

[原著]

Protease-activated receptor 2 agonists 刺激による interferon regulatory factor 5 の発現抑制効果

山本 隆 敏¹⁾ 山口 類²⁾ 坂本 亜里紗¹⁾
榎原 真 二¹⁾ 杉内 博 幸¹⁾ 山口 康 雄²⁾

AC-264613, a protease-activated receptor 2 agonist, suppresses interferon regulatory factor 5

Takatoshi YAMAMOTO, Rui YAMAGUCHI, Arisa SAKAMOTO, Shinji NARAHARA,
Hiroyuki SUGIUCHI, Yasuo YAMAGUCHI

1) 熊本保健科学大学医学検査学科

2) 熊本保健科学大学大学院保健科学科

転写因子であるインターフェロン調節因子5 (interferon regulatory factor 5: IRF5) は、マクロファージにおける IL-12産生の重要な因子の一つである。また、IRF5は Toll 様受容体 (TLR) シグナル伝達経路に属している。また、p53により発現が増強する遺伝子でもある。本研究では、プロテアーゼ活性化受容体の活性化アゴニストによる IRF5や IL-12p40の発現に対する効果について検討した。顆粒球・マクロファージ刺激因子で分化したマクロファージでは、IRF5の発現が増強した。しかし、マクロファージを好中球エラスターゼで刺激すると IRF5や p53の発現量が減少した。p53 siRNA を移入したマクロファージでは、IRF5の発現が減少した。また、好中球エラスターゼを追加投与すると、更に IRF5が減少した。 β arrestin 2 siRNA を移入したマクロファージでは、好中球エラスターゼ刺激でも IRF5の発現量は減少しなかった。PAR-2 agonist である AC-264613をマクロファージに添加すると、IRF5及び p53の発現が有意に抑制された。Lipopolysaccharide (LPS) 刺激により IL-12p40の産生が増加した。しかし、AC-264613の前投与後に LPSで刺激すると IL-12p40の産生が有意に抑制された。しかし、これに反して、好中球エラスターゼで処理したマクロファージでは、IL-12p40の産生が有意に増加した。以上より、PAR-2 agonist である AC-264613は、LPS 刺激による IL-12p40の産生を有意に抑制することが判明した。

キーワード：好中球エラスターゼ, interferon regulatory factor 5, p53, プロテアーゼ活性化受容体

I. 緒言

インターフェロン (interferon: IFN) β 遺伝子の発現調節領域に結合する転写因子として同定されたのが IFN 調節因子 (interferon regulatory factor: IRF) である。ヒトやマウスでは IRF1から IRF9 という9つのメンバーから構成されるファミリーを形成している。IRF-1や IRF-5は DNA 損傷時のアポトーシス誘導や細胞周期の調節作用により、がん化

の制御にも関与していると考えられている。また、IRF の遺伝子変異や欠損または過剰発現は、種々の疾患の発症に関わっている。IRF5の遺伝子多型が全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) をはじめとする多くの自己免疫疾患の発症と関連している。マクロファージの IRF5は Toll 様受容体 (Toll-like receptor: TLR) シグナル伝達に反応し、IL-12や IL-23を産生増強する。また、IRF5はアポトーシスの誘導に密接に関連していることが

報告されている¹⁾。実際に、IRF5はFas (CD95/APO-1/TNFRSF6) を介するアポトーシスを促進することが報告されている²⁾。一方、p53もアポトーシスを誘導する因子である³⁾。IRF5は細胞周期とアポトーシスの調節において、p53依存性またはp53非依存性の作用を発揮することが示されている。また、p53を有する細胞 (MCF7, NHDF) ではIRF5を発現できるが、p53が欠損した細胞 (H1299) ではIRF5を発現できないことより、IRF5の発現にはp53の存在が不可欠であることが報告された⁴⁾。一方、プロテアーゼ活性化受容体 (protease-activated receptor-2: PAR-2) の活性化で、U87 cellsのp53の発現が減少し、アポトーシスが抑制されることが判明している⁵⁾。そこで、本研究では、PAR-2 agonistである好中球エラスターゼ刺激によるIRF5の発現動態について検討した。

