

膠原病におけるNF-κB経路

The NF-κB pathways in connective tissue diseases

東京医科歯科大学 大学院保健衛生学研究科 准教授 窪田哲朗

TETSUO KUBOTA (Associate Professor)

Tokyo Medical and Dental University Graduate School of Health Care Sciences

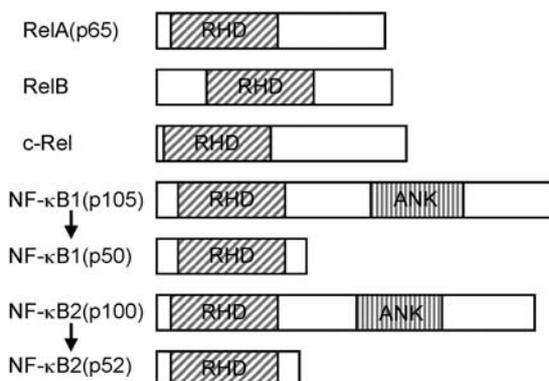
1. はじめに

転写因子NF-κB(nuclear factor-kappa B)の制御を受けている遺伝子は、細胞増殖、アポトーシス、炎症、免疫に関連するものなど多岐にわたる。しかも、それらの発現は他の転写因子経路の影響も受けているため、NF-κBの活性化、あるいは抑制が、実際に*in vivo*でどのような結果をもたらすかを予測することは容易でない。しかし、近年、全身性自己免疫疾患(膠原病)の病態形成におけるNF-κB経路の重要性を示唆する研究成果が少なからず報告されており、NF-κB経路は新規治療薬開発の標的とも考えられる。本稿では膠原病の中でも関節リウマチについて患者数の多い全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus, SLE)および、その合併症としてしばしば認められる抗リン脂質抗体症候群(antiphospholipid syndrome, APS)の病態とNF-κBとの関わりについて概説する。

2. NF-κB経路の構成要素

NF-κBファミリーは、N端側にDNAとの結合や2量体形成に関わるRel-homology domain (RHD)を有する5つの分子、RelA (p65)、RelB、c-Rel、NF-κB1 (p50/p105)、NF-κB2 (p52/p100)から構成され、これらが種々の組合せでホモまたはヘテロ2量体を形成して機能を発揮する(図1)。RHDには核局在化シグナル(nuclear localization signal, NLS)が存在するが、無刺激状態の細胞では通常、この部分がIκBα、IκBβ、IκBεなどのIκB(inhibitor of κB)ファミリータンパク質に被われ、NF-κBは主に細胞

The NF-κB family



The IκB family

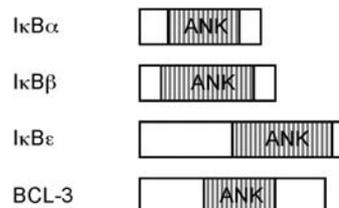


図1 NF-κBファミリーおよびIκBファミリータンパク質
RHD: Rel-homology domain, ANK: ankyrin-repeat motifs

質に留まっている。また、p50とp52は、それぞれの前駆体p105、p100として生成されるが、これらのC末端側にはIκBと同様のankyrin-repeat motifs(ANK)が存在して、NF-κBの活性化を抑制している。

3. NF-κB経路の活性化

様々な刺激によって活性化されるNF-κB経路には、canonical(またはclassical) pathway、non-canonical(またはalternative) pathwayなどが知られている。Canonical

pathwayでは、TNFレセプター(TNF-R)、IL-1レセプター(IL-1R)、Toll-likeレセプター(TLR)、T細胞レセプター(TCR)などを介した刺激によって、主としてRelA(p65):p50ヘテロ2量体が活性化される(図2)。上記のレセプターから細胞内に入った刺激は、IKKα、IKKβ、NEMO(NF-κB essential modifier、別名IKKγ)からなるIκB kinase 3量体(IKK trimer)に伝わり、これらのキナーゼが活性化するとIκBαのリン酸化とユビキチン化がもたらされる。ユビキチン化IκBαはプロテアソームで分解され、RelAのNLSが露出して、RelA:p50 2量体は核内に移行する。近年、この過程はさらに多くの調節因子によって制御される複雑な経路であることが明らかにされつつある¹⁾。

