

筑波大学

博士（医学）学位論文

**Clinical and functional  
significance of STEAP4-splice  
variant in CD14<sup>+</sup> monocytes in  
patients with rheumatoid arthritis**

(関節リウマチ患者における  
STEAP4 及びその変異体の発現と機能解析)

2 0 1 7

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

江辺広志

# 目次

I. 概要	4
II. 序論	7
III. 目的	10
IV. 対象と方法	11
1. 参加者と血液検体	
2. リアルタイム qPCR	
3. STEAP4 および v-STEAP4 の DNA 配列のクローニング	
4. 過剰発現細胞株の樹立	
5. 細胞培養研究	
6. 酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)	
7. Cytometric Bead Array (CBA)	
8. SDS-PAGE 免疫ブロット法	
9. 統計学的解析	
V. 結果	18
1. ヒト単球での STEAP4 のエクソン 3 欠損変異体の同定	
2. RA 患者と健常者の STEAP4 および v-STEAP4 発現量の比較検討	
3. RA 患者における STEAP4 および v-STEAP4 発現と臨床情報との相関	
4. STEAP4 および v-STEAP4 の過剰発現細胞株の樹立	
5. STEAP4 および v-STEAP4 過剰発現細胞株による機能解析	

VI. 考察	23
VII. 結論	26
VIII. 謝辞	27
IX. 参考文献	28
X. 主要略語一覽	32
XI. 図表	33

# I. 概要

## 【目的】

TNF  $\alpha$ -induced adipose-related protein (TIARP)は関節炎モデルマウスの単球、滑膜、好中球で高発現しており、炎症に対して抑制的に働いている。

TIARP のヒトホモログである six transmembrane epithelial antigen of prostate 4 (STEAP4)は関節リウマチ (RA) 患者の CD14 陽性単球で健常人に比べ発現量が増加しており、近年ブタ肺臓では STEAP4 のエクソン 3 欠損変異体 (v-STEAP4)が高発現していることが報告された。本研究の目的は RA 患者の単球における STEAP4 及び v-STEAP4 の発現と RA 病態における機能を明らかにすることである。

## 【対象と方法】

- 1) 健常者および RA 患者 CD14 陽性単球を用いて、v-STEAP4 発現を PCR-sequence 法で解析し、定量 PCR にてその発現を比較した。
- 2) RA 患者の CD14 陽性単球で、STEAP4 及び v-STEAP4 の発現と臨床検査情報との相関について検討した。
- 3) RA 患者の CD14 陽性単球で、STEAP4 及び v-STEAP4 の IL-6 拮抗薬治療前後の発現を比較した。
- 4) ヒト単球系細胞株である THP-1 に STEAP4 と v-STEAP4 遺伝子をそれぞれ導入して過剰発現株を作成した。

5) LPS 刺激による炎症性サイトカイン産生への影響を Cytometric Bead Array (CBA)で検討した。

6) 過剰発現させた STEAP4 及び v-STEAP4 が toll-like receptor 4 (TLR4)の下流シグナルへ与える影響について免疫ブロット法で検討した。

7) NF $\kappa$ B 阻害薬と STAT3 阻害薬の投与によるサイトカイン産生に与える影響を検討した。

#### 【結果】

1) v-STEAP4 がマウス TIARP と同様にヒトでも存在した。STEAP4 及び v-STEAP4 の発現量、v-STEAP4/STEAP4 比は RA 患者において健常者より増加していた。

2) STEAP4 は CRP、ESR に対して正の相関、v-STEAP4 は CRP、RF と正の相関を示した。

3) IL-6 阻害薬投与後、STEAP4 及び v-STEAP4 の発現量は低下していた。

4) STEAP4 及び v-STEAP4 過剰発現細胞株を作成した。

5) v-STEAP4 により LPS 刺激に伴う TNF $\alpha$  産生が増強しており、IL-6 産生が抑制されていた。

6) LPS 下流のシグナル伝達物質の検討では、v-STEAP4 により NF- $\kappa$ B のリン酸化は増強、I $\kappa$ B $\alpha$  の degradation は遷延し、一方で STAT3 のリン酸化は抑制されていた。

7) NF $\kappa$ B のリン酸化を抑制することで TNF $\alpha$  産生が抑制され、STAT3 のリン酸化を抑制することで IL-6 産生が抑制された。

## 【考察】

本研究でヒト単球において **v-STEAP4** が存在し、健常者と比べ **RA** 特異的に発現が増加していることが見出された。**RA** における **STEAP4** 及びその変異体は **CRP** や **ESR** といった炎症マーカーと正の相関を持って増加しており、一方で **IL-6** 阻害薬の治療後に低下することからこれらの分子は **RA** の炎症によって誘導されている可能性が示唆された。

その機能を解析するために、ヒト単球系細胞株に **STEAP4** と **v-STEAP4** をそれぞれ過剰発現させたところ、興味深いことに **v-STEAP4** は **TNF  $\alpha$**  産生を有意に増加させたのに対して、**IL-6** 産生を抑制した。後者は特に顕著で、**IL-6** 産生はほぼ消失していた。**TIARP KO** マウスが関節炎を自然発症することから、スプライシングを受けた **v-STEAP4** が **STEAP4** よりも機能的に重要であり、単球細胞内の **STAT3** のリン酸化抑制を介して **RA** 病態に抑制的に働くことが示唆された。

一方で **TNF  $\alpha$**  の産生経路に対しては相反する効果を示しており、今後は関節炎モデルマウスで **TIARP** 変異体を過剰発現させるなどの検討が必要である。

## 【結論】

本研究によって **v-STEAP4** が **RA** 単球で炎症に伴い増加しているだけでなく、細胞内シグナルを介してサイトカイン産生を制御することが示唆された。

## II. 序論

関節リウマチ (RA)は慢性、全身性、炎症性の関節疾患であり、TNF  $\alpha$  や IL-6 といった炎症性サイトカインが関与している。これらのサイトカインを標的とした治療が RA に有効であることから、この 2 つのサイトカインは RA の病態形成に重要であると考えられている [1-3]。

TNF  $\alpha$  阻害薬が有効な関節炎モデルマウスの Glucose-6-phosphate isomerase (GPI) 誘導関節炎の CD11b 陽性脾細胞において TNF  $\alpha$ -induced adipose-related protein (TIARP)の発現が上昇していたことから TIARP は関節リウマチの病態に関わる分子であると考えられる [4]。TIARP は 5 つのエクソンから構成される mRNA から翻訳される 6 回膜貫通型タンパクの鉄トランポーターであり (図 1)、細胞形質膜の他、ゴルジ体、リソソームなどの細胞内小器官の膜上に局在し、マクロファージや肝細胞、脂肪細胞といった様々な細胞において TNF  $\alpha$  の他に IL-6 や IL-1  $\beta$  のような炎症性サイトカインや lipopolysaccharide (LPS)によってその発現が誘導されるが、そのリガンドは不明である [5-12]。

TIARP 欠損マウスで関節炎が自然発症することや collagen-induced arthritis (CIA)や K/BxN 血清移入関節炎によりその関節炎が増悪することから TIARP は関節炎の抑制性因子であると考えられる [13,14]。さらに、好中球やマクロファージの細胞数と TNF  $\alpha$  や IL-6、CXCL2 といった炎症性メディエーターは TIARP 欠損マウスの関節局所で増加しており、マクロファージで TIARP は



nuclear factor-kappa B (NF  $\kappa$  B)や signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)といったシグナル伝達物質の抑制を介して、炎症性サイトカイン産生を抑制している [13]。TIARP は細胞内の分子制御を介して RA の炎症機序に関わっている可能性がある。

TIARP のヒトホモログである six transmembrane epithelial antigen of prostate 4 (STEAP4) は RA の CD14 陽性単球と CD68 陽性滑膜細胞に高発現していた [15,16]。STEAP4 の発現は RA 患者の CD14 陽性細胞でトシリズマブの治療後に抑制され、*in vitro* では TNF  $\alpha$  または LPS 刺激によって誘導された [15]。STEAP4 の mRNA 発現は RA 滑膜組織において TNF  $\alpha$  と正相関していた [16]。

STEAP4 の機能に関連して、関節リウマチ患者の線維芽細胞様滑膜細胞由来の細胞株である MH7A や *all-trans* retinoic acid によって好中球様に分化させた HL60 に STEAP4 を過剰発現させた報告がある [16,17]。STEAP4 は MH7A において TNF  $\alpha$  刺激に伴う IL-6 や IL-8 の mRNA 発現と HL60 の RA 滑液への遊走を抑制した [16,17]。しかしながら、ヒト単球における STEAP4 の機能についての報告はない。

近年、STEAP4 のエクソン 3 欠損変異体 (*v*-STEAP4) がブタ肺組織に高発現しており、ヒト肝細胞の細胞株である HepG2 にも存在し、STEAP4 と共に LPS によってその発現が増加したとの報告があった [18]。同じエクソン 3 欠損変異体の発現がマウスの GPI 誘導関節炎の脾臓と関節組織で認められ、その発現量は関節炎の重症度と相関して増加していることを確認した (データ

未表示)。選択的スプライシングは遺伝子の豊富な多様性を生み出す非常に優れた制御機構である [19]。しかしながらヒト末梢血単球における **STEAP4** 変異体の発現とその機能については明らかとなっていない。

本研究では **RA** 患者の単球における **v-STEAP4** の存在を同定し、その発現量を健常者と比較し、**RA** の臨床指標との関連について解析した。さらに **v-STEAP4** を過剰発現させた細胞株を作り、**v-STEAP4** がサイトカイン産生や細胞内シグナル伝達物質に与える影響について解析した。

### Ⅲ. 目的

RA 患者の末梢血単球における STEAP4 及び v-STEAP4 の発現と RA 病態における機能を明らかにする。

## IV. 対象と方法

### 1. 参加者と血液検体

対照となる健常者 14 例と RA 患者 19 例、さらにこれとは別にトシリズマブで治療された RA 患者 6 例から血液検体を得た。全血から末梢血単核球を Ficoll 密度勾配法で分離し、さらに CD14 陽性単球を抗 CD14 磁気ビーズ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) と磁気細胞分離装置を用いて分離した。患者背景は表 1 と表 2 に示した通りである。疾患活動性スコア (DAS) は、欧州リウマチ学会議 (European League Against Rheumatism) の基準に従って算出した [20]。RA 患者は全て 1987 年のアメリカリウマチ学会 (American College of Rheumatology) の分類基準もしくは 2010 年の RA 分類基準を満たしている [21,22]。

