

201423023B

厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服緊急対策研究事業

炎症により誘導されるビタミンA非含有細胞の  
マトリクス産生とその機序  
—肝硬変の進行遮断と肝機能の再生を目指した  
線維化防御標的の発見—

平成24年度～26年度 総合研究報告書

研究代表者 朝霧 成挙

平成27（2015）年 5月

## 目 次

### I. 総合研究報告

炎症により誘導されるビタミンA非含有細胞のマトリクス産生とその機序  
—肝硬変の進行遮断と肝機能の再生を目指した線維化防御標的の発見—  
朝霧 成挙 —————1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 —————10

III. 研究成果の刊行物・別刷 —————12

# I. 総合研究報告

炎症により誘導されるビタミン A 非含有細胞のマトリクス産生とその機序  
—肝硬変の進行遮断と肝機能の再生を目指した線維化防御標的の発見—

研究代表者 朝霧 成挙 京都大学 医学系研究科 特定准教授

**研究要旨:**

肝線維症は、肝臓におけるコラーゲンを主とした細胞外基質(ECM)の蓄積であり、この病態反応は、ほぼ全ての原因による慢性肝炎に共通である。慢性肝炎の終末像は肝硬変であり、肝硬変の治療法は肝移植を除けば対症療法のみである。肝線維化の進行を阻止する治療薬を開発することは、医学的にも医療経済上も重要であるが、現在、臨床的に有効な薬剤は存在しない。本研究は、線維化モデル動物を用いた基礎的な解析を基に、肝炎症において誘導されるビタミン A 非含有細胞に着目し、肝線維症の新たな治療標的としての可能性を見い出すことを目的とするものである。

**研究分担者**

上本 伸二: 京都大学医学研究科 教授  
池田 一雄: 大阪市立大学医学研究科 教授  
祝迫 恵子: 京都大学医学研究科 特定講師  
武田 憲彦: 東京大学医学研究科 助教

**A. 研究目的**

慢性肝炎では組織の傷害と修復反応が繰り返されている。持続的な修復反応の一つに、筋線維芽細胞による細胞外マトリクス (extra cellular matrix: ECM) の産生・沈着があるが、肝内での過剰な ECM 沈着には、肝実質細胞の絶対数の減少が伴い、肝機能が低下する。さらに近年、詳細は不明なもの、ECM 沈着が細胞癌化を促進する可能性も示されている。これらに加え、肝線維化・肝硬変が進行して重篤な肝機能不全に陥ると、現在のところ肝臓機能を人工的に代替する医療は完成されていないため、肝移植しか治療の手立てがない。このため、肝硬変の進行を食い止めることは、患者の QOL を考える上でも、医療経済学的にも大きな意義をもつ。

当該研究グループの朝霧、上本、祝迫、池田、武田は、カリフォルニア大学

David Brenner らが作成した Collagen  $\alpha 1(I)$  promoter-GFP トランスジェニックマウスを用いた実験から、ビタミン A を含有しない細胞系列 (非肝星細胞系列) も、肝硬変進行時にコラーゲンを産生するという予備知見を得て本研究を企画し解析をすすめた。

肝臓の筋線維芽細胞は、慢性肝障害に応じて活性化され、コラーゲンを主体とした ECM を盛んに分泌して組織の線維性癒痕変性を導く。一方、肝星細胞は、肝傷害時に増殖してコラーゲンを産生することから、慢性肝炎における肝線維化の責任細胞と目されていた。実際、肝硬変治療薬の多くは、肝星細胞を標的として研究が進められてきた経緯がある。しかし、広範の研究にもかかわらず、肝硬変の進行途上で ECM を分泌する細胞(筋線維芽細胞)が、肝星細胞系列だけで構成されているのか否かについては決着がついていなかった。活性化肝星細胞以外にも、ECM の過剰沈着に関与する細胞があり、肝星細胞とは異なる mode of action で炎症に反応して ECM を産生したり、あるいは肝内で特異的な局在を示すとしたら、肝硬変の進行を遮断するための治療ターゲットとなる可能性があると考えた。我々は、この星細胞とは異なる細胞系列に着目し、解析をおこなった。

## B. 研究方法

本研究では、下記目的を設定し、研究を推進した。

(I) 動物モデルを用いて、肝障害、炎症時にコラーゲンを産生し、肝線維化に関与する細胞系列（およびその起源）を網羅的に同定。

(II) 同定した細胞(群)が、どのようなメカニズムで肝障害、炎症に呼応して ECM を産生するのか(またその機序は肝星細胞とは異なるのか)を検討。

(III) コラーゲン産生細胞の構成を線維化の病因別、病期別に定量的に解析。

(IV) 星細胞、星細胞以外の細胞がコラーゲン産生細胞に形質転換し、コラーゲンを産生するメカニズムについての解析。

(V) ヒト細胞(生検検体、病理検体)において、ECM 産生細胞をモニターできる系を確立し、ヒトのウイルス性肝炎、あるいは、他の種々肝炎病態において、肝星細胞以外の細胞が、ECM 産生に関与するの否かを検討。

以上の検討により、肝硬変を阻止するための新たな治療標的の候補を上げることを本研究の課題とした。

遺伝子組換え動物の扱いは、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」と、その関係法令に従い、適切な拡散防止措置を講じて行うこととした。具体的には、京都大学組換え DNA 実験安全管理委員会の承認を経て、「京都大学組換え DNA 実験安全管理規程」と「京都大学組換え DNA 実験安全管理規程施行細則」に沿って実施した。動物実験は、京都大学医学系研究科・動物実験委員会の承認を経て、「京都大学における動物実験の実施に関する規程」と「京都大学大学院医学研究科・医学部における動物実験の実施に関する規程」に沿って行うものとした。患者試料の使用は、厚生労働省と文部科学省の臨床研究に関する倫理指針と

疫学研究に関する倫理指針に沿い、京都大学の「臨床研究倫理指針」、「ヒトを対象とした医学研究の倫理指針」に従いインフォームド・コンセントによる同意書を得た上、京都大学医の倫理委員会の審査・承認をもって執り行い、いずれもステップにおいても個人情報の取り扱いに特段の配慮を講じ、法令に従って実施した。

## C. 研究結果

### 肝線維化モデルマウスの評価

Collagen  $\alpha 1(I)$  promoter-GFP トランスジェニックマウス[説明:蛍光タンパク質 GFP をコードする遺伝子と、これに連結した Collagen  $\alpha 1(I)$  遺伝子座の制御シーケンスが遺伝子導入されたマウスであり、この系統では細胞内で Collagen  $\alpha 1(I)$  promoter が活性化した場合に GFP を発現する仕組みが構築されている]を用いて、肝線維化モデルを作成した。四塩化炭素による肝線維化は、コーンオイルにより4倍希釈した四塩化炭素  $2 \mu l/body\ weight\ g$  を3日毎に計12回経口投与、Bile duct ligation モデルは、全身麻酔下に開腹し、総胆管を結紮切離し3週間飼育した。

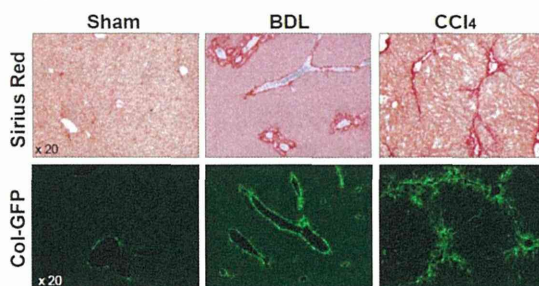


図1 Collagen  $\alpha 1(I)$  promoter-GFP トランスジェニックマウスを用いた肝線維化モデルの病理学的所見

線維肝について病理組織学的、生化学的評価を行った。蛍光顕微鏡下で凍結切片を観察し、GFP の発現によってコラーゲン産生細胞を同定、確認した。四塩化炭素投与モデルの肝線維化は Bridging fibrosis を呈し、ヒドロキシプロリン  $338.9 \pm 21.2\ ng/liver\ mg$  と野生型の四塩化炭素投与モデルと同等の線維化を示した。Bile duct

ligation モデルも portal area 優位な著しい線維化を呈し、ヒドロキシプロリン 547.4 ± 120.6 ng/liver mg と、こちらも野生型の同モデルと同等の線維化を示した。

GFP の発現を観察すると四塩化炭素投与モデルでは、Bridging fibrosis の部位を中心に portal area にも発現がみられたが、Bile duct ligation モデルでは portal area に集中していた。肝組織のシリウスレッド染色により線維の領域と GFP の発現領域が重なることが確認された(図1)。

