

[総説]

細胞表面受容体 PAR-2/EGFR/TLR4 の transactivation

山口 類^{1, 2, *} 山口 康雄¹

Transactivation of cell surface receptor PAR-2/EGFR/TLR4

Rui YAMAGUCHI, Yasuo YAMAGUCHI

要旨

プロテアーゼ活性化型受容体 (Protease-activated receptor 2 :PAR-2) と Toll 様受容体 (Toll-like receptor : TLR4) は自然免疫に深く関与している。そして、受容体間で情報の応答 (cross-talk) が行われている。本稿では、マクロファージの IL-12p40 産生モデルを用いて、これらの受容体間のシグナル伝達における協調作用について概説する。

ヒト末梢血単球を granulocyte macrophage colony-stimulating factor: GM-CSF で刺激すると PAR-2 の発現が経日的に増加する。また、lipopolysaccharide: LPS でマクロファージを刺激すると、IL-12p40 の産生が用量依存性に増強する。一方、PAR-2 のリガンドであるヒト好中球エラスターゼ (human neutrophil elastase: HNE) で刺激してもマクロファージから IL-12p40 の産生増強は認められない。しかし、マクロファージを HNE で前処置後に LPS で刺激すると相乗的に IL-12p40 の産生が増強する現象が認められる。この相乗効果は、TLR4 の低分子干渉 RNA (small interfering RNA: siRNA) を導入したマクロファージでは消失する。また、Phospholipase C の阻害剤 (U73122) や protein kinase C (PKC) 阻害剤 (Rottlerin) を投与するとこの相乗効果は消失する。 β -arrestin 2 は G タンパク質共役受容体のエンドサイトーシスに関与し、そして細胞外シグナル調節キナーゼである extracellular signal-regulated Kinase: ERK1/2 を活性化する。また、PKC により NADPH oxidases が活性化する。 β -arrestin 2, p22phox, DUOX2, 或いは ERK1/2 の siRNA をマクロファージに導入すると IL-12p40 の産生は阻害される。TNF receptor associated factor 6 (TRAF 6 は) TLR シグナルに重要なアダプター分子である。この TRAF 6 の siRNA を導入すると、IL-12p40 の産生が抑制される。

キーワード：好中球エラスターゼ、プロテアーゼ活性化型受容体、Toll 様受容体

I. 緒言

シグナリング分子の働きをするリン脂質誘導体であるリゾフォスファチジン酸、血管内皮細胞由来のペプチドで強力な血管収縮作用を有するエンドセリン、心臓の収縮力を高め細動脈を収縮させるアンジオテンシン II などによる G 蛋白共役型受容体

(GPCR) の活性化に伴って、上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) が活性化される現象を EGFR transactivation と呼ぶ。この過程で EGFR ligands のシェディング (shedding) が中心的な役割を果たしていることが近年明らかになってきている。細胞間情報伝達機能を担う分子群のある種のものは、細胞外からの刺激に伴って酵素

学科

¹熊本保健科学大学大学院保健科学研究科

²熊本大学大学院医学教育部公衆衛生学分野

*責任著者：yamaguchi.rui@kumamoto-hsu.ac.jp

的な切断を受け、細胞外に放出される。この過程はエクドメイン・シェディング (ectodomain shedding) と呼ばれ、膜蛋白質を細胞膜にアンカーされた状態から細胞外に遊離させることで、分子の存在状態を劇的に変化させる。一方、プロテアーゼ活性化型受容体 (protease-activated receptors: PARs) の一つである PAR-2は好中球エラスターゼ刺激により、tumor necrosis factor- α converting enzyme (TACE) の活性化或いは活性酸素 (reactive oxygen species: ROS) の産生に伴い pro-transforming growth factor (TGF) - α が切断され EGFR の活性化によりムチンが産生されることが報告された¹⁾。

Toll-like receptor (TLR) は病原体を感知して自然免疫を作動させる。ヒトでは10種類存在し、ウイルスや細菌などの病原体のもつ特異的分子により活性化されて二量体を形成することで機能する。また、EGFR kinase が TLR4シグナルに必要であることが報告され²⁾、EGFR と TLR の密接な関連性が示唆された。TLR4は病原体に特徴的な分子を認識する TLR の一つで、グラム陰性菌の外膜の成分であるリポ多糖 (LPS)³⁾ やグラム陽性菌のペプチドグリカン層にあるリボテイコ酸をリガンド⁴⁾ として認識する受容体である。また TLR4と PAR-2の cross-talk の存在が報告された⁵⁾。このような事実より、PAR-2/EGFR/TLR4のレセプター間の密接な情報伝達による関連性が示唆される。

好中球が活性化すると elastase, proteinase 3, cathepsin G などの proteases が遊離する。多臓器不全を引き起こし致死率の高い敗血症を伴う重症急性性肺炎では、血中好中球エラスターゼ濃度が重要な指標のひとつであることを我々は報告した⁶⁾。敗血症や全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome: SIRS) に伴う病態に対し、選択的好中球エラスターゼ阻害剤が効果的であることが報告されている⁷⁾。PAR-2の活性化を誘発する proteases の一つが好中球エラスターゼである。従って、感染症で活性化された好中球より分泌されるエラスターゼにより PAR-2が活性化される。更に感染症はその遷延に伴い PAR-2/EGFR/TLR4の transactivation により、更に重症化の一途を辿る危険性がある。本稿では、PAR-2/EGFR/TLR4の密接な関連性について概説する。

II. プロテアーゼ活性化型受容体 (protease-activated receptors: PARs)

PARs は G 蛋白共役型受容体 (G protein-coupled receptor: GPCR) ファミリーに属する 7 回膜貫通型受容体である。7つの α ヘリックス構造が細胞質膜を貫通し、N 末端は細胞外に、そして C 末端領域は細胞内に位置する。その活性化メカニズムはセリンプロテアーゼによって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、新しく作り出された N 末端構造が tethered ligand として受容体自身を活性化する (図 1)。

III. G タンパク質

G タンパク質グアニンヌクレオチド結合タンパク質 (guanine nucleotide-binding proteins : G proteins) の略称であり、細胞内の生化学的反応をグアノシン三リン酸 (GTP) をグアノシン二リン酸 (GDP) へ切り替えるスイッチである。GPCR に共役している G タンパク質は α , β , γ の三つのサブユニットの複合体 (ヘテロ三量体 G タンパク質) であり、 β と γ サブユニットは常に複合体で挙動する。GPCR にリガンドが結合し活性化すると、 G_a は GDP

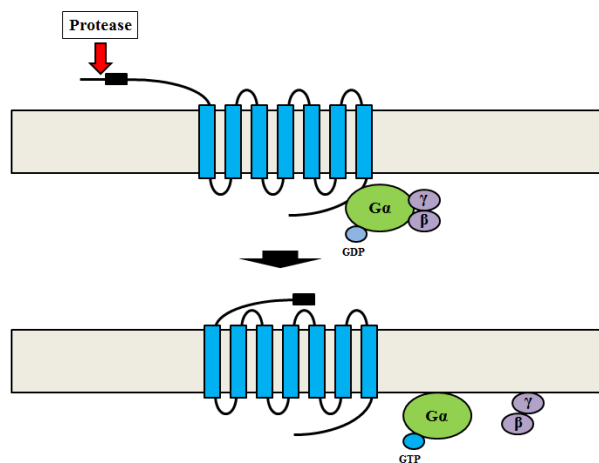


図 1. Neutrophil protease による protease-activated receptor の活性化と G タンパク質の挙動

Neutrophil elastase により N 末端ペプチド鎖が切断され、protease-activated receptor が活性化される。その後、G タンパク質が活性化型へ変化する。G α : GTP-binding protein α subunit, GDP: guanine diphosphate, GTP: guanine triphosphate.

