

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460503

研究課題名(和文)新規核内I $\kappa$ B分子I $\kappa$ BLによる炎症反応制御研究課題名(英文)Inflammation control by novel nuclear I $\kappa$ B, I $\kappa$ BL

研究代表者

佐藤 健人(SATO, Takehito)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：50235363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムワイド関連解析により、関節リウマチなど各種自己免疫疾患に関連する遺伝子として報告されていたI $\kappa$ B-like (I $\kappa$ BL)の炎症反応制御への寄与について検討した。過剰発現マウスでは関節炎が緩和したが、主としてマクロファージなど自然免疫系細胞の機能低下によるものであった。一方KOマウスに盲腸結索穿刺による敗血症、LPS投与による急性炎症を誘導したところ、有意の差が認められなかった。I $\kappa$ BLは核への移行に依存してNF $\kappa$ Bの活性を抑制し、RelB蛋白に特異的に結合した。RelBの機能修飾を介して炎症反応制御に関わることが示唆されたが、生理的意義についてはさらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Contribution to the inflammation control by I $\kappa$ B-like (I $\kappa$ BL) was examined. Tg mice showed reduced severity of experimentally-induced arthritis, mainly resulting from reduced function of innate immune cells such as macrophages. However, KO mice did not show significant change in the severity of acute inflammation induced by cecal ligation and puncture (CLP) or LPS injection. It is found that I $\kappa$ BL showed inhibitory effect on the transactivation of NF $\kappa$ B dependently on its nuclear translocation and that I $\kappa$ BL binds specifically to RelB protein, suggesting that it is involved in the control of inflammation through the modification of RelB function. Physiological significance of I $\kappa$ BL is to be further investigated.

研究分野：免疫学 細胞生物学

キーワード：自己免疫 炎症 NF $\kappa$ B

### 1. 研究開始当初の背景

炎症反応の遷延は様々な難治性疾患の要因となる他、老化に伴う諸症状の基盤の一つともなっている。IkBL (別名 NFKBIL1) は関節リウマチ患者のゲノムワイド関連解析から、本学 (東海大) 猪子らのグループにより関節リウマチ感受性遺伝子の候補として見出された遺伝子である (Okamoto et al. *Am.J.Hum.Genet.* 2003)。その後、国内外のいくつかのグループにより、IkBL 遺伝子近傍の多型がシェーグレン症候群、全身性エリテマトーデス (SLE)、高安型血管炎等のリスクと関連することが相次いで報告された。したがって IkBL は、自己免疫疾患、あるいは炎症制御に広く役割を果たす可能性があるが、その生理的意義や機能についてはほとんどわかっていなかった。

そこで我々はヒト IkBL を強制発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製し、コラーゲン投与により自己免疫性関節炎を誘導する実験系 (collagen-induced arthritis, CIA) を試みたところ、コントロールマウスに比べ、関節炎の重症度が有意に低下していた (Chiba et al. *Scand.J.Immunol.* 73:478-485 2011)。Tg マウスの樹状細胞 (DC) では、刺激による炎症性サイトカインの産生ならびに CD80/86 発現の低下が認められ、CIA 軽症化の一因と考えられた。したがって、IkBL は炎症反応に対して抑制的に働くものと思われた。このことは、上述のヒトゲノム解析において、疾患感受性のハプロタイプでは IkBL 遺伝子のプロモーター活性が低下していたことと一致している。

IkBL は、IkB ファミリーの ANK (アンキリン) 領域と相同性のある部分を持ち、NFκB 活性を修飾する機能が予想された。古典的 IkB ファミリーである IkBα, β, ε などは NLS (核移行シグナル) 配列を持たず細胞質に局在し、NFκB ファミリー分子を細胞質に捕捉することで NFκB 活性の抑制を行う事が知られている。これに対し、NLS 配列に依存し核内で NFκB 活性を修飾する新しいタイプの IkB (IkBζ, Bcl-3, IkBNS など) の重要性が近年知られるようになってきている (*Nature* 464:1381 2010 など)。IkBL は NLS 配列を持つことから、この核内 IkB ファミリーの新たな一員であると予想された (Chiba et al. *FEBS Letters* 585:3577-3581 2011)。したがって、他のファミリー分子と同様に、NFκB に核内で結合して、その転写活性を修飾することによって炎症反応制御に関わるものと思われたが、その当否、メカニズムの詳細については不明であった。

