

**サイトカイン産生、炎症の新たな制御機構の解明**  
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学  
松本 佳則

**(研究の背景)**

炎症性腸疾患、関節リウマチをはじめとする自己免疫性炎症性疾患は、腸内常在菌や自己または外来抗原に対する異常な免疫応答により活性化された炎症細胞から、サイトカインやケモカインが異常産生されることで生じる。近年、TNF- $\alpha$ やIL-6など炎症性サイトカインの阻害薬が炎症性疾患の主な治療法の1つとなっているが、その効果は十分でなく、またサイトカイン異常産生の機序も明らかになっていない。これらの機序を解明することは、治療ターゲットとなる新たな因子の発見に繋がり、疾病と遺伝的・環境的素因の関係を明らかにする上でも重要である。

“SH3BP2 (3BP2)”はpleckstrin homology (PH) ドメインの他、Src homology 3 (SH3) ドメイン含有タンパクに結合するプロリンリッチ領域や、リン酸化チロシンに結合するSH2ドメインを有し、受容体と細胞内シグナルを仲介するアダプタータンパクである。2001年、この3BP2の1アミノ酸置換を起こすミスセンス変異が、顔面骨の炎症を伴う顔面変形、歯牙の脱落を特徴とする遺伝性骨疾患“チェルビズム”の原因であると初めて報告された<sup>(1)</sup>。

Tankyraseはpoly(ADP-ribose) polymerase (PARP) familyのメンバーで、基質蛋白と結合しこれをADPリボシル化することで、基質蛋白の活性や分解を制御している。我々はこれまで、Tankyraseが3BP2に結合、ADPリボシル化する事を発見し、これが標識となってE3リガーゼのRNF146にユビキチン化された3BP2が、プロテアソームで分解されるメカニズムを解明した<sup>(2)</sup>。TankyraseとRNF146による3BP2の分解制御機構は恒常性維持に重要であることが明らかとなり、これらの生体内での生理的機能の解明が次なる検討課題であった。

そこで私は3BP2がその基質蛋白であるABLチロシンキナーゼを活性化し、骨芽細胞の必須転写因子であるRUNX2の転写活性を高めることで骨芽細胞の分化が促進する機序を解明し<sup>(3)</sup>、RNF146の単球・マクロファージ分画でのノックアウトマウスは破骨細胞の異常活性化による骨粗鬆症を呈すること<sup>(4)</sup>、また骨芽細胞分画でのノックアウトマウスの新生児は致死的な頭蓋骨欠損や肺形成障害を呈することを報告した<sup>(5)</sup>。これらの研究から、TankyraseとRNF146の協調による基質蛋白のADPリボシル化、ユビキチン化が障害されると、様々な疾患を発症し得るのではないかと考えた。

1. Ueki Y et al. Nature Genetics. 2001; 28(2):125-126
2. Levaot N, Rottapel R et al. Cell. 2011; 147(6):1324-1339
3. Matsumoto Y et al. The Journal of Clinical Investigation. 2016; 126(12):4482-4496
4. Matsumoto Y et al. The Journal of Clinical Investigation. 2017; 127(4):1303-1315
5. Matsumoto Y et al. The Journal of Clinical Investigation. 2017; 127(7):2612-2625

**(研究の目的)**

本研究では、poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) familyのメンバーで、基質蛋白と結合しこれをADPリボシル化するTankyraseに着目し、生体内でのTankyraseの分子生物学的機能を解明する。

## (研究方法)

今回我々は、Tankyrase ノックアウトマウスの作製に成功した。サイトカイン産生に關与する Toll-like receptor (TLR) 経路に着目し、Tankyrase 発現の有無による同経路のシグナルの変化やサイトカイン産生量の変化を野生型と比較し、Tankyrase がサイトカイン産生を制御するメカニズムを解明する。また Tankyrase 阻害剤である NVP-TNKS656 は、Tankyrase の既知の基質蛋白である AXIN の分解抑制を介して Wnt/ $\beta$ -catenin 経路を阻害する為、細胞増殖抑制作用を有し、癌の新たな治療薬として期待されている。Tankyrase を生体内でブロックすることの問題点、予想される副作用、炎症を制御する Tankyrase の機能を明らかにする。