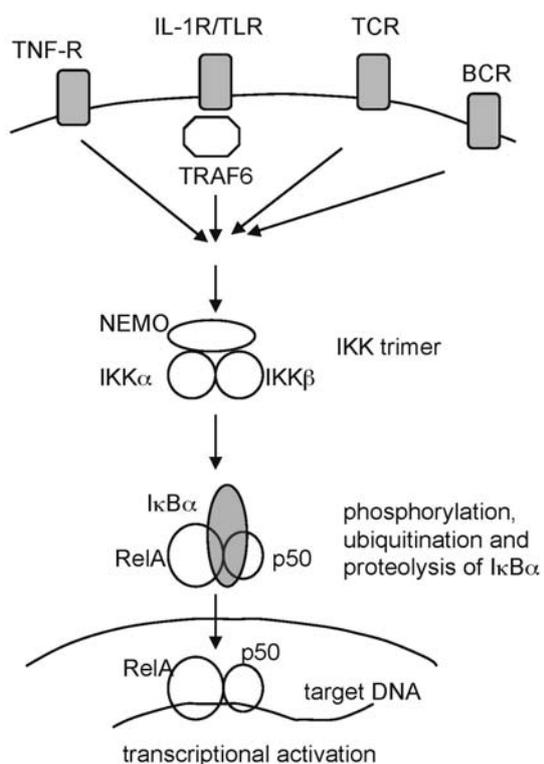


図2 NF-κB canonical pathway.
BCR: B cell receptor, TCR: T cell receptor, TLR: Toll-like receptor

一方、non-canonical pathwayはCD40、lymphotoxin-βレセプター(LTβR)、RANK(receptor activator of NF-κB)、BAFFレセプター(BAFF-R)などから入る刺激で活性化される(図3)。これらの刺激がNF-κB-inducing kinase(NIK)の活性化と、それに続くIKKα 2量体によるp100のC端側のankyrin repeatのリン酸化、ユビキチン化、部分的な分解をもたらし、その結果、N端側のp52フラグメントとRelBの2量体が核に移行する。

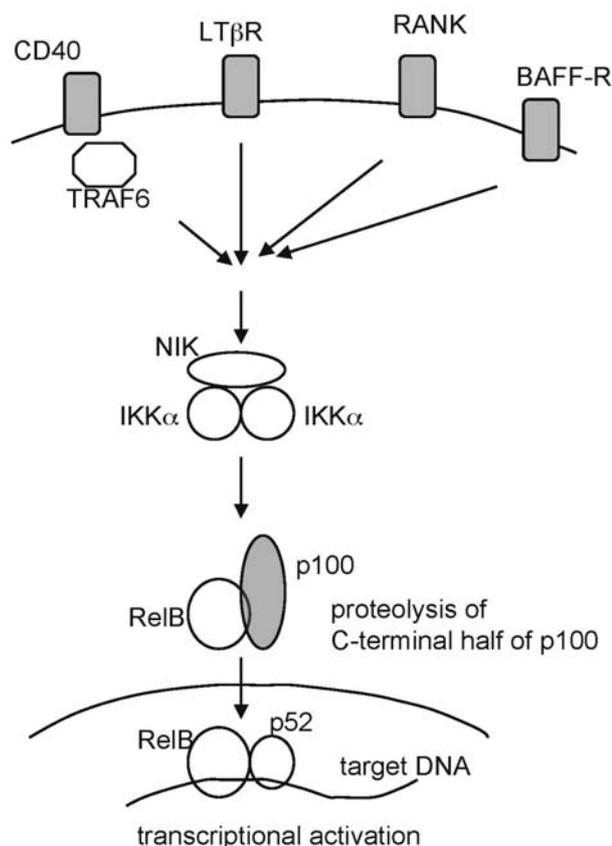


図3 NF-κB non-canonical pathway.
LTβR: LTβ receptor, RANK: receptor activator of NF-κB, BAFF-R: BAFF receptor

4. 自己免疫反応とNF-κB

自己免疫反応は、免疫系における自己と非自己の識別機構に不具合を生じて、自己抗原に対するトレランスが破綻する結果もたらされる。自己トレランスの確立には、自己反応性リンパ球がB細胞の場合は骨髄、T細胞の場合は胸腺において除去されることが重要であるが、NF-κBはこのしくみに強く関わっている。

