

P : positive control  
 N : negative control

Fig. 2 水疱性類天疱瘡(BP)患者血清を用いたBP230リコンビナント蛋白質の免疫ブロット

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

膿疱性乾癬（汎発型）の機序解析-脂質代謝とビタミンD3

研究分担者 照井 正 日本大学医学部皮膚科学系皮膚科学分野 教授

**研究要旨** 昨年までの研究で、乾癬病変部位では角層バリア機能が低下し、それにセラミドとフィラグリンの低下しているを明らかにした。セラミドの産生に重要な酵素である serine palmitoyl transferase (SPT) と elongase of very long fatty acid (ELOVL) の誘導に活性型ビタミンD3が関係することから、活性型ビタミンD3がセラミドを介して角層バリア機能を制御している可能性が示唆されている。

本研究の目的は、昨年度に引き続き表皮細胞における Cyp27b1（活性化ビタミンD3合成酵素）と Cyp24a（活性化ビタミンD3の不活化酵素）の役割を解明することで、今年度の目標は表皮特異的に発現する上記ビタミンD3関連酵素のベクターを作製することである。

共同研究者

佐野 栄紀 高知大学医学部皮膚科  
玉井 克人 大阪大学大学院医学系研究科再生誘導医学  
葉山 惟大 日本大学皮膚科

A. 研究目的

活性型ビタミンD3は表皮細胞の増殖を抑制し、角化を正常化し、分化を正常化させる。この作用のため活性型ビタミンD3は乾癬の治療に広く用いられている。皮膚への紫外線療法はビタミンD3の活性化やその受容体の発現を促進するため、乾癬に有用である。ビタミンD3は循環血漿中では活性化酵素、不活化酵素により厳密に濃度が管理されている。表皮でも同様の酵素が働いており、循環血漿中よりやや高い濃度に維持されている。乾癬の病態を知るためにはこれらの酵素の機能が重要となるが、表皮細胞におけるビタミンD3、その代謝酵素についてはいまだ不明な点が多い。

これまでの本研究班における研究で乾癬病変部位の角層バリア機能が低下しているのが分かった。乾癬の病変部位では角質水分量の維持に必要なセラミドが優位に低下している。

Low dose (1/2 MED) の紫外線はセラミドの産生酵素である SPT の mRNA の発現や活性型ビタミンD3産生酵素である 1-hydroxylase の発現を増強させること、また長鎖セラミドの産生に必要な ELOVL は VDR の活性化により発現が促進される。このようにビタミンD3はセラミドの代謝にも深く関与していることが報告されている。

これまでの報告では、培養表皮角化細胞に活性型ビタミンD3を添加する影響をみる研究が主であった。本研究ではビタミンD3代謝酵素を表皮細胞特異的に強発現させることにより、その分化や脂質代謝への影響を解析することを目的とする。その第一歩として表皮特異的に発現するプロモーターを組み込んだビタミンD3代謝酵素発現プラスミドを作製する。

B. 研究方法

実験1：ロリクリンプロモーターの作製

今年度の研究で作製したプラスミドを皮膚特異的に発現させるためにロリクリンプロモーターを結合する。

ロリクリンプロモーター（6.5kb断片）は筑波大学皮膚科 川内 康弘先生より提供い

ただいた。常法に従いベクターを抽出して大腸菌を形質転換し、ベクター調製を行った。得られたベクターを鋳型に PCR により目的プロモーター遺伝子断片を増幅し、クローニングベクターに連結した。DNA シーケンス解析を行い、PCR エラーのないことを確認した。

#### 実験 2 : プロモーターの発現確認

抽出ベクターを HK293細胞に Lipofectamine LTX でトランスフェクションして 24時間培養した。細胞抽出液を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。

#### C. 研究結果

実験 1 : 提供された濾紙を水に浸潤させた溶液を用いて大腸菌を形質転換し、コロニーを得た。

得られたコロニーのうち、2クローンについて LB 培養してベクターを調製した。

調製した抽出ベクターを制限酵素 Hind III で処理してアガロースゲル電気泳動した結果、目的断片サイズ(4.8 kb(ベクター)、6.5 kb(インサート)) にバンドが検出された(図 1)。

抽出ベクタークローン No.1 を鋳型に PCR を行った(図 2)。KOD plus DNA polymerase では約 1.1 kb に顕著な増幅バンドが見られた。また、LA Taq DNA polymerase with GC buffer では顕著な増幅バンドは見られなかった。再度 Pyrobest DNA polymerase を用いて PCR を行った結果、KOD plus DNA polymerase と同様な位置に増幅バンドが見られた。

データベース情報(LOCUS MMU09189 6530bp DNA linear ROD 30-NOV-1995) による目的プロモーターサイズは 1.22 kb であるが、増幅された DNA 断片は約 1.1 kb で 100 bp 程度小さく、PCR 増幅エラーまたは鋳型である調製ベクターの配列がデータベースと異なっている可能性が示唆された。

実験 2 : 抽出ベクターがプロモーター活性を持っているかを確認するためにルシフェラー

ゼ活性測定を実施した。抽出ベクター 2クローンを HK293 細胞にトランスフェクションして24時間培養し、ルシフェラーゼ活性測定を行った結果、2クローンともコントロールより高い活性を示した(図 3)。

抽出ベクターに挿入されている 6.5 kb の断片にプロモーターの活性がある事が確認できた。

#### D. 考察

抽出したベクターにプロモーター活性があることを確認した。

#### E. 結論

今後、今年度作成したベクターを昨年度作製した Cyp27b1 と Cyp24a1 発現プラスミドに組み込む作業を行う。作製したプラスミドを培養表皮細胞にトランスフェクションし、増殖、分化、セラミドの発現などを調べる予定である。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究発表(平成23年度)

##### 論文発表

1. Goto H, Hara H, Takayanagi T, Terui T. Coexistence of papuloerythroderma of Ofuji and acrokeratosis paraneoplastica (Bazex syndrome) preceding the diagnosis of primary hepatocellular carcinoma. *Int J Dermatol* 50(11) : 1393-6, 2011.
2. Hiruma A, Ikeda S, Terui T, Ozawa M, Hashimoto T, Yasumoto S, Nakayama J, Kubota Y, Iijima M, Sueki H, Matsumoto Y, Kato M, Akasaka E, Ikoma N, Mabuchi T, Tamiya S, Matsuyama T, Ozawa A, Inoko H, Oka A. A novel splicing variant of CADM 2 as a protective transcript of psoriasis. *Biochem Biophys Res Commun* 412 : 626-32, 2011.