II. 方法

1. ヒト末梢血単球の分離

健康成人ボランティアよりヘパリン加静脈血を採取した (熊本保健科学大学倫理審査: 2015-03)。Ficollを用いた密度勾配遠心分離法で単核球分画を採取した⁶⁾。

2. 末梢血単球の分化

Recombinant GM-CSFはTocris Bioscience (Bristol, UK) より購入した。得られた末梢血単球分画にRPMI1640 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) を加えて、1500rpmで5分間遠心した。上清を除去してRPMI1640 2mLを加えて、0.5%トリパンブルー溶液で染色し細胞数を計測した。単球分離後はRPMI1640 + 10% FCSを加えて、1時間培養した。培地を除去し、RPMI1640 + 10% FCS (Thermo Fischer Scientific) で2回洗浄を行った。RPMI1640 + 10% FCS + GM-CSF (10 ng/mL) を加えて培養した。3日目に培養液を除去し、新たなRPMI1640 + 10% FCS + GM-CSF (10 ng/mL) を添加した⁷⁾。培養9日目のマクロファージを、GM-CSF-dependent macrophages (day 9) として実験に使用した。

3. small interfering RNA (si RNA) の移入

p53 siRNA 及び IRF5 siRNA を Santa Cruz

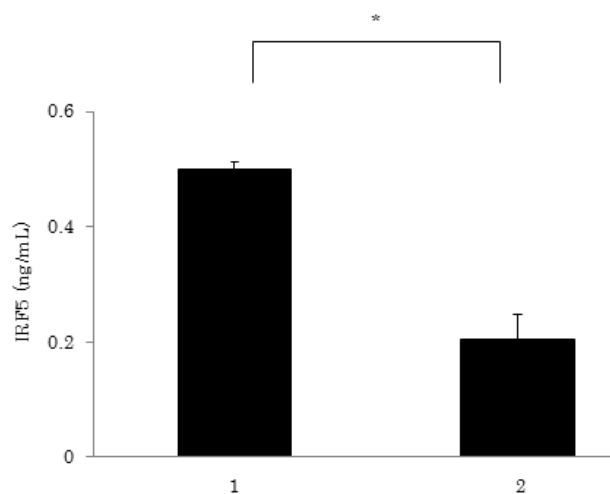


図1. 好中球エラスターゼ刺激による interferon regulatory factor 5 (IRF5) の減少効果

1. GM-CSF-dependent macrophages (day 9)
2. GM-CSF-dependent macrophages (day 9) + HNE (50 μM)

GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

HNE: human neutrophil elastase

Data=mean ± S.E. n=3 *P<0.01

Biotechnology (Dallas, TX) より購入した。GM-CSF-dependent macrophages 培養 7 日目に、Lipofectamine (2.0 × 10³ μL/L) を用いて p53 siRNA (50nM) 及び IRF5 siRNA (50nM) を siRNA 移入に使用した。同時に、Lipofectamine を単独投与し、細胞死がないことを確認した。

4. Wester blotting

細胞破碎液を e-PAGEL (5-20%) (ATTO corporation, Tokyo) を用いて、SDS-PAGE 電気泳動を行った。電気泳動条件 30 mA, 55min とした。iBlot[®]2 Dry Blotting System (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) を用いて Nitrocellulose membrane へ転写した。転写後、PBS (R & D systems, Minneapolis, MN) + 10% skim milk (Wako, Osaka) を用いて 1 時間振とうしてブロッキングを実施した。ブロッキング後、PBS + 10% skim milk を除いた後に、PBS (R & D systems, Minneapolis, MN) + TweenR 20 (Promega, Madison, WI) で 10 分間振とうした。PBS (R & D systems, Minneapolis,