### 肝炎モデルマウスからコラーゲン産生細胞を分取する方法の確立

Collagen  $\alpha 1(I)$  promoter-GFP トランスジェニックマウスを用いて、四塩化炭素投与、bile duct ligation を行い、肝炎・肝線維化モデルを作成した。Collagenase type IV をマウスの門脈から灌流して肝組織を消化し、肝非実質細胞(細胞外マトリクス産生細胞を含む)を採取した。FACS にて、ビタミン A 含有 × GFP 発現を指標に解析を行ったところ、四塩化炭素投与モデルでは、GFP を発現する細胞(コラーゲンを主とした細胞外マトリクスを産生する細胞)の 80% 以上がビタミン A を含有しているのに対し、bile duct ligation モデルの GFP 陽性細胞のビタミン A 含有細胞は 56% であることが判明した(図 2)。

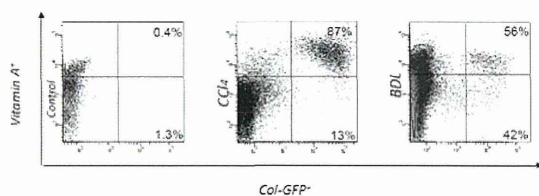


図2 FACSによる細胞外マトリクス産生細胞の解析: コントロールでは GFP 陽性細胞はほとんど存在しないが、四塩化炭素投与モデルではビタミン A を含有した GFP 陽性細胞が出現する。一方、胆管結紮モデルでは、ビタミン A 非含有細胞が GFP 陽性細胞の約半数を占めている。

ビタミン A 含有 GFP 陽性細胞とビタミン A 非含有 GFP 陽性細胞を各モデルから

セルソーターで分取し、プラスチックディッシュ上での培養を試みた。初代培養肝星細胞の培養法でいずれの分画も培養が可能であった。形態観察から、ビタミン A 含有 GFP 陽性細胞の起源は肝星細胞、ビタミン A 非含有 GFP 陽性細胞の起源は、門脈域の線維芽細胞と考えられる。

### ビタミン A 非含有細胞外マトリクス産生細胞の性状解析

肝線維化モデルマウスからコラーゲン産生細胞を分離し、さらにビタミン A 含有、非含有細胞に分けて、in vitro で各種増殖因子に対する反応性を調べた。筋線維芽細胞の最も代表的な刺激因子である TGF- $\beta$ 1、肝星細胞(=ビタミン A 含有細胞)の増殖刺激因子である PDGF、肝星細胞のアポトーシス誘導因子である NGF を各々添加して遺伝子の発現を RT-qPCR で調べたところ、TGF- $\beta$ 1 刺激に対する線維化関連遺伝子(Coll1a1,  $\alpha$  SMA, TIMP-1, Col1a2)の誘導には差がみられなかったが、PDGF、NGF 刺激に対しては、各々増殖関連遺伝子(CyclinD1)、アポトーシス関連遺伝子(Bax, Bid, Bim, Bcl-2, Bcl-xl)の発現が肝星細胞のみで誘導され、ビタミン A 非含有細胞では変化が観察されなかった(図3)。

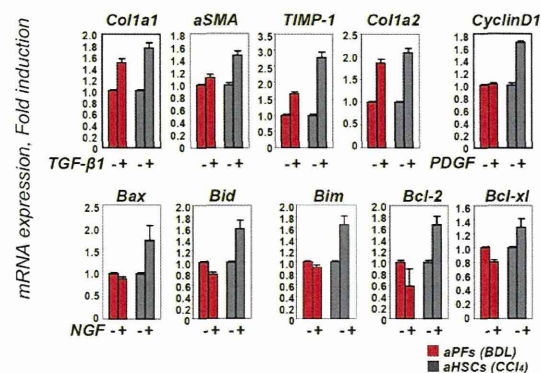


図3 星細胞を起源とするマトリクス産生細胞とビタミン A 非含有細胞外マトリクス産生細胞の刺激因子に対する反応性の違い。

これまでの研究によって、ビタミン A 非含有細胞外マトリクス産生細胞の起源は、門脈

域の線維芽細胞であることが明らかとなった。胆汁鬱滞を背景とする肝線維症では、局所での胆汁の逸脱が起こっていると考えられるため、各種胆汁酸による刺激を検討したところ、Taurocholic acid (TCA)に対してビタミンA非含有細胞外マトリクス産生細胞のみで *Col1a1* 遺伝子の発現上昇が認められた。また、マイクロアレイによってビタミンA非含有細胞外マトリクス産生細胞で IL-25 受容体の遺伝子発現が肝星細胞に比較して優位に高かったことから IL-25 による刺激を行ったところ、ビタミンA非含有細胞外マトリクス産生細胞のみで IL-13 の発現が上昇した(図4)。肝線維化では、IL-13 をはじめとする Th2 サイトカインが上昇することが知られており、IL-13 は肝星細胞を直接的に活性化すると報告されている。IL-25 はビタミンA非含有細胞外マトリクス産生細胞を活性化させて IL-13 を産生することにより、肝星細胞を活性化し肝線維化を進行させると考えられる。

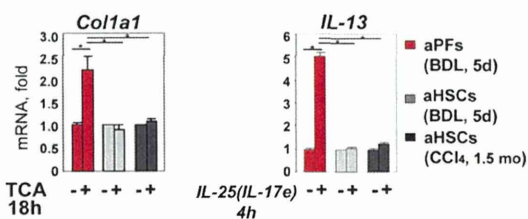


図4 ビタミンA非含有細胞外マトリクス産生細胞は Taurocholic acid (TCA) と IL-25 (IL-17e) 刺激に応答して活性化する。

肝炎モデルマウスからコラーゲン産生細胞を分離し、ビタミンA含有、非含有の比率を解析

Collagen  $\alpha 1(I)$  promoter-GFP トランスジェニックマウスを用いて、四塩化炭素投与、総胆管結紮を行い、FACSにて、ビタミンA含有×GFP発現を指標に解析を行ったところ、四塩化炭素投与モデルでは、四塩化炭素を投与し始めてから5日目の急性期でも14日目の慢性期でもコラーゲン産生細胞の約80%がビタミンAを含有し、ビタミンA非含有細胞は20%以下と病期で比率

が変化しなかった。一方、総胆管結紮モデルのGFP陽性細胞のビタミンA非含有細胞は、総胆管結紮5日目の急性期は、70%であるが17日目の慢性期になると約50%に低下することが示された(図5)。

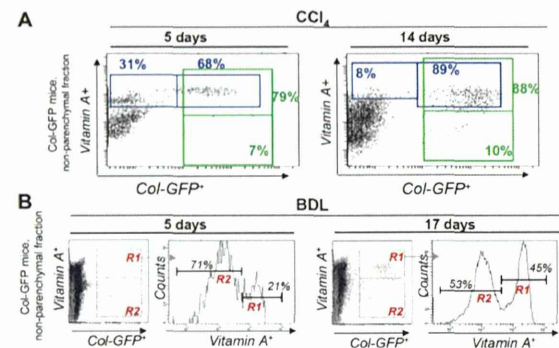


図5 FACSによるコラーゲン産生細胞の解析：(A)四塩化炭素投与モデルでは、GFP陽性細胞に占めるビタミンA含有細胞と非含有細胞の比率は、投与から5日目(急性期)でも14日目(慢性期)でも変わらない。(B)総胆管結紮モデルでは、GFP陽性細胞に占めるビタミンA含有細胞と非含有細胞の比率は結紮から5日目(急性期)は71:21で、17日目(慢性期)には53:45と圧倒的優位だったビタミンA非含有細胞の比率が低下する。

以上の結果から、病因、病期によって星細胞の比率は変化し門脈域の線維芽細胞が同等もしくは星細胞以上に線維化病態の形成に寄与していることが示唆された。

ビタミンA非含有細胞外マトリクス産生細胞のマーカーを同定

ビタミンA含有GFP陽性細胞とビタミンA非含有GFP陽性細胞について、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、MesothelinとThy1がビタミンA非含有細胞外マトリクス産生細胞に高発現していることを見出した。マウス肝の免疫組織学的解析によって、蛋白レベルでの発現を確認したところ、図6に示すようにMesothelinの発現は、胆管結紮モデルの肝非実質細胞に認められた。

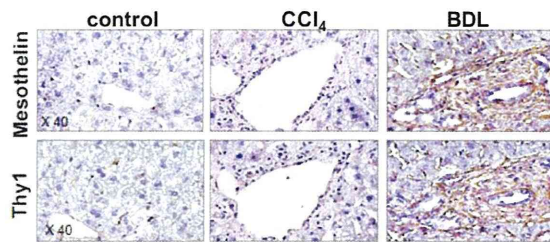


図6 マウス免疫組織染色

### ビタミン A 非含有細胞外マトリクス産生細胞のマーカについて

マウスのビタミン A 非含有細胞外マトリクス産生細胞のマーカとして Mesothelin がどうていされたので、ヒト肝臓の門脈域の線維芽細胞のマーカとしての妥当性を検証した。