本研究は筑波大学附属病院研究倫理審査委員会 (承認番号: H24-164) において、倫理的・科学的妥当性について審査され、その実施が承認されている。各参加者からは署名入りの文書でインフォームドコンセントが得られている。

### 2. リアルタイム qRT-PCR

全 RNA を Isogen (Nippon Gene, Toyama, Japan) を用いて抽出し、cDNA を逆転写キット (Takara Bio, Otsu, Japan) を用いて合成した。リアルタイム定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) は、7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) で TaqMan プローブ法を用いて

行った。対照及び RA 患者のデータを、標準曲線を用いて分析した。全てのデータをヒト - グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ内因性コントロール (VIC<sup>®</sup>/MGB Probe, Primer Limited) (Applied Biosystems) に対して標準化した。STEAP4 及び v-STEAP4 のそれぞれに特異的なプライマー、蛍光標識プローブセット下記の通り作成した (図 2)。

STEAP4 probe, [FAM]3'-TCTTTGCTTGGCTTTGCTGTCATTTCCACA-5'[TAMRA], STEAP4 forward, 5'-GCAAGTCGGCAGGTGTTTG-3', STEAP4 reverse, 3'-GTCCAAGATTACGAACAATATCCATCA-5', v-STEAP4 probe, [FAM]3'-TTCTTGAGTATTGCCTGCCGACTTGCAT-5'[TAMRA], v-STEAP4 forward, 5'-TGGGCTCTCCAGTCAGGAG-3' and v-STEAP4 reverse, 3'-CAGGCTGAGGAGGTGCTAAA-5'(Sigma Aldrich, Japan)

STEAP4 と v-STEAP4 に対する特異性の評価は後述するクローニング後のベクターDNA を用いて行った (データ未表示)。

### 3. STEAP4 および v-STEAP4 のクローニング

pLVSIN-IRES-ZsGreen1 ベクター (Takara Bio) を用いて STEAP4 および v-STEAP4 過剰発現細胞を構築した。このベクターは、目的遺伝子とマーカー遺伝子を単一の mRNA から IRES を介して 2 つの独立したタンパク質として翻訳するバイシストロン性発現ベクターであり、ZsGreen1 を形質導入効率の指標やフローサイトメトリーを用いた選択マーカーとして使用することができる。

ヒト CD14 陽性単球から PrimeSTAR Max DNA Polymerase (Takara Bio) を用いた逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法により得られたヒト STEAP4 (NM\_024636.3) とそのエクソン 3 欠損変異体の開始コドンから終止コドンまでの DNA 配列をそれぞれ In-Fusion HD Cloning Kit (Takara Bio) により pLV5IN-IRES-ZsGreen1 ベクターに挿入した。STEAP4 と v-STEAP4 の RT-PCR に用いたプライマーの配列は以下に示す通りである。

STEAP4/v-STEAP4 forward, 5'-ATGGAGAAAACCTTGTATAGATGC-3',

STEAP4/v-STEAP4 reverse, 5'-CTAGTGTTTTGAGTTCCTTTCCC -3' (Life Technologies Japan, Tokyo, Japan)

対照となる mock のために、ZsGreen1 のみを発現する空ベクターを用意した。

これらのベクターDNA を ECOS<sup>TM</sup> Competent E. coli DH5  $\alpha$  (Nippon Gene, Toyama, Japan)を用いてクローニングした。

#### 4. 過剰発現細胞株の樹立

レンチウイルスは、用意したプラスミドをレンチウイルス産生する Lenti-X293T パッケージング細胞にトランスフェクションすることによって調製した。培養上清中のレンチウイルス粒子を Lenti-X concentrator kit (Takara Bio) を用いて濃縮した。レンチウイルスの宿主側の細胞としてヒト単球細胞系細胞株である THP-1 細胞(RIKEN RBRC-RCB1189)を用意した。48 ウェルカルチャープレート上の 250  $\mu$ l の完全培地で  $7.5 \times 10^4$  個を 24 時間培養した後、産生・濃縮したレンチウイルス粒子 (MOI=80) とポリブレン 16 $\mu$ g/ml を加え、

32°C、1200 x g で 90 分間遠心し、形質導入した。MoFlo cell sorter (DakoCytomation, Glostrup, Denmark)を用いて ZsGreen1 陽性細胞のソーティングと培養を 3 回繰り返すことで形質導入率を上げ、安定細胞株を樹立した。

## 5. 細胞培養研究

THP-1 細胞は 10%FBS (Sigma Aldrich) 、100U / ml のペニシリンストレプトマイシン (Gibco) 、および 10ng / ml のホルボール 12-ミリスチン酸塩 13-アセテート (PMA) (Sigma Aldrich) を加えた RPMI-1640 (Sigma Aldrich、St. Louis、MO) 培地で、37°C、5%CO<sub>2</sub> の湿潤インキュベーター内で培養した。1×10<sup>6</sup> 細胞/ml の STEAP4、v-STEAP4 過剰発現細胞、および mock を 48 ウェル細胞培養プレートに播種し、48 時間培養しマクロファージ様に分化させた後、PMA フリーの完全培地に置換し、24 時間さらに培養した後、S3I-201 もしくは Bay 11-7082 (Sigma Aldrich) の存在下または非存在下で 1 μg / ml リポ多糖 (LPS) により刺激した。

上清を LPS 刺激の 24 時間後に回収し、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) キット (R&D systems) またはサイトカインビーズアレイ (BD Biosciences, San Jose, CA) を用いて IL-6 および TNF α などの炎症性サイトカインの産生を測定した。免疫ブロット法の為に、LPS 刺激 1 μg / ml の後、0 分もしくは 15 分、30 分、60 分間の時点でウェル中の接着細胞を、プロテ

アーゼ/ホスファターゼ阻害剤 (CST) を補充した緩衝液 (Tris-HCl pH7.4, 50mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, PMSF 2mM, NP-40 0.5%) 中で溶解した。

## 6. 酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)

ELISA キット (R&D Systems) を使用して、細胞培養上清中のサイトカインおよびケモカインならびに TNF  $\alpha$  および IL-6 の血清濃度を測定した。

## 7. Cytometric Bead Array (CBA)

IL-8、IL-1  $\beta$ 、IL-6、IL-10、TNF  $\alpha$  および IL-12p70 を含むヒトサイトカインを同時に検出する BD Cytometric Bead Array Human Inflammatory Cytokines Kit (BD Biosciences) を用いて血清サンプル中のサイトカインのレベルを測定した。サンプルは、BD FACSVerse サイトメーター (Becton Dickinson、Franklin Lakes、NJ) を用いて評価し、FCAP アレイソフトウェア (BD Biosciences、San Jose、CA) を用いて分析した。

## 8. SDS-PAGE 免疫ブロット法

BCA タンパク質アッセイ試薬キット (Pierce、Rockford、IL) を用いてタンパク質濃度を計算し、等しい濃度に調整した検体を等量ずつ SuperSep Ace 10-20%ゲル (Wako、Osaka、Japan) の各ウェルに充填した。STEAP4 および v-STEAP4 の両方を認識することができる抗 STEAP4 C 末端領域抗体 (Aviva Systems Biology、San Diego) および抗 actin 抗体 (Sigma-Aldrich)



を 1 : 1000 および 1 : 3000 で希釈した。一次抗体の希釈液には 10% ブロックエース (Dainippon Pharmaceutical, Osaka, Japan) を用いた。Toll 様受容体 4 (TLR4) の下流シグナルである NF- $\kappa$ Bp65、リン酸化された (p-) NF- $\kappa$ Bp65 (Ser536)、I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-p38 (Thr180 / Tyr182)、p38、p-ERK1 / 2 (Thr202/Tyr204)、ERK1 / 2、JNK、p-JNK (Thr183 / Tyr185)、SOCS3、STAT1、p-STAT1 (Ser727)、STAT3 (Cell Signaling Technology) および p-STAT3 (Thr202 / Tyr204) (Assay Biotechnology Company) に対する抗体を 10% ブロックエース (Dainippon Pharmaceutical) で 1 : 1000 に希釈した。抗ウサギ IgG-HRP コンジュゲート二次抗体 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を STEAP4 については 1 : 1000、シグナルタンパク質については 1 : 2000、actin については 1 : 6000 で、Solution 2 (TOYOBO, Osaka, Japan) に希釈した。

## 9. 統計学的解析

データは平均±標準偏差 (SD) または平均±標準誤差 (SEM) として記載した。STEAP4 過剰発現 THP-1 細胞株に関するデータを、Levene 検定により  $P > 0.05$  (等分散性) を確認した後、Tukey 検定を用いて統計学的有意差について解析した。Mann-Whitney U 検定を使用して、対照群と RA 群との間の種々のパラメーターの差ならびに THP-1 細胞株における TLR4 下流シグナル特異的阻害剤によるサイトカイン抑制アッセイの結果について解析した。トシリズマブ治療群の前後の差異を Wilcoxon の符号順位検定によって解析した。

STEAP4 発現と臨床情報との間の相関性を Spearman 検定によって解析した。

0.05 未満の P 値は統計的に有意であるとした。

## V. 結果

### 1. ヒト末梢血単球での STEAP4 のエクソン 3 欠損変異体の同定。

ヒト初代単球における変異型発現を調べるために、STEAP4 の RT-PCR を行った。対照および RA から得られた検体において、全長 STEAP4 バンド (1340bp) だけでなく低分子量バンド (812bp) も見出し、この 812bp のバンドの強度は対照よりも RA で強い傾向があった。これらの電気泳動で展開されたバンドをアガロースゲル上からそれぞれ切り出し、溶出した DNA をクローニングしてその塩基配列を解析した。重分子量バンド(1340bp)は全長 STEAP4 として同定され、一方で低分子量バンドはそのエクソン 3 欠損変異体 (v-STEAP4) (812bp) として同定された (図 3)。