### 2. 研究の目的

多因子疾患のゲノム解析により、疾患との関連が指摘された SNP 等の多型は、きわめて多数に上っている。しかし、DNA 多型と疾患との関連が機能レベル・分子レベルで証明された例は少ない。IkBL については、す

で炎症反応に重要な転写因子 NFκB の活性を抑制することを見出しているため、稀な例外の一つになることが期待された。そのようなポスト・ゲノムの研究状況も踏まえ、本研究では炎症反応制御における IkBL の生理的意義や分子機構について、さらに検討することを目指した。

### 3. 研究の方法

(1) 作製した IkBL Tg マウス、IkBL KO マウスを用いた in vivo 実験によって、各種自己免疫反応および急性・亜急性期炎症への関与を検討

すでに IkBL Tg マウスではコラーゲン投与による自己免疫性関節炎 (collagen-induced arthritis, CIA) において関節炎の重症度が低下することを見ている。これを踏まえ、KO マウスにおいて CIA の重症度の悪化や、発症時期の早期化が起こるかどうかを調べた。

同様に、MOG ペプチド投与による実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を誘導し、KO マウス及び正常マウスにおける EAE 発症率、重症度、発症時期を比較した。

盲腸結索穿刺 (cecal ligation and puncture, CLP) による敗血症モデル、LPS 投与による急性期炎症モデルにおける KO マウス及び正常マウスの生存曲線、体温変化、血中サイトカインについて比較検討した。

(2) 各種細胞の in vitro 実験による IkBL の NFκB 活性抑制の分子機構の解明

各種培養細胞を LPS 刺激し、他の核内 IkB ファミリー分子 (IkBζ, Bcl-3, IkBNS など) の発現動態と比較する。特に KO マウス骨髄由来樹状細胞、またはマクロファージ細胞を用いて、IL-1, IL-6, TNFα など各種サイトカインの産生への影響を調べた。

IkBζ, Bcl-3, IkBNS がいずれも NFκB ファミリーの p50, p52 と核内で結合し、p50/p52 を含む複合体の転写活性を制御する。このことから、IkBL もまた、NFκB ファミリーのいずれかの分子と特異的結合を行う可能性がある。この点につき HEK293 細胞等への遺伝子導入と免疫沈降実験を行い、NFκB ファミリーのなかで、IkBL の結合パートナーが存在するか、存在した場合、その結合はそれぞれの分子のどの領域に依存するかを調べた。

炎症遷延化を評価する実験系の一つとして、マクロファージ細胞株によるエンドトキシン・トレランスを検討した。エンドトキシン・トレランスとは、あらかじめ (通常 24 時間前) LPS に暴露した単球や樹状細胞が、LPS に対する反応性を失い、炎症性サイトカインの産生を低下させる現象である。siRNA による IkBL のノックダウンを行った細胞でエンドトキシン・トレランスへの影響が認められるかどうかを検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) in vivo 実験による各種自己免疫反応、急性・亜急性期炎症への関与

I $\kappa$ BL-Tg マウスを用いた実験では、コラーゲン投与により自己免疫性関節炎を誘導する実験系(collagen-induced arthritis, CIA)において、関節炎の重症度の優位な軽症化が観察された。このとき、マクロファージ、樹状細胞など自然免疫系ではサイトカイン産生低下、co-signal receptor (CD80 および CD86)の発現低下など、免疫反応の進行に対して抑制的に働く要素の幾つかを示した。このことが関節炎重症度の緩和をもたらしたと考えられたが、興味深いことに、このとき、T 細胞の側は反対にサイトカイン産生、細胞増殖など、機能はむしろ亢進していた。その機序は不明であるが、以下に記述するように、I $\kappa$ BL は NF $\kappa$ B ファミリー分子の中でも RelB と特異的に結合する。一部に T 細胞において RelB が RelA に対して一過性に抑制的に働く場合があることを示した報告もあり、I $\kappa$ BL の機能は細胞や時期によって複雑な様相を示し得ることが推測された。

そこで I $\kappa$ BL の生理的機能をさらに確認する目的で、I $\kappa$ BL KO マウスを用いた解析を行った。KO マウスは ES 細胞に I $\kappa$ BL 遺伝子 exon 2 を loxP 配列に挟まれた Neo 耐性マーカーと置換した遺伝子断片と homologous recombination を行い、当該配列を保持した子孫を確保したのち、受精卵に Cre リコンビナーゼを導入、loxP に挟まれた不要配列を除いて KO マウスを得た。

