

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592280

研究課題名(和文) インターロイキン32の関節疾患における役割とその下流シグナルの解明

研究課題名(英文) Potential role of Interleukin-32 for joint disease and elucidation of the downstream signaling

研究代表者

二木 康夫 (Niki, Yasuo)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10276298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：IL-32は単独でも炎症性サイトカインを誘導することができるのみならず、TLRシグナルの作用を増強する可能性が示唆されているが、これまでIL-32の受容体、下流シグナルは同定されていない。TLR-4の下流にあるTRIF分子をノックダウンすると、IL-32のTNFとⅡ型IFN誘導が抑制されることを確認した。IL-32はTLRシグナルを介して初期にはTNFをはじめとする炎症性サイトカインの誘導に働くが、その後はIRF系を介して、自然免疫による初期の炎症を抑える作用があるⅡ型IFNの誘導に働き、自然免疫による炎症を終息させ、獲得免疫への移行に重要な役割をはたしている可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：IL-32 is known to induce various inflammatory cytokines and trigger the TLR signaling cascade, however, receptors and downstream signaling pathways remain to be clarified. We found that IL-32 upregulated PR3, in turn triggering PAR2 signaling. TNF and type II interferon expression decreased with siRNA targeting TRIF. Initially IL-32-PAR2-TRIF pathway induce TNF expression and latter pathway induces type II interferon expression via IRF. IL-32 signaling gradually increases type II interferon expression to translate innate to adaptive immunity and terminate acute inflammation. IL-32-PAR2-TRIF axis may have been gained during the evolution of mammalian immune systems in order to function not only as an extracellular sensor of bacterial and autologous proteases, but also as an interface between innate and adaptive immunity.

研究分野：膝関節、関節リウマチ

キーワード：インターロイキン32 Toll様受容体 関節リウマチ 変形性関節症

1. 研究開始当初の背景

IL-32 は Lung carcinoma A549 細胞株に IL-18 の遺伝子を導入して誘導された新規サイトカインで、1992 年にメラノーマの IL-2 療法中に発見された NK4 と一致する分子である(Kim SH et al, Immunity, 2005)。これまでの諸家の報告により、IL-32 はマウスならびにヒト細胞において TNF α 誘導能をもち、また RA 患者の炎症性滑膜に高発現していることから RA の病態と深く関わることを示唆された。一方、リウマチモデル動物においても IL-32 の関与が証明されており、IL-32 の関節内投与や過剰発現により進行性の関節炎が誘導できることも実験的に確かめられている(Shoda H et al. Arthritis Res Ther, 2006)。興味深いことに TNF α ノックアウトマウスでは IL-32 を関節内に投与しても関節炎抵抗性であることが報告され (Joosten LAB, et al, Proc Natl Acad Sci USA, 2006) IL-32 の主要な作用は TNF α を誘発することであると考えられてきた。一方、最近 IL-32 は抗炎症性サイトカインの 1 つである IL-10 の誘導効果があると報告されている(Kang JW et al, Immunology, 2009)。また IL-32 γ 過剰発現トランスジェニック(Tg)マウスを用いた腸炎モデルにおいて、初期には強い腸炎が惹起されるが後期にはむしろコントロールマウスに比べて沈静化する傾向がみられたと報告されている(Choi J, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010)。これらの結果は、IL-32 の作用は必ずしも炎症を正に制御するのではなく、病期によっては炎症を負に制御する可能性を示唆している。しかし依然としてその受容体および下流シグナルの詳細は不明である。

1. 研究の目的

これまで、インターロイキン(IL)-32 は TNF α を中心とした炎症性サイトカインの産生を誘導し、関節リウマチ(RA)、炎症性腸疾患、閉塞性肺疾患、マイコバクテリウム感染、ウイルス感染等の病態に関与することが明らかにされてきた。われわれのこれまでの研究結果においてもリポポリサッカライド(LPS)誘導関節炎や敗血症性ショックモデルにおいて TNF α の産生を介して炎症を増悪することが確認された。しかし、ごく最近では炎症初期には TNF α を誘導するが、逆に後期には炎症を抑制するという抗炎症作用についても報告されている。われわれの関節リウマチ患者における血清 IL-32 濃度の測定結果では CRP, MMP-3, TNF α , IL-6 などの炎症マーカーとは全く相関しないことが明らかとなった。したがって、IL-32 は炎症を正に制御するだけでなく、時期または量によって負に制御する作用も併せ持っていると考えられる。これまで IL-32 は toll 様受容体(TLR)のシグナルを正に制御し、自然免疫系の重要なメディエーターであることが定説となっている。しかし、外界から侵入した病原体に対し急性炎症反応が活発化した後、これを沈静化させ、獲得