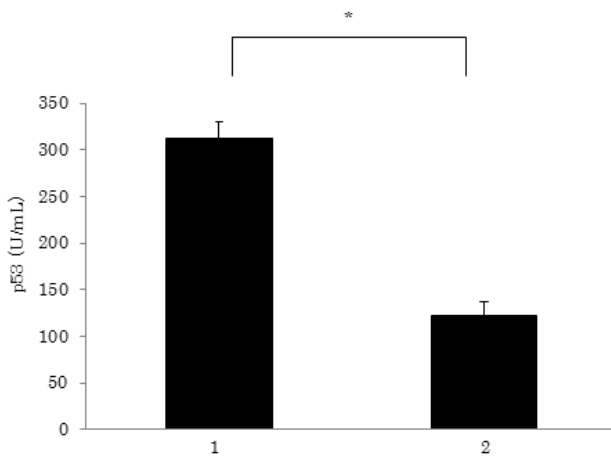


図2. 好中球エラスターゼ刺激による p53の減少効果

1. GM-CSF-dependent macrophages (day 9)
2. GM-CSF-dependent macrophages (day 9) + HNE (50 μM)

GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

HNE: human neutrophil elastase

Data=mean ± S.E. n=3 *P<0.01

MN) + TweenR 20を除去し洗浄を行った。この洗浄を三回繰り返した。洗浄後は1次抗体 mouse anti-human IRF5 IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) を PBS + 3 % skim milk に希釈し, Nitrocellulose membrane と共に 1 時間振とうした。振とう後, 上記と同様に洗浄を行った。洗浄後, 2次抗体 guinea pig anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology) を PBS + 3 % skim milk で希釈し, Nitrocellulose membrane と共に 1 時間振とうした。振とう後は洗浄を行ったのちに蛍光発色試薬を用いて発色を確認した⁸⁾。

Ⅲ. 結果

GM-CSF 添加による培養 9 日目のマクロファージ (GM-CSF-dependent macrophages) を好中球エラスターゼ (50 μM) で刺激すると, 刺激後 6 時間目の細胞融解液中の IRF5 は有意に減少した (図 1)。同様に, 細胞融解液中の p53 も有意に減少した (図 2)。また, GM-CSF-dependent macrophages (day 9) に p53 siRNA と移入すると p53 の発現量

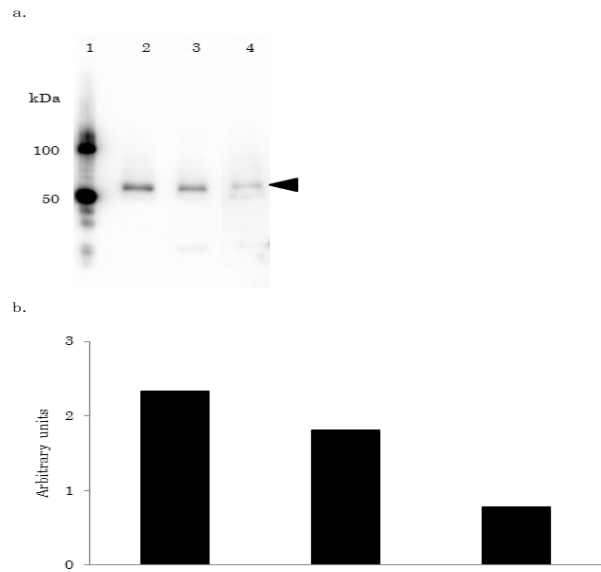


図3. p53 siRNA 及び好中球エラスターゼによる p53 の発現抑制効果

2. GM-CSF-dependent macrophages (day 9)
3. GM-CSF-dependent macrophages (day 9) + p53 siRNA (50 nM)
4. GM-CSF-dependent macrophages (day 9) + p53 siRNA (50 nM) + HNE (50 μM)

GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

HNE: human neutrophil elastase

Si RNA: small interfering RNA

a. representative western blotting

b. arbitrary density units

が減少した。そして, 好中球エラスターゼ (50 μM) を追加投与すると, 更に p53 の発現量が減少した (図 3)。次に, PAR-2 の agonist である AC-264613 の効果について検討した。その結果, AC-264613 の投与で p53 の発現量が有意に抑制された (図 4)。また, 好中球エラスターゼ刺激による IRF5 の産生抑制効果について, 細胞内シグナル伝達経路に含まれる β arrestin 2 について検討した。その結果, β arrestin 2 siRNA の移入により IRF5 の産生は有意に抑制された (図 5)。更に, LPS 刺激による IL-12p40 の産生を検討した。無刺激のマクロファージに比較して LPS 投与により有意に IL-12p40 の産生量が増加した。しかし, IRF5 siRNA を移入したマクロファージでは, LPS 刺激による IL-12p40 の産生量が有意に抑制された (図 6)。次