3. Miyazaki-Nakajima K, Hara H, Terui T. Subungual trichoadenoma showing differentiation toward follicular infundibulum. *J Dermatol* 38 : 1118-21, 2011.
  4. Washio H, Fukuda N, Matsuda H, Nagase H, Watanabe T, Matsumoto Y, Terui T. Transcriptional inhibition of hypertrophic scars by a gene silencer, pyrrole - imidazole polyamide, targeting the TGF -  $\beta$  1 promoter. *J Invest Dermatol* 131 : 1987-1995, 2011.
  5. Torii H, Nakagawa H ; Terui T, Japanese Infliximab Study Investigators. Long - term study of infliximab in Japanese patients with plaque psoriasis, psoriatic arthritis, pustular psoriasis and psoriatic erythroderma. *J Dermatol* 38(4) : 321-34, 2011.
  6. Furue M, Yamazaki S, Jimbow K, Tsuchida T, Amagai M, Tanaka T, Matsunaga K, Muto M, Morita E, Akiyama M, Soma Y, Terui T, Manabe M. Prevalence of dermatological disorders in Japan : a nationwide, cross - sectional, seasonal, multicenter, hospital-based study. *J Dermatol* 38(4) : 310-20, 2011.
  7. Hayama K, Suzuki Y, Inoue T, Ochiai T, Terui T, Ra C. Gold activates mast cells via calcium influx through multiple H2O2-sensitive pathways including L-type calcium channels. *Free Radic Biol Med* 50(10) : 1417-28, 2011.
  8. Watanabe T, Yachi K, Ohta T, Fukushima T, Yoshino A, Katayama Y, Shinojima Y, Terui T, Nagase H. Non-promoter hypermethylation of zygote arrest 1 (ZAR1) in human brain tumors. *Brain Tumor Pathol* 28(3) : 199-202, 2011.
  9. Ishige T, Kikuchi K, Miyazaki Y, Hara H, Yoshino A, Terui T, Katayama Y, Kusama K, Nemoto N. Differentiation and apoptosis in pilomatrixoma. *Am J Dermatopathol* 33(1) : 60-4, 2011.
  10. Suda-Takayanagi T, Hara H, Ohyama B, Hashimoto T, Terui T. A case of pemphigoid vegetans with autoantibodies against both BP180 and BP230 antigens. *J Am Acad Dermatol* 64(1) : 206-8, 2011.
  11. 藤澤大輔、篠島由一、照井 正. 乾癬治療におけるエキシマライト療法の有効性. *Visual Dermatology* 10(8) : 819-821, 2011.
  12. 大槻マミ太郎、照井 正、小澤 明、森田明理、佐野栄紀、高橋英俊、小宮根真弓、江藤隆史、鳥居秀嗣、朝比奈昭彦、根本 治、中川秀己、日本皮膚科学会生物学的製剤検討委員会. 日本皮膚科学会マニュアル 乾癬における生物学的製剤の使用指針および安全対策マニュアル (2011年版). *日皮会誌* 121(8) : 1561-1572, 2011.
  13. 野村みずほ、洲崎玲子、石崎純子、田中 勝、神戸克明、照井 正. 関節リウマチにアダリムマブ投与後より乾癬様皮疹を生じた1例. *臨床皮膚科* 65(7) : 509-513, 2011.
- 学会発表
1. Terui T. Pathophysiology of neutrophilic dermatoses - neutrophilic inflammation of the skin. Symposia : Neutrophilic Dermatoses. 22<sup>nd</sup> World Congress of Dermatology, May 24-29, 2011, Seoul.
  2. 照井 正. 尋常性乾癬の病態と治療. 最近のトピックス. 特別講演、日本皮膚科学会第205回熊本地方会、平成23年12月4日、熊本.
- H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得  
該当なし

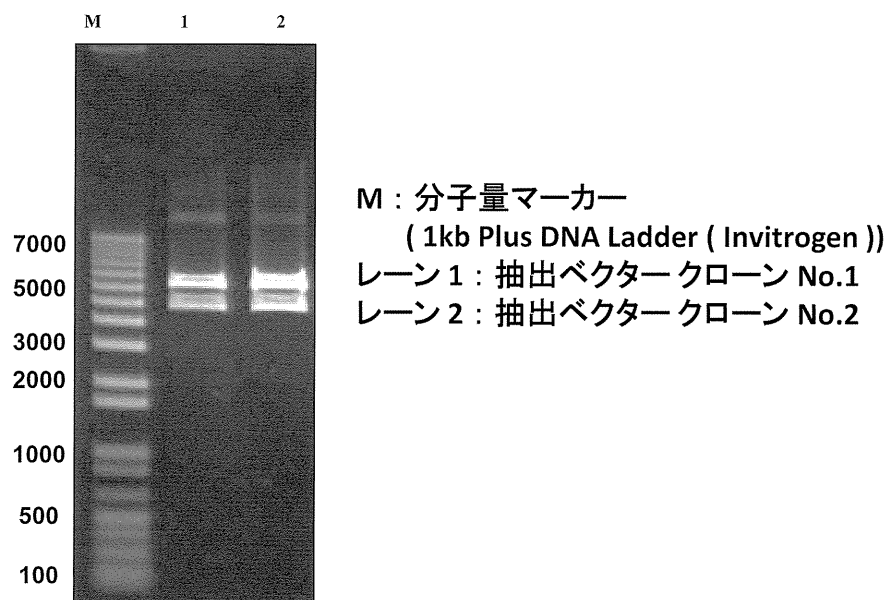


図 1 : ロリクリンプロモーターの抽出

抽出ベクターを大腸菌を形質転換し、コロニーを得た。調製した抽出ベクターを制限酵素で処理して電気泳動した結果、目的断片サイズ { 4.8 kb (ベクター)、6.5 kb (インサート)} にバンドが検出された。

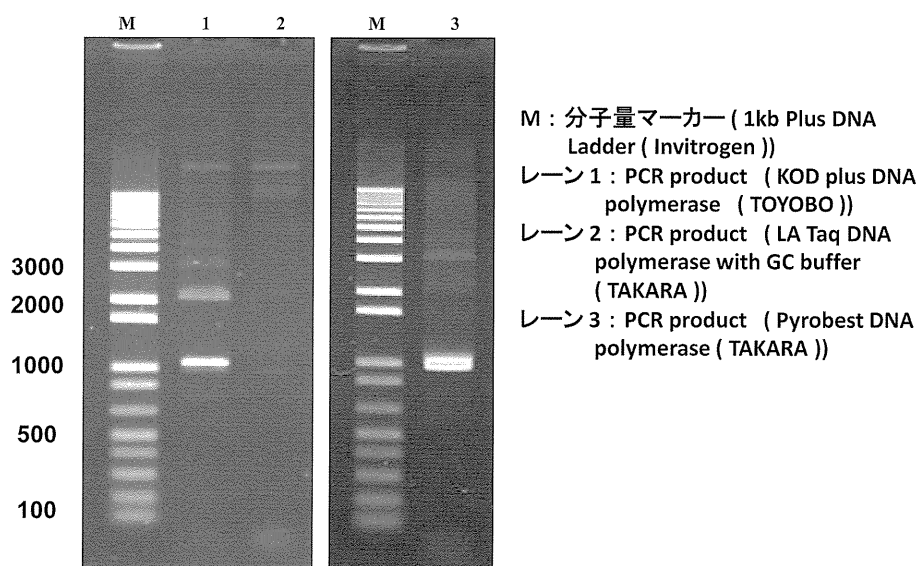


図 2 : PCR 増幅結果

抽出ベクタークローン No.1 を鋳型に PCR を行った。約1.1kbに顕著な増幅バンドが見られた ( レーン 1 )。レーン 2 ではバンドは見られなかったが、別の DNA polymerase を用いて PCR を行った結果、レーン 1 と同様の位置に増幅バンドが見られた ( レーン 3 )。

プロモーターのルシフェラーゼ活性測定

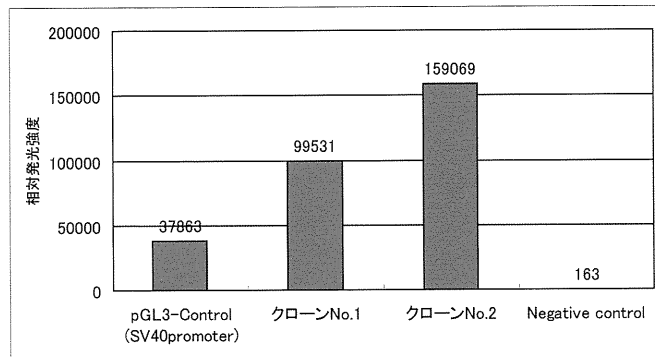


図3：プロモーターのルシフェラーゼ活性測定：

HK293細胞にトランスフェクションして24時間培養し、ルシフェラーゼ活性測定を行った。プロモーター活性があることは確認された。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

膿疱性乾癬の病態解明とその対策に向けて  
- S100A8/A9タンパク質の新規受容体の探索とその機能解析（1） -

研究分担者 許 南浩 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞生物学 教授  
研究協力者 阪口政清 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞生物学 准教授

**研究要旨** 炎症性重篤疾患である膿疱性乾癬は、皮膚に炎症性膿疱が現われ、全身症状として高熱や倦怠感を伴う特長を持つ。現在、本病状は、種々乾癬病態の中でも明確な治療手段がなく、その制御には特に困難を要する。従って、膿疱化への病的憎悪過程を辿る炎症機転の機構と本態を明らかにし、初期段階でその憎悪過程を断ち切ることは大きな意義を有する緊急な課題である。

我々は、その炎症機転で中心的な役割を担う分子として、S100A8/A9タンパク質とその受容体の一つであるRAGE（Receptor for Advanced Glycation Endproducts）に着目し、研究を進めてきた。その背景には、我々のこれまでの研究成果、(1) S100A8/A9は乾癬患部で過剰発現していること（Aochi et al, JAAD, 2011）、(2) S100A8/A9は分泌されて細胞増殖、炎症性サイトカインの産生誘導に働くこと（Nukui et al, J Cell Biochem, 2007）、(3) 炎症性サイトカイン誘導には、今まで謎であったRAGE膜直下作動機構が重大な役割を担っていること（Sakaguchi et al, 2011 論文投稿中）、等がある。

