

機関番号：35408

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008年～2010年

課題番号：20570166

研究課題名 (和文)

熱ショック転写因子による発熱・炎症性サイトカイン遺伝子群の転写制御

研究課題名 (英文)

Transcriptional regulation of cytokines produced in febrile- and inflammatory response by heat shock transcription factor

研究代表者

井上幸江 (INOUE SACHIYE) 安田女子大学・薬学部・教授

研究者番号：60159978

研究成果の概要 (和文)：IL-1、IL-6 や TNF- α などの炎症性サイトカインは、細菌感染や疾患ともなって産生され、発熱反応を引き起こす。発熱は疾患の予後を良くすることが知られている。しかし、発熱による炎症性サイトカイン遺伝子発現の抑制機構はまだ明らかにされていない。本研究では、温熱ストレスがLPSで誘導されるIL-6の産生を抑制することを示した。温熱ストレスで活性化されたHSF1は、ATF3の転写を活性化し、誘導合成されたATF3がIL-6の転写を抑制する。さらに、網羅的な解析を行ったところ、このHSF1-ATF3経路は様々な発熱・炎症性サイトカイン遺伝子群の発現制御に関わっていることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：Inflammatory cytokines, such as IL-1, IL-6 and TNF- α , are produced in response to bacterial infections and disease and elicit the febrile response. Fever plays beneficial roles in the clinical prognosis of disease. However, the molecular mechanisms underlining the fever-mediated suppression of inflammatory gene expression have not been clarified. In this study, we showed that heat shock suppresses LPS-induced expression of IL-6. The heat activated heat shock transcription factor 1 (HSF1) induced the expression of activating transcription factor 3 (ATF3), a negative regulator of the *IL-6* gene. A comprehensive analysis revealed that the HSF1-ATF3 pathway was required for heat-mediated suppression of inflammatory genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：分子生物学

キーワード：転写、ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

IL-1、IL-6、そして TNF α などの炎症性サイトカインは、細菌などの感染やさまざまな疾患により誘導され、発熱反応を引き起こす。発熱は細菌感染による敗血症などの予後を良くする

因子であることが臨床的に知られており (Bryant et al, Arch Intern Med, 1971; Mackowiak et al, Am J Med Sci, 1980)、さらにLPS投与のモデル動物において、あらかじめ温熱処理をすることで生存率が上がることが知られている (Hotchkiss et al, Am J Physiol,

1993; Chu et al, Crit Care Med, 1997)。さらに、発熱は炎症性サイトカインの発現を負に制御することで、炎症を終結させる方向に働くことが細胞や個体のレベルで示唆されている (Kappel et al, Immunology, 1991; Fouqueray et al, Eur J Immunol, 1992; Ensor et al, Am J Physiol, 1994; Chu et al, Crit Care Med, 1997; Kluger et al, Am J Physiol, 1997)。

すべての生物における温熱ストレスに対する主要な適応反応は、熱ショックタンパク質 (HSPs) の誘導合成である。HSPs はタンパク質のフォールディングを促し、タンパク質の変性を防ぐ。このHSPsの誘導合成を担っているのが、熱ショック転写因子 HSF1 である。HSF1 は温度ストレスを感知することで、熱ショック遺伝子群を誘導して細胞死を防ぎ (Inouye et al, Mol Cell Biol, 2003; Fujimoto et al, J Biol Chem, 2005)、時には障害を受けた細胞の排除を促す (Hayashida et al, EMBO J, 2006) ことが我々の研究から明らかとなった。

一方で、発熱による炎症性サイトカイン遺伝子発現の負の制御に HSF1 が関与していることが推測されてきた。実際に、HSF1 欠損マウスに LPS を投与すると血中 TNF α が増え、死亡率が増加する (Xiao et al, EMBO J, 1999)。その分子機構として、HSF1 が TNF \cdot の上流配列に直接結合することによって転写を抑制することが報告されている (Singh et al, J Biol Chem, 2002)。また HSF1 は、NF-IL6 との相互作用を介して IL-1 の遺伝子発現を負に制御すること (Xie et al, J Biol Chem, 2002) などが示唆されている。しかしながら、通常は HSF1 が強力な転写活性化因子であることから、遺伝子発現を抑制する分子機構については十分に明らかにされていない。

