

新規 S100A8/A9 受容体の発見を切り口とした膿疱性乾癬の分子機構の解明

阪口政清

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞生物学分野

【研究の背景】

我々は、乾癬をはじめとする皮膚炎症疾患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、我々のこれまでの共同研究成果、(1) S100A8/A9 は乾癬患部で過剰発現していること (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 (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 (PLOS ONE、2011)、(4) 乾癬病態では、RAGE は DAP10 膜アダプターと共役することで、S100A8/A9 刺激によるシグナルをサバイバル能の更新に変化させること (J Biol Chem、2014)、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増悪過程に重要な役割を担っていると考えられた。

一方、RAGE 信号伝達阻害の検討から、S100A8/A9 が働く受容体は RAGE のみでないこともわかって来ており、その一つとして重要な受容体 EMMPRIN を同定することができている (Cancer Res、2013)。最近 EMMPRIN の細胞質領域のホモロジー検索により EMMPRIN に似た分子 NPTN を見出すことができ、予備的検討から NPTN も S100A8/A9 が働く受容体として機能するようである。本研究では、当新規受容体 NPTN に焦点を当て、NPTN 分子の機能を探り、乾癬病態における意義の検討を試みた。

【目 的】

表皮角化細胞における EMMPRIN と NPTN 受容体の機能を解明することで、皮膚炎症性病態における S100A8/A9 の細胞の増殖、死、炎症増悪の分子制御メカニズムを理解する。

【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 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 (Mol Biotech、2014)、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、NPTN、EMMPRIIN (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。

【結 果】

1. S100A8/A9 受容体の探索: 我々は、EMMPRIN のアミノ酸配列をホモロジー検索することで EMMPRIN 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 NPTN を発見することができた。NPTN には、2つのアイソタイプ (α と β) が存在する。

2. NPTN、EMMPRIN 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、EMMPRIN、NPTN α 、NPTN β) 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 NPTN β を同定することに成功した。NPTN α は、EMMPRIN と同様に S100A9 への強い結合性を示した。

3. NPTN と EMMPRIN の2量体形成: 次に我々は、RAGE、NPTN α 、NPTN β 、EMMPRIN 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 EMMPRIN + (RAGE or NPTN α or NPTN β or EMMPRIN) 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。NPTN α + (RAGE or NPTN α or NPTN β or EMMPRIN)、NPTN β + (RAGE or NPTN α or NPTN β or EMMPRIN) に関しても上記と同様に行った。

各受容体 (NPTN α 、NPTN β 、EMMPRIN) の免疫沈降の結果、NPTN α 、NPTN β 、EMMPRIN はそれぞれホモダイマー性能 (NPTN α /NPTN α 、NPTN β /NPTN β 、EMMPRIN/EMMPRIN) があること、そして、NPTN α /NPTN β 、NPTN α /EMMPRIN、NPTN β /EMMPRIN 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、NPTN α 、NPTN β 、EMMPRIN はいずれも RAGE との結合性を示さなかった。

4. NPTN のアダプタータンパク質: NPTN と EMMPRIN の細胞質領域には、共通して TRAF 結合モチーフが存在する。NPTN にのみ PxxP もモチーフが認められた。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は、炎症性サイトカイン誘導に関わるものが多い。一方、PxxP モチーフは SH3 ドメインを持つアダプタータンパク質を引き寄せ、増殖に関わることが知られている。そこで、NPTN と EMMPRIN の細胞質領域への代表的アダプタータンパク質の結合能を検討した。

NPTN あるいは EMMPRIN の細胞質領域と各アダプタータンパク質 (TRAF2、GRB2、CRK、NCK1、NCK2) あるいは p38 リン酸化酵素を HEK293 に同時トランスフェクションし、NPTN あるいは EMMPRIN 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、EMMPRIN には TRAF2 のみが、NPTN には、TRAF2 と GRB2 が結合性を示すことが判明した。TRAF2 は NF κ B 活性を上昇させ、炎症性サイトカイン誘導に関わり、GRB2 は MAPK の活性化を促し、細胞増殖の促進に関わる。このことより、EMMPRIN と NPTN は相互に S100A8/A9 の信号を使い分ける重要な受容体であることが考えられた。

【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-NPTN β 、S100A9-NPTN α と EMMPRIN) 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に違いが生まれてくるものと推察する。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。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、GRB2) 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NPTN/EMMPRIN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。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

複雑な乾癬増悪過程に関わる炎症機転の機構解明には、外因性(菌やウイルス)および内因性(S100A8/A9など)の因子を検出して炎症へと導く生体応答の総体を理解する必要があり、これは、TLR、RAGE、そして新規受容体群を包括的に理解して初めてその全体像が明らかになる。従って、新しい受容体の発見を基盤とする本成果は、乾癬の統合的理解を深めることに貢献する。また、S100A8/A9の関わる疾患は、乾癬のみならず、炎症の関わる神経変性疾患、2型糖尿病、自己免疫疾患、がんなど、広範にわたる。本研究により、新規受容体群の作動機構が解明され、これらを標的とした治療戦略が構築されれば、上記の広範な疾患に対する共通の対策を提供することになり、臨床応用展開への貢献度は非常に大きい。

【参考・引用文献】

(JAAD, 2011)

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.

(J Cell Biochem, 2007)

Nukui T, Ehama R, **Sakaguchi M**, Sonogawa H, Katagiri C, Hibino T, Huh NH. S100A8/A9, a key mediator for positive feedback growth stimulation of normal human keratinocytes. **J Cell Biochem**. 104: 453-464, 2008.

(PLOS ONE 2011)

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.

(Cancer Res 2013)

Hibino T, **Sakaguchi M**, Miyamoto S, Yamamoto M, Motoyama A, Hosoi J, Shimokata T, Ito T, Tsuboi R, Huh NH. S100A9 is a novel ligand of EMMPRIN that promotes melanoma metastasis. **Cancer Res**. 73: 172-183, 2013.

(J Biol Chem 2014)

Sakaguchi M, Murata H, Aoyama Y, Hibino T, Putranto EW, Ruma IM, Inoue Y, Sakaguchi Y, Yamamoto KI, Kinoshita R, Futami J, Kataoka K, Iwatsuki K, Huh NH. DNAX-Activating Protein 10 (DAP10) Membrane Adaptor Associates with Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and Modulates the RAGE-triggered Signaling Pathway in Human Keratinocytes, **J Biol Chem**. 289: 23389-23402, 2014.

(Mol Biotech 2014)

Sakaguchi M, Watabe M, Kinoshita R, Kaku H, Ueki H, Futami J, Murata H, Inoue Y, Li SA, Huang P, Putranto EW, Ruma IMW, Nasu Y, Kumon H, Huh NH. Dramatic increase in expression of a transgene by insertion of promoters downstream of the cargo gene. **Mol Biotech**. 56: 621-630, 2014.