### 2. RA 患者と健常者の STEAP4 および v-STEAP4 発現量の比較検討

次に、STEAP4 と v-STEAP4 のそれぞれに特異的なプライマープローベセットを作成し、19 人の RA 患者 (RA 群) および 14 人の健常者 (対照群) から得られた末梢血 CD14 陽性単球における STEAP4 および v-STEAP4 の mRNA 発現レベルを分析するために qRT-PCR を行った。STEAP4 および v-STEAP4 の発現は、双方ともに対照群と比較して RA 群で有意に高かった ( $P < 0.05$ ) (図 4)。RA 群では STEAP4 と v-STEAP4 との間に正の相関が認められ ( $R = 0.463$ ,  $P < 0.05$ ) (図 5)、STEAP4 に対する v-STEAP4 の発現比は RA 群で対照群より有意に高かった (図 6,  $P < 0.05$ )。

### 3. RA 患者における STEAP4 および v-STEAP4 発現と臨床情報との相関

CD14 陽性細胞における STEAP4 および v-STEAP4 の発現は、対照群よりも RA 群で有意に高かった。しかしながら、RA 患者におけるこれらの炎症性因子とそれらの発現との間の関連性は、これまで検証されていない。そこで、STEAP4 または v-STEAP4 の発現レベルと、C 反応性タンパク質 (CRP)、赤血球沈降速度 (ESR)、リウマトイド因子 (RF)、マトリックスメタロプロテイナーゼ 3 (MMP-3) と RA 患者における臨床的疾患活動性のマーカーである DAS28-CRP / ESR などの臨床情報との相関を調べた。STEAP4 は CRP ( $R = 0.619$ ,  $P < 0.01$ )、ESR ( $R = 0.499$ ,  $P < 0.05$ ) と正の相関を持ち、v-STEAP4 は CRP ( $R = 0.549$ ,  $P < 0.05$ )、RF ( $R = 0.485$ ,  $P < 0.05$ ) と正の相関を持っていた (図 7)。MMP-3 と DAS-28-CRP/ESR は STEAP4、v-STEAP4 のいずれとも相関しなかった (図 8)。

STEAP4 と v-STEAP4 の発現が生体内で炎症性サイトカインにより制御されていることを明らかにするために、トシリズマブ (IL-6 阻害薬) が STEAP4 および v-STEAP4 mRNA 発現レベルに及ぼす影響について検討した。本研究では、12 週間のトシリズマブ治療を受けた 6 人の RA 患者から得られた治療前後の CD14 陽性単球において、v-STEAP4 / STEAP4 発現比は変動しなかったものの、STEAP4 および v-STEAP4 発現は共に有意な減少を示した (表 2、図 9)。

#### 4. STEAP4 および v-STEAP4 の過剰発現細胞株の樹立

ヒト単球における STEAP4 および v-STEAP4 の相対的な機能を解析するために、STEAP4 および v-STEAP4 過剰発現細胞を樹立した。

過剰発現細胞株の各群の培養とレポータータンパク質 ZsGreen1 を用いたソーティングを 3 回繰り返すことにより、導入効率を上げた。3 回目の選別後、純度は 95% 以上に上昇した (図 10A)。各過剰発現細胞株における STEAP4 および v-STEAP4 の mRNA 発現を確認するために RT-PCR を実施した。全長 mRNA バンドおよびエクソン 3 欠損変異体のサイズのバンドが、過剰発現細胞株の各グループにおいて明瞭に検出された (図 10B)。次に、内部対照としての actin に対する STEAP4 および v-STEAP4 のタンパク質発現レベルを確認するために免疫ブロット法を行った。STEAP4 過剰発現細胞株における全長 mRNA に相当するバンド (52kD) の強度は空ベクターを導入した対照となる mock と比較して増加し、エクソン 3 欠損変異体のバンド (31.3kD) も v-STEAP4 過剰発現細胞株で増加した (図 10C)。

#### 5. STEAP4 および v-STEAP4 過剰発現細胞株による機能解析

次に、STEAP4 および v-STEAP4 の機能を解明するために、LPS 刺激を介して炎症性サイトカイン産生を検出しようと試みた。LPS 受容体である TLR4 の発現を上げるために、LPS 刺激の前に THP-1 細胞を PMA 刺激によりマクロファージ様に分化させた。STEAP4 過剰発現細胞株では IL-6 の産生が増加し、TNF  $\alpha$  は v-STEAP4 過剰発現細胞株で産生が増加した (図 11、

左)。一方で、興味深いことに v-STEAP4 過剰発現細胞株では IL-6 の産生が著明に抑制された (図 11、中央)、さらに、IL-1 $\beta$  の変動は IL-6 と同様の傾向を示した (図 11、右)。

次に、STEAP4 および v-STEAP4 過剰発現細胞株の LPS 刺激を介した下流シグナル伝達タンパク質の変動を調べた。まず、NF- $\kappa$ B と STAT3 に注目した。TNF $\alpha$  産生の主要な TLR4 下流シグナリング経路である NF- $\kappa$ B シグナル伝達に関して解析したところ、p-NF- $\kappa$ B は、v-STEAP4 過剰発現細胞株における LPS 刺激の 15 分後および 30 分後に増加し、NF- $\kappa$ B の分解阻害分子である I $\kappa$ B $\alpha$  の degradation は、v-STEAP4 過剰発現細胞株において 30 分および 60 分で遷延していた (図 12A)。一方、v-STEAP4 過剰発現細胞株では、LPS 刺激の 15 分、30 分、60 分後に p-STAT3 が減少していた。興味深いことに、0 分、15 分、30 分および 60 分で STAT3 は v-STEAP4 で内部対照の actin と比較して degradation していた。p-STAT1 は過剰発現細胞株の各群間でほぼ同等であった。さらに、STAT3 の負の調節因子として知られている SOCS3 は、v-STEAP4 過剰発現細胞株において LPS 刺激によって誘導されなかった (図 12B)。

また、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) ファミリー (p38、ERK1/2、および JNK) であるその他の TLR4 関連シグナル伝達カスケードを分析した。STEAP4 過剰発現細胞株において 15 分および 30 分で P-p38 が減少し、30 分で p-ERK1/2 が減少したが、p-JNK は STEAP4 及び v-STEAP4 過剰発現細胞株では影響を受けなかった (図 12C)。

NF- $\kappa$ B または STAT3 シグナル伝達がそれぞれ TNF $\alpha$  または IL-6 の産生に必要であるかどうかを確認するために、この実験系においてそれぞれのシグナル伝達物質に特異的な阻害剤による実験を行った。未感染の THP-1 マクロファージにおいて、NF- $\kappa$ B 阻害剤 (Bay 11-7082) により LPS 刺激後の TNF $\alpha$  産生および LPS 刺激後 15 分での NF- $\kappa$ B のリン酸化および I $\kappa$ B $\alpha$  の分解が抑制され、STAT3 阻害剤 (S3I-201) により IL-6 産生および STAT3 のリン酸化が抑制された (図 13A、B)。これら実験によって THP-1 マクロファージの LPS 刺激を介したこれらのサイトカインの産生に NF- $\kappa$ B および STAT3 がそれぞれ必要であることを確認した。mock と v-STEAP4 過剰発現細胞株において TNF $\alpha$  産生は、NF- $\kappa$ B 阻害剤に用量依存的に抑制されたが、STEAP4 過剰発現細胞株では抑制されなかった (図 14、左)。IL-6 産生は、mock および v-STEAP4 過剰発現細胞株で STAT3 阻害剤によって抑制されたが、STEAP4 過剰発現細胞株では増加した (図 14、右)。

以上をまとめると、STEAP4 および v-STEAP4 の過剰発現は、LPS 刺激の下流カスケードに影響を与え、v-STEAP4 過剰発現細胞株における主なカスケードは、NF- $\kappa$ B 経路を介した TNF $\alpha$  と STAT3 を介した IL-6 産生であることを示唆する (図 15 に要約)。

## VI. 考察

本研究では、最初にヒト単球における STEAP4 のエクソン 3 欠損変異体 (v-STEAP4) を同定した。STEAP4 および v-STEAP4 の mRNA 発現は、RA 患者においてより高く、RA に関連した炎症マーカーである CRP や ESR と正の相関があった。STEAP4 の mRNA 発現は、CD14 陽性単球における TNF  $\alpha$  によって誘導され[15]、RA 患者において TNF  $\alpha$  阻害薬での治療により減少した [17]。この研究では、STEAP4 および v-STEAP4 の発現が IL-6 阻害薬によって有意に減少することを見出した。これらの知見は、STEAP4 および v-STEAP4 の発現が、TNF  $\alpha$  や IL-6 などの炎症性サイトカインによって制御されていることを示唆する。しかしながら、サイトカイン産生とそれに関連するシグナル伝達物質に対する STEAP4 および v-STEAP4 の機能的差異は依然として不明である。

STEAP4 または v-STEAP4 のいずれかを過剰発現する単球系細胞株を独自に樹立した。LPS 刺激による IL-6 および IL-1  $\beta$  の産生が v-STEAP4 において著明に抑制されたが、TNF  $\alpha$  は増加していた。一方で、STEAP4 は IL-6 および IL-1  $\beta$  の産生を有意に増加させたが、TNF  $\alpha$  は LPS 刺激によって増加せず、STEAP4 および v-STEAP4 が LPS 刺激下の異なる経路に影響することが示唆された。STEAP4 は RA のヒト単球、好中球および滑膜線維芽細胞に見出され、RA の病因における負の制御因子であると考えられている [15~17]。しかし、ヒト単球では、v-STEAP4 の過剰発現は *in vitro* で TNF  $\alpha$  および IL-6 の



産生に反対の効果をもたせた。この研究でより重要な結果は、**v-STEAP4** の過剰発現が **IL-6** の産生を著明に抑制したことである。 **STEAP4** の選択的スプライシングの制御メカニズムは未知であるが、 **LPS /IL-6** カスケードのこの **STEAP4** と **v-STEAP4** の機能的差異は、 **v-STEAP4** の主要な抗炎症性の役割を示している。

過去のマウスの研究では、 **TIARP** 欠損マウス（ **TIARP** およびその変異体の両方を欠損している）では、 **IL-6** の血清レベルが高く一方で **TNF  $\alpha$**  は検出されなかった。 **TIARP** 欠損マウスでコラーゲン誘導性関節炎および **K / B  $\times$  N** 血清移行性関節炎を起こすと野生型と比べより関節炎が増悪し、その関節炎は **IL-6** 阻害薬により改善したが、 **TNF  $\alpha$**  阻害薬では改善が見られなかった [13,14]。したがって、 **TIARP** は関節炎における負の調節因子であると考えられており、その機能は、 **in vivo** で **TNF  $\alpha$**  より **IL-6** の調節に依存している。また、 **GPI** 誘導性関節炎におけるエクソン 3 欠損変異体が関節炎の症度に応じて発現が増加することも見出した（予備的観察）。 **TIARP** の変異体は、関節炎モデルにおいて **IL-6** の抑制に関連する可能性があり、今後は関節炎モデルマウスで **TIARP** 変異体を過剰発現させるなどの検討が必要である。