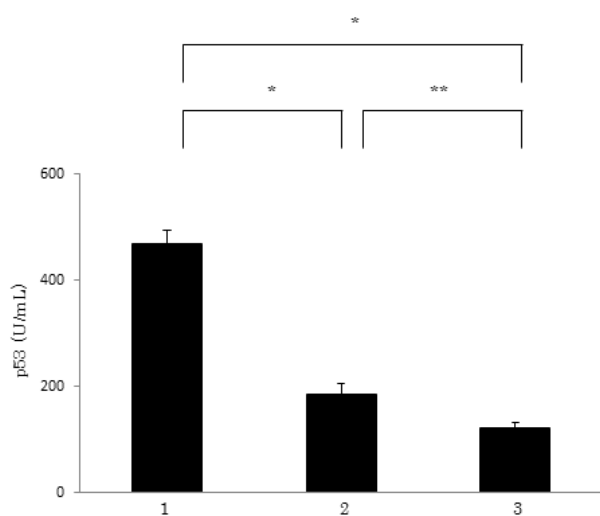


図4. PAR-2 agonistである好中球エラスターゼ及び AC-264613による p53発現抑制効果の比較

1. GM-CSF-dependent macrophages (day 9)
2. GM-CSF-dependent macrophages (day 9) +HNE (50 μ M)
3. GM-CSF-dependent macrophages (day 9) +AC-264613(10 μ M)

GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

HNE: human neutrophil elastase

Data=mean \pm S.E. n=3 *P<0.01 **P<0.05

に、LPS 刺激による IL-12p40の産生に対する PAR-2 antagonists の効果を検討した。AC-264613の前投与で LPS 刺激による IL-12p40の産生は有意に抑制された。しかし、好中球エラスターゼを前投与したマクロファージでは、LPS 刺激による IL-12p40の産生量が有意に増加した(図7)。

IV. 考察

GM-CSF 刺激により単球から分化したマクロファージ(培養9日目)では IRF5の発現増強が認められた。GM-CSF 刺激のよるマクロファージは通常7日間培養した細胞が使用されるが、我々は、Coomassie Brilliant Blue 染色により7日目に比較して9日目のマクロファージでは産生される蛋白分画がより一定していることを報告した⁸⁾。そこで、本研究では培養9日目の GM-CSF-dependent

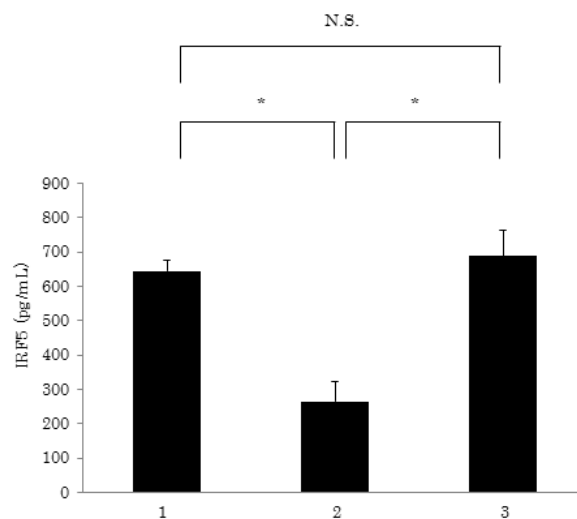


図5. 好中球エラスターゼ刺激による IRF5産生抑制効果と β arrestin 2

1. GM-CSF-dependent macrophages (day 9)
2. GM-CSF-dependent macrophages (day 9) +HNE (50 μ M)
3. GM-CSF-dependent macrophages (day 9) + β arrestin 2 siRNA (50nM) +HNE (50 μ M)

GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

HNE: human neutrophil elastase IRF5: interferon regulatory factor 5

siRNA: small interfering RNA

Data=mean \pm S.E. n=3 *P<0.01 N.S.: not significant

macrophages (day 9) を使用した。興味あることに、好中球エラスターゼで6時間刺激すると、IRF5のタンパク発現量が減少することが判明した。IRF5mRNA の発現は、p53が IRF5のエキソン2の p53 binding site (p53BS) に結合することによって活性化されることが報告⁴⁾されており、本研究では好中球エラスターゼ刺激により p53の発現量が低下するとの仮説に従って、まず、好中球エラスターゼ刺激による p53の発現量を検索した結果、好中球エラスターゼ刺激によりマクロファージの p53の発現量は有意に低下することが判明した。次に、p53 siRNA 及び好中球エラスターゼ刺激による IRF5の発現量を western blotting を用いて検討した。p53 siRNA の移入により IRF5の発現量が低下した。更に、好中球エラスターゼを追加投与すると、更にそ

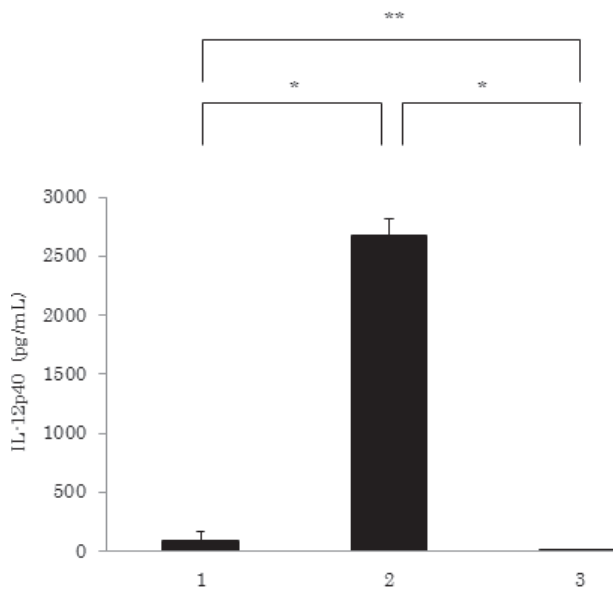


図 6. LPS 刺激による IL-12p40 産生に対する IRF5 siRNA の抑制効果

1. GM-CSF-dependent macrophages (day 9)
2. GM-CSF-dependent macrophages (day 9) + LPS (50ng)
3. GM-CSF-dependent macrophages (day 9) + IRF5 siRNA (50nM) + LPS (50ng)

GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

IRF5: interferon regulatory factor 5

LPS: lipopolysaccharide

Data=mean ± S.E. n=3 *P<0.01 **P<0.05

の発現量が低下した。この結果、好中球エラスターゼ刺激により p53 が低下することで IRF5 の発現量の低下につながったものと推察された。好中球エラスターゼは protease-activated receptor-2 (PAR-2) を介して細胞内にシグナルを伝達することから、PAR-2 receptor agonist である AC-264613 でも同様の作用を有るかを検討した。その結果、AC-264613 投与より p53 の発現抑制効果が認められた。以上の結果より、IRF5 の発現には p53 が深く関与していることが判明したが、PAR-2 を介する細胞内シグナル伝達経路の中で、どのようなシグナルが IRF5 の発現に関わっているかを検討した。その中で、細胞質内に存在する骨格蛋白質（足場蛋白）の一つである β arrestin 2 の効果について検証した。G タンパク質共役型受容体 (GPCR) である PAR-2 が