臨床検体(胆汁鬱滞性線維肝)の免疫染色でも門脈域に線維芽細胞と考えられる Mesothelin 陽性細胞が認められた。一方、慢性 C 型肝炎を背景とする肝線維症では  $\alpha$  SMA 陽性細胞は類洞に沿って多数みられ、門脈域にも多くの  $\alpha$  SMA 陽性細胞が存在するものの、Mesothelin 陽性細胞は、ほとんど認められなかった(図 7)。

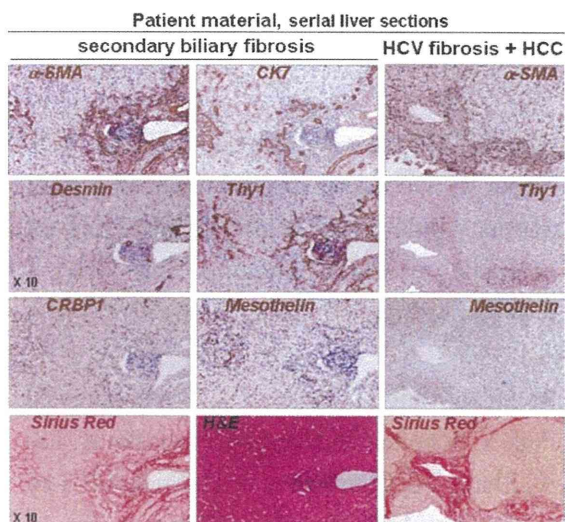


図7 臨床検体の免疫組織学的解析 肝文部胆管癌で二次性の閉塞性黄疸により胆汁鬱滞性の肝線維症をきたした例では、門脈域に多数の Mesothelin 陽性細胞を認めるが、慢性 C 型肝炎による肝硬変では Mesothelin 陽性細胞はほとんど認められない。

### D. 考察

正常肝の肝星細胞は、類洞内皮細胞と肝細胞との間のディッセ腔に存在し、長い突起を伸ばして類洞内皮細胞を外側から取り巻いて収縮弛緩することによって肝微小循環を調節している。肝星細胞は、肝を構成する全細胞の 10%未満にすぎないが、生体のビタミン A の約 60%をその細胞質の脂肪滴の中にレチニルエステルの形で貯蔵している。腸で吸収されたビタミン A は、門脈経由で肝細胞に取り込まれ、肝細胞で合成されるレチノール結合タンパクと結合して速やかに肝細胞外へ放出され、肝星細胞に取り込まれて脂肪滴として貯蔵される。肝星細胞は、肝組織を酵素処理によって細胞分散させたとき、この高脂肪含有率のために他の肝構成細胞より軽く、密度勾配遠心法によって高純度で分離してることができる。初代培養肝星細胞はプラスチックディッシュ上で接着培養すると、in vivo で肝臓が障害を受けた時と同じように形質転換して筋線維芽細胞に変化し、 $\alpha$  SMA を発現し細胞外マトリクスを産生することから、肝臓の線維化研究に資されてきた。生体においても、ディッシュ上でも、肝星細胞は筋線維芽細胞に変化する際、ビタミン A を含む脂肪滴を放出するといわれてきた。

今回、我々はコラーゲンを産生する細胞を GFP でラベルするレポーターマウスを用いた研究によって、コラーゲン産生細胞、すなわち筋線維芽細胞が均一な細胞集団ではないことを明らかにした。肝星細胞の特徴であるビタミン A は、紫外線(UV)の励起によって自家蛍光を発する。肝星細胞は、筋線維芽細胞に変化する過程で脂肪滴を放出してビタミン A を失うといわれてきたが、光学顕微鏡での脂肪滴確認が困難であっても、フローサイトメトリーでは検出可能な程度にはビタミン A が残存していることが判明した。この方法によって、ビタミン A を全く持たない肝星細胞以外の細胞を起源とする筋線維芽細胞が存在することを明らかに



することができた。つまり、UV による自家蛍光を持たない細胞として、ビタミン A 非含有細胞外マトリクス産生細胞を分離することが可能となった。

胆汁鬱滞を伴う肝炎、肝線維化で誘導されるビタミン A 非含有細胞外マトリクス産生細胞の存在は、臨床検体でも確認され、その特異的マーカーとして Mesothelin が有用であることが分かった。ビタミン A 非含有細胞外マトリクス産生細胞は、門脈域に常在する線維芽細胞を起源とすると考えられる。肝臓の門脈域はグリソン鞘とも呼ばれ、肝動脈、門脈、小葉間胆管などが結合組織によって鞘状に束ねられた部位である。

胆汁鬱滞を伴う肝線維症では、門脈域に優位な線維化や細胆管反応と呼ばれる胆管構造の異常な増加が認められるが、これらはビタミン A 非含有細胞外マトリクス産生細胞が病態形成に大きく寄与していることが分かった。しかし、正常肝に存在する活性化していないビタミン A 非含有細胞外マトリクス産生細胞には、特異的なマーカーが存在せず、その組織内局在や細胞の性質など、未だ不明な点が残された。

## E. 結論

肝炎時に誘導されるビタミン A 非含有細胞外マトリクス産生細胞の存在が確認され、その起源は門脈域の線維芽細胞であることが示された。

ビタミン A 非含有細胞外マトリクス産生細胞の活性化は、肝星細胞の活性化と異なることが明らかとなり、抗線維化療法において、このビタミン A 非含有細胞外マトリクス産生細胞こそがこれまで見過ごされていた治療標的であると考えられた。今後、このビタミン A 非含有細胞外マトリクス産生細胞を標的とした新たな抗線維化療法の開発を展開したいと考えている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Iwaisako K, Haimerl M, Paik YH, Taura K, Kodama Y, Sirlin C, Yu E, Yu RT, Downes M, Evans RM, Brenner DA, Schnabl B. Protection from liver fibrosis by a peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(21):E1369-76.

Kim JW, Evans C, Weidemann A, Takeda N, Lee YS, Stockmann C, Branco-Price C, Brandberg F, Leone G, Ostrowski MC, Johnson RS. Loss of fibroblast HIF-1 $\alpha$  accelerates tumorigenesis. *Cancer Res*. 2012;72(13):3187-95.

Kisseleva T, Cong M, Paik Y, Scholten D, Jiang C, Benner C, Iwaisako K, Moore-Morris T, Scott B, Tsukamoto H, Evans SM, Dillmann W, Glass CK, Brenner DA. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(24):9448-53.

Abe H, Takayama M, Takeda N, Takanashi S, Nagai R. Successful surgical repair of a giant coronary-pulmonary artery fistula: role of magnetic resonance imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2012;13(10):826.

Meng F, Wang K, Aoyama T, Grivennikov SI, Paik Y, Scholten D, Cong M, Iwaisako K, Liu X, Zhang M, Osterreicher CH, Stickel F, Ley K, Brenner DA, Kisseleva T. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice.

*Gastroenterology*. 2012;143(3):765-76.

