

平成 21 年 4 月 15 日現在

研究種目：若手研究 B
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19780231
 研究課題名（和文）
 慢性疾患と貧血；炎症性サイトカインによる赤芽球系遺伝子転写抑制メカニズムの解明
 研究課題名（英文）
 Chronic diseases and anemia; Investigation of the mechanisms for downregulation of erythroid-specific genes by inflammatory cytokines
 研究代表者
 大塚弥生（北海道大学・大学院獣医学研究科・客員研究員）
 研究者番号：30396303

研究成果の概要：

本研究は全身性慢性疾患において高頻度に発症する非再生性貧血ACD(Anemia of chronic diseases)発症機序ついて、炎症性サイトカインによる赤芽球系特異的遺伝子発現への影響に焦点を当て研究を進め、IL-6が赤芽球前駆細胞に作用する結果、細胞内情報伝達経路であるJAK/STAT3経路を活性化し、GATA-1に転写制御を受ける赤芽球系特異的分子 α -ヘモグロビン安定化蛋白質(AHSP)やグロビン遺伝子の発現を抑制することを実証した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,700,000	0	2,700,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	240,000	3,740,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：病理・病態

1. 研究開始当初の背景

動物、ヒトを問わず、リウマチ性疾患・慢性炎症および腫瘍性疾患など全身性慢性疾患では二次性の病態として高頻度に非再生性の貧血ACD (Anemia of chronic diseases) が発症し、基礎疾患の進行の程度にかかわらず病態を憎悪させる要因となる。ACD

発症にはこれらの疾患に共通して増加が認められる炎症性サイトカイン、IL-1 β 、TNF α 、IL-6などが関与するとされているが、これらがどの細胞または分子をターゲットとしACDを発症させるのか、分子機構と貧血との直接的因果関係は不明であり、現在、臨床領域において積極的な治療法がないま

ま見過ごされている。

ACD 発症機序に関して、La Feltra ら (FASEB J. 2002) や Figueroa ら (Exp Hematol. 2002) の行ったエリスロポエチン (Epo) 産生性培養細胞 Hep3B を用いた実験によって、一つの展開が生まれた。彼らにより IL-1 β と TNF α シグナル伝達の共通分子である NF- κ B が Epo 遺伝子転写を抑制することが分かり、ACD は腎 Epo 産生減少によるヘモグロビン合成低下が原因で陥るとい説が浸透した。しかし ACD 治療は Epo の投与や輸血が対症療法的に行われているだけで、実際の臨床現場では ACD は Epo 非反応性の場合が多く、ACD の直接的な原因はいたって不明である。

申請者はこれまでの研究で、プリオン病個体で発現が低下していた赤芽球特異的タンパク質 α -ヘモグロビン安定化タンパク質 (AHSP) (Miele, G. ら Nat. Med. 2001) がヒトプリオン病 (CJD) 患者血液において上昇している IL-6 により、発現抑制するという現象を見出した。AHSP は赤芽球分化に必須な転写因子 GATA-1 に制御される赤芽球系特異的遺伝子であることから、IL-6 による AHSP 遺伝子発現抑制が ACD 発症機序に深く関与する可能性が示唆され、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究は申請者のこれまでの研究より得られた知見「赤芽球分化に必須な転写因子 GATA-1 に制御される赤芽球系特異的遺伝子の発現が IL-6 により抑制される」という現象を中心にその分子機構を解明し、ACD 発症の原因分子を見出し、ACD の治療法開発に役立てることが最終的目標である。具体的には炎症性サイトカインによる AHSP 遺伝子発現抑制現象について、

(1) サイトカインシグナル伝達分子が AHSP の転写制御因子である GATA-1 に直接結合するなどし、GATA-1 の機能を阻害する。

(2) AHSP プロモーター領域に存在する GATA-1 エlement、およびその近傍において、サイトカインシグナル伝達分子が単独、または複合体を形成し、AHSP 遺伝子転写を妨げる。