上記成果より、S100A8/A9-RAGE信号伝達は確かに乾癬病態の炎症憎悪過程に重要な役割を担っていると考えられた。しかし最近になって、RAGE信号伝達阻害の検討から、S100A8/A9が働く受容体はRAGEのみでないことが示唆された。そこで我々は、S100A8、S100A9 タンパク質のそれぞれに対する特異的受容体の新規同定を目指した。

その結果、S100A9の結合タンパク質の解析から新規受容体としてR9（仮称）とR8 $\alpha$ （仮称）を見出すことに成功した。R9の解析からさらにS100A8に対する候補受容体R8 $\beta$ （仮称）も同定することができた。これら受容体は、それぞれホモダイマーあるいはヘテロダイマーを形成するようである。また、それら受容体の下流信号伝達の解析から、アダプタータンパク質群（TRAF, TRADD, FADD等）を同定することにも成功した。これらはいずれも、炎症の発症および憎悪過程に深く関与していることが知られている。以上、RAGEに加えて、S100A8/A9によるR8/R9の活性化が、本炎症病態に重要な役割を担っている可能性が示唆された。このような分子機構の解明は、本性への有効な治療法を開発する上で大きな意義を有すると考える。

#### A. 研究目的

S100A8、S100A9 タンパク質のそれぞれに対する特異的受容体の新規同定を目指す。

#### B. 研究方法

細胞：本研究には、ヒト胎児腎細胞株（HEK293、ATCC社）を使用した。HEK293細胞は、10% FBSを含有するDMEM/F12培

地 (Gibco 社) にて培養した。

抗体：Western blot 解析には以下の抗体を使用した。mouse anti-HA tag (clone 6E2: Cell Signaling社), mouse anti-Myc tag (clone 9B11: Cell Signaling社)

哺乳動物発現コンストラクト：CMV イントロンプロモーター (CMVi) を導入した PDNR 1 r ベクター (プロモーターレスドナーベクター: Clontech 社) を構築し、CMVi の下流にヒト S100A4、A7、A8、A9、A11、B (C末に Myc-6His tag が付加)、ヒト RAGE、R8、R9 (C末に Myc-6His tag あるいは HA-6His tag が付加) をコードする cDNA を挿入した。ヒト TRADD、FADD、TRAF2、TRAF6 (C末に Myc tag が付加) も上記と同様に作製した。各挿入 cDNA の塩基配列は DNA シークエンサーにより正しいことを確認した。

プラスミドベクターの細胞内導入：高純度精製発現コンストラクトの細胞へのトランスフェクションは FuGENE-HD (Roche 社) トランスフェクション試薬を用いて行った。36時間後に細胞を回収した。

免疫沈降：HEK293細胞に強制発現させた tag 付加遺伝子産物の免疫沈降には、Monoclonal Anti-HA (clone HA-7) tag-agarose (Sigma-Aldrich 社)、monoclonal anti-Myc tag (clone 1G4) agaroses (MBL 社) を使用した。沈降してきた担体結合タンパク質は、いずれも酸性 buffer により溶出した。

## C. 研究結果

1. S100A8/A9受容体の探索：GST-S100A8、GST-S100A9、ヒト表皮角化細胞抽出液の3者を混合し、グルタチオンビーズによる pull-down により上記 GST 融合組み替えタンパク質を回収した。

組み替えタンパク質結合画分を調製し、質量分析計にて解析を行ったところ、

S100A8/A9結合性候補受容体タンパク質として R9 (仮称) を同定することに成功した (資生堂 日比野 利彦 先生による発見 図 1 A)。後の結合解析から R9 には S100A9 が特異的に結合することが判明した (図 1 B)。

我々は、R9 のアミノ酸配列をホモロジー検索することで R9 と一次構造が極めて類似した一回膜貫通型膜タンパク質 R8 (仮称) を発見することができた (data not shown)。R8 には、2つのアイソタイプ ( $\alpha$  と  $\beta$ ) が存在する。

2. R8、R9 と S100 タンパク質の結合：各 S100 タンパク質 (S100A4、A7、A8、A9、A11、B) を強制発現させた HEK293 細胞より培養上清 (分泌された S100 タンパク質を含有) をそれぞれ回収し、受容体群 (RAGE、R9、R8  $\alpha$ 、R8  $\beta$ ) を強制発現させた HEK293 細胞の培養系に添加した。細胞を回収し、強制発現させた受容体群の免疫沈降の後に、結合性 S100 タンパク質群を WB により解析した。結果、S100A8 に対する特異的受容体として R8  $\beta$  を同定することに成功した (図 2)。R8  $\alpha$  は、R9 と同様に S100A9 への強い結合性を示した。

3. R8 と R9 の 2 量体形成：次に我々は、RAGE、R8  $\alpha$ 、R8  $\beta$ 、R9 の 4 者間で、どのような 2 量体形成が起こるのかについて検討した。HEK293 細胞に R9 + (RAGE or R8  $\alpha$  or R8  $\beta$  or R9) のコンビネーションで各二種類の受容体ペアを強制発現させた。R8  $\alpha$  + (RAGE or R8  $\alpha$  or R8  $\beta$  or R9)、R8  $\beta$  + (RAGE or R8  $\alpha$  or R8  $\beta$  or R9) に関しても上記と同様に行った。

各受容体 (R8  $\alpha$ 、R8  $\beta$ 、R9) の免疫沈降の結果、R8  $\alpha$ 、R8  $\beta$ 、R9 はそれぞれホモダイマー形性能 (R8  $\alpha$  / R8  $\alpha$ 、R8  $\beta$  / R8  $\beta$ 、R9 / R9) があること、そして、R8  $\alpha$  / R8  $\beta$ 、R8  $\alpha$  / R9、R8  $\beta$  / R9 のヘテロダイマー形成も可能であることが判明した。



また、R8 $\alpha$ 、R8 $\beta$ 、R9はいずれも RAGE との結合性を示さなかった (図3)。

4. R8とR9のアダプタータンパク質：R8とR9の細胞質領域には、TRAF結合モチーフが存在する。細胞質領域にTRAFアダプタータンパク質を直接トラップする受容体としてはTNF受容体が良く知られている。TNF受容体は、TRAFの他にTRADDやFADDをリクルートし、炎症性サイトカイン誘導のみならず、アポトーシス誘導にも深く関わってくる。そこで、TNF受容体のアダプタータンパク質群 (TRAF2、TRAF6、TRADD、FADD) に関して、R8とR9の細胞質領域への結合性を検討した。

R8あるいはR9の細胞質領域と各アダプタータンパク質 (TRAF2、TRAF6、TRADD、FADD) をHEK293に同時トランスフェクションし、R8あるいはR9の細胞質領域を免疫沈降した。結合性アダプタータンパク質をWBにより解析したところ。R8にはTRAF2、TRADD、FADDの3種が、R9には、TRAF2のみが結合性を示すことが判明した (図4)。

#### D. 考察

本研究より今まで見いだされていなかったS100A8、S100A9に対する新規受容体 (S100A8-R8 $\beta$ 、S100A9-R8 $\alpha$ とR9) を同定することができた。これら3種の受容体は、それぞれホモダイマーあるいはヘテロダイマーを形成する。従って、ダイマーのパターンによって結合するリガンド種と受容体細胞質領域から発するシグナルの違いが生まれてくるものと推察する (図5)。細胞種による上記受容体群の発現パターンの違いが、上皮細胞、血球系細胞、間質系細胞におけるS100A8/A9によるレスポンスの違いを生み出しているのかもしれない。

#### E. 結論

本研究より、S100A9の新規受容体としてR8 $\alpha$ とR9を見出すことに成功した。さらにS100A8に対する受容体R8 $\beta$ も同定することができた。これら受容体は、それぞれホモダイマーあるいはヘテロダイマーを形成する。また、これら受容体の下流信号伝達の解析から、アダプタータンパク質群 (TRAF、TRADD、FADD等) を同定することにも成功した。これらはいずれも、炎症の発症および憎悪過程に深く関与していることが知られている。従って、RAGEに加えて、S100A8/A9によるR8/R9の活性化も、本炎症病態に重要な役割を担っている可能性が示唆された。このような分子機構の解明は、本性への有効な治療法を開発する上で大きな意義を有すると考える。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究発表 (平成23年度)