Abe H, Takeda N, Aoki H, Nagai R. Sinus of

- Valsalva aneurysm accompanying bicuspid aortic valve. *Intern Med.* 2012;51(10):1275.
- Nakao T, Watanabe H, Takeda N, Takanashi S, Nagai R. The efficacy of real-time three-dimensional transoesophageal echocardiography in detecting unicuspid aortic valve. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2012;13(11):966.
- Nakamura K, Hatano E, Narita M, Miyagawa-Hayashino A, Koyama Y, Nagata H, Iwaisako K, Taura K, Uemoto S. Sorafenib attenuates monocrotaline-induced sinusoidal obstruction syndrome in rats through suppression of JNK and MMP-9. *J Hepatol.* 2012;57(5):1037-43.
- Hirota T, Lee JW, St John PC, Sawa M, Iwaisako K, Noguchi T, Pongsawakul PY, Sonntag T, Welsh DK, Brenner DA, Doyle FJ 3rd, Schultz PG, Kay SA. Identification of small molecule activators of cryptochrome. *Science.* 2012;337(6098):1094-7.
- Kanemaru K, Nakamura Y, Sato K, Kojima R, Takahashi S, Yamaguchi M, Ichinohe M, Kiyonari H, Shioi G, Kabashima K, Nakahigashi K, Asagiri M, Jamora C, Yamaguchi H, Fukami K. Epidermal phospholipase C $\delta$ 1 regulates granulocyte counts and systemic interleukin-17 levels in mice. *Nat Commun.* 2012;3:963.
- Cong M, Iwaisako K, Jiang C, Kisseleva T. Cell signals influencing hepatic fibrosis. *Int J Hepatol.* 2012;2012:158547.
- Wang VY, Huang W, Asagiri M, Spann N, Hoffmann A, Glass C, Ghosh G. The transcriptional specificity of NF- $\kappa$ B dimers is coded within the  $\kappa$ B DNA response elements. *Cell Rep.* 2012;2(4):824-39.
- Shih VF, Davis-Turak J, Macal M, Huang JQ, Ponomarenko J, Kearns JD, Yu T, Fagerlund R, Asagiri M, Zuniga EI, Hoffmann A. Control of RelB during dendritic cell activation integrates canonical and noncanonical NF- $\kappa$ B pathways. *Nat Immunol.* 2012;13(12):1162-70.
- Brenner DA, Kisseleva T, Scholten D, Paik YH, Iwaisako K, Inokuchi S, Schnabl B, Seki E, De Minicis S, Oesterreicher C, Taura K. Origin of myofibroblasts in liver fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2012;5(Suppl 1):S17.
- Tong M, Watanabe E, Yamamoto N, Nagahata-Ishiguro M, Maemura K, Takeda N, Nagai R, Ozaki Y. Circadian expressions of cardiac ion channel genes in mouse might be associated with the central clock in the SCN but not the peripheral clock in the heart. *Biol Rhythm Res.* 2013;44(4):519-530.
- Amiya E, Watanabe M, Takeda N, Saito T, Shiga T, Hosoya Y, Nakao T, Imai Y, Manabe I, Nagai R, Komuro I, Maemura K. Angiotensin II impairs endothelial nitric-oxide synthase bioavailability under free cholesterol-enriched conditions via intracellular free cholesterol-rich membrane microdomains. *J Biol Chem.* 2013;288(20):14497-509.
- Saito S, Hata K, Iwaisako K, Yanagida A, Takeiri M, Tanaka H, Kageyama S, Hirao H, Ikeda K, Asagiri M, Uemoto S. Cilostazol attenuates hepatic stellate cell activation and protects mice against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. *Hepatol Res.* 2014;44(4):460-73.

- Koyama Y, Taura K, Hatano E, Tanabe K, Yamamoto G, Nakamura K, Yamanaka K, Kitamura K, Narita M, Nagata H, Yanagida A, Iida T, Iwaisako K, Fujinawa H, Uemoto S. Effects of oral intake of hydrogen water on liver fibrogenesis in mice. *Hepatology*. 2014;44(6):663-677.
- Saito T, Takeda N, Amiya E, Nakao T, Abe H, Semba H, Soma K, Koyama K, Hosoya Y, Imai Y, Isagawa T, Watanabe M, Manabe I, Komuro I, Nagai R, Maemura K. VEGF-A induces its negative regulator, soluble form of VEGFR-1, by modulating its alternative splicing. *FEBS Lett*. 2013;587(14):2179-85.
- Soeno Y, Fujita K, Kudo T, Asagiri M, Kakuta S, Taya Y, Shimazu Y, Sato K, Tanaka-Fujita R, Kubo S, Iwakura Y, Nakamura Y, Mori S, Aoba T. Generation of a mouse model with down-regulated U50 snoRNA (SNORD50) expression and its organ-specific phenotypic modulation. *PLoS One*. 2013 Aug 26;8(8):e72105.
- Cowburn AS, Takeda N, Boutin AT, Kim JW, Sterling JC, Nakasaki M, Southwood M, Goldrath AW, Jamora C, Nizet V, Chilvers ER, Johnson RS. HIF isoforms in the skin differentially regulate systemic arterial pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(43):17570-5.
- Yamagata K, Goto Y, Nishimasu H, Morimoto J, Ishitani R, Dohmae N, Takeda N, Nagai R, Komuro I, Suga H, Nureki O. Structural basis for potent inhibition of SIRT2 deacetylase by a macrocyclic peptide inducing dynamic structural change. *Structure*. 2014;22(2):345-52.
- Ruthenborg RJ, Ban JJ, Wazir A, Takeda N, Kim JW. Regulation of wound healing and fibrosis by hypoxia and hypoxia-inducible factor-1. *Mol Cells*. 2014;37(9):637-43.
- Jobara K, Kaido T, Hori T, Iwaisako K, Endo K, Uchida Y, Uemoto S. Whey-hydrolyzed peptide-enriched immunomodulating diet prevents progression of liver cirrhosis in rats. *Nutrition*. 2014 Oct;30(10):1195-207.
- Iwaisako K, Jiang C, Zhang M, Cong M, Moore-Morris TJ, Park TJ, Liu X, Xu J, Wang P, Paik YH, Meng F, Asagiri M, Murray LA, Hofmann AF, Iida T, Glass CK, Brenner DA, Kisseleva T. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(32):E3297-305.
- Abe H, Iguchi N, Utanohara Y, Inoue K, Takamisawa I, Seki A, Tanizaki K, Takeda N, Tohbaru T, Asano R, Nagayama M, Takayama M, Umemura J, Sumiyoshi T, Tomoike H. Non-invasive diagnosis of coronary artery disease by 123I-BMIPP/201TlCl dual myocardial SPECT in patients with heart failure. *Int J Cardiol*. 2014;176(3):969-74.
- Kageyama S, Hata K, Tanaka H, Hirao H, Kubota T, Okamura Y, Iwaisako K, Takada Y, Uemoto S. Intestinal ischemic preconditioning ameliorates hepatic ischemia/reperfusion injury in rats: role of heme oxygenase 1 in the second window of protection. *Liver Transpl*. 2015;21(1):112-22.
- Takemoto K, Hatano E, Iwaisako K, Takeiri M, Noma N, Ohmae S, Toriguchi K, Tanabe K, Tanaka H, Seo S, Taura K, Machida K, Takeda N, Saji S, Uemoto S, Asagiri M.

Necrostatin-1 protects against reactive oxygen species induced hepatotoxicity in acetaminophen-induced acute liver failure. FEBS Open Bio. 2014;4:777-87.

Iwaisako K, Taura K, Koyama Y, Takemoto K, Asagiri M. Strategies to Detect Hepatic Myofibroblasts in Liver Cirrhosis of Different Etiologies. Curr Pathobiol Rep. 2014;2(4):209-215.

Noma N, Asagiri M, Takeiri M, Ohmae S, Takemoto K, Iwaisako K, Minato N, Maeda-Yamamoto M, Simizu S, Umezawa K. Inhibition of MMP-2-Mediated Mast Cell Invasion by NF- $\kappa$ B Inhibitor DHMEQ in Mast Cells. Int Arch Allergy Immunol. 2015;166(2):84-90.

Ochiya T, Takenaga K, Asagiri M, Nakano K, Satoh H, Watanabe T, Imajoh-Ohmi S, Endo H. Efficient inhibition of tumor angiogenesis and growth by a synthetic peptide blocking S100A4-methionine aminopeptidase 2 interaction. Mol Ther Methods Clin Dev. 2015;2:15008.

## 2. 学会発表

Iwaisako K. et al. Protection from liver fibrosis by a PPAR agonist. the 18th Annual Meeting of the Korean Association for the Study of the Liver Seoul (Korea) 2012.6.16

祝迫 恵子. 筋線維芽細胞の起源—肝線維化の基礎研究— 第9回大阪肝臓病ワークショップ. 大阪 2013.2.19

祝迫 恵子. 胆汁鬱滞時に誘導されるコラーゲン産生細胞の解析 と抗線維化治療標的の探索 第68回日本消化器外科学会総会. 宮崎 2013.7.18

祝迫 恵子、朝霧 成挙、木下 正彦、濱野 玄弥、野沢 彰紀、西岡 孝芳、浦田 順久、坂田 親治、竹村 茂一、久保 正二 肝臓の筋線維芽細胞の起源 —肝疾患の治療標的探索— 第114回日本外科学会定期学術集会 (京都) 2014.4.4

祝迫 恵子、河本 宏、佐治 重衡:肝線維症における筋線維芽細胞の起源 第35回日本炎症・再生医学会年次集会 (沖縄) 2014.7.1

祝迫 恵子:教育セッション 3 腎障害後の線維化と再生のターニングポイント 線維化と再生を多臓器に学ぶ Liver fibrosis and regeneration 第57回日本腎臓学会学術総会 (横浜) 2014.7.5

