆幸、渡邊哲史、高橋達治、北川誠一、カルパイン阻害剤はヒト・フォルミルペプチド受容体と直接相互作用して活性化する、第33回 日本炎症・再生医学会、2012年07月06日～2012年07月07日、ホテル日航福岡、福岡

(3)連携研究者
なし

③ 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～2012年10月21日、国立京都国際会館、京都

④ 加藤隆幸、他、Roles of IRF4 and IRF8 in Myeloid Cell Development, 第89回日本生理学会大会、2012年3月31日、長野県松本市

⑤ 藤田寿一、加藤隆幸、渡邊哲史、高橋達治、北川誠一、カルパイン阻害剤はヒトホルミルペプチド受容体を介して食細胞機能を活性化する、第104回 近畿生理学談話会、2011年10月1日、大阪医科大学、大阪

⑥ 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), 2011年5月16日、Awaji Yumebutai International Conference Center, 兵庫県

[図書] (計1件)

① Kitagawa S, Kato T, 他, Biological Effects of Calpain Inhibitors on Human Phagocyte Functions. In: Enzymes and Enzyme Activity., Chapter V. ed. E.M. Lashinski, p.121-144, Nova Science Publishers, Inc. NY

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/physiology2/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 隆幸 (KATO TAKAYUKI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師