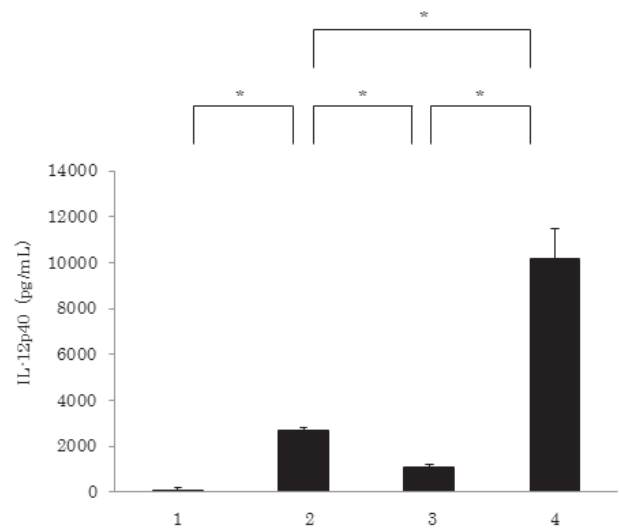


図 7. LPS 刺激による IL-12p40 産生と PAR-2 antagonists の効果

1. GM-CSF-dependent macrophages (day 9)
2. GM-CSF-dependent macrophages (day 9) + LPS (50ng)
3. GM-CSF-dependent macrophages (day 9) + AC-264613 (10 μM) + LPS (50ng)
4. GM-CSF-dependent macrophages (day 9) + HNE (50 μM) + LPS (50ng)

GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

LPS: lipopolysaccharide

PAR-2: protease-activated receptor-2

Data=mean ± S.E. n=3 *P<0.0

agonist により活性化されると、 β arrestin 2 が GPCR に結合し、GPCR の過剰な活性化を抑制する。しかし、 β arrestin 2 が G タンパク質非依存的なシグナル伝達を活性化することが明らかとなっている⁹⁾。つまり、PAR-2 を介する細胞内シグナル伝達には、G タンパク質依存的シグナル伝達と β arrestin 依存的シグナル伝達が存在する。本研究では、好中球エラスターゼ刺激により IRF5 の発現が有意に減少したが、 β arrestin 2 siRNA を移入したマクロファージでは、好中球エラスターゼで刺激しても IRF5 の発現量が減少しないことより、IRF5 発現抑制に β arrestin 2 が深く関与していることが判明した。

IRF5 は toll-like receptor (TLR) シグナル伝達に反応し、IL-6、IL-12 及び TNF- α などの炎症性サ

イトカインの誘発する。IRF-5は Toll 様受容体 (TLR) シグナルのアダプターである MyD88 と会合し, MyD88-TRAF6 依存性に活性化されて炎症性サイトカインである TNF- α や IL-6, IL-12 の遺伝子発現誘導に関与すること, また, IRF5 遺伝子欠損マウスでは, IL-12 の産生が抑制されることが報告されている¹⁰⁾。そこで, LPS 刺激による IL-12p40 産生量に対する PAR-2 agonists である好中球エラストラーゼと AC-264613 の効果について検討した。その結果, AC-264613 前投与により LPS 刺激による IL-12p40 産生は有意に抑制された。しかし, 好中球エラストラーゼの前投与では, LPS 刺激による IL-12p40 の産生は有意に増加するという相反する効果が認められた。LPS は主に, TLR4 を介して細胞内にシグナルを伝達する。一方, PAR-2 は TLR4 の活性化を増強する cross talk が存在することが報告されている¹¹⁾。この相違点について, 好中球エラストラーゼで, 細胞外に露出している N 末端ペプチド鎖が特定部位で切断され, 新しく精製された N 末端構造が tethered ligand として GCPR の細胞外第 2 ループに結合することによって, PAR-2 が活性化される。一方, AC-264613 は化学的に合成された物質で, ホスファチジルイノシトール (phosphatidylinositol) の加水分解やカルシウム動員作用¹²⁾ などから PAR-2 agonist に属するが, tethered ligand による PAR-2 の活性化という点で, PAR-2 agonists である好中球エラストラーゼと AC-264613 では細胞内シグナル伝達経路に相違点が存在する可能性がある。この点については, 更なる検討が必要と思われる。

V. 結語

PAR-2 agonists である好中球エラストラーゼ及び AC-264613 によりマクロファージにおける p53 の発現量が抑制され, p53 依存性の IRF5 の産生が抑制された。また, 好中球エラストラーゼによる p53 発現の抑制機序に β arrestin 2 が関与していることが示唆された。AC-264613 投与で LPS 刺激による IL-12p40 産生が有意に抑制された。しかし, 好中球エラストラーゼ刺激では逆に IL-12p40 産生量は有意に増加した。この要因の一つとして, PAR-2 と TLR4 の cross talk の存在が考えられた。