私を知る限り、これはヒト **STEAP4** と比較してヒト **v-STEAP4** の細胞内機能を比較した最初の報告である。免疫ブロット法により、 **v-STEAP4** 過剰発現細胞における **LPS** 刺激下の **p-NF- $\kappa$  B** および **p-STAT3** の明らかな違いを確認した。 **v-STEAP4** 過剰発現細胞において、 **TNF  $\alpha$**  産生の変動は、 **NF- $\kappa$  B** シグナル伝達の活性化と一致し、 **IL-6** は、 **STAT3** のリン酸化と一致した。こ

これらの知見は、**v-STEAP4** の過剰発現が、それぞれのシグナル伝達経路の各々を介して各サイトカインの産生に影響を及ぼすことを示唆している。

**STAT3** のリン酸化の負の調節因子として知られている **SOCS3** が **LPS** 刺激で誘導されるとの報告も過去にはある [23,24]。しかし、我々の研究では、**SOCS3** は、**v-STEAP4** 過剰発現細胞株において **LPS** 刺激で誘導されなかった。したがって、**v-STEAP4** による **STAT3** リン酸化の抑制は **SOCS3** を介してはいないと考えられた。さらに、**NF- $\kappa$ B** には **Bay 11-7082**、**STAT3** には **S3I-201** といったそれぞれのシグナル伝達経路に特異的な阻害剤を使用して、未感染の **THP-1** マクロファージにおいて **LPS** 刺激後の **TNF  $\alpha$** 、**IL-6** 産生を検討することでこの実験系においては **TNF  $\alpha$**  産生には **NF- $\kappa$ B** シグナル伝達経路が必要であり、**IL-6** 産生には **STAT3** シグナル伝達経路が必要であることを確認した。これらの阻害剤は、**mock** および **v-STEAP4** 過剰発現細胞株における **TNF  $\alpha$**  および **IL-6** 産生を抑制したが、**STEAP4** 過剰発現細胞株では抑制しなかったことから、**STEAP4** はおそらく **NF- $\kappa$ B** および **STAT3** カスケードとは別のシグナル伝達経路を調節する可能性がある。

**v-STEAP4** と違い、**STEAP4** は **p-ERK1 / 2** および **p-p38** を減少させた。しかしながら **STEAP4** 過剰発現細胞株におけるサイトカイン産生はこれらの **MAPK** ファミリーと共に有意に抑制されなかったため、その影響は限定的であると考えられた。一方で、**STEAP4** は特に **STAT3** 特異的阻害剤での **IL-6** 産生の増加に関連し得る **p-STAT1** を増加させる可能性がある。

## VII. 結論

v-STEAP4 が RA 患者で増加しているだけでなく、RA 炎症状態を模倣した LPS によって誘導される炎症性サイトカインの産生経路を特異的に制御するという機能的意義を明らかにした。v-STEAP4 経路を特異的に活性化する新規治療は、NF- $\kappa$ B および STAT3 経路におけるサイトカインの制御を介して RA 炎症の軽減をもたらす得る。さらに、v-STEAP4 の制御は、正常な免疫応答を維持し、有害な免疫抑制を回避できる可能性がある。我々の研究は、RA におけるヒト単球での STEAP4 およびその変異体による炎症制御の分子メカニズムについて新しい洞察を提供した。今後の治療応用のためにより詳細なメカニズムの解明が望まれる。

## VIII. 謝辞

本研究を行うにあたり、多くの御指導と御支援を承りました住田孝之教授、松本功准教授に厚く御礼を申し上げます。また、日頃より研究への御助言、御指導を頂きました膠原病・リウマチ・アレルギー内科の研究室の皆様から心から感謝致します。

## IX. 参考文献

1. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:429–42.
2. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol.* 2008;214:149–60.
3. Al-Shakarchi I, Gullick NJ, Scott DL. Current perspectives on tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis: a review. *Patient Preference Adherence.* 2013;4:653–66.
4. Inoue A, Matsumoto I, Tanaka Y, Iwanami K, Kanamori A, Ochiai N, et al. Tumor necrosis factor alpha-induced adipose-related protein expression in experimental arthritis and in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:R118.
5. Moldes M, Lasnier F, Gauthereau X, Klein C, Pairault J, Fève B, et al. Tumor necrosis factor-alpha-induced adipose-related protein (TIARP), a cell-surface protein that is highly induced by tumor necrosis factor-alpha and adipose conversion. *J Biol Chem.* 2001;276:33938–46.
6. Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Chambaut-Guérin AM, et al. Interleukin-6 is a positive regulator of tumor necrosis factor alpha-induced adipose-related protein in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett.* 2004;560:153–7.
7. Kralisch S, Sommer G, Weise S, Lipfert J, Lossner U, Kamprad M, et al. Interleukin-1 beta is a positive regulator of TIARP/STAMP2 gene and protein expression in adipocytes in vitro. *FEBS Lett.* 2009;583:1196–200.

8. Sparna T, Rétey J, Schmich K, Albrecht U, Naumann K, Gretz N, et al. Genome-wide comparison between IL-17 and combined TNF- $\alpha$ /IL-17 induced genes in primary murine hepatocytes. *BMC Genomics*. 2010;11: 226.
9. Ramadoss P, Chiappini F, Bilban M, Hollenberg AN. Regulation of hepatic six transmembrane epithelial antigen of prostate 4 (STEAP4) expression by STAT3 and CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$ . *J Biol Chem*. 2010;285:16453-66.
10. Matsumoto I, Inoue A, Takai C, Umeda N, Tanaka Y, Kurashima Y, et al. Regulatory roles of tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced proteins (TNFAIP) 3 and 9 in arthritis. *Clin Immunol*. 2014;153:73–8.
11. Wellen KE, Fucho R, Gregor MF, Furuhashi M, Morgan C, Lindstad T, et al. Coordinated regulation of nutrient and inflammatory responses by STAMP2 is essential for metabolic homeostasis. *Cell*. 2007;129: 537–48.
12. Ten Freyhaus H, Calay ES, Yalcin A, Vallerie SN, Yang L, Calay ZZ, et al. Stamp2 controls macrophage inflammation through nicotinamide adenine dinucleotide phosphate homeostasis and protects against atherosclerosis. *Cell Metab*. 2012;16:81–9.
13. Inoue A, Matsumoto I, Tanaka Y, Umeda N, Tanaka Y, Mihara M, et al. Murine tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced adipose-related protein (tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced protein 9) deficiency leads to arthritis via interleukin-6 overproduction with enhanced NF- $\kappa$ B, STAT-3 signaling, and

- dysregulated apoptosis of macrophages. *Arthritis Rheum.* 2012;64:3877-85.
14. Inoue A, Matsumoto I, Tanaka Y, Umeda N, Takai C, Kawaguchi H, et al. TIARP attenuates autoantibody-mediated arthritis via the suppression of neutrophil migration by reducing CXCL2/CXCR2 and IL-6 expression. *Sci Rep.* 2016;20:38684.
  15. Takai C, Matsumoto I, Inoue A, Umeda N, Tanaka Y, Kurashima Y, et al. Specific overexpression of tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced protein (TNFAIP)9 in CD14<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup> monocytes in patients with rheumatoid arthritis: comparative analysis with TNFAIP3. *Clin Exp Immunol.* 2015;180:458-66.
  16. Tanaka Y, Matsumoto I, Iwanami K, Inoue A, Minami R, Umeda N, et al. Six-transmembrane epithelial antigen of prostate4 (STEAP4) is a tumor necrosis factor alpha-induced protein that regulates IL-6, IL-8, and cell proliferation in synovium from patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2012;22:128–136.
  17. Tanaka Y, Matsumoto I, Iwanami K, Inoue A, Umeda N, Tanaka Y, et al. Six-transmembrane epithelial antigen of prostate4 (STEAP4) is expressed on monocytes/neutrophils, and is regulated by TNF antagonist in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2012;30:99–102.
  18. S.B. Wang, T. Lei, L.L. Zhou, H.L. Zheng, C.P. Zeng, N. Liu, Z.Q. Yang, X.D. Chen. Functional analysis and transcriptional regulation of porcine six

- transmembrane epithelial antigen of prostate 4 (STEAP4) gene and its novel variant in hepatocytes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45:612-20.
19. Stamm S, Ben-Ari S, Rafalska I, Tang Y, Zhang Z, Toiber D, et al. Function of alternative splicing. *Gene* 2005;344:1–20.
20. van Gestel AM, Prevoo ML, van 't Hof MA, van Rijswijk MH, van de Putte LB, van Riel PL. Development and validation of the European League Against Rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis. Comparison with the preliminary American College of Rheumatology and the World Health Organization/International League Against Rheumatism Criteria. *Arthritis Rheum* 1996;39:34-40.
21. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-24.
22. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010;62:2569-81.
23. Zhu BM, Ishida Y, Robinson GW, Pacher-Zavisin M, Yoshimura A, Murphy PM, et al. SOCS3 negatively regulates the gp130-STAT3 pathway in mouse skin wound healing. *J Invest Dermatol* 2008;128:1821-9.
24. Zhou X, Liu Z, Cheng X, Zheng Y, Zeng F, He Y. Socs1 and Socs3 degrades Traf6 via polyubiquitination in LPS-induced acute necrotizing pancreatitis. *Cell Death Dis.* 2015;6:e2012.