プレ実験として KO マウスと同性同週齢の B6 マウスを用いて、コラーゲン投与による自己免疫性関節炎(CIA)の誘導を行ったところ、B6 マウスが投与後 70 日で全例(n=10)発症となったのに対し、KO マウスでは 45 日で全例(n=10)発症と、顕著な早期化を示した。Tg マウスでは関節炎の軽症化が起こったこととよく一致する結果となった。

そこで、B6 への戻し交配を進めるとともに、ヘテロマウスの兄妹交配により得られた +/+, +/-, -/- マウスに、デキストラン硫酸(DSS)を飲水中に混入して与え、腸炎発症の度合いを比較した。2% DSS を飲水にて 7 日間投与の後、7 日間のインターバル、その後 1% DSS 入りの飲水を与えるというスケジュールで実験を実施した。体重変化、便の形状、出血の度合いの 3 項目において、はじめの 7 日間で 3 群に明らかな差は観察しなかった。しかし、インターバル期間の後半(10 日以降)において、+/+, +/- 群が体重増加に転じたのに対し、-/- 群では立ち上がりが悪く、回復に遅れが認められた。2 回目の投与後 -/- マウスでは直ちに便の形状が柔らかくなったが、+/+ マウス、+/- マウスでは急激な変化はなかった。また、スケジュール後、開腹して大腸の長さを計測したところ、無処置マウス 85-90mm のところ、+/+ マウスで 73mm、+/- 及び -/- マウスで 65mm となり、重症度の亢進傾向が認められた。

次に MOG ペプチド投与による実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を誘導し、比較した。この実験系ではペプチド投与後、12 日頃より各種症状(四肢の機能低下、麻痺)が顕現し、18-21 日ごろ症状のピークを迎える。前後肢において、動かない、掴めない、弱まって十分に掴めない、の基準でスコア化したところ、KO マウスにおいてやや重症化の傾向が見られた。

次に、KO マウス、ヘテロマウス、正常マウスを用いて、盲腸結索穿刺(cecal ligation and puncture, CLP)による敗血症モデルの適用を試みた。この方法は麻酔後開腹したマウスの盲腸部を糸により結索し、結索部を針により穴を開けて、腸内細菌を腹腔内に播種して閉腹しておく。

敗血症は救命救急外来における死亡原因の第 2 位を占める。その病態を調べると、死亡者の多くは高齢者であり、急性期のショックではなく亜急性期にわたる炎症遷延化傾向と、これに伴う免疫抑制状態を特徴とすることが明らかとなった(S.Inoue, T.Sato et al. *Critical Care Medicine* 41:810 2013)。高齢マウスを用いた敗血症モデル実験でもこの傾向は再現し、老化に伴う炎症遷延化傾向の重要性を示している(S.Inoue, T.Sato et al. *Critical Care* 18:R130 2014)。

我々は、後述するように I $\kappa$ BL が亜急性期以降の炎症反応抑制に関わる可能性を考えていたので、CLP の系で老化マウスと同様に I $\kappa$ BL KO マウスでも炎症の重症化が認められるのではないかと考えた。しかし、生存、体温変化、血清サイトカインの変化において 3 者に大きな違いは認められなかった。

次に、KO マウス、ヘテロマウス、正常マウスに LPS を 10mg/kg 体重、または 1mg/kg 体重となるように腹腔内に投与し、0, 2, 6, 24 時間後の血清を採取し、IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ の定量を行った。その結果、3 者に大きな違いは認められなかった。

##### (2) in vitro 実験による I $\kappa$ BL の NF $\kappa$ B 活性抑制の分子機構の解明

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞に NF $\kappa$ B 支配下にルシフェラーゼ(luc)を発現するレポータープラスミド、補正用 pRL-TK プラスミドとともに、I $\kappa$ BL 及び各種変異体発現ベクターを遺伝子導入し、100ng/ml LPS 刺激によるルシフェラーゼ活性を測定した。

I $\kappa$ BL 発現は NF $\kappa$ B の転写活性を阻害したが、この時 Rel-A の核移行を阻害しなかった。この時 I $\kappa$ B $\alpha$ の分解も I $\kappa$ BL 発現により影響を受けておらず、核移行に変化がなかったことと一致していた。一方、この阻害活性は I $\kappa$ BL の核移行シグナル(NLS)、アンキリンリピート領域(ANK)を欠失させると失われた。以上の知見は、I $\kappa$ BL が、I $\kappa$ B $\zeta$ , I $\kappa$ BNS, Bcl-3 などの「核内 I $\kappa$ B」ファミリーであることを示唆している。I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ など、古典的な

