

## TNF $\alpha$ により誘導される遺伝子群の同定とその治療への応用

●中野 裕康 ◆奥村 康

順天堂大学医学部

### 〈研究の目的と進め方〉

TNF $\alpha$ は慢性関節リウマチや、グラム陰性悍菌感染時にみられるエンドトキシンショックなどにおいて中心的な役割を果たすことが知られており、またある種の腫瘍細胞にはアポトーシスを誘導することが知られている。しかしながら、大多数の他の細胞にはアポトーシスを誘導せず、むしろ炎症性サイトカインの産生や接着因子などの発現上昇を誘導することから、TNF $\alpha$ 刺激時にはアポトーシスを誘導するシグナル伝達経路と同時に抗アポトーシス遺伝子の誘導がもたらされると考えられている。しかしながら、このような多彩な機能を有するTNF $\alpha$ により誘導される遺伝子群については完全には明らかにされていない。我々の作製したTNF receptor-associated factor (TRAF) 5/TRAF2のダブルノックアウト (DKO) マウス由来の胎児線維芽細胞(MEFs)はTNF $\alpha$ 刺激によるNF- $\kappa$ Bの活性化の障害とTNF $\alpha$ 誘導性細胞死に対する感受性の亢進が認められる。そこでcDNA マイクロアレイを用い、野性型およびDKOマウス由来のMEFsをTNF $\alpha$ 刺激することにより誘導される遺伝子群の発現パターンを検討し、DKO MEFsで特異的に発現の低下した遺伝子群をcDNA マイクロアレイを用いて同定することを目的とする。

### 〈研究開始時の研究計画〉

- ①DKOマウスおよび野生型マウス由来のMEFsをTNF $\alpha$ 刺激し、その時に誘導される遺伝子の発現パターンを理研20K cDNAマイクロアレイを用いて比較検討し、TNF $\alpha$ により誘導されてくる遺伝子群および、DKO由来のMEFsで特異的に誘導の見られなくなった遺伝子群を同定する。発現に変化のあった遺伝子群については再現性を見るためにノーザンブロット法により確認する。
- ②ノーザンブロット法で発現に差の見られた遺伝子群についてはその遺伝子をレトロウイルスベクターに組み込み、DKOマウス由来のMEFsに遺伝子導入し、TNF $\alpha$ により誘導される細胞死に抵抗性となるかを検討する。
- ③同定された遺伝子のプロモーター解析を行い、同定された遺伝子の発現調節のメカニズムを明らかにする。

### 〈研究期間の成果〉

理研20K cDNAマイクロアレイを用いてTNF $\alpha$ 刺激前、2, 4, 6時間後にRNAを回収し、遺伝子の発現パターンを検討した結果、DKO MEFsで野性型MEFsに比較し、4分の1以下に発現の低下している遺伝子を300個以上同定した。さらに興味深い遺伝子あるいは未知の遺伝子についてはノーザンブロット法を用いその発現の差を確認した。これらの解析の結果、刺激に伴い野生型細胞ではスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)IやSOD2, グルタチオンS-トランスフェラーゼ、メタロチオネインなどの抗酸化酵素あるいは抗酸化分子の発現上昇が認められた。さらにこれらの抗酸化酵素の発現上昇は、DKO MEFsでは低下していることより、NF- $\kappa$ Bの機能としてこれらの酵素の発現上昇を介して活性酸素(ROS)の蓄積を抑制し

ている可能性が示唆された(6)。しかしながら、残念ながらこれら抗酸化酵素分子をレトロウイルスベクターに組み込みDKO MEFsに遺伝子導入しても、TNF $\alpha$ 刺激により誘導される細胞死に対する抵抗性を獲得しなかった。以上より、単一の抗酸化酵素の過剰発現だけではROS産生を抑制するためには十分ではなく、これらの酵素群の協調的な働きがROSの効率的な除去には必要である可能性が示唆された。

また我々は、NF- $\kappa$ Bの欠損した細胞ではTNF $\alpha$ 刺激により大量のROS産生が生じること、およびこのROS産生がTNF $\alpha$ 刺激により誘導されるネクローシスや、数時間にもわたって持続するc-Jun N-terminal kinase (JNK)の活性化に必須であることを示した(10)。