という2つの仮説を立て、研究期間内に、炎症性サイトカイン受容から遺伝子発現抑制にいたるまでの分子機構を解明し、炎症性サイトカインによる赤芽

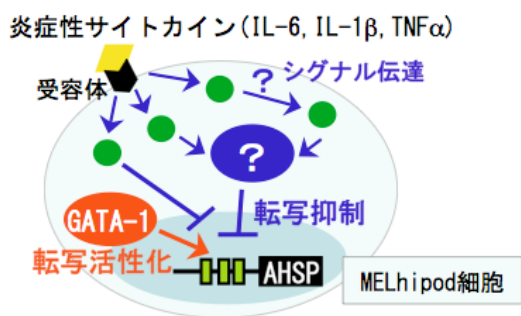
球系特異的遺伝子の転写抑制こそが ACD 発症の直接的原因である可能性を立証することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) GATA-1 により転写制御を受ける赤芽球系特異的遺伝子 AHSP、 α -globin、 β -globin、ヘモグロビン合成酵素群、スペクトリンなどが、炎症性サイトカインにより発現抑制されるかどうか、サイトカイン存在・非存在下で培養した赤芽球系前駆細胞モデル MELhipod 細胞を用いてリアルタイム PCR 法、イムノプロット (IB) 法で解析した。また GATA-1 の機能的抑制についても、MELhipod 細胞に AHSP プロモーターレポーター発現ベクターを導入し、サイトカイン存在下で培養し解析した。

(2) サイトカインの主要シグナル伝達分子 (JAK/STAT3 系、MAPK 系、MEK 系、NF- κ B 系など) を IB 法で解析し、炎症性サイトカインが赤芽球系遺伝子発現を抑制するときに関わる細胞内情報伝達分子の同定を行った。

(3) 得られた伝達分子のドミナントネガティブ変異体を導入した MELhipod 細胞を作成し、サイトカインを作用させ、赤芽球系遺伝子転写抑制が失われるかどうか RT-PCR にて確認した。



研究方法

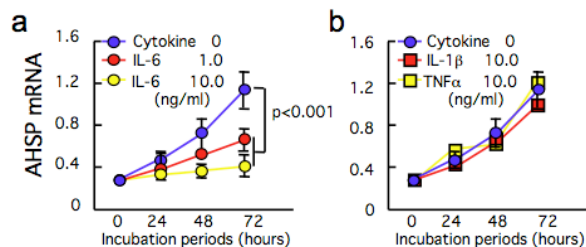
炎症性サイトカインはどのような分子機構で赤芽球系特異的遺伝子の発現を抑制するのか？高率に赤芽球系分化誘導可能なマウス赤白血病 MELhipod細胞を用いて、炎症性サイトカイン受容から赤芽球系特異的遺伝子の発現抑制に至るまでの細胞内情報伝達経路を解析。

4. 研究成果

〔主な研究成果〕

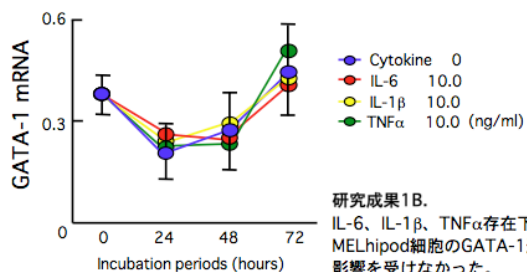
- (1) 炎症性サイトカイン (IL-6、IL-1 β 、TNF α) による赤芽球系遺伝子発現抑制の普遍性確認
- ①リアルタイム PCR による遺伝子発現解析。

IL-6 の存在下に培養した MELhipod 細胞では、AHSP (研究成果 1A-a)、 α -globin、 β -globin 遺伝子発現が有意に抑制された。一方、IL-1 β および TNF α 存在下に培養した MELhipod 細胞では AHSP 遺伝子発現抑制は認められなかった (研究成果 1A-b) が、 α -globin、 β -globin 遺伝子発現は若干抑制が認められた。



研究成果 1A.
赤芽球系造血細胞モデルマウス赤白血病細胞(MELhipod)を用いた AHSP 遺伝子発現解析の結果 (リアルタイムPCRにより解析)。IL-6 は AHSP 遺伝子発現を著しく抑制する(a)。一方、IL-1 β 、TNF α では AHSP 遺伝子発現は抑制されなかった(b)。

また GATA-1 は GATA-1 自身によって発現制御を受けるマスター遺伝子あることから、同様に培養した MELhipod 細胞の GATA-1 遺伝子発現量についても解析した。興味深いことに IL-6、IL-1 β 、TNF α いずれの存在下においても、GATA-1 遺伝子発現量はほとんど影響されなかった (研究成果 1B)。



研究成果 1B.
IL-6、IL-1 β 、TNF α 存在下に培養した MELhipod 細胞の GATA-1 遺伝子発現は影響を受けなかった。

②赤芽球特異的転写因子 GATA-1 の遺伝子転写活性の解析。

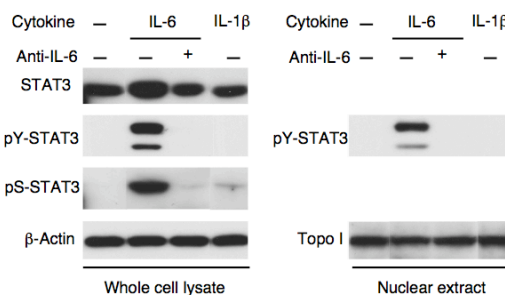
AHSP 遺伝子発現にはプロモーターに GATA-1 が結合することが必須条件であるため、炎症性サイトカインによる GATA-1 の転写活性化機能について AHSP プロモーター-レポーターアッセイ系を用いて解析した。その結果、IL-6 はレポーター遺伝子の発現を濃度依存性に有意に抑制した。一方で IL-1 β および TNF α ではレポーター遺伝子の発現は抑制されなかった。この結果は(1)-①の結果と一致し、炎症性サイトカインのうち、とくに IL-6 刺激によりある細胞内情報伝達経路が活性化され、GATA-1 の発現レベル