を GTP へ交換し、さらに $G_{\beta\gamma}$ から解離し活性型となる (図 1)。解離した G_{α} と $G_{\beta\gamma}$ はそれぞれの効果器にシグナルを伝える。ヒト好中球エラスターゼ (human neutrophil elastase: HNE) 刺激で活性化した PAR-2 は G_{α} を介して phospholipase C (PLC) を活性化する (図 2)。PLC は、リン酸エステル基の直前でリン脂質を切断する酵素群の総称である。

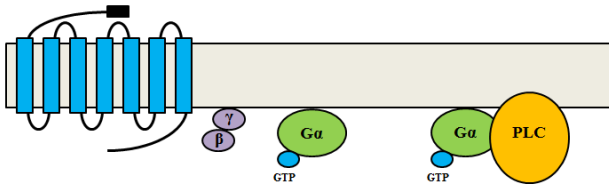


図 2. PAR-2 の活性化に伴う phospholipase C の活性化

PAR-2 の活性化に伴い G_{α} と $G_{\beta\gamma}$ が解離し G_{α} を介して phospholipase C (PLC) が活性化する。GDP: guanine diphosphate, GTP: guanine triphosphate, G_{α} : GTP-binding protein α subunit, PAR: protease-activated receptor, PLC: phospholipase C.

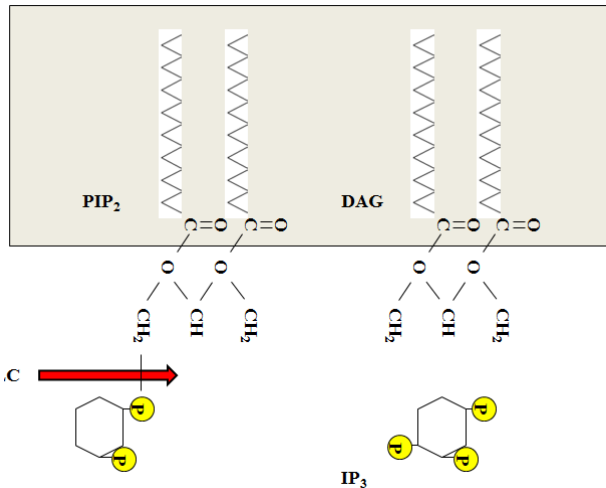


図 3. Phospholipase C (PLC) によるイノシトール 1,4,5- トリスリン酸 (IP_3) の切離

PLC によるホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸 (PIP_2) のイノシトール 1,4,5- トリスリン酸 (IP_3) の切離により、 IP_3 は細胞質ゾルへ放出され、ジアシルグリセロール (DAG) は膜内に残存する。DAG: diacylglycerol, PIP_2 : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, IP_3 : inositol trisphosphate, PKC: protein kinase C, PLC: phospholipase C.

IV. Phospholipase C (PLC)

G_{α} により活性化した PLC により、ホスファチジルイノシトール 4,5- ビスリン酸 (PIP_2) はジアシルグリセロール (DAG) およびイノシトール 1,4,5- トリスリン酸 (IP_3) へと切断される。DAG は膜に結合したまま留まり、 IP_3 は細胞質ゾルへと放出される (図 3)。次に、 IP_3 は細胞質ゾルを介して拡散し、小胞体 (ER) にある特有のカルシウムチャネルであるイノシトールトリスリン酸受容体 (inositol trisphosphate receptor: IP_3R) に結合する。これによって、 Ca^{2+} の細胞質ゾル濃度が上昇し、細胞内変化および活性化のカスケードが引き起こされる。加えて、 Ca^{2+} および DAG はプロテインキナーゼ C (protein kinase C: PKC) を活性化する (図 4)。PKC はその他のタンパク質分子をリン酸化し、細胞活性を変化させる。ヒト末梢血単球をヒト好中球エラスターゼ (human neutrophil elastase: HNE) で刺激すると IL-10 mRNA の発現が増強する。しかし、phospholipase C inhibitor (U73122) で前処置すると HNE 刺激による IL-10 mRNA の発現が減弱する (図 5) ことを我々は報告した⁸⁾。

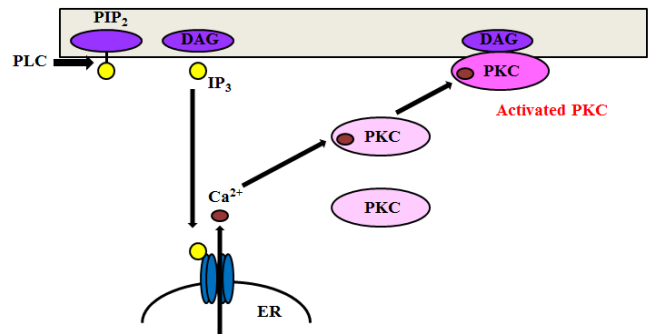


図 4. Phospholipase C (PLC) 活性化に伴う Ca^{2+} の動員と protein kinase C (PKC) の活性化

PLC 活性化により細胞質内へ遊離した IP_3 は粗面小胞体 (ER) の IP_3 受容体に結合すると ER 内から細胞質へ Ca^{2+} が放出される。また、 Ca^{2+} により PKC が活性化される。更に DAG により PKC の活性化が起こる。DAG: diacylglycerol, ER: endoplasmic reticulum, PIP_2 : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, IP_3 : inositol trisphosphate, PKC: protein kinase C, PLC: phospholipase C.

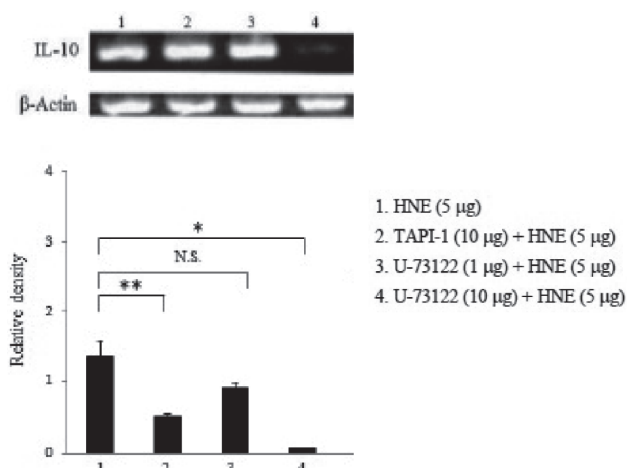


図 5. U-73122 (PLC inhibitor) による IL-10 mRNA 発現の抑制効果

ヒト末梢血単球を HNE で刺激すると, IL-10 mRNA が発現する。しかし, PLC inhibitor である U-73122 で前処置を行うと, IL-10 mRNA の発現が有意に抑制された。

PCR 産物は β actin で補正し, relative density とした。HNE: human neutrophil elastase, PLC: phospholipase C, TAPI-1; TACE/ADAM17 inhibitor. Data=mean \pm S.E. n=3 *P<0.01; **P<0.05; N.S. not significant

V. Protein kinase C (PKC)

PKC はセリン・スレオニンキナーゼの 1 つで, 細胞質に 80%, 細胞膜に 20% が存在する。また PKC は 3 つのサブタイプに分類される (表 2)。表 3 に示す PKC アイソフォーム選択的阻害剤を用いて, HNE 刺激におけるヒト末梢血単球の IL-10 mRNA の発現を検索した。その結果, Ro-318425 (conventional PKC inhibitor) 及び PKC θ/δ inhibitor により HNE 刺激による IL-10 mRNA の発現が抑制されることが判明した (図 6)。

VI. Protease-activated receptors (PARs) と各種 proteases の相互関係

PARs ファミリーは, PAR-1, PAR-2, PAR-3, PAR-4 に分類される。好中球由来のプロテアーゼには, elastase, proteinase 3, Cathepsin G などが含まれる。これらのプロテアーゼで活性化される PARs は限定される (表 1)。実際に, transwell