謝辞

本研究を進めるにあたり, ご指導頂いた山口類先生 (Western blotting), 坂本亜里紗先生 (HNE 刺激), 植原真二先生 (siRNA 導入), 杉内博幸先生 (統計処理), 山口康雄先生 (研究統括) に深謝致します。また, 本研究は熊本保健科学大学研究費 27-A-01 により実施された。

本研究における離席相反は存在しない。

文献

- 1) Hu G, Barnes BJ. IRF-5 is a mediator of the death receptor-induced apoptotic signaling pathway. *J Biol Chem*, 284 : 2767-2777, 2009.
- 2) Couzinet A, Tamura K, Chen HM, et al: A cell-type-specific requirement for IFN regulatory factor 5 (IRF5) in Fas-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 : 2556-2561, 2008.
- 3) Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ, et al: The role of p53 in apoptosis. *Discov Med*, 9: 145-152, 2010.
- 4) Mori T, Anazawa Y, Iizumi M, et al: Identification of the interferon regulatory factor 5 gene (IRF-5) as a direct target for p53. *Oncogene*, 21: 2914-2918, 2002.
- 5) Luo R, Wang X, Dong Y, et al: Activation of protease-activated receptor 2 reduces glioblastoma cell apoptosis. *J Biomed Sci*, 21: 25-30, 2014.
- 6) Strieter RM, Remick DG, Lynch JP 3rd, et al: Differential regulation of tumor necrosis factor-alpha in human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes: a cellular and molecular analysis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1: 57-63, 1989.
- 7) Aoki M, Yamaguchi R, Yamamoto T, et al: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor primes interleukin-13 production by macrophages via protease-activated receptor-2. *Blood Cells Mol Dis*, 54 :353-359, 2015.
- 8) Yamaguchi R, Yamamoto T, Sakamoto A, et

- al: Mechanism of interleukin-13 production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent macrophages via protease-activated receptor-2. *Blood Cells Mol Dis*, 55 :21-26, 2015.
- 9) Luttrell LM, Lefkowitz RJ: The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci*, 115: 455-465, 2002.
- 10) Takaoka A, Yanai H, Kondo S, et al: Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature*. 434:243-249, 2005.
- 11) Bucci M, Vellecco V, Harrington L, et al: Cross-talk between toll-like receptor 4 (TLR4) and proteinase-activated receptor 2 (PAR(2)) is involved in vascular function. *Br J Pharmacol*, 168:411-420, 2013.
- 12) Gardell LR, Ma JN, Seitzberg JG, et al: Identification and characterization of novel small-molecule protease-activated receptor 2 agonists. *J Pharmacol Exp Ther*, 327: 799-808, 2008.

(平成28年 2月10日受理)

AC-264613, a protease-activated receptor 2 agonist, suppresses interferon regulatory factor 5

Takatoshi YAMAMOTO, Rui YAMAGUCHI, Arisa SAKAMOTO,
Shinji NARAHARA, Hiroyuki SUGIUCHI, Yasuo YAMAGUCHI

The transcription factor interferon regulatory factor 5 (IRF5) has a key role in the production of interleukin (IL)-12 by macrophages. IRF5 is also a central mediator of Toll-like receptor signaling and is a direct target of p53. This study investigated the influence of human neutrophil elastase (HNE) and PAR-2 agonists on expression of IRF5 and IL-12p40 by macrophages stimulated with LPS. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-dependent macrophages showed upregulation of IRF5 expression, while HNE reduced expression of p53 and IRF5. HNE also caused a decrease of IRF5 in macrophages transfected with small interfering RNA to silence p53, while silencing of beta-arrestin 2 blunted the reduction of p53 or IRF5 by HNE. Incubation of macrophages with PAR-2 agonist, AC-264613, caused a decrease of IRF5 expression and also significantly reduced p53 protein expression. LPS caused upregulation of IL-12p40 production, while silencing of IRF5 blunted the increase of IL-12p40 in response to LPS. HNE did not affect this response to LPS, but AC-264613 significantly reduced IL-12p40 production after stimulation with LPS. In conclusion, the PAR-2 agonist AC-264613 attenuated IL-12p40 production associated with IRF5 signaling in macrophages.