免疫系につなぐ調節的な役割を担う分子の存在も必要である。本研究では IL-32 の下流シグナルを解明することで、IL-32 の自然免疫系と獲得免疫系をつなぐ調節的な作用を解明し、IL-32 が炎症性関節疾患の治療標的となり得るのか、または非炎症性の関節疾患すなわち変形性関節症における新たな治療標的になり得るのかについて検討する。

2. 研究の方法

(1) IL-32 の Toll 様受容体シグナルへの関与と関節炎の病態について

野生型マウス 2 系統 (C57BL/6 および Balb/C) の膝関節内にリコンビナント IL-32 (rIL-32) を注射し、2 週間後の病理組織学的検討を行い、また滑膜組織を採取し、TNA の発現を測定する。さらにシグナル伝達経路の解明のため、Raw264.7 細胞を用いて、TLR 下流シグナルである NF κ B と MAPKs (ERK1/2, p38, JNK) のインヒビターと rIL-32 を加え、24 時間後の上清中の TNF の量を測定し、また各分子のリン酸化を調べる。経時的な炎症性サイトカイン誘導の変化をみるため、培養後 24-96 時間での TNF と IL-10 の量を測定する。

(2) IL-32 下流シグナルの解析

THP-1 を用いて、IL-32 添加後 Proteinase3 (PR3) の発現量を real time PCR で定量する。また PR3 ならびにその下流候補として Protease activated receptor2 (PAR2) さらに TLR4 下流分子として知られ、同時に PAR2 の下流にも存在すると報告されている TRIF の 3 分子をそれぞれ siRNA の手法を用いてノックダウンし、IL-32 の TNF ならびに type 1 interferon (IFN) 誘導作用が抑制されるかを real time PCR を用いて解析する。また、TLR4 アゴニストである LPS を加えた際の IL-32 の誘導を real time PCR にて定量する。

(3) TLR シグナルが変形性関節症(OA)モデルに及ぼす効果

OA モデルとして destabilization of medial meniscus (DMM) モデルを作成する。8 週齢雄の TRIF KO、Myd88 KO マウスと野生型マウス (WT) に OA モデルを作製し、術後 12 週にて病理組織学的検討を行う。また同時に膝関節から RNA を採取する。TLRs signaling PCR array を行い、各 TLR の発現および MyD88, TRIF (TICAM1), TRAM などのアダプター分子の発現をチェックする。

3. 研究成果

(1) rIL-32 の注射により組織学的にプロテオグリカンの消失を認め、また滑膜組織による TNF の発現上昇を認めた。Raw264.7 細胞においては IL-32 による TNF 誘導が NF κ B と ERK1/2 のインヒビターにより阻害され

た。また Western blot にて、I B および ERK1/2 の IL-32 添加によるリン酸化を確認した。また rIL-32 添加 24 時間の段階では TNF の誘導が有意であるが、その後経時的に IL-10 の誘導が増加した。IL-32 は NF B/ERK シグナルを介して TNF を誘導し、プロテオグリカンの消失と滑膜増殖を惹起し、関節炎の病態に関与すると考えられた。

(2) LPS と IL-32 の共刺激を与えると TNF と IL-6 の誘導が亢進したことから、IL-32 は単独でも炎症性サイトカインを誘導することができるのみならず、TLR シグナルの作用を増強する可能性が示唆された。THP-1 を用いた実験により、PR3、PAR2、TRIF 分子を siRNA の手法を用いてノックダウンすると、IL-32 の TNF 誘導が抑制されることを確認した。すなわち、IL-32 は TRIF を介して TLR シグナル下流に入り、TNF の誘導に寄与すると考えられる。他方、TRIF をノックダウンした系で IL-32 による 型 IFN の誘導も抑制された。TRIF の下流に IRF があることから、IL-32 は TRIF を介して 型 IFN も誘導する働きがあると考えられた。

IL-32 は TLR シグナルを介して初期には TNF をはじめとする炎症性サイトカインの誘導に働くが、その後は IRF 系を介して、自然免疫による初期の炎症を抑える作用がある 型 IFN の誘導に働き、自然免疫による炎症を終息させ、獲得免疫への移行に重要な役割をはたしている可能性がある。

