

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590492

研究課題名(和文) 心疾患における転写因子IRF-3の役割の解明

研究課題名(英文) The role of transcription factor IRF-3 in cardiac disease

研究代表者

柳井 秀元 (YANAI HIDEYUKI)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70431765

研究成果の概要：

心肥大病態モデルマウスに昇圧剤アンジオテンシン(Ang)IIを投与すると、野生型マウスでは高血圧性心疾患に見られる心臓の線維化が進行するがIRF(IFN regulatory factor)ファミリー遺伝子*Irf3*欠損マウスでは線維化が起きない事、また骨髄系由来細胞のIRF3がAngII下流でセリン残基リン酸化を受け活性化し、線維化に関与する事を見いだした。

さらにDNAマイクロアレイ解析によりAngII-IRF3経路のケモカイン・心疾患関連遺伝子誘導への関与を明らかとした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：(1)心疾患 (2)IRF (3)アンジオテンシン (4)TLR (5)サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

心不全は心疾患の終末像として出現する頻度の高い病態で、罹患者数は50～100万人と言われている。心不全の原因としては高血圧性心疾患や虚血性心疾患など、いわゆる生活習慣病により発症する病態が主要な原因であると考えられており、高血圧が長い年月に渡り持続し、血管に過度のストレスが加わることで心筋肥大や線維化が進行して心機能が低下する。1980年代後半からレニン-ア

ンジオテンシン-アルドステロン系やカテコラミンを標的として治療が行われるようになり、心不全患者の予後は飛躍的に向上したとは言え、十分な治療効果が出現せず、最終的には心移植を必要とする症例も未だ少なくない。高齢化社会の進行に伴い今後も罹患者数が増加し続けることが予想されていることを考えると、心不全の新たな治療戦略の開発基盤として、発症メカニズムを解析することは現代医療に科せられた重要課題の一つと考えられる。

これまでの心不全研究においては、心筋細胞での現象に興味、関心が向けられてきた。心筋細胞は、物理的、化学的、生物学的なストレス負荷により適応現象として肥大し、傷害の程度が大きいとアポトーシスを引き起こすことが明らかとなっている。さらに近年、高血圧や心筋梗塞、ウイルス感染等により心筋細胞が障害され、心血管系の組織再構築が進展し、心不全を発症していく過程において、全身および心血管局所の免疫反応が重要な役割を果たしていることが示唆されるにつれ、心筋細胞自体のストレス応答に加えて、免疫系の循環器疾患の発症における役割の解明に興味を持たれるようになってきた。実際、肥大や拡張した心臓及び動脈硬化等の病理所見からは、マクロファージや CD4⁺T 細胞などの免疫担当細胞の浸潤が数多く認められること、interleukin (IL) 6 や MCP-1 などのサイトカインやケモカインが心血管リモデリングの進行に関わっていることが示唆されている。また、今まで炎症のマーカーとして使用されてきた血清中の CRP 値や IL 6 の微量な変化が心血管病態の発症や予後と相関することが報告されている。

我々の研究室では、Interferon (IFN) の誘導制御に関わる分子機構の解析を Interferon regulatory factor (IRF) を中心として行ってきた。IRF は 9 つから成るファミリーを形成する転写因子であり、インターフェロンの誘導制御のみならず、IL 6 や IL-12、ケモカイン等の誘導をも制御する重要な転写因子である。近年、Toll-like receptor (TLR) をはじめとする病原体特異的パターン認識受容体 (Pattern recognition receptor: PRR) による免疫系発動機構が急速に理解され、様々な感染において中心的役割を果たしていることが明らかになってきた。これら PRR は感染急性期における自然免疫系、獲得免疫系双方の誘導制御にとどまらず、炎症惹起後すなわち慢性期における炎症の終息、組織修復や再構築、さらには様々な細胞の定常時におけるホメオスタシスをも支配すると考えられるようになった。心不全や動脈硬化をはじめとする循環器系疾患の多くは、物理的負荷や代謝的な負荷によって誘発される慢性的な炎症と修復過程の異常であることを考えると、PRR をはじめとする免疫系シグナル伝達経路の視点に立った病態解明が急務となってきている。