## (結果)

### ①Tankyrase は炎症を制御する：

驚くことに、Tankyrase ノックアウトマウスは、野生型 (wild-type) と比較して小さく、全身性の炎症を起こした。また 20 種類の血中サイトカイン、ケモカインを同時に測定できる “Multiplex bead based platform” の検討では TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-17、G-CSF、IL-2、IL-10、IL-12、CCL2 及び CCL3 の異常産生を認めた。また脾臓・リンパ節では胚中心の破壊と共に広範囲の炎症細胞浸潤を認めた。以上の結果から Tankyrase ノックアウトマウスは細胞浸潤を伴う全身性炎症を呈することを明らかにした。

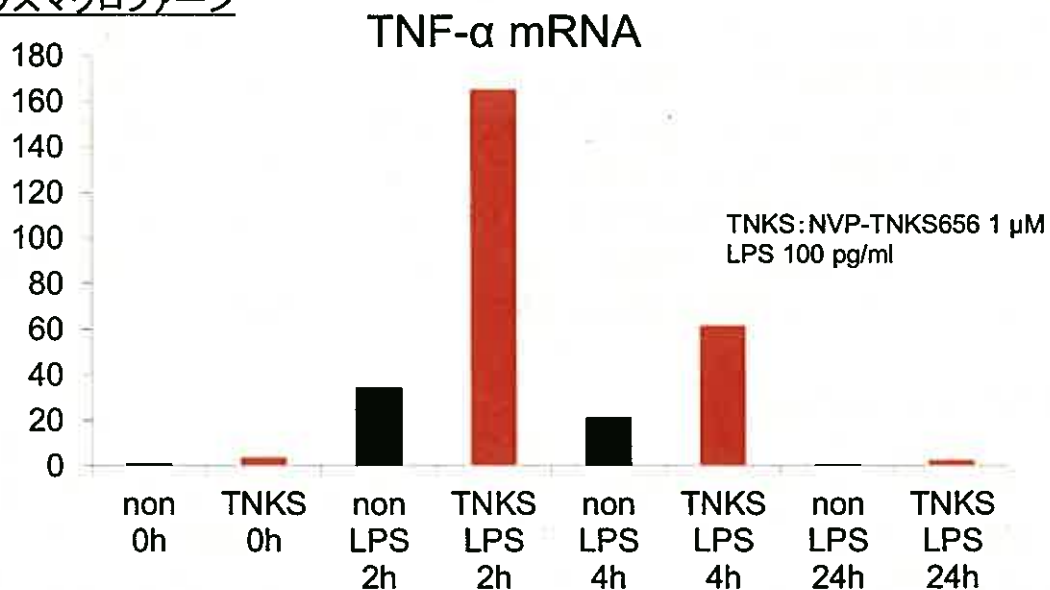
### ②Tankyrase は TLR シグナルを制御する：

KO マウスマクロファージでは TNF- $\alpha$ /IL-6mRNA の発現増加を認め、Tankyrase がサイトカイン産生を制御する機序として TLR シグナルに着目した。KO 細胞では転写因子 NF- $\kappa$ B の核内移行が促進し、TLR のリガンド (HKPG : TLR2, LPS : TLR4, ssRNA : TLR7) 刺激で WT 細胞に比して IL-6 発現が増加した。以上の結果から、Tankyrase は TLR シグナルを制御することでサイトカイン産生をコントロールすることが明らかになった。

### ③Tankyrase 阻害剤 NVP-TNKS656 はサイトカイン産生を促進する：

次に我々は、NVP-TNKS656 のサイトカイン産生作用について検討した。マウス骨髄から分離したマクロファージを NVP-TNKS656 で培養し、更に LPS で刺激すると、マクロファージ内の TNF- $\alpha$ 、IL-6 をはじめとする様々なサイトカインの mRNA 発現が亢進した (下図)。これらの作用は Tankyrase KO 細胞で見られた結果と同様であった。

## マウスマクロファージ



図：マウスマクロファージを NVP-TNKS656 で培養後に LPS で刺激して、刺激後 2-24 時間で回収し、TNF- $\alpha$  の mRNA レベルを定量 PCR で検討した。