## X. 主要略語一覧

本論文において用いた主な略語を以下に示す。

<b>TNF<math>\alpha</math></b> : tumor necrosis factor alpha	<b>qRT-PCR</b> : quantitative reverse
<b>TIARP</b> : TNF $\alpha$ -induced adipose- related protein	20 transcription polymerase chain reaction
<b>STEAP4</b> : six transmembrane 5 epithelial antigen of prostate 4	<b>PBMC</b> : peripheral blood mononuclear cell
<b>RA</b> : rheumatoid arthritis	<b>GPI</b> : glucose-6-phosphate isomerase
<b>v-STEAP4</b> : exon3-spliced variant STEAP4	25 <b>PMA</b> : phorbol 12-myristate 13- acetate
<b>PCR</b> : polymerase chain reaction	<b>ELISA</b> : enzyme-linked immunosorbent assay
10 <b>TLR4</b> : toll-like receptor 4	<b>SOCS3</b> : suppressor of cytokine signaling 3
<b>IL</b> : interleukin	30 <b>DAS</b> : Disease Activity Score
<b>LPS</b> : lipopolysaccharide	<b>SD</b> : standard deviation
<b>p-</b> : phosphorylated	<b>SEM</b> : standard error of the mean
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b> : nuclear factor-kappa B	<b>CRP</b> : C-reactive protein
15 <b>STAT3</b> : signal transducer and activator of transcription 3	35 <b>ESR</b> : erythrocyte sedimentation rate, <b>RF</b> : rheumatoid factor
<b>RT-PCR</b> : reverse transcription polymerase chain reaction	<b>MMP-3</b> : matrix metalloproteinase 3

40

## XI. 図表

45

50

55

表 1.

RA 患者の臨床的背景 (n = 19)

Age	64.3± 10.2
Female, n (%)	13 (68%)
Disease duration (years)	14.7±10.2
DAS28-CRP	3.1± 0.9
DAS28-ESR	3.4± 1.0
Erythrocyte sedimentation Rate (mm/h)	29.2±20.2
C-reactive protein (mg/dl)	1.7± 1.8
Rheumatoid factor (IU/ml)	120.7±168.5
Matrix metalloproteinase 3 (ng/ml)	243.5±291.4
Anti-CCP antibodies Positive, n	11 (unknown: 6)
Prednisolone use, n (% , mean dose)	11 (58%, 5.7± 0.6mg/day)
Methotrexate use, n (% , mean dose)	11(58%, 6.5± 0.7mg/week)
Use of biological Agents, n (%)	0 (0%)

Values are the mean ± SD. RA = rheumatoid arthritis, CRP = C-reactive protein. DAS 28 = disease activity score in 28 joints; CCP = cyclic citrullinated peptide.

表 2.

---

トシリズマブ治療をした RA 患者の臨床的背景 (n = 6)

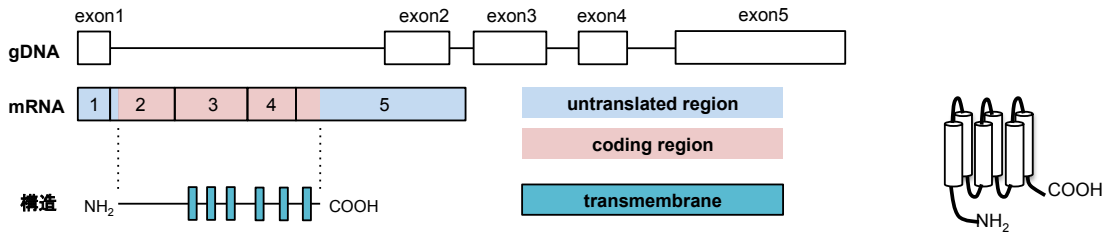
---

Age	53.7± 7.4
Female, n (%)	5 (83%)
Disease duration (years)	9.6± 5.7
Use of biological Agents before tocilizumab, n (%)	2 (17%)
Anti-CCP antibodies Positive, n (%)	5 (83%)
DAS28-CRP	3.5± 0.6
DAS28-ESR	3.7± 0.8
Erythrocyte sedimentation Rate (mm/h)	27.6± 9.9
C-reactive protein (mg/dl)	1.0± 0.50
Prednisolone use, n (%), mean dose)	6 (100%, 6.2± 1.2mg/day)
Methotrexate use, n (%), mean dose)	3 ( 50%, 10± 2.0mg/week)

---

Values are the mean ± SD. CRP = C-reactive protein. RA = rheumatoid arthritis; DAS 28 = disease activity score in 28 joints; CCP = cyclic citrullinated peptide.

---



70

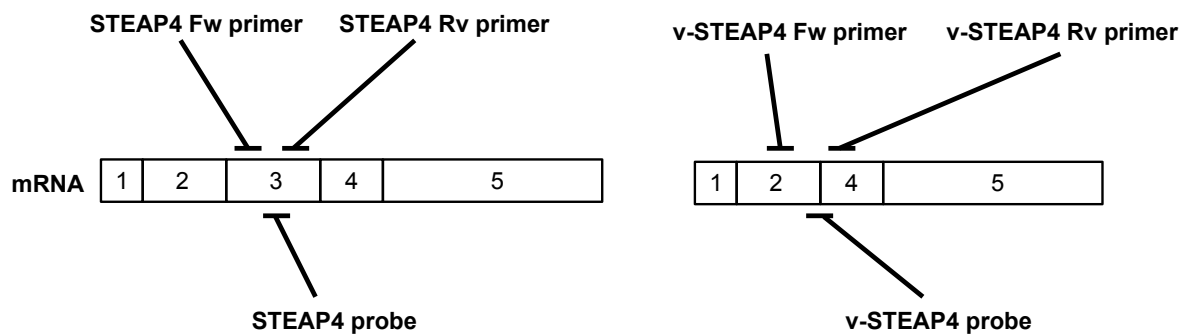
図 1 TIARP/STEAP4 の構造

TIARP/STEAP4 は 5 のエクソンから成る mRNA で構成され、翻訳されたタンパクは 6 回膜貫通型の構造となっている。

75

80

85



90

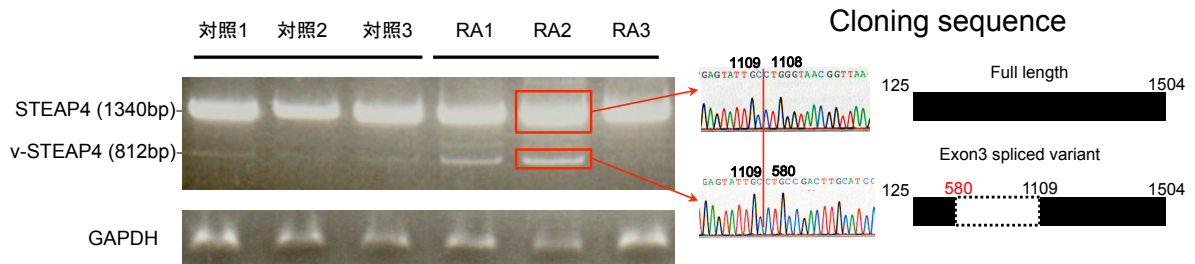
図 2 STEAP4 及び v-STEAP4 のそれぞれに特異的なプライマー、蛍光標識プローブセットの認識部位

STEAP4 のプライマーとプローブは v-STEAP4 には存在しないエクソン 3 を認識部位とすることで STEAP4 を特異的に増幅、検出するように設計した。v-STEAP4

95 については STEAP4 には存在しないエクソン 2 とエクソン 4 の連結部をプローブの認識部位とすることで v-STEAP4 に特異的な検出系となるように設計した。

100

105

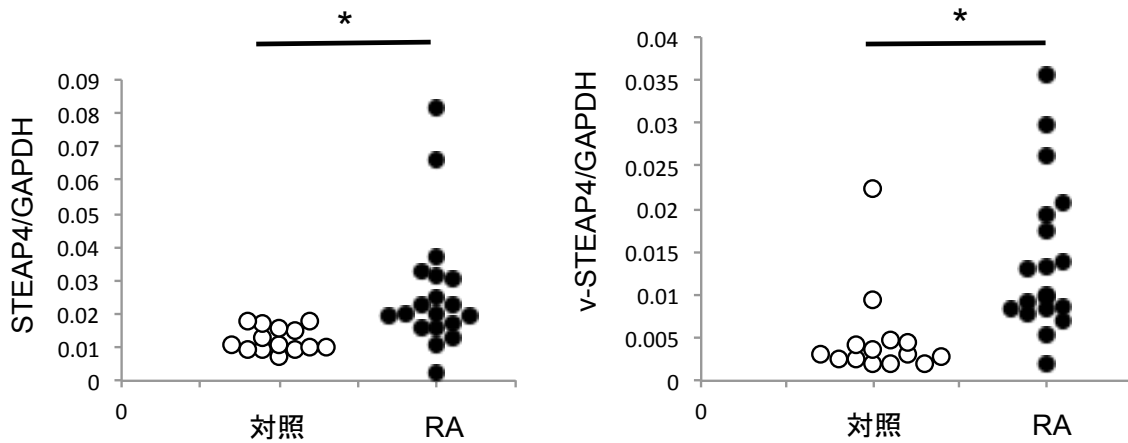


110 **図 3** ヒト末梢血単球での **STEAP4** のエクソン 3 欠損変異体の同定

RT-PCR を用いた CD14 陽性単球 (対照, n = 3; RA, n = 3) における STEAP4 およびそのエクソン 3 欠損変異体の検出とクローニングシーケンス解析による同定を行った。

115

120



125

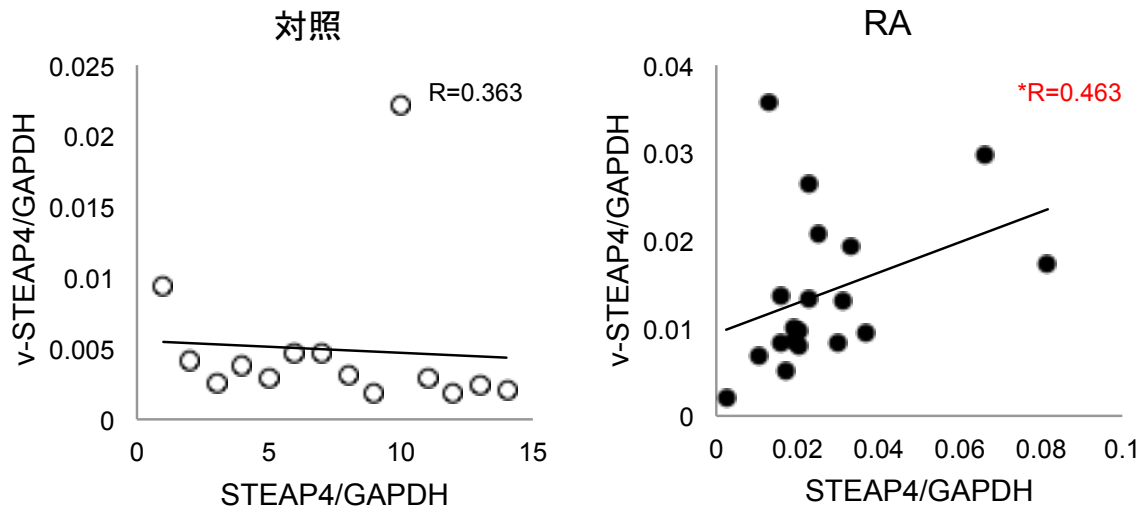
図 4 RA 患者で **STEAP4** と **v-STEAP4** の発現が上昇している。

qRT-PCR を用いた対照 (n = 14) と RA (n = 19) との間の末梢血 CD14 陽性単球における **STEAP4** (左) および **v-STEAP4** (右) mRNA 発現レベルを比較した。\* P < 0.05 は Mann-Whitney U 検定による。