### 〈国内外での成果の位置づけ〉

NF- $\kappa$ Bの細胞死抑制機能としては、これまでカスパーゼの活性化を抑制することによりアポトーシスを抑制することが注目されてきた。しかし、我々の今回のNF- $\kappa$ B欠損細胞と野生型細胞のTNF $\alpha$ 刺激により誘導される遺伝子発現のパターンをマイクロアレイを用いて解析した結果、NF- $\kappa$ Bの重要な機能として、抗酸化酵素の発現上昇を介してROS産生を抑制する機能が重要であることが初めて明らかとなった。さらにNF- $\kappa$ Bはアポトーシスだけではなく、ネクローシスを抑制する機能のあることが明らかとなった。我々の研究以後、複数のグループにより同様の結果が報告され(Ventura et al., Genes Dev, 2004; Pham et al., Cell, 2004; Kamata et al., Cell, 2005)、この分野における研究の方向性を決定づけたものとなった。これらの研究により、その後我々はこのテーマについての総説を書く機会を与えられ(1, 4, 7)、これらの総説のなかで今後のこの分野の研究の方向性を示すことができた。

### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

マイクロアレイ解析により得られたNF- $\kappa$ B依存性に誘導される遺伝子群のなかで、TNF $\alpha$ 刺激による細胞死を抑制する遺伝子を同定することはできなかった。しかしながら、NF- $\kappa$ B依存性の細胞死抑制のメカニズムとしては、複数の細胞死促進経路(カスパーゼ系、ROS産生経路、およびJNK経路)を抑制することが必要であることを考えると、この結果はむしろ現時点では当然なことかもしれないと考えられた。さらにマイクロアレイでの差が、ノーザンブロット解析の結果と必ずしも一致しない場合も存在し、より詳細な時間経過の設定および同一ポイントにおいて3回以上(今回はすべて2回の実験)の実験が結果の信頼性を上げるためには必要と思われた。

### 〈今後の課題〉

現在TNF $\alpha$ により誘導されるシグナル伝達経路に関する大きな問題点は、一つはどのようなメカニズムによりTNF $\alpha$ がROS産生を誘導するかという点と、またある状況ではどのようにしてネクローシスを誘導するのかという点である。これらの問題の解決を通じて、TNF $\alpha$ が深

く病態に関わっているとされる敗血症性によるショックや慢性関節リウマチの治療法を開発する上で、より有望な標的分子あるいは標的シグナル経路を同定できる可能性がある。さらに、これらの分子メカニズムを明らかにする上で、今回我々の用いたようなマイクロアレイ解析や、プロテオーム解析などのいわゆる網羅的なアプローチをすべて動員することにより明らかにできるのではないかと期待が持たれる。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. 0602021804

Nakano, H., Nakajima, A., Sakon-Komazawa, S., Piao, J. H., Xue, X., and Okumura, K. Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF- $\kappa$ B and JNK. *Cell Death Differ* (2006).

2. 0602021651

Wu, L., Nakano, H., and Wu, Z. The CTAR2 domain of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 activates NF- $\kappa$ B through TRAF6 and TAK1. *J Biol Chem* 281, 2162-2169 (2006).

3. 0602021637

Xue, X., Piao, J. H., Nakajima, A., Sakon-Komazawa, S., Kojima, Y., Mori, K., Yagita, H., Okumura, K., Harding, H., and Nakano, H. Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) induces the unfolded protein response (UPR) in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion, and the UPR counteracts ROS accumulation by TNF  $\alpha$ . *J Biol Chem* 280, 33917-33925 (2005).

4. 0602021757

Nakano, H. A revival of old players. *EMBO Rep* 6, 126-127 (2005).

5. 0602021550

Chen, L. F., Williams, S. A., Mu, Y., Nakano, H., Duerr, J. M., Buckbinder, L., and Greene, W. C. NF- $\kappa$ B RelA Phosphorylation Regulates RelA Acetylation. *Mol Cell Biol* 25, 7966-7975 (2005).