論文発表

1. Sakaguchi M, Murata M, Yamamoto K, Ono T, Sakaguchi Y, Motoyama A, Hibino T, Kataoka K, Huh NH. TIRAP, an Adaptor Protein for TLR2/4, Transduces a signal from RAGE Phosphorylated upon Ligand Binding. PLoS ONE, 6 : e23132, 2011.
2. Sakaguchi M, Huh NH. S100A11, a dual growth regulator of epidermal keratinocytes. Amino Acids. (Review) 41 : 797-807, 2011.
3. Sakaguchi M, Huh NH, Namba M. A Novel Tumor Suppressor, REIC/Dkk-3 Gene Identified by Our In Vitro Transformation Model of Normal Human Fibroblasts Works as a Potent Therapeutic Anti-tumor Agent. Adv Exp Med Biol. (Review) 720 : 209-215, 2011.
4. Ochiai K, Watanabe M, Ueki H, Huang P,

- Fujii Y, Nasu Y, Noguchi H, Hirata T, Sakaguchi M, Huh NH, Kashiwakura Y, Kaku H, Kumon H. Tumor suppressor REIC/Dkk-3 interacts with the dynein light chain, Tctex-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 412 : 391-5, 2011.
5. Kubo T, Toyooka S, Tsukuda K, Sakaguchi M, Fukazawa T, Soh J, Asano H, Ueno T, Muraoka T, Yamamoto H, Nasu Y, Kishimoto T, Pass HI, Matsui H, Huh NH, Miyoshi S. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c plays an important role in the pathogenesis of malignant pleural mesothelioma. *Clin Cancer Res.* 17 : 4965-4974, 2011.
6. Aochi S, Tsuji K, Sakaguchi M, Huh NH, Tsuda T, Yamanishi K, Komine M, Iwatsuki K. Markedly elevated serum levels of calcium-binding S100A8/A9 proteins in psoriatic arthritis are due to activated monocytes/macrophages. *J Am Acad Dermatol.* 64 : 879-887, 2011.
7. Than SS, Kataoka K, Sakaguchi M, Murata H, Abarzua F, Taketa C, Du G, Yashiro M, Yanagihara K, Nasu Y, Kumon H, Huh NH. Intraperitoneal administration of an adenovirus vector carrying REIC/Dkk-3 suppresses peritoneal dissemination of scirrhous gastric carcinoma. *Oncol Rep.* 25 : 989-995, 2011.
8. Murata H, Sakaguchi M, Jin Y, Sakaguchi Y, Futami JI, Yamada H, Kataoka K, Huh NH. A new cytosolic pathway from a Parkinson's disease-associated kinase, BRPK/PINK1 : activation of AKT via MTORC2. *J Biol Chem.* 286 : 7182-7189, 2011.
9. Du G, Kataoka K, Sakaguchi M, Abarzua F, Than SS, Sonogawa H, Makino T, Shimizu T, Huh NH. Expression of REIC/Dkk-3 in normal and hyperproliferative epidermis. *Exp Dermatol.* 20 : 273-277, 2011.
- 学会発表
1. Masakiyo Sakaguchi, Hitoshi Murata, Ken-ichi Yamamoto, Yoshihiko Sakaguchi, Akira Motoyama, Toshihiko Hibino, Ken Kataoka, and Nam-ho Huh ; TI-RAP is a critical transducer of RAGE-mediated inflammatory signaling、名古屋、第70回日本癌学会学術総会、2011年10月3-5日(4日)。(English Workshop)
- H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)  
該当なし