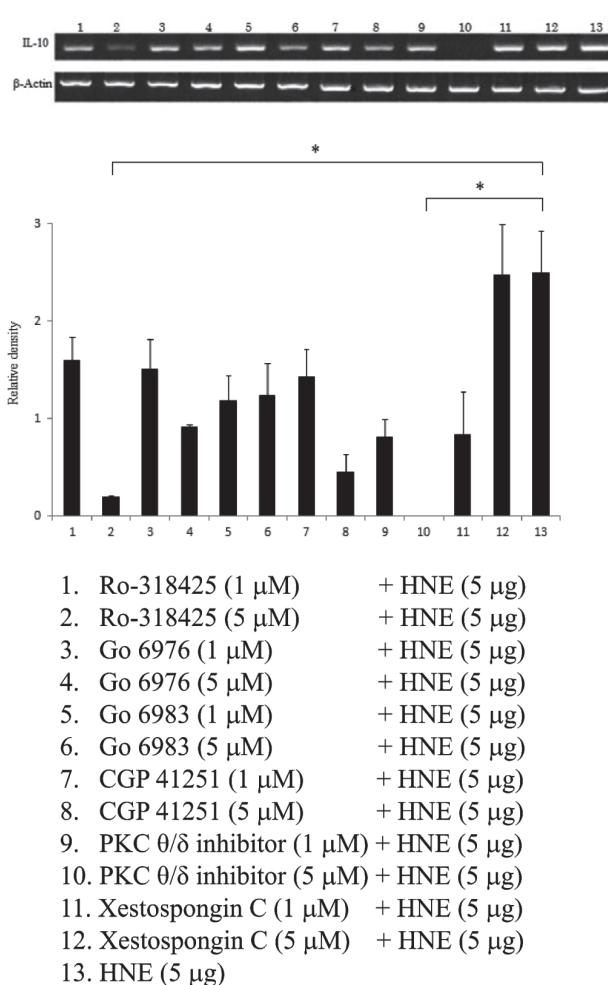


図 6. HNE 刺激によるヒト末梢血単球の IL-10 mRNA の発現

各種 PKC アイソフォーム選択的阻害剤 (表 3) による IL-10 mRNA の発現に及ぼす影響を示す。Ro-318425 (conventional PKC inhibitor) 及び PKC θ/δ inhibitor により IL-10 mRNA の発現が有意に抑制される。PCR 産物は β actin で補正し relative density とした。HNE: human neutrophil elastase, PKC: protein kinase C. Data=mean \pm S.E. n=3 *P<0.01

system を用いて, 上層に phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 刺激で活性化したヒト好中球, そして細胞が通過不可能な半透膜を隔てた下層にヒト末梢血単球を置いて, 単球における各種サイトカインの mRNA の発現を RT-PCR 法にて比較検討すると, 活性化好中球刺激群と HNE 単独刺激群では IL-10 及び IFN- γ mRNA の発現 (図 7) に有意差が認められた⁹⁾。

VII. IL-12p40

IL-12は4つの α ヘリックス構造からなるサイトカインである。つまり、IL-12p35とIL-12p40からなるヘテロ二量体(p70)とIL-12p40のホモ二量体が存在する。IL-12p40はT細胞応答を制御する重要なサイトカインの一つである^{10, 11)}。また、IL-23(p40/p19)はIL-23p19とIL-12と共通のサブユニットであるIL-12p40で構成されている。またIL-23はTh17細胞への分化を誘導し、Th17細胞の増殖・維持に必要である¹²⁾。Lipopolysaccharide (LPS)

刺激によりTLRを介してmacrophagesよりIL-12p40が産生される¹³⁾。しかし、HNE刺激ではmacrophagesにIL-12 mRNAの発現が認められないことを我々は報告した¹⁴⁾。そこで、ヒト末梢血単球を用いてGM-CSF-dependent macrophagesを作製し、LPS刺激によるIL-12p40の産生機序に関するPAR-2/TLRのレセプター間の情報伝達の連携について検索した。

表1. 好中球由来のプロテアーゼとそれに反応する各種PARsとの相互関係

PARs: Protease-activated receptors			
PARs	Proteases		
PAR-1	Elastase	Cathepsin G	
PAR-2	Elastase	Cathepsin G	Proteinase 3
PAR-3			
PAR-4		Cathepsin G	

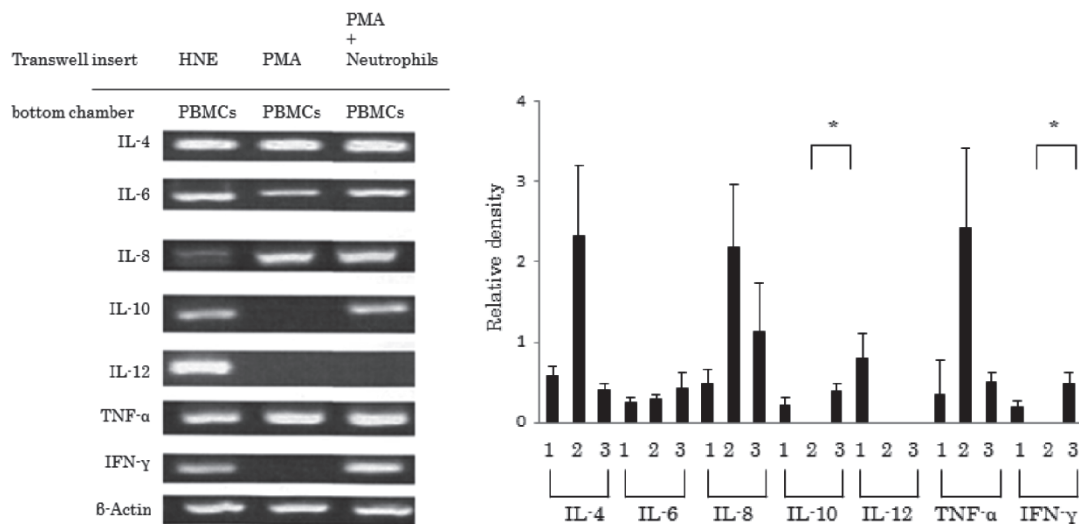


図7. Transwell systemを用いた活性化好中球刺激によるヒト末梢血単球の各種サイトカイン mRNA の発現

Transwell systemの上層にPMA刺激で活性化したヒト好中球、そして細胞が通過不可能な半透膜で隔てた下層にヒト末梢血単球を置いて、単球における各種サイトカインのmRNAの発現をRT-PCR法にて比較検討すると、活性化好中球刺激群とHNE単独刺激群ではIL-10及びIFN- γ mRNAの発現に有意な差が認められた。PCR産物を β actinで補正し、relative densityとした。HNE: human neutrophil elastase, IL: interleukin, TNF: tumor necrosis factor, IFN: interferon, PBMCs: peripheral blood mononuclear cells, PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate, RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction. Data=mean \pm S.E. n=3, *P<0.01

VIII. マクロファージの分化と PAR-2の発現

Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) により monocytes は

macrophages へと分化する。GM-CSF-dependent macrophages を用いた研究では、通常 GM-CSF 添加・培養 7 日後の macrophages が実験に使用されている。我々はヒト末梢血単球分離後、3 日目の

表 2. PKC の分類とその isoforms

PKC subfamily	Isoforms				Activating factors
conventional-PKC	α	β I	β II	γ	Ca ²⁺ , DAG, PS
novel-PKC	δ	ϵ	η	θ	DAG, PS
atypical-PKC	ζ	ι			PS

Ca²⁺: calcium

DAG: diacylglycerol

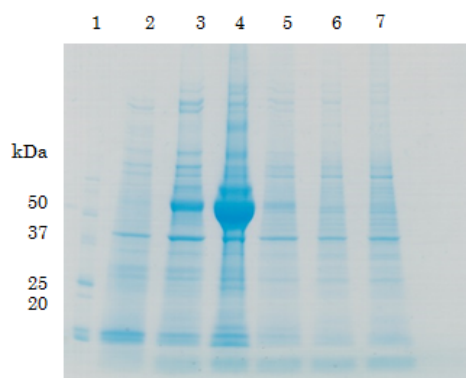
PS: phosphatidylserine

表 3. PKC isoforms とそのアイソフォーム選択的阻害剤

Reagents	PKC isoforms				
Ro318425	PKC β I	PKC β II	PKC γ		
Go6976	PKC β I				
Go 6983	PKC β I		PKC γ	PKC δ	
CGP41251	PKC β I	PKC β II	PKC γ	PKC δ	
PKC θ / δ inhibitor				PKC δ	PKC θ

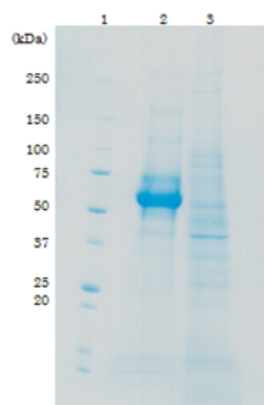
PKC: protein kinase C

a.