さらに、ひとたび自己免疫反応が起こって組織内に炎症が生じた場合には、接着分子、炎症性サイトカイン、ケモカインなどの発現が亢進するが、よく知られているように炎症に関連する分子の多くがNF-κB依存性である²⁾。このように、NF-κB経路は自己トレランスの破綻と、炎症の2つの段階で自己免疫疾患の発症に関わっている。

自己トレランスに関してみると、胸腺髄質上皮細胞は、全身の諸臓器に存在する様々な抗原を発現するユニークな性質をもっており(promiscuous expression と呼ばれる)、未熟T細胞の教育にあたっている。この胸腺髄質上

皮細胞の分化には、NF-κB経路の上流に存在してIL-1レセプターやToll-likeレセプターからの刺激を伝えるアダプター分子TRAF6が、重要な働きをしている。TRAF6欠損マウスでは、胸腺髄質上皮細胞の分化が障害されて、自己反応性T細胞の除去が不完全になってしまう。このようなマウスの胸腺からリンパ球を除去した胸腺ストローマを、胸腺を持たないヌードマウスに移植した実験では、肺、脾、肝、腎などに炎症細胞浸潤が認められ、それらの組織と反応する自己抗体も検出された³⁾。

NF-κB2 (p100)も胸腺髄質上皮細胞の分化に関わっていると考えられ、NF-κB2欠損マウスではやはり多臓器にわたる炎症細胞浸潤と、自己抗体産生が認められた⁴⁾。また、胸腺における自己反応性T細胞のアポトーシスは、negative selectionに因んで IκB_{NS}と命名された分子がNF-κBと結合することによってもたらされる⁵⁾。

一方、B細胞が骨髄で成熟する過程で、自己抗原と強く反応するB細胞レセプター (BCR) が作られてしまった場合には、recombinase-activating gene (RAG) の作用でBCRの再編成が行なわれるが、RAGの発現はRelA、cRelによる正の、NF-κB1 (p50) による負の制御を受けている⁶⁾。

5. 全身性エリテマトーデス (SLE)

SLEは20歳台から40歳台の女性に好発する自己免疫疾患で、男女比は1:9、わが国の患者数は約50,000人と推定されている。原因は不明であるが、複数の遺伝的素因に環境要因が加わって発症するものと考えられ、自己抗体の産生や自己反応性リンパ球の活性化によって皮膚病変、胸膜炎、糸球体腎炎 (ループス腎炎)、中枢神経症状 (CNSループス)、血球減少など様々な病態がもたらされる。とりわけループス腎炎とCNSループスは、早期に診断して強力な治療を行なわないと生命予後に影響する重篤な病態である。自己抗体としては、抗DNA抗体、抗RNP抗体、抗Sm抗体などが高頻度に認められる。治療には副腎皮質ステロイド剤や免疫抑制剤が用いられているが、治療抵抗性の症例もみられ、さらなる治療法の進歩が望まれている。最近、抗CD20モノクローナル抗体投与によるB細胞除去療法など、生物学的製剤の有効性も報告されているが、未だ確立された治療法とはなっていない。

6. SLEとNF-κB

BAFF (B cell-activating factor; 別名 BLYS) は新しいTNFファミリー分子として1999年に4つの研究グループから相次いで報告された。骨髄系細胞、T細胞、種々の間質細胞から産生され、B細胞に生存、増殖、分化を促すサイトカインである。SLEの血清中では可溶性BAFFが高値を示し、病態形成における役割が注目されている。

BAFFにはBAFF-R、TACI (transmembrane activator and CAML interactor)、BCMA (B cell maturation antigen)の3種類のレセプターがある。BCMAとTACIは、もう一つのTNFファミリーのサイトカインAPRIL (a proliferation-inducing ligand)とも結合するが、BAFF-RはBAFFとのみ結合する(図4)。これら3つのレセプターから入るシグナルはいずれもNF-κBのcanonical pathwayを活性化するが、non-canonical pathwayはBAFF-Rからのシグナルによってのみ活性化される。