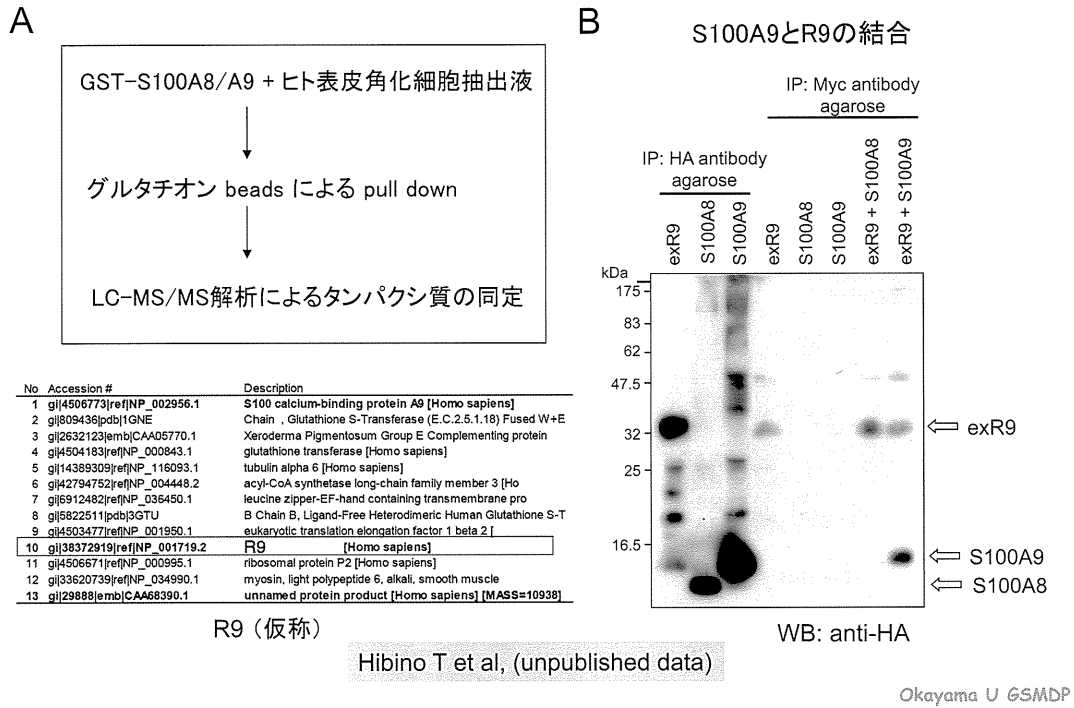


図1 S100A8/A9受容体の探索

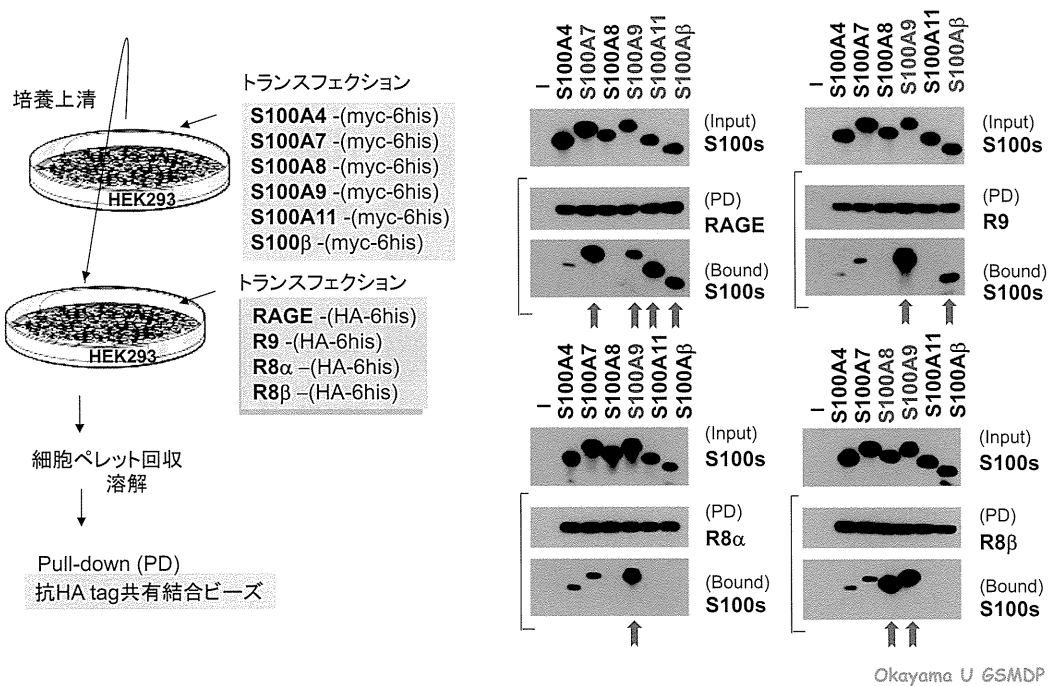


図2 R8, R9とS100タンパク質の結合

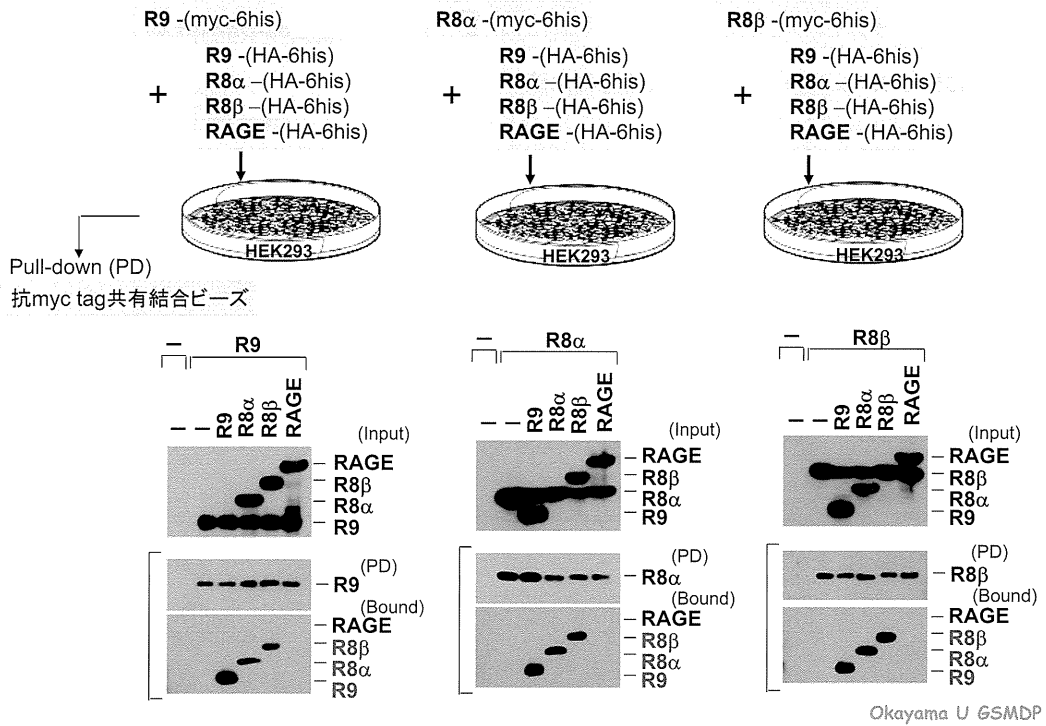


図3 R8, R9の二量体形成

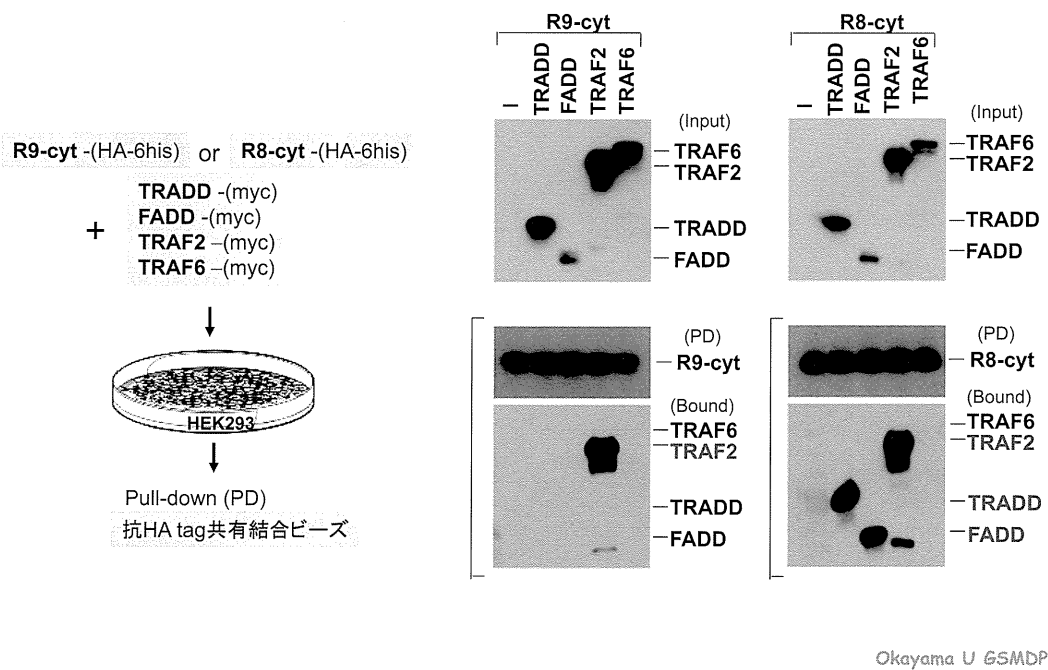
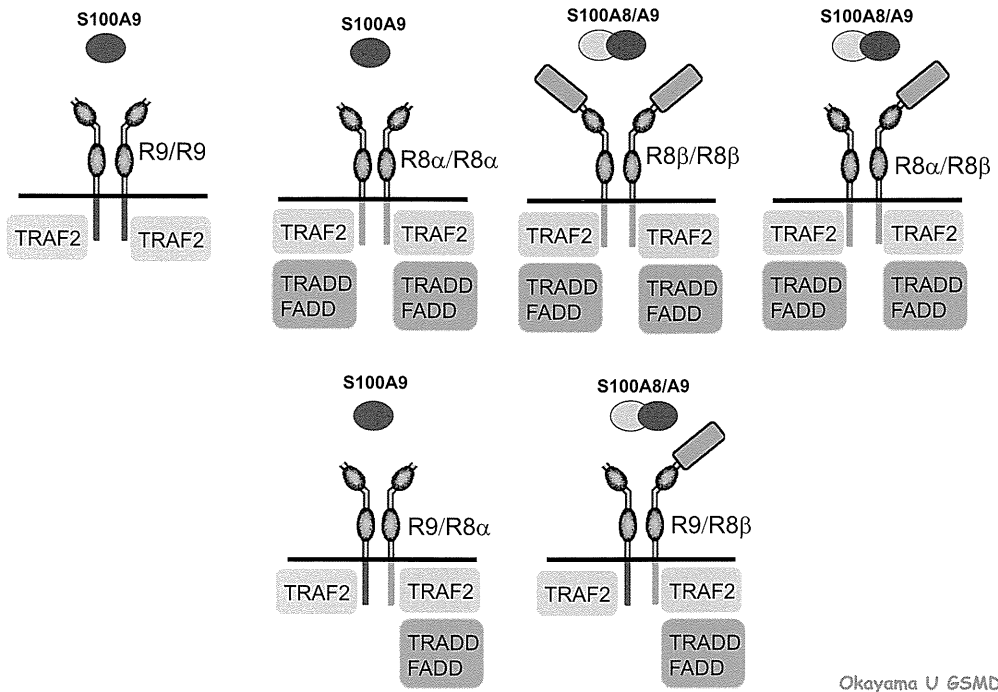


図4 R8, R9のアダプタータンパク質



Okayama U GSMDP

图5 S100A8/A9受容体

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

膿疱性乾癬の病態解明とその対策に向けて  
- S100A8/A9タンパク質の新規受容体の探索とその機能解析（2） -

研究分担者 許 南浩 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞生物学 教授  
研究協力者 阪口政清 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞生物学 准教授

**研究要旨** 我々は、膿疱性乾癬患者血清中に過剰量存在するS100A8、S100A9タンパク質に着目し、これらの受容体およびその機能を解明することが、本性への有効な治療法を開発する上で大きな意義を有すると考え研究を進めている。一つは既知の受容体RAGEの未解明な部分を、もう一つは新規受容体の同定とその機能に焦点を当てている。

前回我々は、受容体探索の研究より、S100A8、A9タンパク質に対する新規受容体 R8（仮称）、R9（仮称）の同定に成功し、その成果について報告した。その下流信号伝達の解析から、RAGEに加えて、S100A8、A9によるR8、R9の活性化も、本炎症病態に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