IκB 分子が細胞質に NFκB を停留させ、核内移行を抑制することで機能を担っているのは異なり、「核内 IκB」ファミリーは核内に移行した NFκB に結合し、その機能を修飾することで活性を表している。その際、p50, p52 に結合して IL-6, TNFα の発現制御に関わることが報告されている。そこで、IκBL もまた NFκB ファミリーのいずれかと特異的な結合を行うことを予想して、FLAG-tag 付加した IκBL を Rel-A, Rel-B, c-Rel, p50, p52 と共に HEK293 細胞に遺伝子導入し、抗 FLAG 抗体で、免疫沈降、NFκB ファミリーの中に共沈するものがあるかどうかを検討した。その結果、IκBL は Rel-B にのみ特異的に結合し、この結合には核移行シグナル領域(NLS)は必要でないが、アンキリンリピート(ANK)部が必要であることが判明した。

一方、クロマチン免疫沈降(ChIP)法により、Rel-A 蛋白の IL-6 遺伝子、TNFα 遺伝子の各プロモーターへの結合を調べると、IκBL は、この結合を阻害する傾向のあることがわかった。IκBL の結合パートナーである RelB にも同様の効果があることから、この阻害効果を IκBL がサポートしていることが推測される。

次に、IκBL の生理的意義について明らかにする目的で、Loss of function の効果を検討する各種実験を行った。

RAW264.7 細胞に IκBL のノックダウンを行ったところ、LPS 刺激による IL-1β, TNFα の産生がコントロールに比べおよそ 2 倍(前者は刺激後 5 時間、後者は 1 時間)となった。しかし、KO マウス骨髄より誘導した樹状細胞、並びにマクロファージでは有意の差が認められなかった。しかしながら、RAW246.7 細胞、骨髄由来樹状細胞のいずれも生理的状態での樹状細胞、マクロファージを表すとは考えられず、さらなる検討が必要と思われた。

マウス CD4 T 細胞、脾臓樹状細胞を抗 CD3 抗体、LPS によりそれぞれ刺激すると、刺激後 12 時間という、比較的遅い時間をピークに IκBL 発現が高まってくる。これは他の核内 IκB 分子である IκBζ, IκBNS が LPS 刺激後 30~60 分程度の急性期に発現が最大となり、その後急速に低下する傾向を示すのと対照的である。このことは、IκBL がサイトカイン産生のマグニチュードではなく、持続時間のコントロールに役割を果たすことを推測させる。

そこで、持続性 LPS 刺激による反応性を比較する目的で、LPS 刺激後 24 時間の時点で再び LPS 刺激を行い、IL-1β, IL-6, TNFα の産生について、IκBL ノックダウン細胞とコントロール細胞を比較した。この手法により観察されるサイトカイン産生低下には、Rel-B が関与することが報告されている。IκBL が Rel-B と特異的に結合することから、この現象への関与が疑われた。

いずれのサイトカイン産生でも、IκBL ノックダウンにより産生がやや増大した。この時

RelB ノックダウンを同時に行っても、明瞭な相乗効果は認められなかった。

関節リウマチ患者のゲノムワイド関連解析から注目された IκBL 遺伝子は、配列から予想された通り、核内で NFκB の転写活性を調節する核内 IκB ファミリーの一員であった。IκBL は古典的 IκB と異なり、核内において機能し、既知の核内 IκB ファミリーと異なり、p50, p52 ではなく、Rel-B と特異的に結合した。Rel-B の機能として、いわゆるエンドトキシン・トランスが知られているが、IκBL はこれをサポートする可能性がある。しかしながら、RelB 独自の機能については未だ不明の点が多く、本研究においても gain of function 実験が比較的明瞭な結果を示したのに対し、loss of function 実験は不明瞭な結果となった。このため IκBL の生理的意義、重要性について十分に明らかにできなかったとは言えない。しかしながら、NFκB 活性が多層的に制御されていることは改めて浮き彫りとなり、今後さらなる検討を加える必要があると考えられる(T.Chiba, T.Sato et al. *BioMol Concepts* 2012)。

## 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 0 件)  
[学会発表](計 0 件)  
[図書](計 0 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 健人(SATO, Takehito)  
東海大学・医学部・准教授  
研究者番号 50235363