2. 研究の目的

自然免疫系のシグナル伝達系の心血管病態形成における役割を解明し、循環系と免疫系のシグナル伝達のクロストークの解明、及び心血管病の新たな分子標的を発見するこ

とを目標とする。これまでに TLR の遺伝子改変マウスを用いて、心血管病態の発症に異常が見られると報告されているが、その分子メカニズムに関しては明らかにされていない。我々は、これまで報告されている 12 種類の TLR、あるいはそのシグナル伝達に必須な IRF ファミリー転写因子群の遺伝子改変マウスを用いて心血管病態について解析したところ、*Irf3* 遺伝子欠損マウスにおいて、心血管病態の発症が著しく促進もしくは抑制され、PRR のシグナル伝達系が心不全の分子標的であるアンジオテンシン II による細胞内シグナル伝達系と一部共通する可能性があることを見いだした。これらのことは、急性期の免疫系のシグナル応答機構が、心肥大、動脈硬化、臓器線維化などの長期間を要して形成される心血管疾患の病態形成において重要な役割を担っていることを示唆する。IRF-3 が AngII シグナルによって、どのような機構で活性化され、且つ免疫系を活性化するのは不明である。IRF-3 はこれまで免疫系において、ウイルス感染などによって活性化され、サイトカイン・ケモカイン遺伝子の誘導に関与するというのが定説であったが、本研究では新たに AngII による心臓線維化誘導に IRF-3 がどのように関与しているかを分子レベルで明らかにし、臨床応用の可能性についても検討していく。

3. 研究の方法

心血管系のリモデリングにおける免疫系の関与を検討するために、IRF ファミリー転写因子遺伝子欠損マウスを用いてアンジオテンシン II 負荷モデルを作成した。心血管系の発現系に異常を来すマウスのスクリーニングを行う。高血圧性心疾患の心肥大病態モデルとして、Alzet infusion pump を用いて Val5-AngII をマウスに 14 日間持続投与する。野生型マウスの心臓では、高血圧性心疾患に見られるような心重量/体重比の増加と間質の線維化が進行する。心血管系の発現系に異常を来す IRF ファミリーの各遺伝子欠損マウスのスクリーニングを行うことができる。

IRF ファミリー転写因子は免疫系に関与することが明らかになっている。ではもし心血管系の異常に関与したとしたならば、どのような細胞群において、IRF 転写因子は機能しているのか、この点を検討するために骨髄移植実験を検討する。線維化のメカニズムには不明な点が多いが、免疫担当細胞による炎症が関与していることが考えられる。この際、IRF が炎症箇所において、免疫担当細胞をリクルートすることに必要なのか、またはリクルートは正常で、免疫担当細胞の機能に異常

があるのかを検討することが可能となる。

IRF は転写因子であることから、心血管系の異常が見いだされた場合には遺伝子発現誘導を解析することによって原因遺伝子の候補を探ることが可能であるかもしれない。そのため、マイクロアレイ解析によって網羅的な遺伝子発現誘導の解析を行い、候補遺伝子を探索する。また、多くの IRF は定常状態では細胞質に存在し、活性化を受けて核内移行し、転写因子として機能することが報告されている。そこで AngII によって IRF 転写因子が活性化されるかどうか、またどのような機構で活性化されているかを分子生物学的手法、主にはレポーターアッセイ、ウエスタンブロットング等の手法を用いて検討を加える。これらの解析により、AngII による IRF の活性化、活性化による心血管系異常につながる原因の検討、病態との関連、という一連の解析が可能となると考えられる。

4 . 研究成果

我々は IRF ファミリー転写因子の中で *Irf3* 遺伝子欠損マウスにおいて、心血管病態の発症が著しく促進もしくは抑制され、IRF-3 のシグナル伝達系が心不全の分子標的であるアンジオテンシン II (AngII) による細胞内シグナル伝達系と一部共通する可能性があることを見いだした。さらに、骨髄移植の系を用いた系による、線維化誘導に関わる細胞の同定、アンジオテンシン II による IRF-3 活性化の分子機構、標的遺伝子の検索について検討を行った。野生型マウスに *Irf3* 遺伝子欠損マウス由来の骨髄細胞を移入した移植実験を行った。野生型マウス由来の骨髄細胞を移入した際には AngII 付加による線維化の誘導が認められたが、*Irf3* 遺伝子欠損マウス由来の骨髄細胞の移入では線維化の誘導は認められなかった。このことから、間葉系由来細胞ではなく、骨髄系細胞で発現している IRF-3 がアンジオテンシン II 刺激による心臓の線維化に重要であることが示唆された。またメカニズムについて、AngII type I レセプターを発現させた HEK293T 細胞に AngII で刺激を行い、IRF-3 のリン酸化を検討した。IRF-3 はウイルス感染時にはリン酸化を受け活性化し、核に移行することによって転写因子として機能することが知られている。実際、IRF-3 はアンジオテンシン II の刺激によってリン酸化を受け、核に移行することがウエスタンブロットにより確認された。この時、各種キナーゼインヒビターを用いた実験から、このリン酸化のキナーゼ (MAP キナーゼの 1 種) を同定した。またリン酸化される部位も IRF-3 変異体を用いた解析から同定している。IRF-3 は線維化にかかわる