一方、RAGE研究では、細胞種に応じた特異的シグナル増幅機構が未解明のまま残されている。我々の今回の研究より、本特異性が共役受容体（細胞種で発現が異なる）の存在に影響されると考えられるデータが得られつつあるので報告する。まず、RAGE、R8、R9のお互いの相互作用の関係について検討した。R8とR9はそれぞれ独自にホモダイマーを、あるいはお互いにヘテロダイマーを形成するが、RAGEはそのどちらとも結合しないことが判明した（前回での検討結果）。このことからR8、R9の共役受容体としての可能性が否定されたので、今回、新たにRAGE共役性受容体があるかどうかを探索した。想定される共役受容体群（1回膜貫通型6種、7回膜貫通型24種）をスクリーニングした結果、これらの中から3種の候補受容体を同定することに成功した。一つは、増殖、生存（アポトーシス抑制）シグナル増幅を、残りの2種は、走化性シグナル増幅に大きく影響する可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

細胞種に応じたRAGE下流信号伝達経路の特異的増幅機構を明らかにするため、RAGE共役受容体の新規同定を目指す。

抗体：Western blot 解析には以下の抗体を使用した。mouse anti-HA tag (clone 6E2 : Cell Signaling社), mouse anti-Myc tag(clone 9B11 : Cell Signaling社), mouse anti-Flag tag (clone M2 : Sigma-Aldrich社)

#### B. 研究方法

細胞：本研究には、ヒト胎児腎細胞株（HEK293、ATCC社）を使用した。HEK293細胞は、10% FBSを含有するDMEM/F12培地（Gibco社）にて培養した。

哺乳動物発現コンストラクト：CMVイントロンプロモーター（CMVi）を導入したPDNR1rベクター（プロモーターレスドナーベクター；Clontech社）を構築し、CMViの下流にヒトS100A4, A7, A8, A9,

A11, B (C末にMyc-6His tag が付加)、ヒト RAGE, R8, R9 (C末にMyc-6His tag あるいは HA-6His tag が付加)、ヒト TLR4, TNFR1, TNFR2, DAP10,  $\gamma$  c, gp130, chemokine receptors (C末にFlag-6His tag が付加)、ヒト NKG2D (C末にHA-6His tag あるいは Flag-6His tag が付加)、ヒト PI3K, GRB2, GRB7, NCK1, NCK2, CRK, SOCS, SHC, SHP2 (C末にMyc-6His tag が付加) をコードする cDNA を挿入した。ヒト RAGE fragments (8種: C末にMyc-HA-Flag-6His tag が付加) も上記と同様に作製した。各挿入 cDNA の塩基配列は DNA シークエンサーにより正しいことを確認した。

プラスミドベクターの細胞内導入: 高純度精製発現コンストラクトの細胞へのトランスフェクションは FuGENE-HD (Roche社) トランスフェクション試薬を用いて行った。36時間後に細胞を回収した。

免疫沈降: HEK293細胞に強制発現させた tag 付加遺伝子産物の免疫沈降には、Monoclonal Anti-HA (clone HA-7) tag-agarose (Sigma-Aldrich社)、monoclonal anti-Myc tag (clone 1G4) agaroses (MBL社) を使用した。沈降してきた担体結合タンパク質は、いずれも酸性 buffer により溶出した。

## C. 研究結果

1. RAGE 共役受容体のスクリーニング: RAGE と共役する可能性のある受容体群 (I型膜貫通型受容体群6種、7回膜貫通型ケモカイン受容体 (ChemR) 群24種) をクローニングし、RAGE との結合能 (カップリング) に関して解析を行った。

各受容体群と RAGE を HEK293 に同時トランスフェクションした後、細胞を回収し、RAGE に関して免疫沈降を行った。結合画分における WB 解析の結果、RAGE 結合能を有する候補受容体として、DAP10, ChemR4 (仮称), ChemR12 (仮称) を見いだすことに成

功した (図1)。

2. RAGE と DAP10 の結合解析: DAP10 は、NK 細胞の表面マーカーである NKG2D の共役受容体であることが知られている。最近、この NKG2D が NK 細胞のみならず上皮系を含む広範囲細胞種での陽性発現が確認されている。そこで、RAGE が NKG2D を介して間接的に DAP10 と共役する可能性について検討した。

強制発現系による免疫沈降実験の結果、NKG2D は、確かに DAP10 と共役することを確認したが (図2A)、RAGE とは共役しないことが明らかとなった (図2B)。このことより、RAGE と DAP10 との結合には、NKG2D の関与が無いことが判明した。

3. RAGE の DAP10 結合領域の解析: それでは、RAGE は、どの領域で DAP10 と結合するのであろうか。我々は次に、8種の RAGE フラグメント発現コンストラクト (図3) を作成し、DAP10 との結合について免疫沈降による解析を行った。

その結果、RAGE は、膜貫通領域が無くなると DAP10 との結合能が消失することが明らかとなった。これは、RAGE が膜貫通領域で DAP10 と共役していることを意味する。

5. RAGE/DAP10 複合体のアダプタータンパク質: 我々は次に、どのようなアダプタータンパク質が RAGE/DAP10 複合体の細胞質領域にリクルートされてくるのかについて検討した (RAGE のみでは、TIRAP/MyD88 アダプタータンパク質が特異的にリクルートされる)。DAP10 は、PI3K や GRB2 のような SH2 ドメイン保有性アダプタータンパク質をリクルートし、細胞の増殖促進やサバイバル能増強の生理機能を有する。そこで、細胞増殖、サバイバルに深く関わる一連の SH2 ドメイン保有性アダプタータンパク質群 (上記2つのアダプタータンパク質 PI3K, GRB2 をポジティブコントロールとして含む) に関して、

RAGE/DAP10への結合性を検討した。

強制発現系による免疫沈降実験の結果、RAGE/DAP10複合体には、PI3KとGRB2、そして、新たにras活性につながるGRB7がリクルートされてくることが明らかとなった(図4)。これら3種のアダプタータンパク質は、RAGEではなくDAP10細胞質領域側にリクルートされることが確認できている(data not shown)。

#### D. 考察

我々のRAGE研究では、細胞種に応じた特異的シグナル増幅機構が未解明のまま残されていた。しかし、今回の研究より、本特異性が共役受容体の発現状態に影響されると考えられるデータが得られたのである(細胞種で発現が異なると考えている)。想定される共役受容体群(1回膜貫通型6種、7回膜貫通型24種)をスクリーニングした結果、これらの中から3種の候補受容体を同定することに成功した。一つ(DAP10)は、増殖、サバイバル(アポトーシス抑制)シグナル増幅に大きく影響する可能性が示唆された(図5A)。また、残りの2種(ChemR4とChemR12)に関しては、走化性シグナル増幅の機能を有するものと考えている(図5B)。

#### E. 結論

今回の研究より、我々は、RAGE共役性新規受容体群を同定するに至った。この発見は、難解なRAGE作動原理の統合的理解につながり、乾癬発症、特に膿疱化する乾癬に関わる炎症機転の機構解明に大きく貢献することが期待される。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究発表(平成23年度)

論文発表

1. Sakaguchi M, Murata M, Yamamoto K, Ono T, Sakaguchi Y, Motoyama A, Hib-

ino T, Kataoka K, Huh NH. TIRAP, an Adaptor Protein for TLR2/4, Transduces a signal from RAGE Phosphorylated upon Ligand Binding. PLoS ONE, 6: e23132, 2011.