祝迫 恵子、朝霧 成挙、瀬尾 智、田浦 康二郎、波多野 悦朗、上本 伸二、佐治 重衡:肝胆膵領域の悪性腫瘍におけるメソテリンの診断用バイオマーカーとしての意義. 第52回日本癌治療学会学術集会 (横浜) 2014.8.30

## G. 知的所有権の取得状況

特記すべきことなし。

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

【H24. 4. 1～H27. 3. 31】

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Asagiri M et al.	Control of RelB during dendritic cell activation integrates canonical and noncanonical NF- $\kappa$ B pathways.	Nature Immunol.	13(12)	1162-70.	2012
Asagiri M et al.	Epidermal phospholipase C $\delta$ 1 regulates granulocyte counts and systemic interleukin-17 levels in mice.	Nature Commun.	3	963	2012
Iwaisako K et al.	Protection from liver fibrosis by a peroxisome proliferator-activated receptor $\delta$ agonist.	Proc Natl Acad Sci U S A.	109(21)	E1369-76.	2012
Iwaisako K. et al.	What's new in liver fibrosis? The origin of myofibroblasts in liver fibrosis.	Journal of Gastroenterology and Hepatology	27	Aug-65	2012
Asagiri M et al.	Generation of a mouse model with down-regulated U50 snoRNA (SNORD50) expression and its organ-specific phenotypic modulation.	PLoS One	8	E72105	2013
Asagiri M, Uemoto S, Iwaisako K et al.	Cilostazol attenuates hepatic stellate cell activation and protects mice against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis.	Hepatol Res.	44	460-473	2014

Uemoto S, Iwaisako K et al.	Whey-hydrolyzed peptide-enriched immunomodulating diet prevents progression of liver cirrhosis in rats.	Nutrition	30	1195-1207.	2014
Uemoto S, Iwaisako K. et al.	Effects of oral intake of hydrogen water on liver fibrogenesis in mice.	Hepatology Res.	44	663-677	2014
Iwaisako K, Asagiri M et al.	Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice.	Proc Natl Acad Sci U S A.	111	E3297-3305	2014
Iwaisako K, Asagiri M et al.	Strategies to Detect Hepatic Myofibroblasts in Liver Cirrhosis of Different Etiologies.	Curr Pathobiol Rep.	2	209-215	2014
Iwaisako K, Uemoto S, Asagiri M et al.	Necrostatin-1 protects against reactive oxygen species (ROS)-induced hepatotoxicity in acetaminophen-induced acute liver failure	FEBS Open Bio.	4	777-787	2014

### III. 研究成果の刊行物・別刷



# Control of RelB during dendritic cell activation integrates canonical and noncanonical NF- $\kappa$ B pathways

Vincent F-S Shih<sup>1</sup>, Jeremy Davis-Turak<sup>1</sup>, Monica Macal<sup>2</sup>, Jenny Q Huang<sup>1</sup>, Julia Ponomarenko<sup>3</sup>, Jeffrey D Kearns<sup>1,5</sup>, Tony Yu<sup>1</sup>, Riku Fagerlund<sup>1</sup>, Masataka Asagiri<sup>1,4</sup>, Elina I Zuniga<sup>2</sup> & Alexander Hoffmann<sup>1</sup>

The NF- $\kappa$ B protein RelB controls dendritic cell (DC) maturation and may be targeted therapeutically to manipulate T cell responses in disease. Here we report that RelB promoted DC activation not as the expected RelB-p52 effector of the noncanonical NF- $\kappa$ B pathway, but as a RelB-p50 dimer regulated by canonical I $\kappa$ Bs, I $\kappa$ B $\alpha$  and I $\kappa$ B $\epsilon$ . I $\kappa$ B control of RelB minimized spontaneous maturation but enabled rapid pathogen-responsive maturation. Computational modeling of the NF- $\kappa$ B signaling module identified control points of this unexpected cell type-specific regulation. Fibroblasts that we engineered accordingly showed DC-like RelB control. Canonical pathway control of RelB regulated pathogen-responsive gene expression programs. This work illustrates the potential utility of systems analyses in guiding the development of combination therapeutics for modulating DC-dependent T cell responses.

DCs are specialized sentinel immune cells essential in both innate and adaptive immunity. DC progenitors differentiate to become immature DCs that populate both nonlymphoid and lymphoid tissues and perform immune-surveillance functions. When encountering pathogens or pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), immature DCs undergo a maturation program that determines their role in the adaptive immune response<sup>1</sup>. A hallmark of DC maturation is expression of major histocompatibility complex molecules (MHC), T cell co-stimulatory molecules (CD40, CD80 or CD86) and cytokines (for example, interleukin 23; IL-23) in addition to a gene expression program of intracellular factors that enable effective antigen uptake, processing and presentation, and T cell activation. In addition, production of inflammatory molecules such as nitric oxide and cytokines such as tumor necrosis factor (TNF) and interferon underlies DC functions in innate immune responses<sup>2,3</sup>. DCs have thus attracted attention for engineering or modulating immune-based therapies<sup>4</sup>.

The transcription factor NF- $\kappa$ B protein RelB is highly expressed in antigen-presenting cells<sup>5</sup> and is critical for DC maturation, DC function as antigen-presenting cells<sup>6</sup> and DC-mediated immunity. Specifically, small interfering RNA-mediated silencing of RelB expression radically alters the DC maturation process and results in blunted antigen-specific T cell responses *in vitro* and *in vivo*<sup>7</sup>. RelB-deficient mice have deficiencies in splenic DC subsets<sup>8,9</sup> but other critical roles of RelB in DCs may be masked by other cell types in which RelB-deficiency leads to functionally opposite phenotype: notably, T cells are hyperactive in these null mice, whereas DC-specific deletion of the RelB-controlling kinase NIK results in deficient T cell responses<sup>10</sup>. Indeed, the extent of RelB activation determines the tolerance or

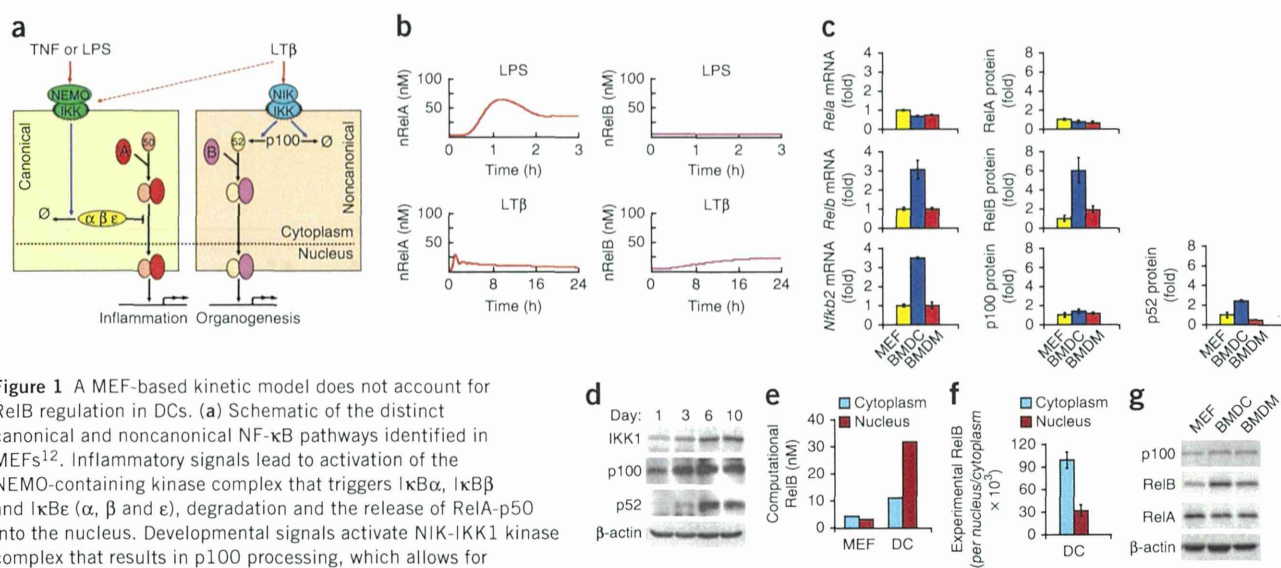
rejection of allogenic organ transplants by determining the balance of associated activated or regulatory T cells<sup>7</sup>. These insights have prompted investigations of cell-based therapies for autoimmune diseases using RelB-silenced DCs<sup>11</sup>.