ような遺伝子の誘導に必須であるのかを検討するため、AngII 付加を行ったマウス由来の心臓から RNA を調製し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、複数の線維化にかかわるような遺伝子群を同定することができた。現在これらの結果をまとめ、論文の投稿準備中である。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- [1] Yanai H, Savitsky D, Tamura T, Taniguchi T. Regulation of the cytosolic DNA-sensing system in innate immunity: a current view. *Curr Opin Immunol*. **1**: 17-22, 2009 (査読有り)
- [2] Chen HM, Tanaka N, Mitani Y, Oda E, Nozawa H, Chen JZ, Yanai H, Negishi H, Choi MK, Iwasaki T, Yamamoto H, Taniguchi T, Takaoka A. Critical role for constitutive type I interferon signaling in the prevention of cellular transformation. *Cancer Sci*. **100**: 449-456, 2009 (査読有り)
- [3] Wang Z., Choi MK., Ban T., Yanai H., Negishi H., Lu Y., Tamura T., Takaoka A., Nishikura K. and Taniguchi T. Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**: 5477-5482, 2008 (査読有り)
- [4] Negishi H, Osawa T, Ogami K, Ouyang X, Sakaguchi S, Koshiba R, Yanai H, Seko Y, Shitara H, Bishop K, Yonekawa H, Tamura T, Kaisho T, Taya C, Taniguchi T, Honda K. A critical link between Toll-like receptor 3 and type II interferon signaling pathways in antiviral innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*. **105**: 20446-20451, 2008 (査読有り)
- [5] Couzinet A., Tamura K., Chen HM., Nishimura K., Wang Z., Morishita Y., Takeda K., Yagita H., Yanai H., Taniguchi T. and Tamura T. 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 (査読有り)
- [6] Tamura T., Yanai H., Savitsky D. and Taniguchi T. The IRF family transcription

factors in immunity and oncogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* **26**: 535-584, 2008
(査読有り)

[7] 柳井秀元・谷口維紹, IRF ファミリー転写因子と生体防御シグナル, 蛋白質核酸酵素, **53**: 1231-1238, 共立出版, 2008.

(査読なし)

[8] Kojima S., Iwahara A., Hisano Y. and Yanai H. Effects of hydrophobic amino acid substitution in *Pleurotus ostreatus* proteinase A inhibitor 1 on its structure and functions as protease inhibitor and intramolecular chaperone. *Protein Eng. Des. Sel.* **103**: 211-217, 2007 (査読有り)

[9] Yanai H., Chen HM., Inuzuka T., Kondo S., Mak TW., Takaoka A., Honda K. and Taniguchi T. Role of IFN regulatory factor 5 transcription factor in antiviral immunity and tumor suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**: 3402-3407, 2007 (査読有り)

[10] Takaoka A., Wang A., Choi MK., Yanai H., Negishi H., Ban T., Lu Y., Miyagishi M., Kodama T., Honda K., Ohba Y. and Taniguchi T. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* **448**: 501-505, 2007 (査読有り)

[学会発表] (計 1 件)

[1] 柳井秀元, Regulation of innate immune responses by DAI(DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules ,第 38 回日本免疫学会総会・シンポジウム ,2008 年 12 月 2 日 . 京都国際会議場

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

柳井 秀元 (YANAI HIDEYUKI)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号 70431765

(2) 研究分担者

都島 健介 (TSUSHIMA KENSUKE)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号 50436482

(3) 連携研究者

なし