130

135





140

図 5 RA 患者では **STEAP4** と **v-STEAP4** 発現に正相関がある。

STEAP4 と v-STEAP4 との間の qRT-PCR による mRNA 発現の相関の分析。

R は相関係数であり、\* P < 0.05 は Spearman 検定による。

145

150

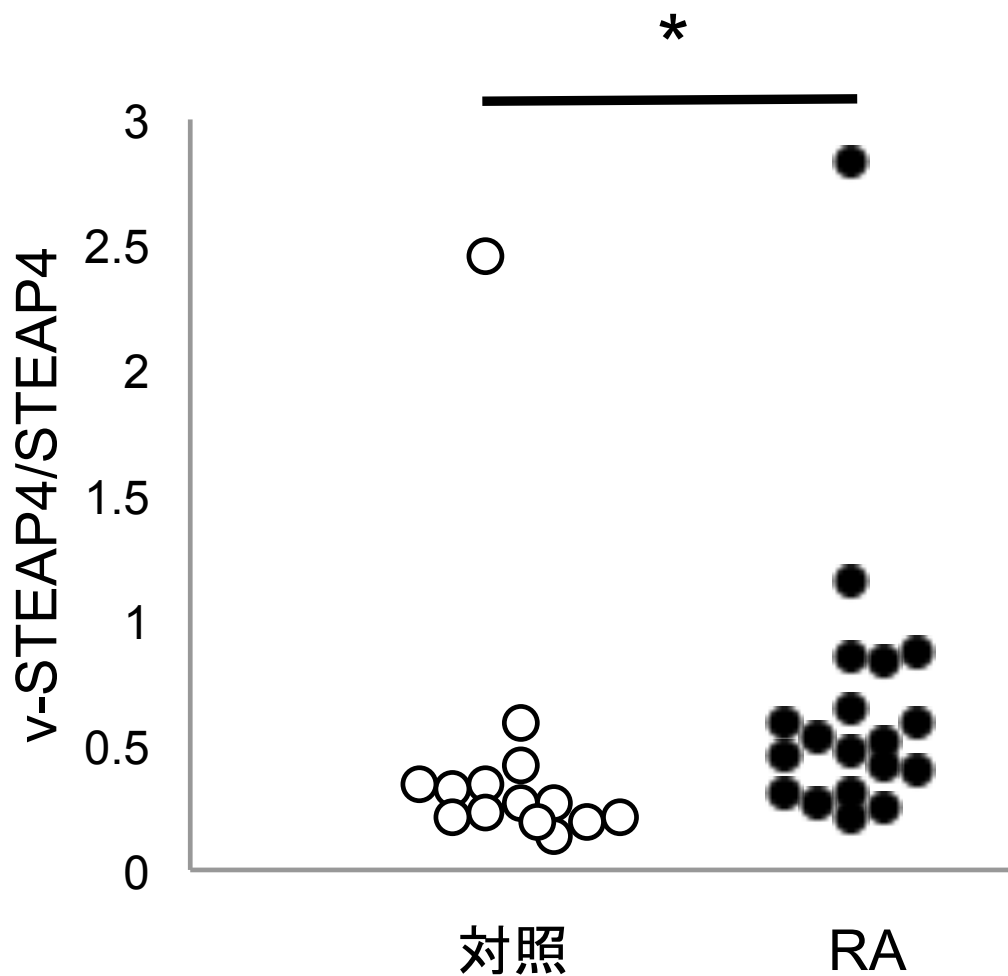
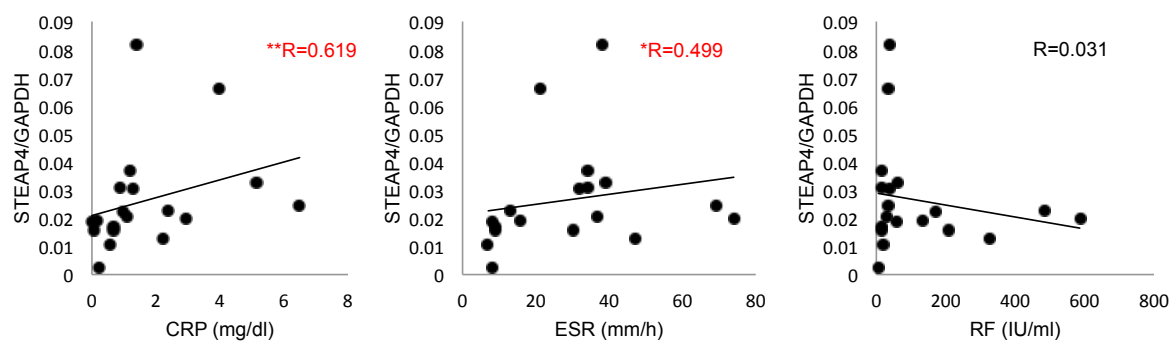


図 6 RA 患者で v-STEAP4 / STEAP4 比が増加している。

対照 (n = 14) と RA (n = 19) との間の末梢血 CD14 陽性単球における qRT-PCR による v-STEAP4 / STEAP4 比を比較した。値は平均±SD である。

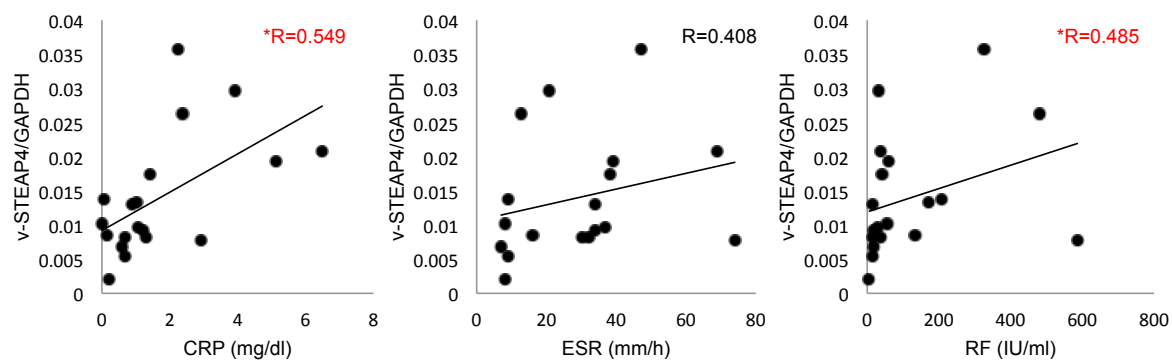
160 \* P < 0.05 は Mann-Whitney U 検定による。

(A)



165

(B)



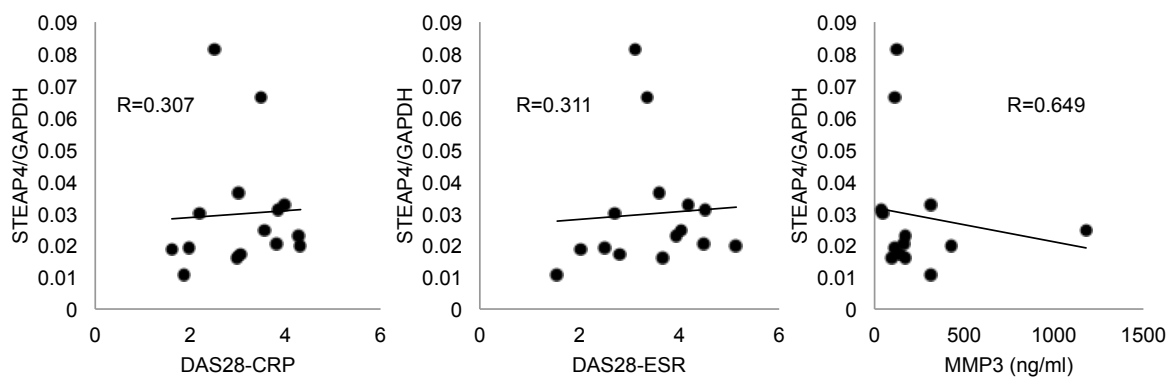
170

### 図 7 STEAP4、v-STEAP4 発現と CRP、ESR、RF との相関

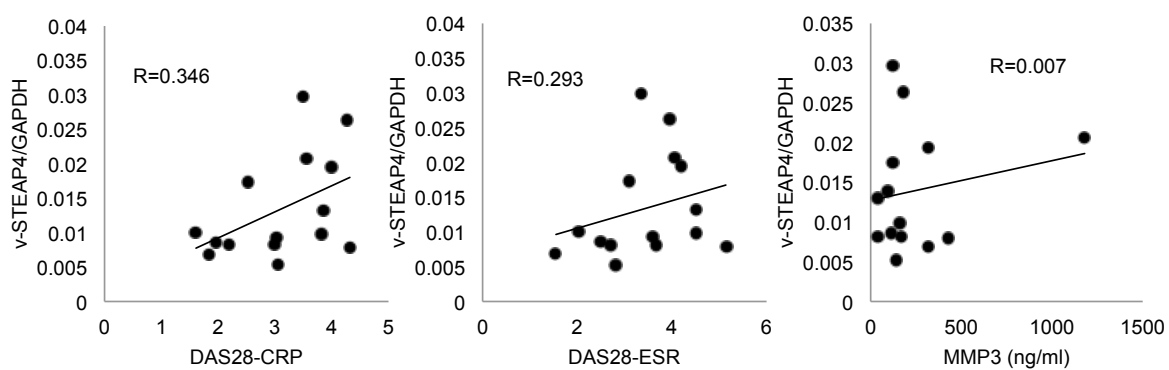
RA 患者における(A) STEAP4 または(B) v-STEAP4 の qRT-PCR による mRNA 発現と、CRP、ESR (n = 18)、RF (n = 19) などのバイオマーカーとの相関を解析した。R は相関係数であり、\* P < 0.05、\*\* P < 0.01 は Spearman 検定による。