2. Sakaguchi M, Huh NH. S100A11, a dual growth regulator of epidermal keratinocytes. Amino Acids. (Review) 41: 797-807, 2011.
3. Sakaguchi M, Huh NH, Namba M. A Novel Tumor Suppressor, REIC/Dkk-3 Gene Identified by Our In Vitro Transformation Model of Normal Human Fibroblasts Works as a Potent Therapeutic Anti-tumor Agent. Adv Exp Med Biol. (Review) 720: 209-215, 2011.
4. Ochiai K, Watanabe M, Ueki H, Huang P, Fujii Y, Nasu Y, Noguchi H, Hirata T, Sakaguchi M, Huh NH, Kashiwakura Y, Kaku H, Kumon H. Tumor suppressor REIC/Dkk-3 interacts with the dynein light chain, Tctex-1. Biochem Biophys Res Commun. 412: 391-5, 2011.
5. Kubo T, Toyooka S, Tsukuda K, Sakaguchi M, Fukazawa T, Soh J, Asano H, Ueno T, Muraoka T, Yamamoto H, Nasu Y, Kishimoto T, Pass HI, Matsui H, Huh NH, Miyoshi S. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c plays an important role in the pathogenesis of malignant pleural mesothelioma. Clin Cancer Res. 17: 4965-4974, 2011.
6. Aochi S, Tsuji K, Sakaguchi M, Huh NH, Tsuda T, Yamanishi K, Komine M, Iwatsuki K. Markedly elevated serum levels of calcium-binding S100A8/A9 proteins in psoriatic arthritis are due to activated monocytes/macrophages. J Am Acad Dermatol. 64: 879-887, 2011.
7. Than SS, Kataoka K, Sakaguchi M, Murata H, Abarzua F, Taketa C, Du G, Yashiro M, Yanagihara K, Nasu Y, Ku-



mon H, Huh NH. Intraperitoneal administration of an adenovirus vector carrying REIC/Dkk-3 suppresses peritoneal dissemination of scirrhous gastric carcinoma. *Oncol Rep.* 25 : 989-995, 2011.

8. Murata H, Sakaguchi M, Jin Y, Sakaguchi Y, Futami JI, Yamada H, Kataoka K, Huh NH. A new cytosolic pathway from a Parkinson's disease-associated kinase, BRPK/PINK 1 : activation of AKT via MTORC2. *J Biol Chem.* 286 : 7182-7189, 2011.
9. Du G, Kataoka K, Sakaguchi M, Abarzua F, Than SS, Sonogawa H, Makino T, Shimizu T, Huh NH. Expression of REIC/Dkk-3 in normal and hyperproliferative epidermis. *Exp Dermatol.* 20: 273-277, 2011.

#### 学会発表

1. Sakaguchi M, Murata H, Yamamoto K, Sakaguchi Y, Motoyama A, Hibino T, Kataoka K, Huh NH. TIRAP is a critical transducer of RAGE-mediated inflammatory signaling、名古屋、第70回日本癌学会学術総会、2011年10月3-5日（4日）。（English Workshop）