Despite the potential clinical importance of RelB, the molecular mechanisms that control its activity in DCs have remained unclear. Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) have served as a useful model system for many signaling studies. Detailed biochemical studies in MEFs have shown that unlike classical NF- $\kappa$ B (the RelA-p50 dimer), RelB is not activated from a latent cytoplasmic pool via the NEMO-dependent, 'canonical' signaling pathway but via the 'noncanonical' NF- $\kappa$ B pathway that involves proteolysis and processing of newly synthesized NF- $\kappa$ B2 p100<sup>12-14</sup>. Consistent with the critical role of RelB in DCs, noncanonical signaling pathway components such as the signaling protein NIK and *Nfkb2* gene have been reported to be required for proper DC functions<sup>10,15</sup>. However, RelB has also been found to be rapidly activated in DCs by canonical pathway stimuli TNF and lipopolysaccharide (LPS)<sup>16-19</sup>, and the canonical signaling pathway component TRAF6 has been shown to be essential<sup>9</sup>. These reports suggest that the mechanism by which RelB activity is controlled in DCs may be different than what has been described in MEFs. In DCs, the molecular control mechanisms must provide for constitutive RelB expression to enable rapid and decisive induction of maturation programs after exposure to pathogens or PAMPs but must limit spontaneous maturation of DCs in their absence.

In this study, we elucidated the molecular mechanisms responsible for regulating RelB in DCs. We used a systems biology approach of iterative computational modeling and quantitative experimental

<sup>1</sup>Signaling Systems Laboratory, Department of Chemistry and Biochemistry and San Diego Center for Systems Biology, University of California, San Diego, La Jolla, California, USA. <sup>2</sup>Division of Biological Sciences, University of California, San Diego, La Jolla, California, USA. <sup>3</sup>San Diego Supercomputer Center, University of California, San Diego, La Jolla, California, USA. <sup>4</sup>Innovation Center for Immunoregulation and Therapeutics, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Yoshida-Konoe, Sakyo-ku, Kyoto, Japan. <sup>5</sup>Present address: Merrimack Pharmaceuticals, Cambridge, Massachusetts, USA. Correspondence should be addressed to A.H. (ahoffmann@ucsd.edu).

Received 28 November 2011; accepted 29 August 2012; published online 21 October 2012; doi:10.1038/ni.2446



**Figure 1** A MEF-based kinetic model does not account for RelB regulation in DCs. **(a)** Schematic of the distinct canonical and noncanonical NF- $\kappa$ B pathways identified in MEFs<sup>12</sup>. Inflammatory signals lead to activation of the NEMO-containing kinase complex that triggers I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  and I $\kappa$ B $\epsilon$  ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\epsilon$ ), degradation and the release of RelA-p50 into the nucleus. Developmental signals activate NIK-IKK1 kinase complex that results in p100 processing, which allows for RelB-p52 nuclear translocation. (The I $\kappa$ B $\delta$  pathway is not shown for sake of clarity<sup>21</sup>). A, RelA; B, RelB; 50, p50; 52, p52; and  $\emptyset$ , sink (from which proteins are synthesized and into which they are degraded). **(b)** Computational simulations using the MEF-based kinetic model version 5.0-MEF (**Supplementary Note**) of nuclear RelA or RelB activity (nRelA and nRelB, respectively) induced by LPS or LT $\beta$  stimulation. **(c)** Quantification of *Rela*, *Relb* and *Nfkb2* transcripts by quantitative RT-PCR (left) and of RelA, RelB, p100 and p52 proteins by immunoblot (right); numbers per cell in resting MEFs, BMDMs and BMDCs, graphed relative to the respective value in MEFs. **(d)** IKK1 and p52 abundance increase during DC differentiation. Whole-cell extracts prepared from BMDC culture during a differentiation time course (days 1–10) were subjected to IKK1, p100 and p52 immunoblotting.  $\beta$ -actin served as a loading control. **(e)** *In silico* simulation of RelB cellular distribution using the mathematical model version 5.0-MEF describing NF- $\kappa$ B activation in MEFs as in **b** or in model version 5.0-DC incorporating DC-specific parameters derived from **c, d** (**Supplementary Note**). **(f)** Quantification of RelB molecules per wild-type (WT) BMDC distributed in cytoplasmic and nuclear fraction. Quantification methods are described in **Supplementary Figure 1**. **(g)** RelB, RelA and p100 immunoblots of cytoplasmic extracts prepared from the indicated cell types. Data are representative of at least three independent experiments (error bars, s.d.;  $n = 3$ ).

analyses of the NF- $\kappa$ B signaling network in DCs to reveal that RelB activity was limited by classical I $\kappa$ Bs, I $\kappa$ B $\alpha$  and I $\kappa$ B $\epsilon$ , and regulated via the canonical pathway. Modeling studies identified two DC-specific control points that render RelB subject to regulation by the canonical pathway, and we demonstrated their sufficiency by engineering MEFs accordingly to produce DC-like RelB control. Finally, gene expression profiling revealed that RelB-dependent gene expression programs regulated by the canonical pathway activity control DC-orchestrated immune responses.