175

(A)



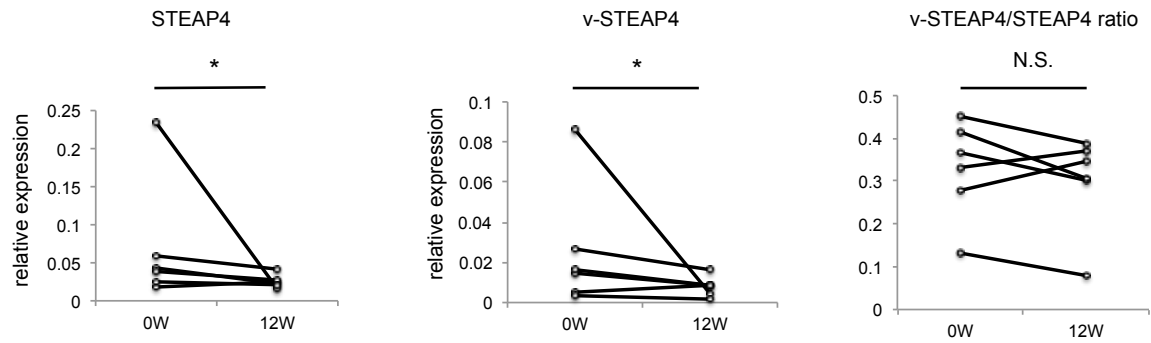
(B)



180

### 図 8 STEAP4、v-STEAP4 発現と DAS28-CRP/ESR、MMP3 との相関

185 RA 患者における(A) STEAP4 または(B) v-STEAP4 の mRNA 発現と DAS28-CRP、DAS28-ESR ( $n = 15$ ) または MMP3 ( $n = 14$ ) との相関を Spearman 検定で解析した。R は相関係数である。



190

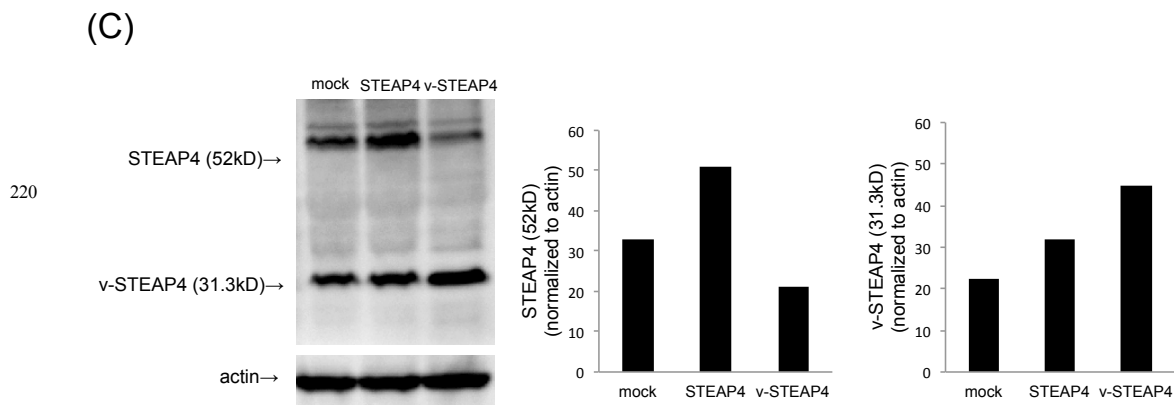
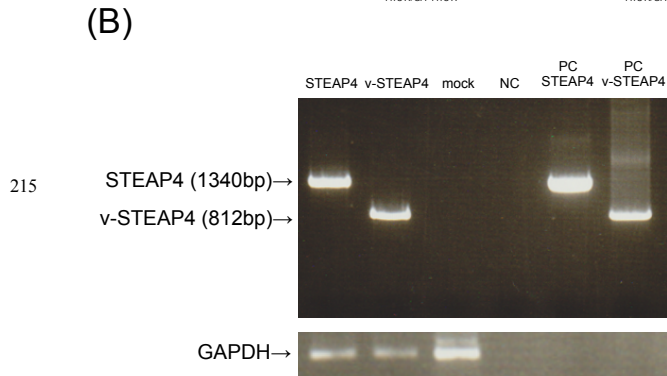
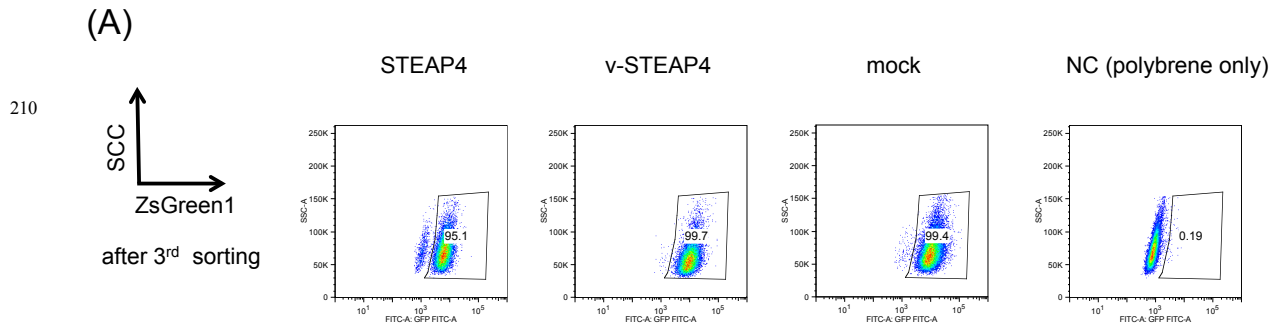
図 9 IL-6 阻害薬投与により **STEAP4** と **v-STEAP4** の発現は低下した。

195

IL-6 阻害薬 (トシリズマブ)による治療を行い、疾患活動性が低下した 6 人の RA 患者の治療前後の末梢血 CD14 陽性単球における **STEAP4** または **v-STEAP4** の発現を解析した。 \*  $P < 0.05$  は Wilcoxon の符号順位検定による。

200

205

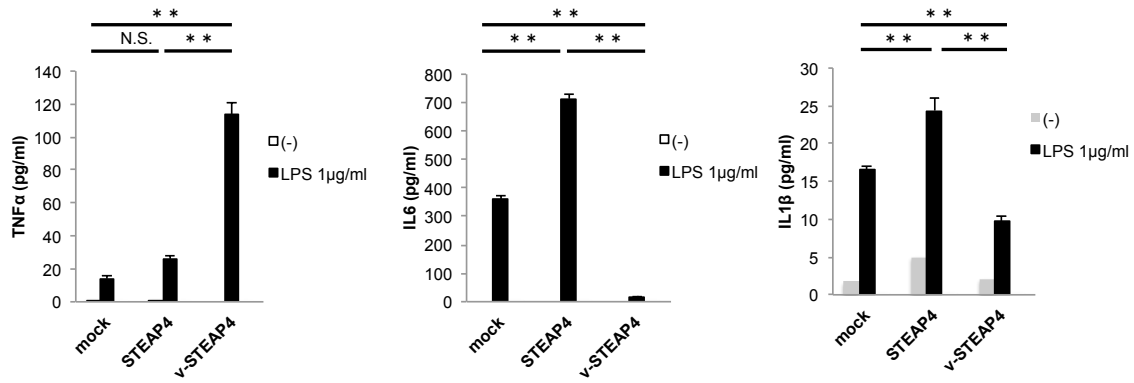


225 **図 10 STEAP4、v-STEAP4 過剰発現細胞株の樹立**

(A) トランスフェクションの導入率をレポーター蛋白である ZsGreen1 発現により確認した。(B)クローニング後のベクターDNA を positive control (PC) として mRNA レベルでの STEAP4、v-STEAP4 の発現を RT-PCR で確認した。

(C)免疫ブロット法で蛋白レベルの STEAP4、v-STEAP4 の発現増加を確認した。actin に対する STEAP4 と v-STEAP4 の発現比を棒グラフで示した。

230

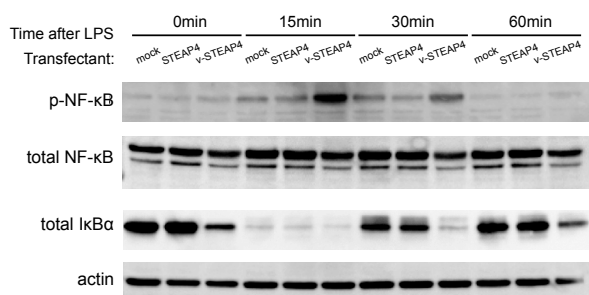


235 図 11 STEAP4、v-STEAP4 過剰発現細胞株でのサイトカイン産生

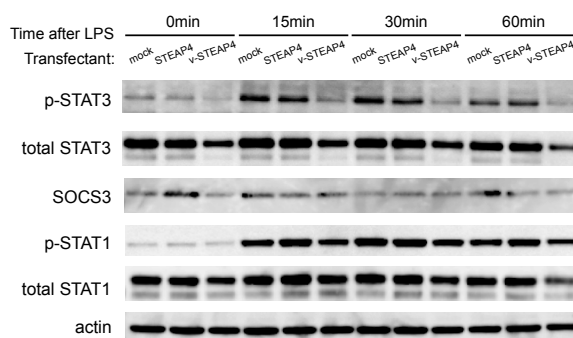
PMA 処理後の THP-1 マクロファージからの 1 μg/ml の LPS 刺激から 24 時間後の培養上清中の TNF α、IL-6 および IL-1 β の濃度を、CBA を用いて測定した。THP-1 マクロファージは、空ベクター (mock) または STEAP4、v-STEAP4 を発現するプラスミドのいずれかをトランスフェクトした。値は、各群当たり 3 ウェルの平均 ± SEM である。\*\*P < 0.01 は Levene 検定により P > 0.05 (等分散性) を確認した後の Tukey 検定による。