1. Markers
 2. GM-CSF-dependent macrophages (0 day)
 3. GM-CSF-dependent macrophages (1 day)
 4. GM-CSF-dependent macrophages (3 day)
 5. GM-CSF-dependent macrophages (7 day)
 6. GM-CSF-dependent macrophages (9 day)

b.



1. Markers
 2. Monocytes (day 0)
 3. Adherent macrophages treated with GM-CSF (day 9)

図 8. GM-CSF 刺激におけるマクロファージの分化過程におけるタンパク分画の経日的推移

ヒト末梢血単球を GM-CSF で刺激した培養細胞の細胞融解液の CBB 染色による経日的推移を示す。培養 0 日目と 9 日目では顕著な相違が認められた。(a) 培養 0 日～9 日目の CBB 染色 (b) monocytes と GM-CSF-dependent macrophages (9 day of culture) の比較 CBB: coomassie brilliant blue, GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.

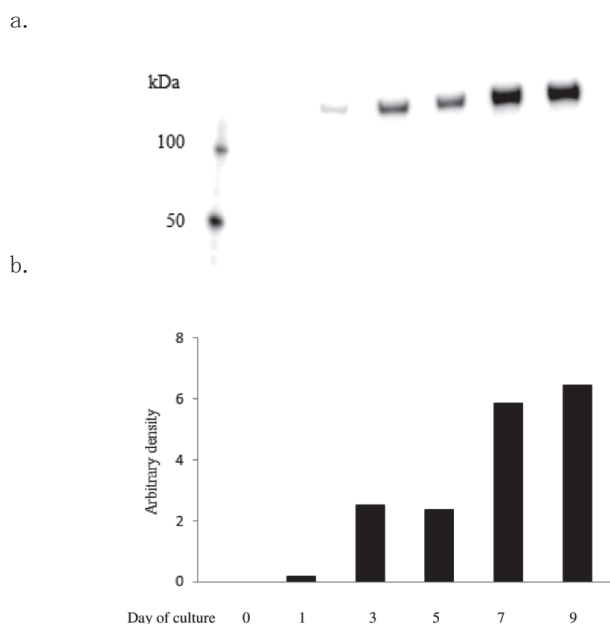


図9. GM-CSF-dependent macrophages における mannose receptor (CD206) 発現の経日的推移

CD206の発現の western blotting による経日的変化を示す。(a) Representative blot (b) Arbitrary density units GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, CD; cluster of differentiation, CD206: mannose receptor.

adherent monocytes に GM-CSF (10 ng) を添加し、そして6日目に培養液を交換し、更に GM-CSF (10 ng) を添加し、9日目の培養細胞を GM-CSF-dependent macrophages として我々の実験に用いた¹⁵⁾。このような分化過程におけるタンパク分画の経日的変化を CBB 染色 (coomassie brilliant blue staining) で検索すると、図8に示すような経日的タンパク分画の推移が得られた。培養0日目と9日目のタンパク分画に著明な相違が認められる。また、macrophages の分化に伴い各種の表面マーカーが表出する。その代表的表面マーカーである mannose receptor (CD206) の発現 (図9) も経日的に増加していることが確認された¹⁶⁾。また、macrophages の分化に伴い PAR-2が経日的に増加する (図10) こと、また培養7日目と9日目の PAR-2の発現には有意な差が認められた¹⁷⁾。

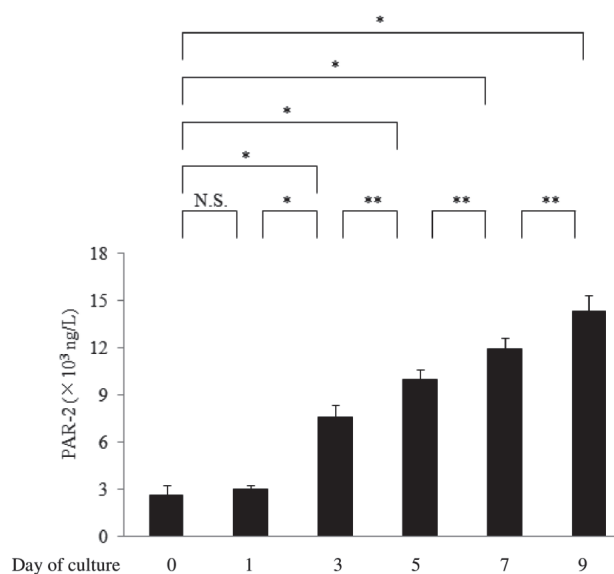


図10. GM-CSF-dependent macrophages における PAR-2の経日的発現動態

GM-CSF 刺激による macrophages の細胞溶解液中の経日的 PAR-2濃度の変化を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で測定した。GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, PAR-2: protease-activated receptor 2. Data=mean \pm S.E. n=3, *P<0.01; **P<0.05; N.S. not significant

Ⅹ. LPS 刺激による GM-CSF-dependent macrophages の IL-12p40産生に対する HNE の増強効果

Human neutrophil elastase (HNE) 刺激で GM-CSF-dependent macrophages (9 day of culture) の IL-12p40の産生は誘導できない。Lipopolysaccharide (LPS) で刺激すると IL-12p40が産生誘導される。興味深いことに GM-CSF-dependent macrophages を HNE で6時間前処置を行い、更に LPS で6時間刺激を行う (HNE + LPS 刺激群) と、LPS 単独刺激群と比較して、IL-12p40の産生が有意に増強する (図11) ことを我々は報告した^{17, 18)}。また HNE 前処置による IL-12p40の増強効果は用量依存性であった (図12)。この増強効果について、PAR-2 agonists である neutrophil protease: HNE と chemical agonist: AC-264613 を用いて、それらの IL-12p40産生増強効果を比較した¹⁸⁾。その結果、増強効果は AC-264613 では認められなかった (図13)。

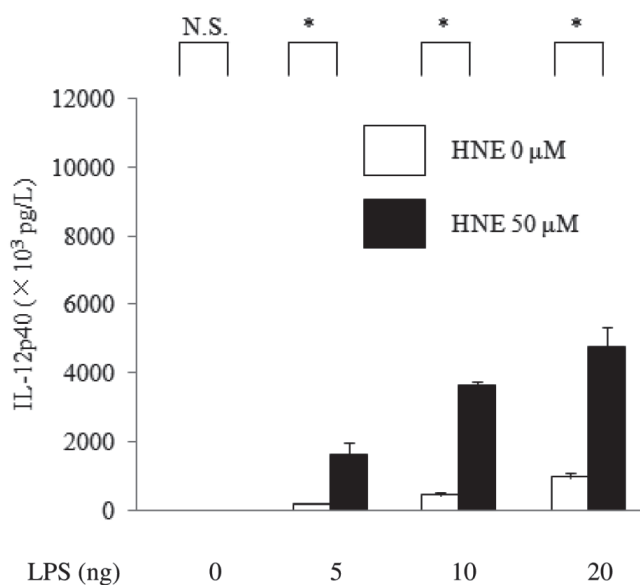


図11. LPS 刺激による IL-12p40 産生に対する HNE の増強効果

GM-CSF-dependent macrophages (9 day of culture) を LPS (10 ng) で 6 時間刺激すると IL-12p40 が産生される。しかし、HNE (50 μM) で macrophages を 6 時間前処置し、その後 LPS (0, 5, 10, 20, 50 ng) で刺激し 6 時間後の細胞融解液中の IL-12p40 濃度を測定すると、LPS 単独刺激群に比較して、HNE+LPS 刺激群では有意な増強効果が認められた。GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, HNE: human neutrophil elastase, LPS: lipopolysaccharide. Data=mean ± S.E. *P<0.01; N.S. not significant