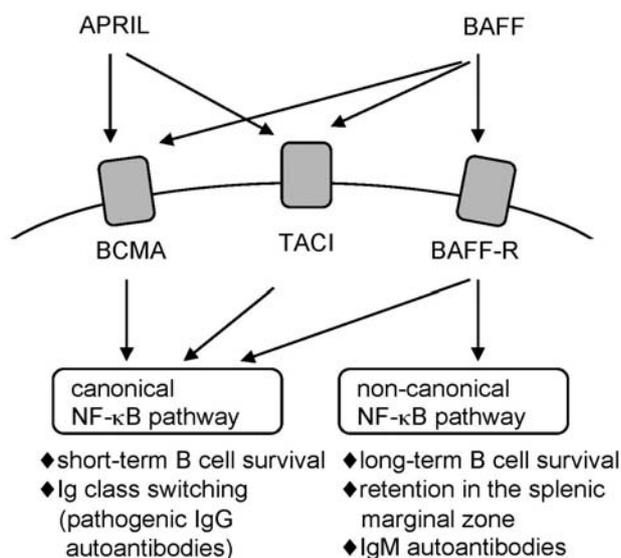


図4 BAFFおよびAPRILのレセプターと、NF-κB経路
BAFFを過剰産生するマウスでは、NF-κB経路の活性化を介して図に示したような効果が発現し、SLE様病態を発症する。

BAFFを過剰発現するトランスジェニックマウスは、脾臓、リンパ節などの末梢リンパ組織が腫大し、B細胞数が増加し、抗DNA抗体産生、血中免疫複合体の増加、免疫グロブリン沈着をともなう糸球体腎炎など、SLE様所見を示して興味深い。Enzlerら⁷⁾は、このような病態の形成に関わるB細胞とNF-κB経路について、BAFFトランスジェニックマウスとNF-κB各経路の構成要素を欠損したマウ

スを交雑して検討した。その結果、BAFFはnon-canonical pathwayを介して脾臓のmarginal zoneにおける自己反応性B細胞の生存を促し、さらにcanonical pathwayを介して抗DNA抗体のIgGへのクラススイッチを起こすことなどが明らかにされた(図4)。すなわち、BAFF過剰発現のモデルにおいて、臓器病変をともなうfull-blownのSLE様病態が形成されるためには、NF-κBの両方の経路が必要であることが示された。

SLEの疾患活動性と血清中のBAFFのレベルとの間にはあまり良い相関関係が見られないことから、BAFFと協調して働く他の因子も存在する可能性があると考えられ、Doreauら⁸⁾はIL-17とBAFFの作用に着目した。その結果、BCR刺激によるアポトーシスからB細胞を保護する作用において、IL-17とBAFFは相加的な効果を発揮し、自己反応性B細胞の生存をサポートしている可能性が示唆された。IL-17とBAFFの効果発現には、NF-κB依存性の転写因子Twist-1が重要であることも明らかにされた。

IL-17に関しては様々な炎症性疾患の病態との関わりが報告されているが、SLEに関しても、ループス腎炎患者やモデルマウスの腎組織において、CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ T細胞がIL-17を産生していることなどが報告されている。IL-17レセプターからのシグナル伝達経路の詳細は明らかでないが、NF-κB、c-Jun NH2-terminal kinase (JNK)、MAP kinase経路などが関わると報告されている⁹⁾。

Wuら¹⁰⁾は、種々の異なる系統のループスマウスモデルマウスのB細胞を用いて、どのようなシグナル伝達経路が活性化しているか、網羅的に検討した。その結果、PI3K/AKT/mTOR経路、MEK1/Erk1/2経路、p38、NF-κB、種々のBcl-2ファミリー分子、細胞周期関連分子など、多くの分子が複数の系統のマウスで共通に活性化していることが明らかにされた。mTOR kinase阻害薬RAD001の投与は、モデルマウスの抗DNA抗体産生や糸球体腎炎にきわめて有効であった。しかもRAD001の投与を受けたマウスのB細胞では、AKTのリン酸化の抑制のみならず、Erk1/2、NF-κB、Bcl-2、CDK2、STAT3など、他の経路の分子の活性化も抑制されていることが明らかになった。これらの結果は、ループスマウスモデルB細胞では、直接的または間接的に関連しあう複数の経路が活性化しているものの、適切な標的を阻害することによってネットワーク全体を一挙に抑制できることを示している。