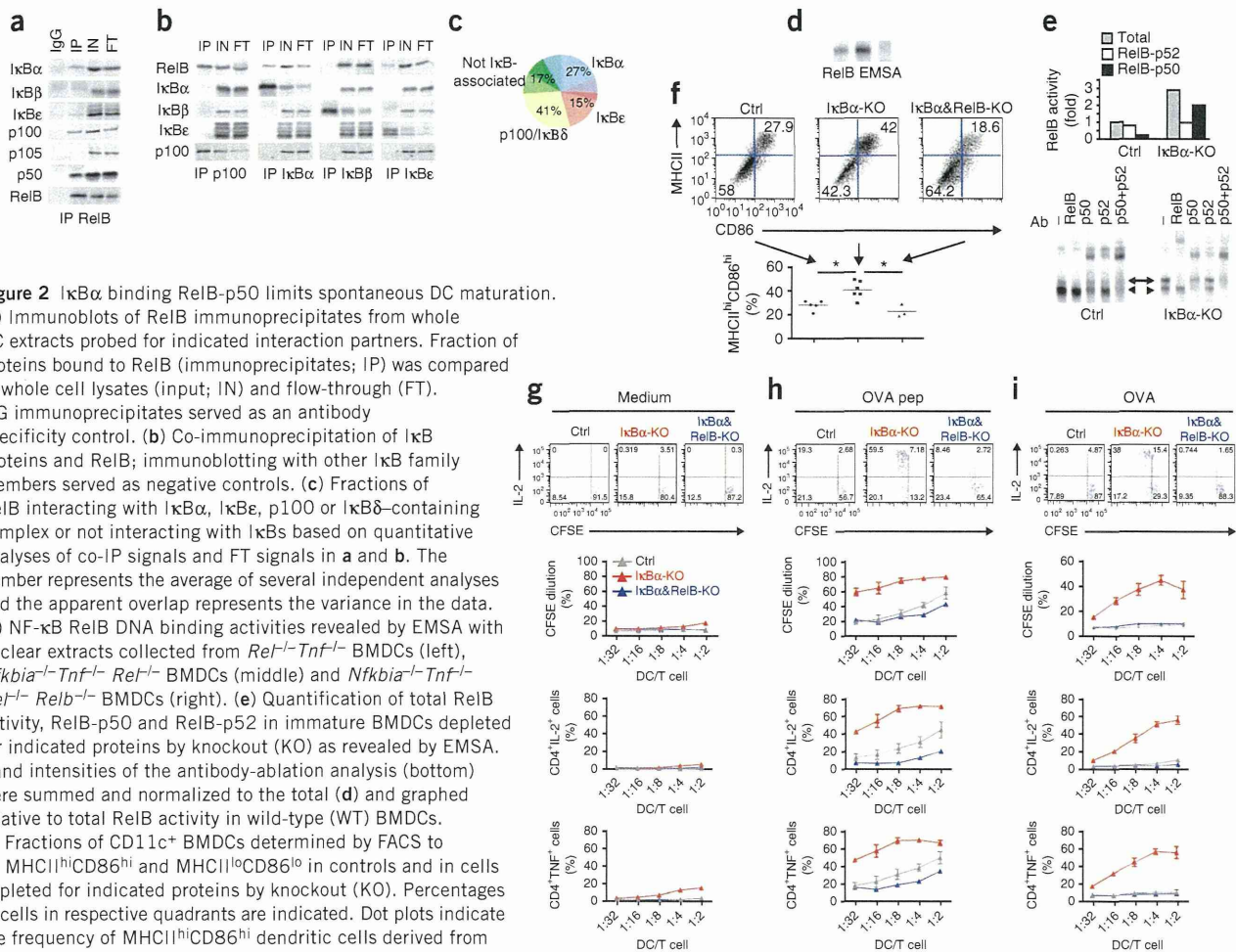
## RESULTS

### Developing a DC-specific model for NF- $\kappa$ B signaling

The established view of NF- $\kappa$ B signaling comprises two separate pathways (**Fig. 1a**)<sup>12</sup>. The canonical pathway, involving the NEMO-dependent kinase IKK, triggers degradation of NF- $\kappa$ B inhibitors, the classical I $\kappa$ Bs: I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  and I $\kappa$ B $\epsilon$ . Resulting activation of latent RelA-containing and c-Rel-containing NF- $\kappa$ B dimers controls inflammatory and proliferative gene expression programs. The noncanonical pathway, involving the kinases NIK and IKK1, triggers processing of p100 to p52 and generation of the RelB-p52 transcription factor, which is implicated in cell survival and maturation. To examine NF- $\kappa$ B RelB signaling in DCs in a quantitative manner, we developed a mathematical model that describes the formation and regulation of RelA and RelB dimers in terms of mass-action kinetics (**Supplementary Note**). The first version of the model involves 41 molecular species, 132 reactions and 53 unique kinetic parameters based on published and newly made measurements that constrain the model to a single parameter set ensemble; it recapitulates well-documented NF- $\kappa$ B control in MEFs<sup>20–22</sup>, such as prompt LPS-induced RelA activation and delayed lymphotoxin  $\beta$ -mediated RelB activation (**Fig. 1b**).

To adapt the model to DCs, we first measured the expression of key NF- $\kappa$ B proteins in bone marrow-derived DCs (BMDCs) in comparison to that in MEFs and bone marrow-derived macrophages (BMDMs). Relative to the expression of the housekeeping gene  $\beta$ -actin (*Actb*), expression of *Rela* mRNA was similar in BMDCs, BMDMs and MEFs, and the relative amount of RelA protein in these cell types correlated (**Fig. 1c**). In contrast, we observed threefold to sixfold more *Relb* mRNA and protein expression in BMDCs than MEFs and BMDMs (**Fig. 1c** and **Supplementary Fig. 1a**). p100, encoded by the *Nfkb2* gene, is known to inhibit RelB. We therefore tested whether p100 expression correlated with enhanced RelB expression in BMDCs. We observed 3.5-fold more *Nfkb2* mRNA in BMDCs, but quantitative immunoblotting showed little difference in the p100 protein abundance among the cell types analyzed (**Fig. 1c** and **Supplementary Fig. 1b**). Lack of correlation between the relative p100 protein and RNA abundance suggested that p100 degradation may be elevated in BMDCs. We noted a 2.5-fold increase in the amount of p52 in BMDCs, which suggests that both complete p100 degradation and p100 processing to p52 may occur in BMDCs (**Fig. 1c** and **Supplementary Fig. 1b**). Consistent with this hypothesis, protein expression of IKK1, the kinase determining the activity of noncanonical NF- $\kappa$ B pathway, gradually increased during DC differentiation with concomitant p100 processing to p52 (**Fig. 1d**), potentially via the control of microRNAs<sup>23</sup>. Our data indicate that DC differentiation involves not only increased expression of RelB but also elevated constitutive activity of the noncanonical NF- $\kappa$ B signaling pathway.

Based on the measurements, we made specific modifications to the computational model to recapitulate RelB control in DCs (**Supplementary Note**). First, we increased *Relb* and *Nfkb2* expression threefold, which increased the abundance of RelB but not its



**Figure 2** IκBα binding RelB-p50 limits spontaneous DC maturation.

(a) Immunoblots of RelB immunoprecipitates from whole DC extracts probed for indicated interaction partners. Fraction of proteins bound to RelB (immunoprecipitates; IP) was compared to whole cell lysates (input; IN) and flow-through (FT). IgG immunoprecipitates served as an antibody specificity control. (b) Co-immunoprecipitation of IκB proteins and RelB; immunoblotting with other IκB family members served as negative controls. (c) Fractions of RelB interacting with IκBα, IκBe, p100 or IκBδ-containing complex or not interacting with IκBs based on quantitative analyses of co-IP signals and FT signals in a and b. The number represents the average of several independent analyses and the apparent overlap represents the variance in the data. (d) NF-κB RelB DNA binding activities revealed by EMSA with nuclear extracts collected from *Rel<sup>-/-</sup>Tnf<sup>-/-</sup>* BMDCs (left), *Nfkb1a<sup>-/-</sup>Tnf<sup>-/-</sup>Rel<sup>-/-</sup>* BMDCs (middle) and *Nfkb1a<sup>-/-</sup>Tnf<sup>-/-</sup>Rel<sup>-/-</sup>Relb<sup>-/-</sup>* BMDCs (right). (e) Quantification of total RelB activity, RelB-p50 and RelB-p52 in immature BMDCs depleted for indicated proteins by knockout (KO) as revealed by EMSA. Band intensities of the antibody-ablation analysis (bottom) were summed and normalized to the total (d) and graphed relative to total RelB activity in wild-type (WT) BMDCs. (f) Fractions of CD11c<sup>+</sup> BMDCs determined by FACS to be MHCII<sup>hi</sup>CD86<sup>hi</sup> and MHCII<sup>lo</sup>CD86<sup>lo</sup> in controls and in cells depleted for indicated proteins by knockout (KO). Percentages of cells in respective quadrants are indicated. Dot plots indicate the frequency of MHCII<sup>hi</sup>CD86<sup>hi</sup> dendritic cells derived from granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-cultured *Rel<sup>-/-</sup>Tnf<sup>-/-</sup>* cells ( $n = 5$ ), *Nfkb1a<sup>-/-</sup>Tnf<sup>-/-</sup>Rel<sup>-/-</sup>* ( $n = 6$ ), and *Nfkb1a<sup>-/-</sup>Tnf<sup>-/-</sup>Rel<sup>-/-</sup>Relb<sup>-/-</sup>* ( $n = 3$ ) bone marrow cells in individual experiments.

\* $P < 0.01$ . (g–i) T cell proliferation in DC–T cell cocultures using *Tnf<sup>-/-</sup>*, *Nfkb1a<sup>-/-</sup>Tnf<sup>-/-</sup>* and *Nfkb1a<sup>-/-</sup>Tnf<sup>-/-</sup>Relb<sup>-/-</sup>* BMDCs exposed to medium (g), OVA peptide (h) or OVA protein (i). Top, raw FACS data of CFSE-labeled T cells stained for IL-2, showing proliferation-associated dye dilution and IL-2 production. Middle, fraction of divided cells and, bottom, fraction of T cells positive for the indicated activation-associated cytokine, graphed as a function of the DC:T cell ratio. Data in a, b, d, e are representative of at least two independent experiments. Data in g–i are the average of duplicate leukocyte reactions produced for each of two independent BMDC cultures. Error bars, s.e.m.;  $n = 4$ .

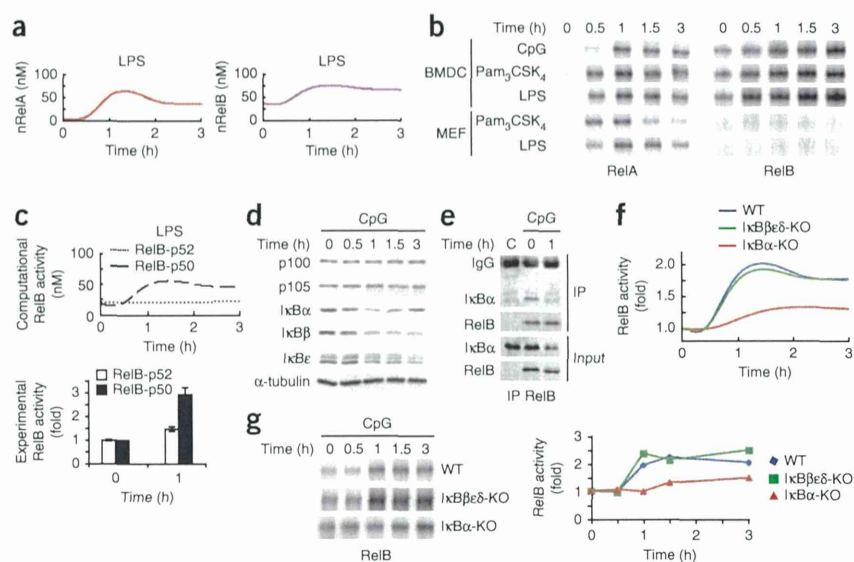
nuclear localization. Then we destabilized p100 by the IKK1-dependent pathway to achieve comparable p100 expression as in MEFs (Fig. 1c). This change resulted in a substantial increase of nuclear RelB activity (Fig. 1e). To test experimentally whether RelB in DCs primarily localizes into the nucleus, we separated BMDCs into cytoplasmic and nuclear extracts but found that more than 75% of the total RelB protein was cytoplasmic (Fig. 1f and Supplementary Fig. 1c,d). Indeed, whereas RelB was more abundant in the cytoplasm of BMDCs than of MEFs or BMDMs, p100 was not (Fig. 1g). The fact that the mathematical model, which encodes the known mechanisms of RelB control, did not reproduce our experimental observations suggested that there may be as-yet undescribed regulatory mechanisms that sequester RelB in the cytoplasm.