X. LPS 刺激による IL-12p40 産生と TLR4

GM-CSF-dependent macrophages (9 day of culture) を Escherichia coli 0111:B4 lipopolysaccharide (10 ng) で 6 時間刺激すると IL-12p40 が産生される。しかし、HNE (50 μM) で 6 時間前処置を行うと IL-12p40 の産生増強効果が認められる。LPS 刺激によるシグナルは主に TLR4 を介することが報告されている¹⁹⁾。今回我々は、TLR4 siRNA を導入した GM-CSF-dependent macrophages では HNE + LPS 刺激群で IL-12p40 産生が有意に減少することを確認した (図14)。

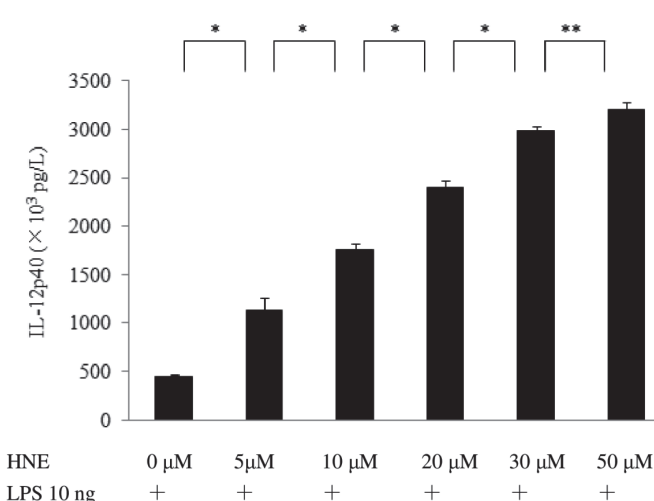


図12. LPS 刺激による IL-12p40 産生に対する HNE の用量依存性増強効果

GM-CSF-dependent macrophages (9 day of culture) を HNE (0, 5, 10, 20, 50 μM) で前処置 (6 時間) し、LPS (10 ng) で 6 時間刺激後の IL-12p40 産生能を検索すると、HNE の用量依存性増強効果が認められた。GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, HNE: human neutrophil elastase, LPS: lipopolysaccharide. Data=mean ± S.E. *P<0.01; **P<0.05

XI. LPS 刺激による IL-12p40 産生と PAR-2

LPS 刺激による IL-12p40 産生の増強効果が HNE 前処置で認められた。HNE 刺激は PAR-2 を介してシグナルが伝達されるため、まず PAR-2 siRNA を導入した GM-CSF-dependent macrophages を HNE で前処置し、そして LPS で刺激すると IL-12p40 の産生増強効果は軽減する (図15)。また、足場タンパク質 (scaffold protein) である β arrestin 2²⁰⁾ はリガンドにより活性化された PAR-2 の G タンパク質共役型受容体 (GPCR) に結合することで GPCR の脱感作を促すことが知られている。一方、G タンパク質非依存性の細胞内シグナル伝達を活性化させることが明らかとなり、biased ligands という新たな概念が提唱された²¹⁾。そこで、HNE 刺激による IL-12p40 の産生増強効果に β arrestin 2 が関与しているかどうかを検証するために、β arrestin 2 siRNA を導入した GM-CSF-dependent macrophages の LPS 刺激を試みた。その結果、IL-12p40 産生増強効果が軽減された。ま

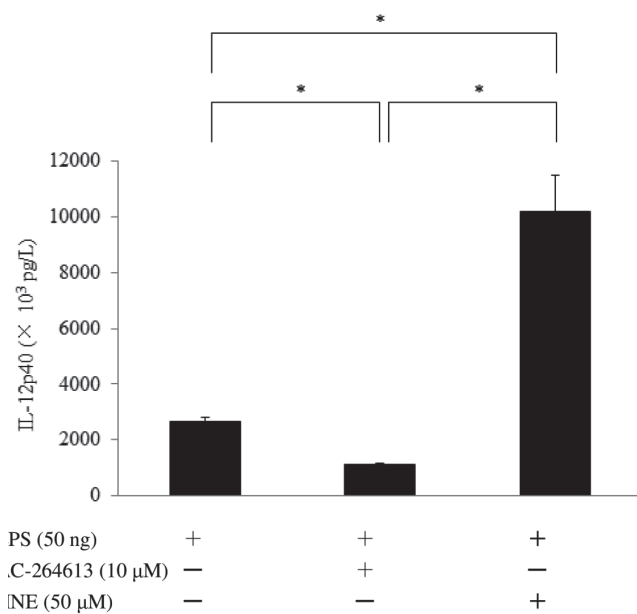


図13. LPS 刺激による IL-12p40 の産生に対する PAR-2 agonists (HNE, AC-264613) の増強効果の比較

GM-CSF-dependent macrophages (9 day of culture) を LPS (10 ng) で刺激すると IL-12p40 が産生される。HNE (50 μM) では IL-12p40 の産生増強効果が認められたが、AC-264613 (10 μM) ではその効果は認められなかった。HNE: human neutrophil elastase, LPS: lipopolysaccharide. Data=mean ± S.E. *P<0.01

た PAR-2 を介して extracellular signal-regulated kinase (ERK) により IL-8 が産生されることが報告²²⁾ されている。そのため、本研究では ERK1/2 siRNA を導入した GM-CSF-dependent macrophages を LPS で刺激する実験を試みた。その結果、ERK1/2 siRNA によりは HNE による IL-12p40 産生増強効果が抑制された (図15)。

XII. Protease-activated receptors (PARs) と reactive oxygen species (ROS)

PARs の活性化に伴う ROS の産生が報告されている²³⁾。ROS の生成制御には、刺激に応答して酸素分子から ROS を生成する nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase (Nox) が極めて重要な役割を果たす。p22phox (phagocyte oxidase: phox) は NADPH oxidase の構成ユニット

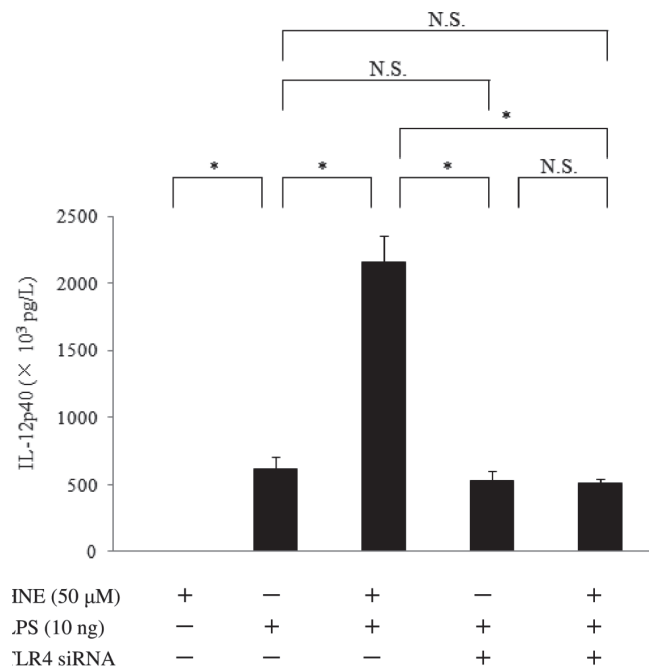


図14. TLR4 siRNA の LPS 刺激による IL-12p40 産生に対する影響

GM-CSF-dependent macrophages (9 day of culture) を LPS (10 ng) で 6 時間刺激すると IL-12p40 が産生される。しかし、HNE (50 μM) で 6 時間前処置を行うと LPS 刺激後の IL-12p40 産生が増強する。しかし、TLR4 siRNA を導入した GM-CSF-dependent macrophages では HNE+LPS 群でも IL-12p40 の産生増強効果は認められなかった。GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, HNE: human neutrophil elastase, LPS: lipopolysaccharide, TLR: toll-like receptor, si: small interfering. Data=mean ± S.E. *P<0.01; N.S. not significant