7. 抗リン脂質抗体症候群(APS)とNF-κB

APSは動脈または静脈の血栓症をくり返したり、流早産などの妊娠合併症を引き起こしたりし、血清中に抗リン脂質抗体が検出される疾患で、基礎疾患のない1次性APSと、基礎疾患に合併する2次性APSに分類される。2次性APSの基礎疾患としてはSLEが最も多く、約50%を占める。治療には抗血小板薬や抗凝固薬が使われるが、効果が不十分な症例や、副作用として出血が助長される恐れがあり、さらなる治療法の改善が望まれている。

本症候群における向血栓傾向のメカニズムは複雑で未だ不明の点も多いが、β₂-glycoprotein Iなどのリン脂質結合性タンパク質を介して間接的にリン脂質と結合する自己抗体が向血栓傾向に大きく寄与している¹¹⁾。López-Pedrerら¹²⁾は、APS患者の単球をフローサイトメトリーで解析し、44例中29例に凝固経路の主要因子であるtissue factor (TF)が発現していることを見出し、そのような細胞ではp38 MAP kinase経路を介したNF-κBの活性化と、MEK-1/ERK経路の活性化が起こっていることを示した。さらに、健康人単球を培養してAPS患者IgGを添加すると、同様のシグナル伝達経路の活性化とTF発現がもたらされたという。

また、ケモカインによる血小板の活性化もAPSの向血栓傾向に関わっている可能性が考えられる。すなわち、血小板にはCCR1、CCR3、CCR4、CXCR4などのケモカインレセプターが発現しており、特異的なケモカインを添加することによって凝集反応を惹起することができる。CX3CL1も血小板を活性化させてP-selectinの発現を亢進させたり、コラーゲンやフィブリノゲンへの粘着を亢進させることが報告されている。私たちは抗β₂-glycoprotein I抗体が単球を活性化してIL-1βやTNFαを産生させ、それらが血管内皮細胞にCX3CL1やCCL5などのケモカインの発現を誘導すること、CX3CL1は血小板のコラーゲンへの粘着を亢進させ、CCL5は血小板凝集を惹起することを観察した(図5)。IL-1β、TNFα、CX3CL1、CCL5の発現はいずれもNF-κB依存性で、NF-κB特異的阻害剤DHMEQ¹³⁾により抑制され、NF-κB経路がAPS治療の標的となり得ると考えられた¹⁴⁾。in vivoモデルにおいても、抗リン脂質抗体によって誘発される向血栓傾向の是正にNF-κB阻害剤MG132が有効であることが報告されている¹⁵⁾。

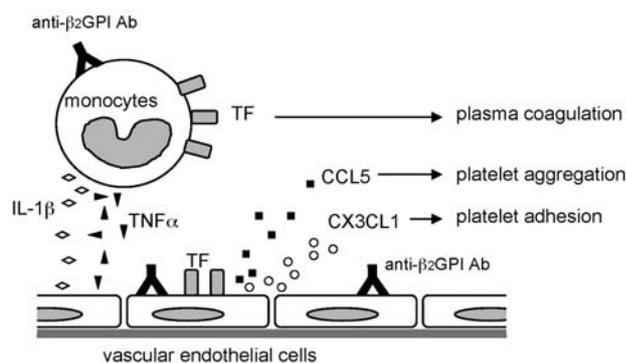


図5 抗リン脂質抗体症候群における向血栓傾向
抗β2-glycoprotein I抗体が単球を刺激して組織因子(TF)や炎症性サイトカインを発現させる。
抗β2-glycoprotein I抗体やサイトカインで活性化した血管内皮細胞は、TFやケモカイン(CCL5、CX3CL1など)を発現する。

8. おわりに

生理的な状態において、NF-κB経路は中枢リンパ組織の骨髄や胸腺で、リンパ球の自己トレランスの確立に重要な働きをしている。この他、NF-κBは皮膚、粘膜など絶えず外界から様々な刺激を受ける組織の自然免疫機能の維持にも必要で、これらの組織におけるNF-κBの欠損は重篤な感染症を引き起こしてしまう¹⁶⁾。