(3) TRIF KO (n=3)、Myd88 KO (n=3) マウスを用いて in vivo での検討を行った。術後 12 週の病理組織学的検討にて、Modified semi-quantitative grading score を用いて検討した。Myd88、TRIF それぞれの KO マウスにおいて WT と比較し OA の進行が抑制された。TRIF、Myd88 は OA の発症に関与し、増悪させている可能性が示唆された。

また、invitro での実験のために、マウス EC (Embryonal Carcinoma) 細胞由来クローン化細胞株である ATDC5 をコラーゲン溶液に混和し、コラーゲンスキャフォールド (アテロコラーゲンスポンジ MIGHTY, KOKEN) に細胞を播種し、三次元組織を作製した。作製した三次元培養組織を力学刺激下で培養するため、生体力学刺激培養装置を用いて、圧縮刺激を加えるための条件の条件を検討した。今後、細胞形態、力学負荷による反応から生体軟骨の組織変性を反映する実験モデルの確立を目指していく。

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. 著者名 : Masanori Nakayama, Yasuo Niki, Toshiki Kawasaki, Yuki Takeda, Hiroyasu

Ikegami, Yoshiaki Toyama, Takeshi Miyamoto

論文標題 : IL-32-PAR2 axis is an innate immunity sensor providing alternative signaling for LPS- TRIF axis

雑誌名 : Scientific Reports 査読有

巻 : 3

発行年 : 2013

頁 : 2960

DOI : 10.1038/srep02960

2. 著者名 : Nakayama M, Niki Y, Kawasaki T, Takeda Y, Horiuchi K, Sasaki A, Okada Y, Umezawa K, Ikegami H, Toyama Y, Miyamoto T.

論文標題 : Enhanced susceptibility to lipopolysaccharide-induced arthritis and endotoxin shock in interleukin-32 alpha transgenic mice through induction of tumor necrosis factor alpha.

雑誌名 : Arthritis Research Therapy

査読有

発行年 : 2012

頁 : R120

DOI : 10.1186/ar3850

[学会発表](計 4 件)

1. 発表者名 : 中山政憲 二木康夫 武田勇樹 宇田川和彦 戸山芳昭 宮本健史

発表標題 : IL-32 の下流シグナルは Toll 様受容体 4 下流の TRIF を刺激し TNF と I 型インターフェロンの産生に関与する。

学会等名 : 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会

発表年月日 : 2013 年 10 月 17 日 -18 日

発表場所 : 千葉 幕張メッセ

2. 発表者名 : Masanori Nakayama, Yasuo Niki, Toshiki Kawasaki, Yuki Takeda, Yoshiaki Toyama, Takeshi Miyamoto.

発表標題 : Interleukin-32 induces TNFalpha and type I Interferon via Proteinase 3 - Protease activated receptor 2-TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-beta axis

学会等名 : EULAR(ヨーロッパリウマチ学会)2013

発表年月日 : 2013 年 6 月 12 日 -15 日

発表場所 : Madrid, Spain

3. 発表者名 : Masanori Nakayama, Yasuo Niki, Toshiki Kawasaki, Yuki Takeda, Hiroyasu Ikegami, Yoshiaki Toyama, Takeshi Miyamoto.

発表標題 : Interleukin-32 developed inflammatory arthritis with TNFalpha induction via Proteinase 3 and Protease activated receptor

2-TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-beta axis.

学会等名：Orthopaedic Research Society
annual meeting,2013
発表年月日：2013年1月26日-29日
発表場所：San Antonio,USA

4.発表者名：中山政憲 二木康夫 武田勇樹
宇田川和彦 池上博泰 戸山芳昭
宮本健史
発表標題：インターロイキン 32 は Toll 様
受容体シグナルを介してサイトカインを誘
導し関節炎の病態に關与する。
学会等名：第 27 回日本整形外科学会基礎学
術集会
発表年月日：2012年10月26日-27日
発表場所：名古屋 名古屋国際会議場

〔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〕

特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

二木 康夫 (NIKI, Yasuo)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10276298

(2)研究分担者

中山 政憲 (Nakayama, Masanori)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70528249

武田 勇樹 (Takeda, Yuki)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20445307

(3)連携研究者

なし