のひとつである²⁴⁾。そこで、本研究では p22phox が HNE による IL-12p40 の産生増強効果に関与しているのかどうかを検証した。p22phox siRNA を導入した GM-CSF-dependent macrophages を用いて HNE による IL-12p40 の産生増強効果について検索した結果、p22phox が相乗効果に関連性があることが判明した (図15)。

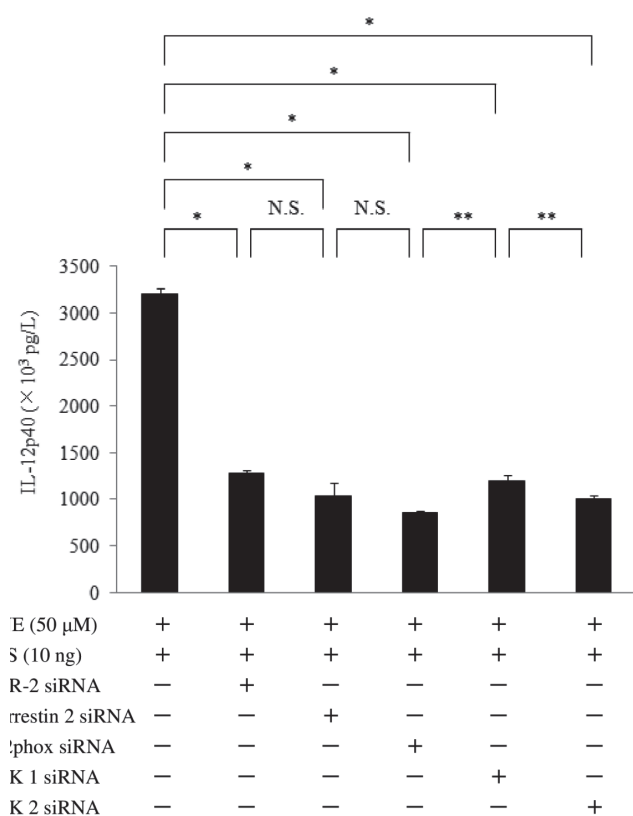


図15. PAR-2, β arrestin 2, p22phox, ERK1/2 siRNA の HNE の IL-12p40産生増強効果に及ぼす影響

PAR-2, β arrestin 2, p22phox, ERK1/2 siRNA を導入した GM-CSF-dependent macrophages (9 day of culture) を HNE 及び LPS で刺激した場合の IL-12p40産生増強効果に及ぼす影響を検討した。ERK: extracellular signal-regulated kinase, HNE: human neutrophil elastase, GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, LPS: lipopolysaccharide. Data=mean \pm S.E. n=3 *P<0.01; **P<0.05; N.S. not significant

XIII. Dual oxidase (DUOX) と protease-activated receptors (PARs)

ROS の生成制御には, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase (Nox) が極めて重要な役割を果たす。これらの Nox に加えて, 遠縁のオキシダーゼとして 2 種類の dual oxidase 1 (DUOX-1), dual oxidase 2 (DUOX-2) が存在する。つまり Nox ファミリー分子は, ヒト

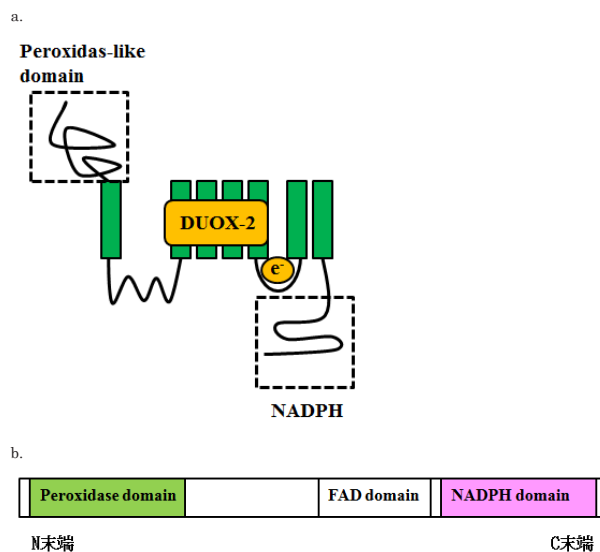


図16. Dual oxidase (DUOX) の構造

DUOX ファミリーの N 末端側は細胞外に位置するペルオキシダーゼ様ドメインをコードしている。C 末端側には FAD 結合部位及び NADPH 結合部位が存在する。DUOX ファミリーは H₂O₂ を生成する。(a) 構造図 (b) 遺伝子上の各ドメインの配列 DUOX: dual oxidase, FAD: flavin adenine dinucleotide, NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.

では 5 種類の Nox (Nox1~5) と 2 種類の Duox (dual oxidase) が存在する。DUOX の名称は C 末端側に HADPH oxidase, N 末端側に peroxidase をもつ (dual oxidase) ことに由来する (図16)。そこで, DUOX-2 siRNA を導入した GM-CSF-dependent macrophages を HNE で前処置を行い, 更に LPS で刺激すると IL-12p40 の産生増強効果が有意に消失した (図17)。このことより, DUOX-2 が HNE の IL-12p40産生増強効果に重要な役割を演じていることが判明した。

XV. Epidermal growth factor receptor (EGFR) と protease-activated receptors (PARs)

PAR-2 と TLR4 間の情報伝達に EGFR が関与しているかどうかを検索する目的で, EGFR siRNA を導入した GM-CSF-dependent macrophages を HNE で前処置し, その後 LPS で刺激した場合 IL-12p40 の産生増強効果は認められなかった。従って,

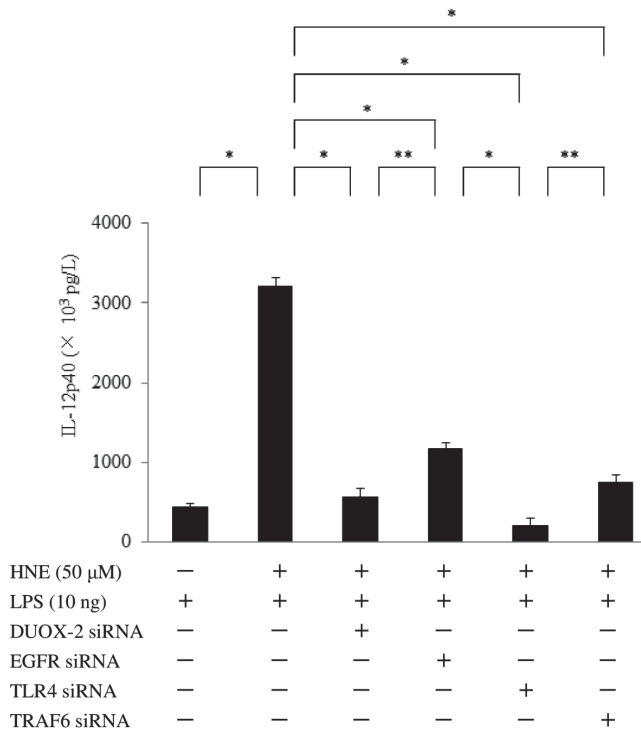


図17. DUOX-2, EGFR, TLR4, TRAF6 siRNA 導入による IL-12p40産生抑制作用

DUOX-2, EGFR, TLR4, TRAF6 siRNA を導入した GM-CSF-dependent macrophages (9 day of culture) を HNE で前処置し、そして LPS 刺激を行うと、IL-12p40の産生増強効果が抑制される。DUOX: dual oxidase, EGFR: epidermal growth factor receptor, GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, HNE: human neutrophil elastase, TLR: toll-like receptor, TRAF6: tumor necrosis factor α -associated receptor. Data=mean \pm S.E. n=3 *P<0.01 ; **P<0.05