### IκBα restrains RelB-p50 and spontaneous DC maturation

To search for inhibitors of RelB in DCs, we immunoprecipitated RelB from BMDC whole-cell lysates and analyzed the associated proteins (Fig. 2a). As expected, p100, the known RelB inhibitor and noncanonical regulator, was associated with RelB. Unexpectedly,

IκBα and IκBe, the classical IκB inhibitors regulating the canonical NF-κB pathway, were also immunoprecipitated with RelB, but IκBβ and p105 were not. Substantial amounts of p50, known as the binding partner of RelA in the canonical pathway, were found in RelB immunoprecipitates, and this complex was primarily cytoplasmic (Supplementary Fig. 2a,b). Reciprocal immunoprecipitation of various NF-κB inhibitors confirmed that RelB not only directly interacted with p100 but also associated with IκBα and IκBe in BMDCs (Fig. 2b and Supplementary Fig. 2c), and RelA associated with IκBα, as expected (Supplementary Fig. 2d). The observations that IκB immunoprecipitates did not contain other IκB isoforms confirmed the specificity of the antibodies used and that only one IκB isoform associated with each RelB molecule. Analyses of the amounts of RelB captured and remaining in the flow-through after immunoprecipitation with various IκB antibodies provides a quantitative understanding of RelB protein distribution in BMDCs (Fig. 2c). This analysis revealed that 37–45% of RelB was associated with p100 and 12–17% with IκBe. A substantial proportion of RelB (19–34%) associated with IκBα, which prompted us to investigate the function of this interaction.

**Figure 3** RelB-p50 is rapidly activated during TLR-mediated DC maturation. (a) Computational simulations of LPS-induced RelA and RelB activity during a 3 h time course using the refined mathematical model version 5.1–DC. (b) NF- $\kappa$ B RelA (left) and NF- $\kappa$ B RelB (right) DNA binding activities monitored by EMSA. Nuclear extracts from wild-type (WT) BMDCs or WT MEFs activated by indicated stimuli were collected and subjected to EMSA. Equal amounts of nuclear proteins from BMDCs or MEFs were loaded and exposure of images was adjusted to reveal similar RelA peak activity in BMDCs and MEFs. (c) Computational simulations of RelB-p50 and RelB-p52 activities upon LPS stimulation that sum up to total nuclear RelB activity shown in **a** (top). Quantification of RelB-p50 and RelB-p52 activities before and after CpG stimulation relative to their respective basal activity (bottom). (d)  $\kappa$ B protein expression profiles induced by CpG. Whole-cell extracts prepared from WT BMDCs were subjected to immunoblotting with antibodies to indicated proteins. (e) Association of  $\kappa$ B $\alpha$  to RelB monitored during a CpG time course by examining RelB immunoprecipitates (IP) from CpG-stimulated WT BMDCs. Immunoprecipitation with *Relb*<sup>-/-</sup> extracts (C) serves as a control, indicating specificity of RelB antibody. (f) Computational simulations of CpG-induced RelB activation in mathematical models, based on version 5.1–DC that were deficient (KO) in the indicated proteins. (g) CpG-induced NF- $\kappa$ B RelB DNA binding activities in BMDCs depleted for indicated proteins by knockout (KO), monitored by EMSA (left). Signals were quantified and graphed relative to respective resting cells (right). Data shown in **b, d, e, g** are representative of at least three independent experiments. Data shown in **c** are representative of two independent experiments (error bars, s.d.;  $n = 3$ ).



To test whether  $\kappa$ B $\alpha$  may inhibit RelB activity in BMDCs, we took advantage of  $\kappa$ B $\alpha$ -deficient mice<sup>22</sup> and developed two strategies to focus our experimental analysis on RelB activity. First, we bred the mice onto a c-Rel-deficient background (*Rel*<sup>-/-</sup>); then we modified the standard electrophoretic mobility shift assay (EMSA) with  $\kappa$ B site-containing probes ( $\kappa$ B EMSA) to include shift-ablating antibodies for RelA, resulting in a specific RelB EMSA. Using these tools, we found that RelB activity was more than twofold elevated in  $\kappa$ B $\alpha$ -deficient BMDCs (Fig. 2d). Supershift analysis with antibodies that were shown to be specific for p50 and p52 (Supplementary Fig. 2e) revealed that whereas control BMDCs contained primarily constitutive RelB-p52 activity, ablation of  $\kappa$ B $\alpha$  resulted in a substantial increase in active RelB-p50 dimer, rendering RelB-p50 the predominant NF- $\kappa$ B activity in  $\kappa$ B $\alpha$ -deficient BMDCs (Fig. 2e). We examined the functional consequences of RelB misregulation by monitoring the frequency of matured DCs as indicated by surface expression of the activation markers CD86 and MHC II.  $\kappa$ B $\alpha$  deficiency resulted in an increased percentage (42% versus 28%) of MHCII<sup>hi</sup>CD86<sup>hi</sup> BMDCs in the absence of external stimuli (Fig. 2f). Although RelB deficiency did not affect the frequency of MHCII<sup>hi</sup>CD86<sup>hi</sup> BMDCs before exposure to maturation stimuli (Supplementary Fig. 2f), the inappropriate spontaneous DC maturation phenotype of  $\kappa$ B $\alpha$ -deficient BMDCs was dependent on RelB, as compound deletion of the *Relb* gene fully reversed the phenotype (Fig. 2f). We then examined the antigen-presenting functions of DCs by testing their ability to activate proliferation and cytokine production of antigen-specific T cells in DC-T cell cocultures (Fig. 2g–i). We found that  $\kappa$ B $\alpha$  deficiency increased the antigen-presenting functions in BMDC cocultures with ovalbumin (OVA)-responsive T cells exposed to OVA peptide, and this effect was largely but not entirely dependent on RelB (Fig. 2h), correlating with the partial dependence on RelB of surface MHC expression (Fig. 2f). However, when we exposed these cocultures to ovalbumin protein,

which must be taken up and processed before being presented, T cell activation showed a near absolute dependence on RelB (Fig. 2i), correlating with previous studies of RelB-deficient DCs<sup>6</sup>, and suggesting a specific function for RelB in regulating the antigen uptake and processing program of antigen-presenting cells. Together, these data demonstrate that the classical NF- $\kappa$ B inhibitor,  $\kappa$ B $\alpha$ , not only restrains the expression of RelB by controlling RelA or c-Rel<sup>24</sup>, but in immature DCs it also has a critical functional role in restraining RelB activity to prevent inappropriate spontaneous maturation.

### TLRs activate RelB-p50 via the canonical NF- $\kappa$ B pathway

To explore the regulatory consequences of RelB-p50 interactions with  $\kappa$ B $\alpha$  and  $\kappa$ B $\epsilon$  proteins during DC maturation, we incorporated them into the mathematical model as kinetic rate equations and used the quantitative immunoprecipitation results as constraints in a multidimensional parameter optimization protocol (Supplementary Note). We simulated NF- $\kappa$ B regulation during Toll-like receptor (TLR)-induced DC maturation using experimentally measured time-course data of the NEMO-dependent IKK kinase activity as an input. Such simulations indicated rapid and substantial activation not only of RelA but also of RelB (Fig. 3a). To test this prediction experimentally, we stimulated BMDCs and MEFs with the TLR9 ligand CpG, the TLR2 ligand Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> and the TLR4 ligand LPS as well as an agonistic antibody to LT $\beta$ R to induce the noncanonical NF- $\kappa$ B pathway. To specifically examine the activation profiles of RelA-containing and RelB-containing NF- $\kappa$ B dimers, we used the newly developed RelA EMSA<sup>22</sup> and RelB EMSA using shift-ablating antibodies for activation domain-containing Rel proteins (Supplementary Fig. 3b). RelA activation was similar in BMDCs and MEFs stimulated with TLR ligands (Fig. 3b). We observed rapid RelB activation in response to TLR stimuli in BMDCs but not in MEFs, although MEFs activated RelB at later time points when stimulated with anti-LT $\beta$ R (Fig. 3b and Supplementary Fig. 3c). Similarly, we