#### H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし

図1 RAGE共役受容体群

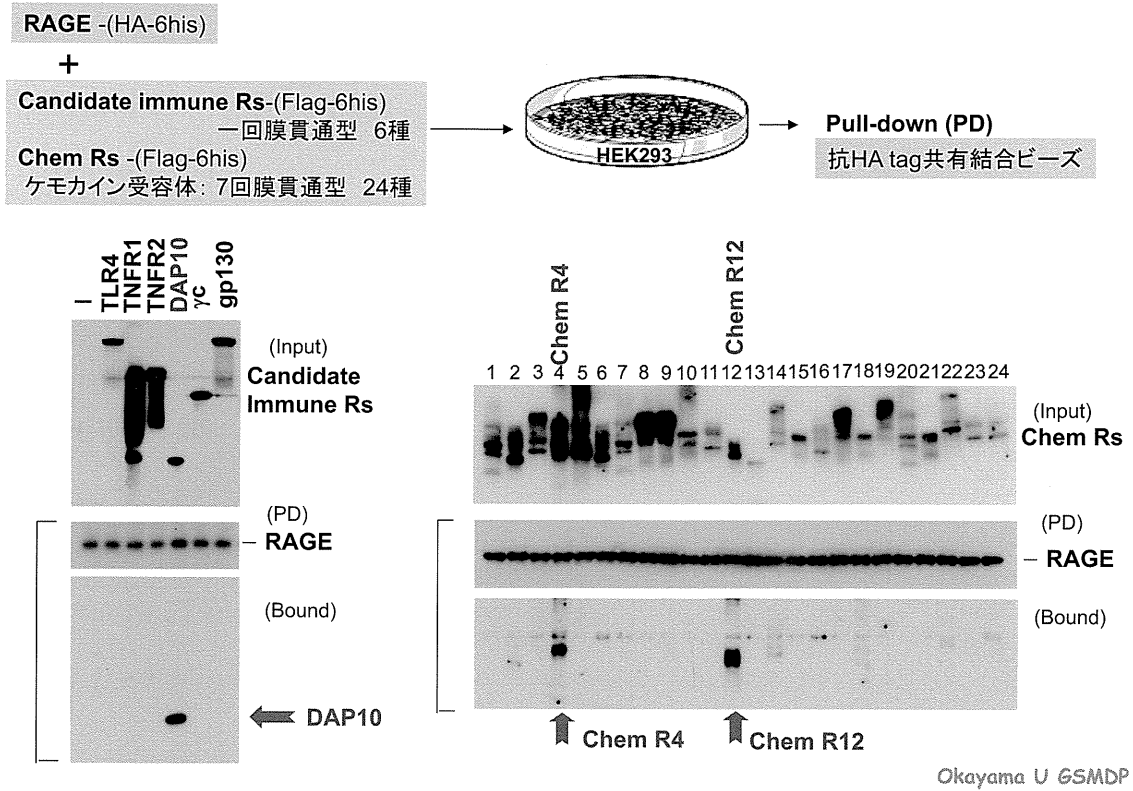


図2 RAGEとDAP10の結合

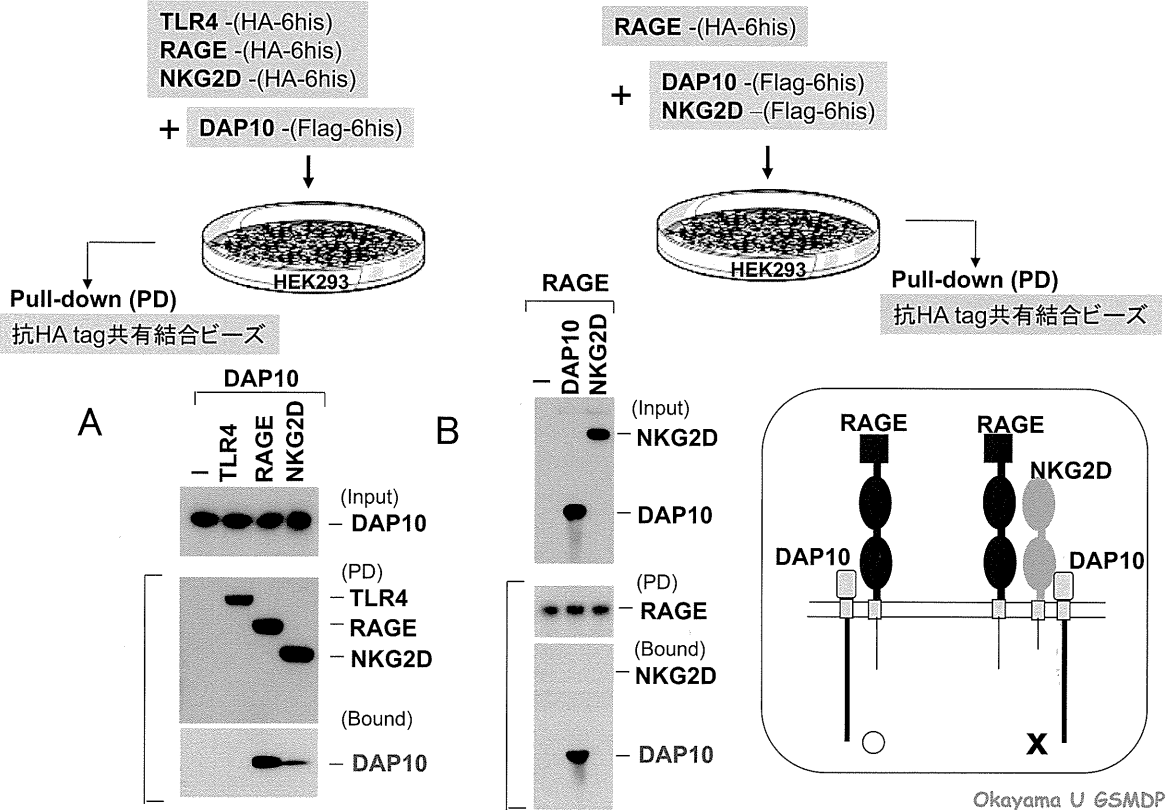


図3 RAGE の DAP10 結合領域

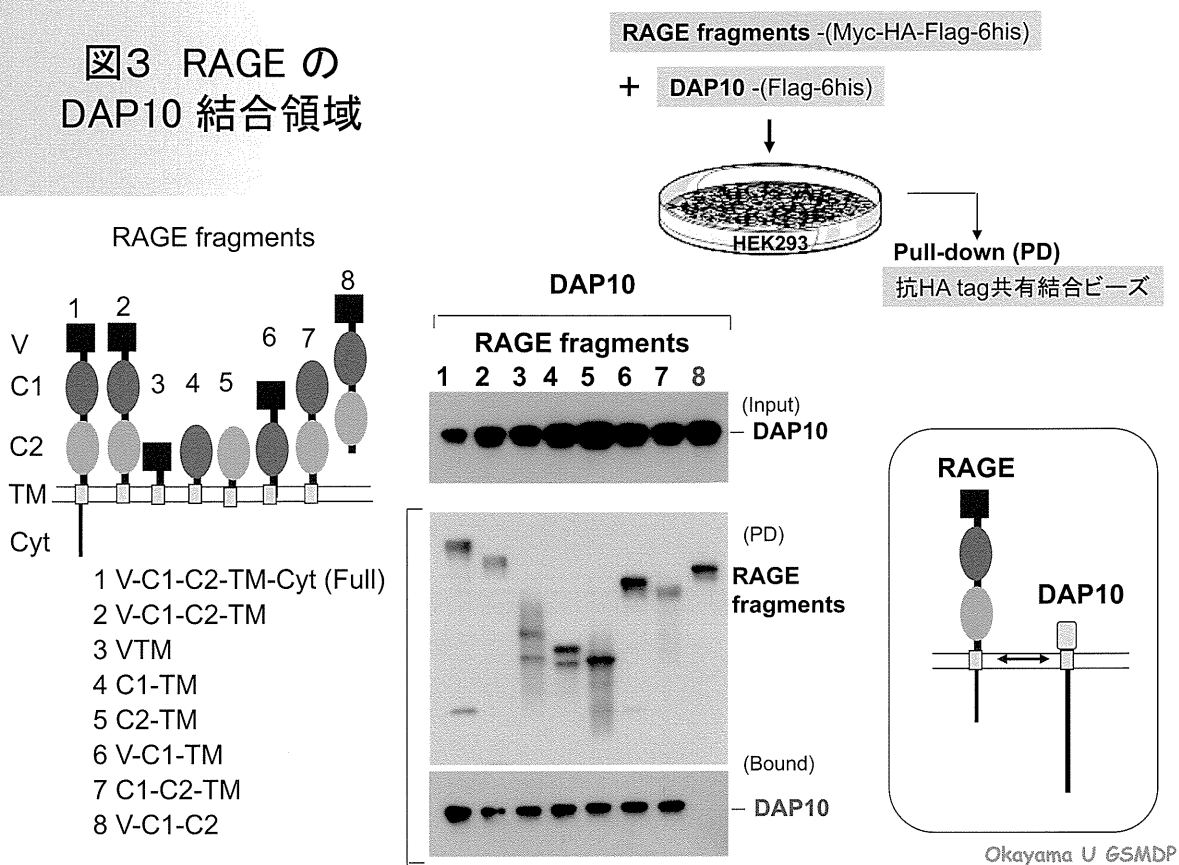


図4 DAP10 のアダプタータンパク質 (SH2ドメイン保有)

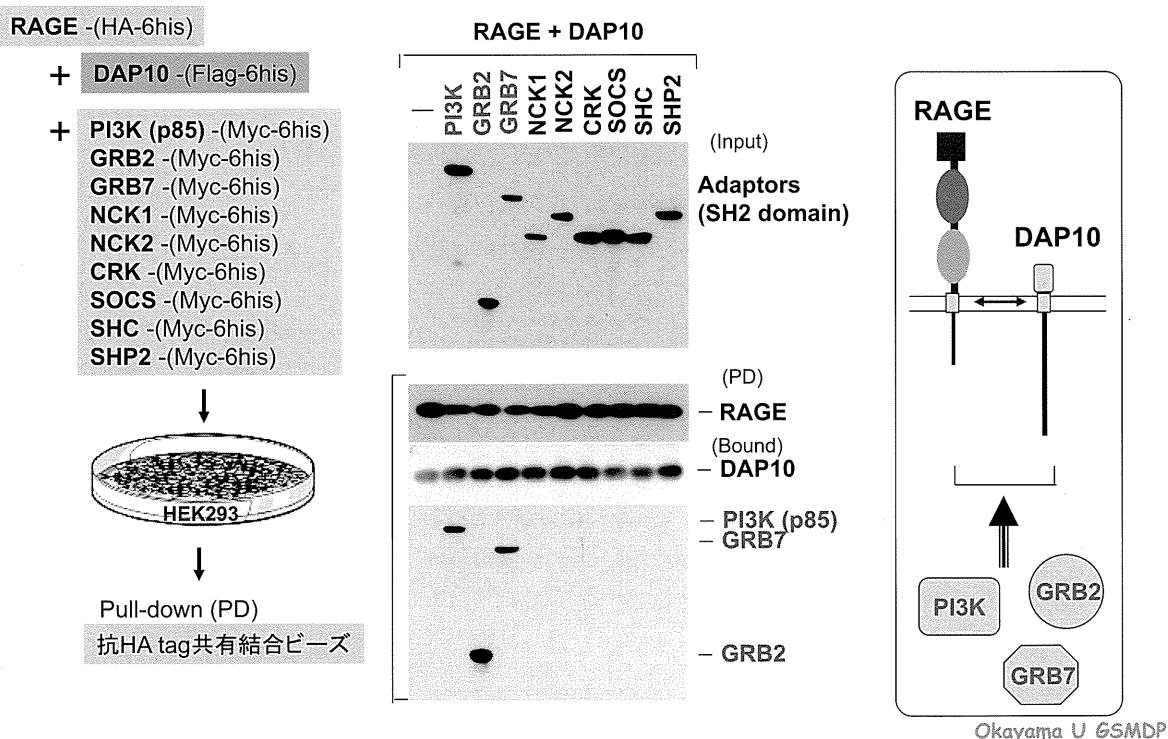
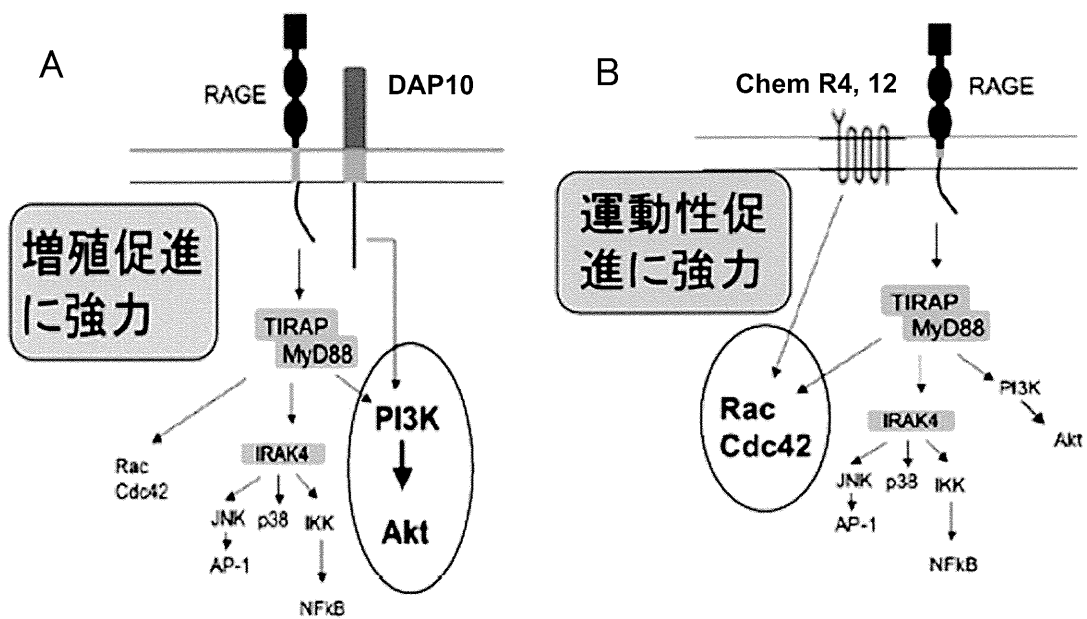


図5 RAGE下流シグナル伝達選択的増幅機構(仮説)



Okayama U GSMDP