この IL-12p40産生増強効果には PAR-2/EGFR/TLR4間の情報伝達が深く関与していることが示唆された。TLR のシグナルはそのアダプター分子である tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) を介して Src (proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src) family kinase へ伝達される²⁵⁾。そこで、TRAF6 siRNA を GM-CSF-dependent macrophages に導入すると HNE による IL-12p40の産生増強効果が認められなかった (図17)。以上の結果より、LPS 刺激による IL-12p40の産生には、HNE 前処置に伴う PAR-2/EGFR/TLR4の transactivation が重要な役割を演じている

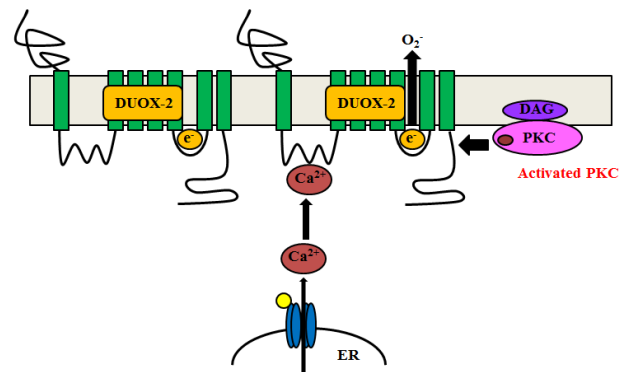


図18. Ca^{2+} 及び活性化 PKC による DUOX-2の活性化

Ca^{2+} 或いは Ca^{2+} や DAG により活性化した PKC による DUOX-2の活性化機序。

Ca^{2+} : calcium, DAG: diacylglycerol, DUOX- dual oxidase, ER: endoplasmic reticulum, PKC: protein kinase C.

ことが判明した¹⁷⁾。また、PAR-2を介して PLC 及び PKC が活性化される。PLC/ Ca^{2+} ²⁶⁾ や PKC²⁷⁾ が DUOX-2を活性化することが報告されている (図18)。DUOX-2の活性化により H_2O_2 が産生される。プロテアーゼには細胞外作用型と細胞内作用型の2種類がある。細胞外作用型のうち膜結合型メタロプロテアーゼである A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) ファミリーは細胞表面タンパク質のシェディング酵素 (shedding enzyme) として注目されるようになった^{28, 29)}。ADAM17は H_2O_2 により活性化され L-selectin の shedding を引き起こす³⁰⁾。また、ADAM17は EGFR ligands の shedding を起こすことが報告された³¹⁾。従って、DUOX-2の活性化に伴い産生された H_2O_2 により EGFR ligands の shedding により EGFR へのシグナルが伝達されることが想定される (図19)。以上のように、PAR-2/EGFR/TLR4の transactivation の存在が示唆された。次に HNE 刺激により活性化する PAR-2のどの下流シグナル伝達系が重要であるかを検討する目的で、GM-CSF-dependent macrophages (9 day of culture) を U73122 (PLC inhibitor) 及び Rottlerin (PKC inhibitor) で前処置を行い HNE 及び LPS で刺激すると、IL-12p40の産生増強効果が消失することが判明した (図20)。

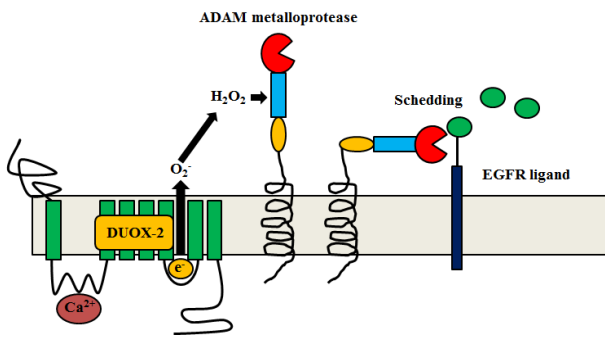


図19. ADAM metalloprotease の活性化と EGFR ligand の shedding

DUOX-2の活性化により産生されたH₂O₂がADAM metalloproteaseを活性化させ、EGFR ligandを切断 (shedding) する。ADAM: A disintegrin and metalloproteinase, DUOX:dual oxidase, Ca²⁺: calcium, EGFR: epidermal growth factor receptor.

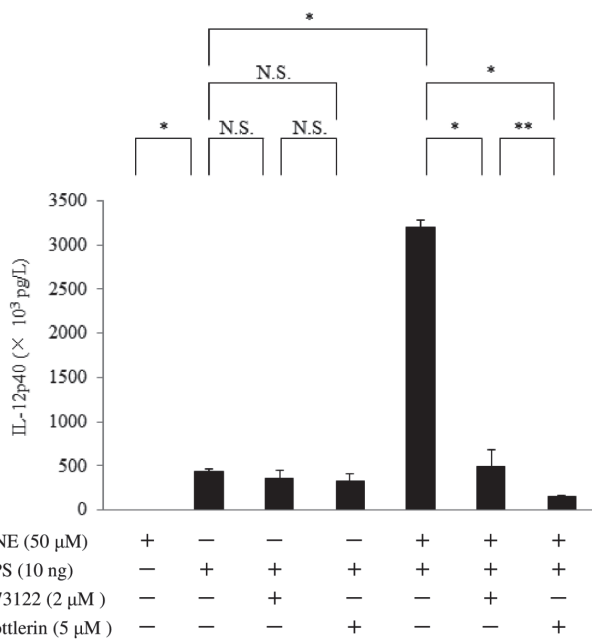
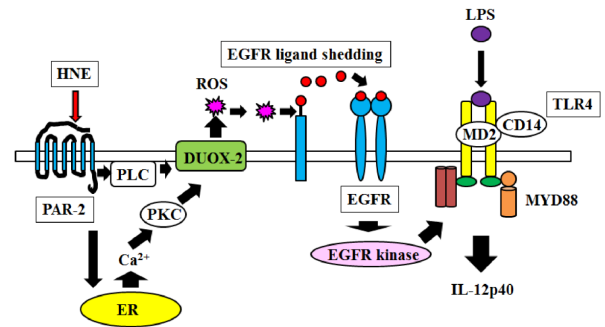


図20. PLC 及び PKC の HNE による IL-12p40 産生増強効果に及ぼす影響

U73122 (PLC inhibitor) 及び Rottlerin (PKC inhibitor) で前処置を行った GM-CSG-dependent macrophages (9 day of culture) を HNE と LPS で刺激した場合、IL-12p40の産生増強効果が消失する。GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, HNE: human neutrophil elastase, PLC: phospholipase C, PKC: protein kinase C. Data=mean ± S.E. n=3 *P<0.01; **P<0.05; N.S. not significant

XV. 結語

LPS 刺激による IL-12p40の産生は、HNE を介する PAR-2/EGFR/TLR4の transactivation により増強される (図21)。



DUOX: dual oxidase
 EGFR: epidermal growth factor receptor
 ER: endoplasmic reticulum
 HNE: human neutrophil elastase
 LPS: lipopolysaccharide
 PAR: protease-activated receptor
 PKC: protein kinase C
 ROS: reactive oxygen species
 TLR: toll-like receptor