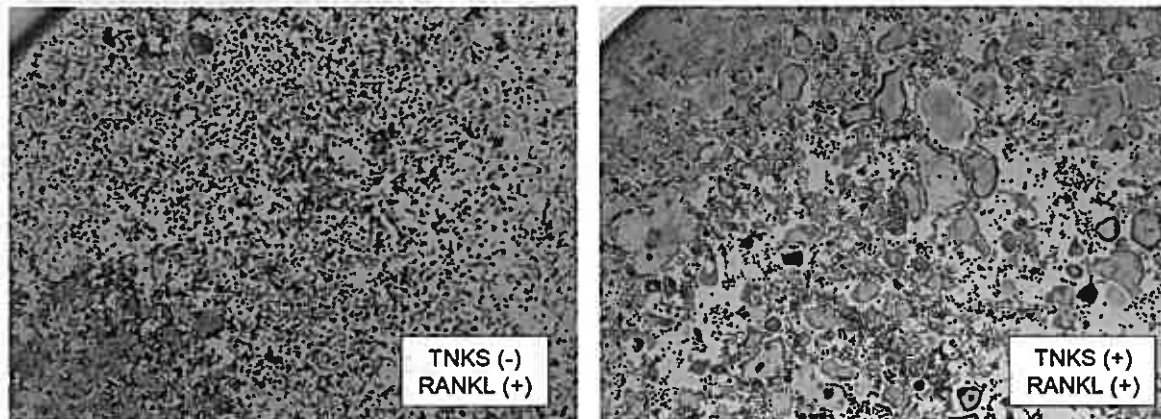
④Tankyrase 阻害剤 NVP-TNKS656 は破骨細胞分化を促進する：

更にマクロファージから破骨細胞への分化能についても検討した。興味深いことにマクロファージを NVP-TNKS656 で刺激すると、RANKL 誘導性の破骨細胞分化が亢進した（下図）。

マウスマクロファージ

TRAP 染色

TNKS: NVP-TNKS656 1  $\mu$ M



図：マウスマクロファージを RANKL 存在下で培養し、NVP-TNKS656 の有無による破骨細胞分化を TRAP 染色で検討した。

⑤Tankyrase 阻害の下流では 3BP2、AXIN の蛋白発現が上昇している：

次に我々は、サイトカイン産生能や破骨細胞分化能亢進のメカニズムを解明するために、Tankyrase 下流の基質蛋白の同定を行った。前述の如く Tankyrase は ADP リボシル化を通して基質蛋白の分解を制御することが知られている。NVP-TNKS656 の添加により、マクロファージ内でアダプター蛋白である 3BP2 や Wnt 経路の抑制因子 AXIN の蛋白発現量増加がウェスタンブロットにより確認された。これらの基質蛋白がサイトカイン産生や破骨細胞分化に関与していると考え、シグナル伝達など更なる解明を進めている。

(考察)

癌治療薬として研究が進んでいる Tankyrase 阻害剤を用いた本研究により、Tankyrase 阻害剤がサイトカイン産生や破骨細胞分化を促進することが明らかとなった。Tankyrase の阻害が既知の基質蛋白である AXIN の分解抑制を介して Wnt/ $\beta$ -catenin 経路を阻害する為、細胞増殖抑制作用を有し、癌の新たな治療薬として期待されている。本研究から Tankyrase 阻害薬である NVP-TNKS656 の添加により、マクロファージが活性化してサイトカイン産生や破骨細胞分化が亢進することが明らかとなり、Tankyrase を生体内でブロックすることの問題点、予想される副作用などが明らかとなった。炎症を制御する Tankyrase の機能を明らかにするため、基質蛋白の下流のシグナル伝達経路の解明を中心に、更なる検討を進めている。

(臨床的意義・臨床への貢献度)

本研究では Tankyrase の生体内での機能に着目し、更に癌の治療薬として開発が進む Tankyrase 阻害薬の問題点について明らかにした。実臨床では癌細胞に対してより特異性の高い阻害でなければ使用が難しいのではないかと考える。更に Tankyrase がサイトカイン産生を介して自然免疫を制御することが明らかとなり、Tankyrase 下流のメカニズムの解明を通して自然免疫制御機構の全容を明らかにしたい。最後に、本研究に多大なるご支援を頂いたアステラス病態代謝研究会の皆様方に深謝致します。