に影響を与えることなく赤芽球系特異的遺伝子発現が抑制されることが示唆された。

(2)炎症性サイトカインによる遺伝子転写抑制の作用点と標的分子の同定

①IL-6 刺激による細胞内情報伝達経路の同定。

IL-6 の主要シグナル伝達分子 JAK/STAT3 系の活性化について、IL-6 作用時の MEL 細胞の核タンパク質を IB 法で解析した。抗-リン酸化 STAT3 抗体により、IL-6 存在下に培養した MELhipod 細胞では STAT3 のリン酸化が、細胞質内・核内において観察された (研究成果 2A)。さらに IL-6 の中和抗体の添加により IL-6 の受容を阻害すると STAT3 のリン酸化および核移行も完全に阻止され (研究成果 2A)、このときの AHSP 遺伝子発現量をリアルタイム PCR で解析した結果、発現抑制は解除された。

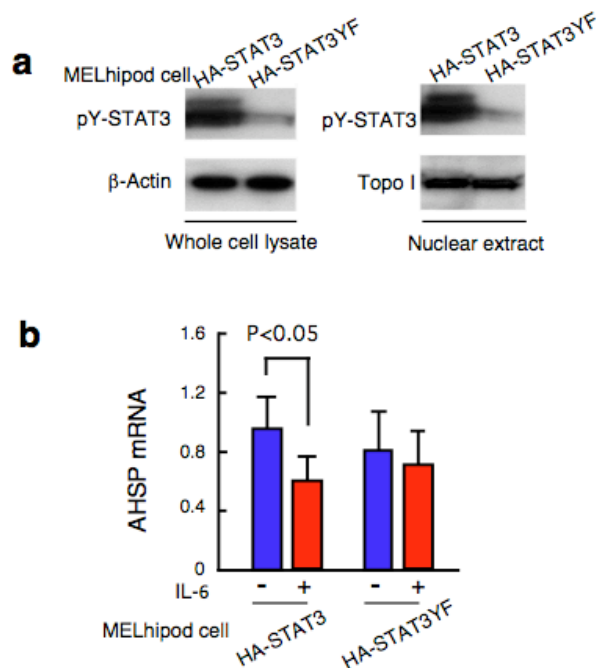


研究成果 2A.
IL-6シグナルの主要伝達物質 STAT3のリン酸化 (pY-STAT3、pS-STAT3) は、IL-6の添加時のみ観察された。IL-6中和抗体 (Anti-IL-6) の添加により、STAT3のリン酸化は起こらず、同時にpY-STAT3の核移行 (右)も抑制された。さらに AHSP 遺伝子発現量もIL-6の中和抗体の添加により抑制されなかった。

②STAT3 ドミナントネガティブ変異体導入 MELhipod 細胞における赤芽球系特異的遺伝子発現解析。

IL-6 シグナルによる JAK/STAT3 系の活性化を阻害する目的で STAT3 ドミナントネガティブ変異体 (HA-STAT3YF) および STAT3 野性体 (HA-STAT3) を MELhipod 細胞に導入し、IL-6 による AHSP 遺伝子の転写抑制が失われるかどうか RT-PCR にて確認した。STAT3 ドミナントネガティブ変異体を導入した MELhipod 細胞 (HA-STAT3YF) では、IL-6 刺激後も STAT3 のリン酸化が野性体を導入した細胞 (HA-STAT3) よりも有意に阻害され、また STAT3 の核移行も顕著に阻害された (研究成果 2B-a)。

この2つの細胞に IL-6 を添加した際の AHSP 遺伝子発現をリアルタイム PCR にて解析したところ、AHSP 遺伝子発現抑制も阻止された (研究成果 2B-b)。



研究成果2B.