図21. PAR-2/EGFR/TLR4の transactivation

想定されるレセプター間の transactivation の機序。

引用文献

1. Shao MX, Nadel JA: Neutrophil elastase induces MUC5AC mucin production in human airway epithelial cells via a cascade involving protein kinase C, reactive oxygen species, and TNF-alpha-converting enzyme. J Immunol, 175: 4009-4016, 2005.
2. Chattopadhyay S, Veleparambil M, Poddar D, et al: EGFR kinase activity is required for TLR4 signaling and the septic shock response. EMBO Rep, 16: 1535-1547, 2015.
3. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS: LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine, 42: 145-151, 2008.
4. Dessing MC, Schouten M, Draing C, et al: Role played by Toll-like receptors 2 and 4 in lipoteichoic acid-induced lung inflammation and coagulation. J Infect Dis, 197: 245-252,

- 2008.
5. 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.
 6. Ikei S, Ogawa M, Yamaguchi Y: Blood concentrations of polymorphonuclear leucocyte elastase and interleukin-6 are indicators for the occurrence of multiple organ failures at the early stage of acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol*, 13: 1274-1283, 1998.
 7. Aikawa N, Ishizaka A, Hirasawa H, et al: Reevaluation of the efficacy and safety of the neutrophil elastase inhibitor, Sivelestat, for the treatment of acute lung injury associated with systemic inflammatory response syndrome; a phase IV study. *Pulm Pharmacol Ther*, 24: 549-554, 2011.
 8. Kawata J, Yamaguchi R, Yamamoto T, et al: Human Neutrophil Elastase Induce Interleukin-10 Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells through Protein Kinase C Theta/Delta and Phospholipase Pathways. *Cell J*, 17: 692-700, 2016.
 9. Yamaguchi R, Kawata J, Yamamoto T, et al: Mechanism of interferon-gamma production by monocytes stimulated with myeloperoxidase and neutrophil extracellular traps. *Blood Cells Mol Dis*, 55: 127-133, 2015.
 10. Khader SA, Partida-Sanchez S, Bell G, et al: Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after Mycobacterium tuberculosis infection. *J Exp Med*, 203: 1805-1815, 2006.
 11. Kim DJ, Youn JI, Seo SH, et al: Differential regulation of antigen-specific CD8+ T cell responses by IL-12p40 in a dose-dependent manner. *J Immunol*, 180: 7167-7174, 2008.
 12. Iwakura Y, Ishigame H: The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest*, 116: 1218-1222, 2006.
 13. Saito S, Matsuura M, Hirai Y: Regulation of lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production by activation of repressor element GA-12 through hyperactivation of the ERK pathway. *Clin Vaccine Immunol*, 13: 876-883, 2006.
 14. 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.
 15. Yamaguchi R, Yamamoto T, Sakamoto A, et al: Substance P enhances tissue factor release from granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent macrophages via the p22phox/ β -arrestin 2/Rho A signaling pathway. *Blood Cells Mol Dis*, 57: 85-90, 2016.
 16. Yamaguchi R, Yamamoto T, Sakamoto A, et al: Roles of myeloperoxidase and GAPDH in interferon-gamma production of GM-CSF-dependent macrophages. *Heliyon* 2: e00080, 2016.
 17. Yamaguchi R, Yamamoto T, Sakamoto A, et al: Neutrophil elastase enhances IL-12p40 production by lipopolysaccharide-stimulated macrophages via transactivation of the PAR-2/EGFR/TLR4 signaling pathway. *Blood Cells Mol Dis*, 59: 1-7, 2016.
 18. Yamaguchi R, Yamamoto T, Sakamoto A, et al: A protease-activated receptor 2 agonist (AC-264613) suppresses interferon regulatory factor 5 and decreases interleukin-12p40 production by lipopolysaccharide-stimulated macrophages: Role of p53. *Cell Biol Int*, 40: 629-641, 2016.
 19. Chow JC, Young DW, Golenbock DT, et al: Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem*, 274: 10689-10692, 1999.
 20. Guo C, Whitmarsh AJ: The beta-arrestin-2 scaffold protein promotes c-Jun N-terminal kinase-3 activation by binding to its nonconserved N terminus. *J Biol Chem*, 283: 15903-15911, 2008.

21. Whalen EJ, Rajagopal S, Lefkowitz RJ: Therapeutic potential of β -arrestin- and G protein-biased agonists. *Trends Mol Med*, 17: 126-139, 2011.
22. Tanaka Y, Sekiguchi F, Hong H, et al: PAR2 triggers IL-8 release via MEK/ERK and PI3-kinase/Akt pathways in GI epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 377: 622-626, 2008.
23. Banfi C, Brioschi M, Barbieri SS, et al: Mitochondrial reactive oxygen species: a common pathway for PAR1- and PAR2-mediated tissue factor induction in human endothelial cells. *J Thromb Haemost*, 7: 206-216, 2009.
24. Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, et al: p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 271: 23317-23321, 1996.
25. Liu A, Gong P, Hyun SW, et al: TRAF6 protein couples Toll-like receptor 4 signaling to Src family kinase activation and opening of paracellular pathway in human lung microvascular endothelia. *J Biol Chem*, 287: 16132-16145, 2012.
26. Ha EM, Lee KA, Seo YY, et al: Coordination of multiple dual oxidase-regulatory pathways in responses to commensal and infectious microbes in drosophila gut. *Nat Immunol*, 10: 949-957, 2009.
27. Rigutto S, Hoste C, Grasberger H, et al: Activation of dual oxidases Duox1 and Duox2: differential regulation mediated by camp-dependent protein kinase and protein kinase C-dependent phosphorylation. *J Biol Chem*, 284: 6725-6734, 2009.
28. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, et al: A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*, 385: 729-733, 1997.
29. Moss ML, Jin SL, Milla ME, et al: Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature*, 385: 733-736, 1997.
30. Wang Y, Herrera AH, Li Y, et al: Regulation of mature ADAM17 by redox agents for L-selectin shedding. *J Immunol*, 182: 2449-2457, 2009.
31. Breshears LM, Schlievert PM, Peterson ML: A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) and epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling drive the epithelial response to *Staphylococcus aureus* toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1). *J Biol Chem*, 287: 32578-32587, 2012.

(平成29年1月19日受理)

Transactivation of cell surface receptor PAR-2/EGFR/TLR4

Rui YAMAGUCHI and Yasuo YAMAGUCHI

Proteinase-activated receptor 2 (PAR-2) and toll-like receptor 4 (TLR4) are involved in innate immune responses and signaling cross-talk between these receptor molecules has the critical role to augment an ongoing inflammatory response. GM-CSF upregulates PAR-2 expression by macrophages in a time-dependent manner. Lipopolysaccharide (LPS) enhances IL-12p40 production by macrophages in a concentration-dependent manner. While human neutrophil elastase (HNE) does not induce IL-12p40 production, pretreatment of macrophages with HNE synergistically increases the IL-12p40 protein level after LPS exposure. Silencing of TLR4 with small interfering RNA (siRNA) blunts the synergistic enhancement of IL-12p40 by HNE combined with LPS. Phospholipase C: PLC inhibitor (U73122) and protein kinase C: PKC inhibitor (Rottlerin) inhibits the increased production of IL-12p40. β -arrestin 2 modulates G-protein-coupled receptor (GPCR) endocytosis and triggers ERK1/2 activation. PKC contributes to activate NADPH oxidases. Silencing of β -arrestin 2, p22phox, DUOX2 or ERK1/2 also inhibited an increase of IL-12p40. TLR4 signaling requires tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). Transfection of macrophages with small interfering RNA duplexes for TRAF6 significantly blunts the increase of IL-12p40 in response to treatment with HNE plus LPS.