一方、自己免疫疾患の病変部位ではNF-κB経路の活性化が様々な炎症関連分子の発現を増強させて、病態形成に関わっている。細胞内シグナル伝達経路は複雑なネットワークを形成して、多数の分子がその調節に関わっているが、特異的な阻害薬を用いて中軸を阻害するとネットワーク全体が抑制されたという実験結果は、新しい治療法の開発に向けて希望を与えてくれる。これは関節リウマチでは、複雑なサイトカインネットワークが活性化しているにも拘わらず、抗TNFαモノクローナル抗体を投与するだけで関節炎が劇的に改善するという事実を思い起こさせる。

NF-κBは間違いなく膠原病の新規治療標的候補と考えられるが、その生理的作用を阻害せずに、有害な作用のみを抑制できるようなプロトコルが作成されなければならない。

引用文献

- Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-κB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* ; **8**: 49-62. (2007)
- Tak PP, Firestein GS. NF-κB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* ; **107** :7-11. (2001)
- Akiyama T, Maeda S, Yamane S, et al. Dependence of self-tolerance on TRAF6-directed development of thymic stroma. *Science* ; **308**: 248-51.(2005)
- Zhang B, Wang Z, Ding J, et al. NF-κB2 is required for the control of autoimmunity by regulating the development of medullary thymic epithelial cells. *J Biol Chem* ; **281**: 38617-24. (2006)
- Fiorini E, Schmitz I, Marissen WE, et al. Peptide-induced negative selection of thymocytes activates transcription of an NF-κB inhibitor. *Mol Cell* ; **9**: 637-48. (2002)
- Verkoczy L, Ait-Azzouzene D, Skog P, et al. A role for nuclear factor kappa B/Rel transcription factors in the regulation of the recombinase activator genes. *Immunity* ; **22**: 519-31. (2005)
- Enzler T, Bonizzi G, Silverman GJ, et al. Alternative and classical NF-κB signaling retain autoreactive B cells in the splenic marginal zone and result in lupus-like disease. *Immunity* ; **25**: 403-15. (2006)
- Doreau A, Belot A, Bastid J, et al. Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol* ; **10**: 778-85. (2009)
- Schwandner R, Yamaguchi K, Cao Z. Requirement of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 in interleukin 17 signal transduction. *J Exp Med* ; **191**: 1233-9. (2000)
- Wu T, Qin X, Kurepa Z, et al. Shared signaling networks active in B cells isolated from genetically distinct mouse models of lupus. *J Clin Invest* ; **117**: 2186-96. (2007)
- Meroni PL, Ronda N, De Angelis V, et al. Role of anti-b2 glycoprotein I antibodies in antiphospholipid syndrome. In vitro and in vivo studies. *Clin Rev Allergy Immunol* ; **32**: 67-73. (2007)
- López-Pedreira C, Buendía P, Cuadrado MJ, et al. Antiphospholipid antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome induce monocyte tissue factor expression through the simultaneous activation of NF- B/Rel proteins via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, and of the MEK-1/ERK pathway. *Arthritis Rheum* ; **54**: 301-11. (2006)
- Yamamoto M, Horie R, Takeiri M, et al. Inactivation of NF-κB components by covalent binding of (-)-dehydroxymethylepoxyquinomicin to specific cysteine residues. *J Med Chem* ; **51**: 5780-8. (2008)
- Kubota T, Fukuya Y, Hashimoto R, et al. Possible involvement of chemokine-induced platelet activation in thrombophilic diathesis of antiphospholipid syndrome. An attractive target for the NF-κB-specific inhibitor DHMEQ. *Ann N Y Acad Sci* ; **1173**: 137-45. (2009)
- Montiel-Manzano G, Romay-Penabad Z, De Martínez EP, et al. In vivo effects of an inhibitor of nuclear factor-kappa B on thrombogenic properties of antiphospholipid antibodies. *Ann N Y Acad Sci* ; **1108**: 540-53. (2007)
- Pasparakis M. Regulation of tissue homeostasis by NF-κB signalling: implications for inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* ; **9**: 778-88. (2009)