6. 0602011656

Sasazuki, T., Okazaki, T., Tada, K., Sakon-Komazawa, S., Katano, M., Tanaka, M., Yagita, H., Okumura, K., Tominaga, N., Hayashizaki, Y., Okazaki, Y., and Nakano, H. Genome wide analysis of TNF-inducible genes reveals that antioxidant enzymes are induced by TNF and responsible for elimination of ROS. *Mol Immunol* 41, 547-551 (2004).

7. 0602021745

Nakano, H. Signaling crosstalk between NF- $\kappa$ B and JNK. *Trends Immunol* 25, 402-405 (2004).

8. 0602021834

Gil, J., Garcia, M. A., Gomez-Puertas, P., Guerra, S., Rullas, J., Nakano, H., Alcamí, J., and Esteban, M. TRAF family proteins link PKR with NF- $\kappa$ B activation. *Mol Cell Biol* 24, 4502-4512 (2004).

9. 0602021704

Sakurai, H., Suzuki, S., Kawasaki, N., Nakano, H., Okazaki, T., Chino, A., Doi, T., and Saiki, I. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced IKK phosphorylation of NF- $\kappa$ B p65 on serine 536 is mediated through the TRAF2, TRAF5, and TAK1 signaling pathway. *J Biol Chem* 278, 36916-36923 (2003).

10. 0602021708

sSakon, S., Xue, X., Takekawa, M., Sasazuki, T., Okazaki, T., Kojima, Y., Piao, J. H., Yagita, H., Okumura, K., Doi, T., and Nakano, H. NF- $\kappa$ B inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *Embo J* 22, 3898-3909 (2003).

11. 0602021850

Okazaki, T., Sakon, S., Sasazuki, T., Sakurai, H., Doi, T., Yagita, H., Okumura, K., and Nakano, H. Phosphorylation of serine 276 is essential for p65 NF- $\kappa$ B subunit-dependent cellular responses. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 807-812 (2003).

12. 0602021845

Luftig, M., Prinarakis, E., Yasui, T., Tschritzis, T., Cahir-McFarland, E., Inoue, J., Nakano, H., Mak, T. W., Yeh, W. C., Li, X., Akira, S., Suzuki, N., Suzuki, S., Mosialos, G., and Kieff, E. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activation of NF- $\kappa$ B through IRAK1 and TRAF6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15595-15600 (2003).

13. 0602021839

Hur, G. M., Lewis, J., Yang, Q., Lin, Y., Nakano, H., Nedospasov, S., and Liu, Z. G. The death domain kinase RIP has an essential role in DNA damage-induced NF- $\kappa$ B activation. *Genes Dev* 17, 873-882 (2003).

14. 0602021559

Chen, M. C., Hwang, M. J., Chou, Y. C., Chen, W. H., Cheng, G., Nakano, H., Luh, T. Y., Mai, S. C., and Hsieh, S. L. The role of apoptosis signal-regulating kinase 1 in lymphotoxin- $\beta$  receptor-mediated cell death. *J Biol Chem* 278, 16073-16081 (2003).

15. 0602021700

Sasazuki, T., Sawada, T., Sakon, S., Kitamura, T., Kishi, T., Okazaki, T., Katano, M., Tanaka, M., Watanabe, M., Yagita, H., Okumura, K., and Nakano, H. Identification of a novel transcriptional activator, BSAC, by a functional cloning to inhibit tumor necrosis factor-induced cell death. *J Biol Chem* 277, 28853-28860 (2002).

16. 0602021643

Tada, K., Okazaki, T., Sakon, S., Kobayashi, T., Kurosawa, K., Yamaoka, S., Hashimoto, H., Mak, T. W., Yagita, H., Okumura, K., Yeh, W. C., and Nakano, H. Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF- $\kappa$ B activation and protection from cell death. *J Biol Chem* 276, 36530-36534 (2001).

17. 0602021855

Matsushima, A., Kaisho, T., Rennert, P. D., Nakano, H., Kurosawa, K., Uchida, D., Takeda, K., Akira, S., and Matsumoto, M. Essential role of nuclear factor (NF)- $\kappa$ B-inducing kinase and inhibitor of  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) kinase  $\alpha$  in NF- $\kappa$ B activation through lymphotoxin  $\beta$  receptor, but not through tumor necrosis factor receptor I. *J Exp Med* 193, 631-636 (2001).