245

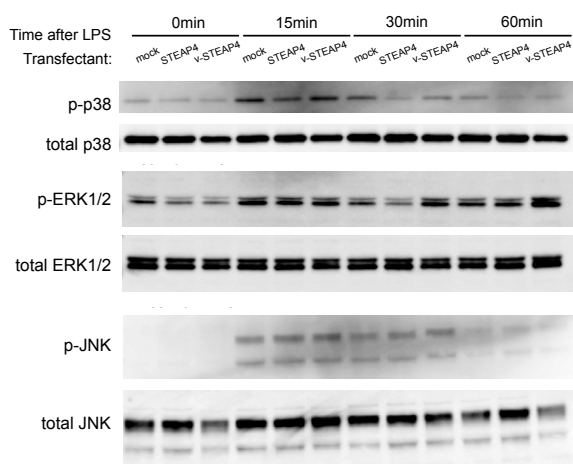
(A)



(B)



(C)



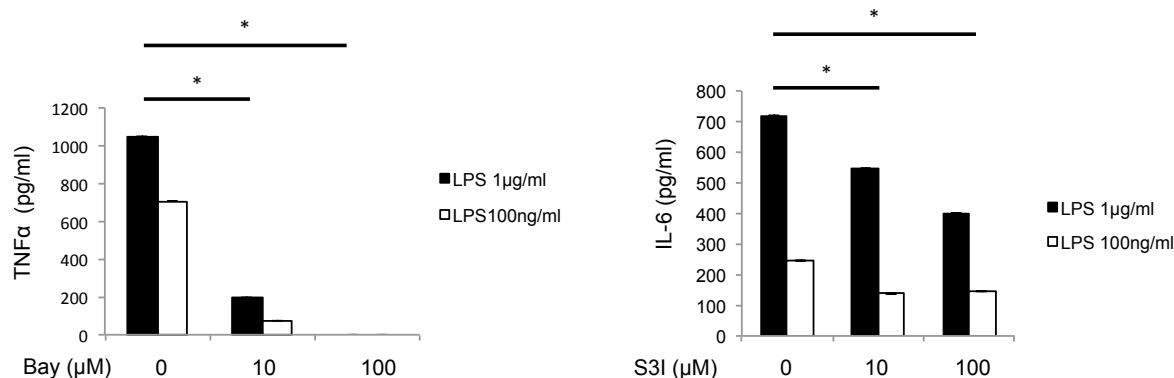
250

255 図 12 STEAP4、v-STEAP4 過剰発現細胞株での TLR4 下流シグナル

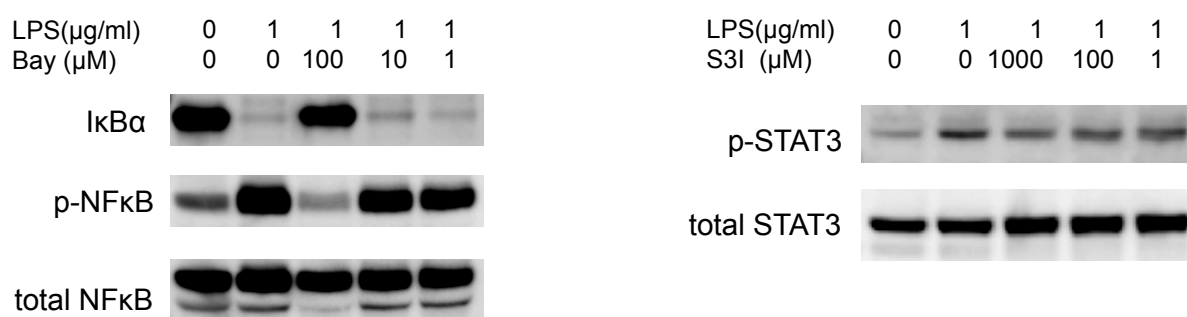
空ベクターまたは STEAP4、v-STEAP4 を発現するプラスミドのいずれかを  
トランスフェクト後に PMA 刺激で分化させた THP-1 マクロファージに 1  $\mu$ g/  
ml の LPS 刺激後 0 分、15 分、30 分または 60 分後の全細胞溶解物で (A) p-  
NF- $\kappa$ B、NF- $\kappa$ B、I $\kappa$ B $\alpha$ 、actin、(B) p-STAT-3、STAT-3、SOCS-3、  
260 STAT1、p-STAT1、actin、(C) p-p38、p38、p-ERK1/2、ERK1/2、p-  
JNK および JNK について免疫ブロット法を実施した。



(A)



(B)

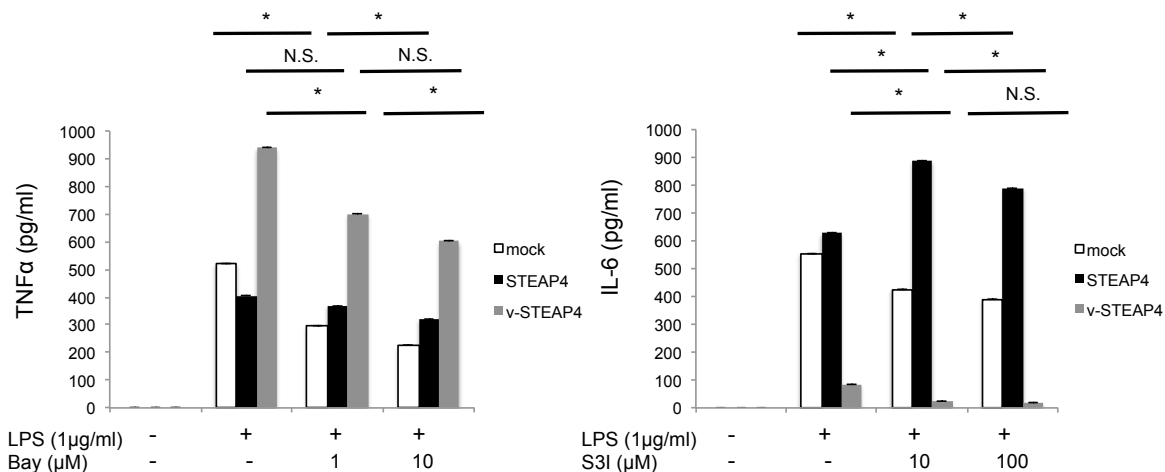


265

図 13 未感染 THP-1 マクロファージにおける LPS による炎症性サイトカイン産生は、TLR4 下流シグナルの特異的阻害剤によって抑制された。

NFκB 阻害薬である Bay 11-7082 または STAT3 阻害薬である S3I-201 の存在・非存在下に (A) PMA 処理後の未感染 THP-1 マクロファージに 1 μg/ml または 100ng/ml の LPS で 24 時間刺激し、培養上清中の TNFα および IL-6 の濃度を、ELISA を用いて測定した。値は、各群当たり 3 ウェルの平均 ± SEM である。\* P < 0.05 は Mann-Whitney U 検定による。(B) LPS 刺激で 15 分後の未感染 THP-1 マクロファージで p-NF-κB、NF-κB、IκBα、STAT-3 および STAT-3 について免疫ブロット法を行った (n = 2 ウェル/群)。

275



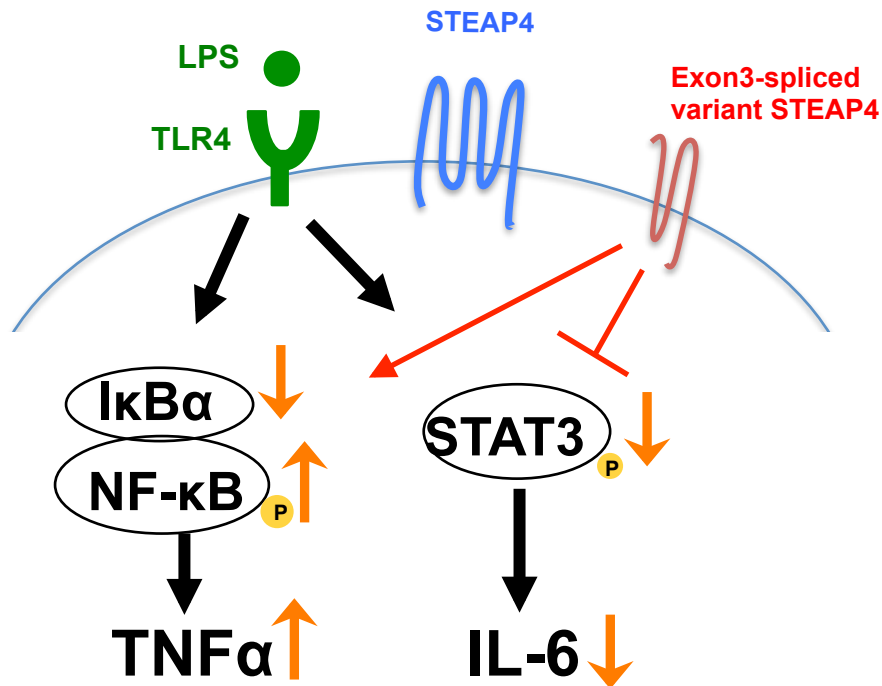
280 **図 14 STEAP4、v-STEAP4 の LPS による炎症性サイトカイン産生は、**  
**TLR4 下流シグナルの特異的阻害剤によって抑制された。**

NF $\kappa$ B 阻害薬である Bay 11-7082 または STAT3 阻害薬である S3I-201 の存在・非存在下に PMA 処理後の STEAP4、v-STEAP4 の過剰発現した THP-1 マクロファージに 1 μg/ml または 100ng/ml の LPS で 24 時間刺激し、培養

285 上清中の TNF $\alpha$  および IL-6 の濃度を、ELISA を用いて測定した。4 ウェルの平均 $\pm$ SEM である。\* P < 0.05 は Mann-Whitney U 検定による。

290

295



300 図 15 v-STEAP4 は、NF $\kappa$ B 経路を活性化し、STAT3 経路を抑制する。

LPS の受容体である TLR4 への結合は、I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化とその後の degradation により、p-NF- $\kappa$ B の核内移行を可能にする。一方で STAT3 をリン酸化し、その核内移行を可能にする。v-STEAP4 は NF $\kappa$ B 経路の活性化を介して TNF $\alpha$  産生を増加させ、STAT3 経路の抑制を介して IL-6 産生を低下

305 させる。