(a) STAT3 野生体 (HA-STAT3) およびドミナントネガティブ変異体 (HA-STAT3YF) を導入した MELhipod 細胞に IL-6 を添加し、STAT3 のリン酸化 (pY-STAT3) を検出した結果、HA-STAT3YF では STAT3 のリン酸化は起こらず、同時に STAT3 の核移行 (右) も抑制された。

(b) HA-STAT3 および HA-STAT3YF 細胞に IL-6 を作用させたところ、AHSP 遺伝子発現は HA-STAT3YF 細胞において、顕著な抑制は認められなかった。これは STAT3 の活性化が赤芽球特異的遺伝子発現に影響することを意味する。

以上の結果より、IL-6 刺激により JAK/STAT3 系細胞内情報伝達経路が活性化され、AHSP 遺伝子発現が抑制されることが実証された。全身性慢性疾患における ACD 発症は、炎症性サイトカイン IL-6 が赤芽球系前駆細胞に作用することで、GATA-1 の発現レベルに影響を与えることなく赤芽球系特異的遺伝子発現を抑制することが示唆された。このことは、JAK/STAT3 系細胞内情報伝達経路の活性化により、直接的あるいは間接的に GATA-1 が機能的に阻害される可能性を含んでおり、分子間相互作用などについて現在解析中である。

[国内外における位置づけとインパクト・今後の展望]

本研究は、ACD 発症機序解明をとおり、サイトカイン・赤芽球転写研究両分野に対して

(1) サイトカインの立場からは「炎症性サイトカイン

の赤芽球系特異的遺伝子発現抑制」という新たな病理学的意義

(2) 造血系細胞の転写研究の立場からは「GATA-1 依存性転写シグナルとサイトカインシグナルのクロストーク」という新たな転写制御・疾患の分子機構

をそれぞれ開拓し、二つを統合させる特色・獨創性を有する。

サイトカイン研究の多くは感染症やガン細胞への免疫応答が主な対象だが、近年、細胞分化・増殖に関する因子も含まれるようになり、広義に研究されるようになった。しかし IL-3、Epo、Stem cell factor などの造血因子が同定されたが、どのシグナルを介し、どの遺伝子を発現させるのかは研究段階である。一方、転写研究では GATA-1 が赤芽球系細胞の分化・成熟に必須な転写因子であることは既に証明されたが、どのサイトカインが GATA-1 を活性化するのか未だ不明である。加えて、炎症性サイトカインと赤芽球系細胞病態との関連は全く未知の領域であった。

本研究では、GATA-1 依存性遺伝子転写が炎症性サイトカイン IL-6・STAT3 シグナルカスケードによって抑制される機序について解明したが、以後、詳細に情報伝達カスケード、分子間相互作用などの解析を進めることで、新たな発見に繋がり、その発見は赤芽球系細胞やその他の細胞においても新たな分子機構を提唱することになる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Otsuka Y, Ito D, Katsuoka K, Arashiki N, Komatsu T, Inaba M. Expression of α -hemoglobin stabilizing protein and cellular prion protein in a subclone of murine erythroleukemia cell line MEL. *Jpn J Vet Res.* 2008. 56(2): 75-84. 査読あり
- ② Sato K, Otsuka Y, Arashiki N, Komatsu T, Wang CC, Tamahara S, Inaba M. Identification of genes for two major sialoglycoproteins, glycophorin A and glycophorin C in canine red cell membranes. *Jpn J Vet Res.* 2008. 55(4):

103-114. 査読あり

③ Ito D, Otsuka Y, Koshino I, Inaba M. Luminal localization in the endoplasmic reticulum of the C-terminal tail of an AE1 mutant responsible for hereditary spherocytosis in cattle. *Jpn J Vet Res.* 2007. 54(4): 191-197. 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

① 大塚弥生 「牛赤血球膜グライコフォリン A」第 146 回日本獣医学会 平成 20 年 9 月 25 日 宮崎県宮崎市・シーガイア

② 大塚弥生 「牛赤血球膜グライコフォリン A: 同定、性状ならびに疾患病態との関連」第 30 年会日本膜学会 平成 20 年 5 月 16 日 東京都新宿区・森戸記念館

③ 大塚弥生 「Mechanisms for down-regulation of α -hemoglobin stabilizing protein (AHSP) in prion diseases」第 80 回日本生化学会 平成 19 年 12 月 12 日 神奈川県横浜市・パシフィコ横浜

④ 大塚弥生 「プリオン感染動物における AHSP mRNA 量低下の分子機構 (IL-6 による GATA-1 依存性赤芽球特異的遺伝子発現の抑制)」第 144 回日本獣医学会 平成 19 年 9 月 2 日 北海道江別市・酪農学園大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 弥生 (北海道大学・大学院獣医学研究科・客員研究員)

研究者番号 : 30396303

(2) 研究協力者

稲葉 睦 (北海道大学・大学院獣医学研究科・教授)

研究者番号 : 00183179

佐藤 耕太 (北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授)

研究者番号 : 50283974