我々は、HSF1 が免疫応答、特に T 細胞依存性の IgG 産生に必須であることを見いだした。その分子機構の少なくとも一部は、HSF1 による IL-6 遺伝子の制御を介している (Inouye et al, J Biol Chem, 2004)。さらに、HSF1 は IL-6 遺伝子のプロモーターに結合することによってクロマチン構造に影響を与え、その結果、転写制御に関与していることを明らかにした (Inouye et al, J Biol Chem, 2007)。今回、HSF1 による IL-6 発現制御の分子機構の詳細を明らかにするとともに、HSF1 が発熱・炎症に関わるどのようなサイトカイン遺伝子群の発現制御に関与しているかを網羅的に探索するとともに、その生理的意義を明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

熱ショック転写因子 HSF1 は、温熱ストレスによって活性化され、一連の熱ショックタンパク質を誘導することは良く知られている。近年、DNA マイクロアレイやクロマチン免疫沈降法による解

析から、HSF1 が熱ショックタンパク質遺伝子以外の様々な遺伝子の発現制御に関与することが知られている。しかし、その分子機構や生理的意義が不明である。我々は、HSF1 欠損マウスを作製し (Inouye et al, 2003)、このマウスにおいて抗体産生が低下していることを初めてみだし (Inouye et al, J Biol Chem, 2004)、HSF1 がクロマチンの構造変化を引き起こすことによって IL-6 遺伝子の転写制御を行うという全く新しい分子機構を明らかにした (Inouye et al, J Biol Chem, 2007)。本件球では、その成果をさらに発展させ、HSF1 が IL-6 遺伝子をはじめとする発熱・炎症に関わる遺伝子群の転写制御に関与しているかを網羅的に探し出し、その発現制御の分子機構を明らかにするとともに、さらにその生理的意義を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

1) LPS による IL-6 の誘導合成が HSF1 の活性化を介して抑制されることを解析する。

LPS による IL-6 の誘導合成が HSF1 の活性化を介して抑制されることを明らかにするために、腹腔マクロファージやマウス繊維芽細胞 (MEF) を用い、LPS 添加による IL-6 誘導が温熱前処理により抑制されるかどうかを検討する。また、温熱処理の代わりに、MEF 細胞にウイルスベクターを用い活性型の HSF1 を導入することにより、LPS 添加による IL-6 誘導が抑制されるかどうかを検討する。

2) LPS 添加と温熱処理により ATF3 発現が協調的に誘導されることを解析する。

我々は、以前に、野生型の MEF と HSF1 欠損 MEF を用い、温熱処理により誘導される遺伝子を同定した (Inouye et al, J Biol Chem, 2004)。そのうちの ATF3 の発現レベルを、LPS 添加、温熱処理、LPS 添加+温熱処理において調べる、さらに、ATF3 遺伝子上流にある熱ショックエレメント (HSE) が HSF1 による誘導に必須であることをクロマチン免疫沈降法やレポーターアッセイ法によって明らかにする。

3) ATF3 が温熱処理による LPS 誘導性の IL-6 産生抑制に必須であることを解析する。

ATF3 欠損 MEF を用いることによって、ATF3 が温熱処理による LPS 誘導性の IL-6 産生抑制に必須であることを検討する。さらに、ATF3 欠損細胞にウイルスベクターを用い ATF3 を導入することにより、野生型細胞と同様に LPS 添加+温熱処理により、IL-6 産生が抑制されることを明らかにする。

- 4) HSF1 によって発現制御をうける発熱・炎症性サイトカイン遺伝子群の網羅的探索と同定を行う。

HSF1-ATF3 経路が温熱処理による発熱・炎症性サイトカイン遺伝子群の負の制御に関与しているかどうかを DNA マイクロアレイ解析により探索する。発現が変化した遺伝子群について、RT-PCR 法により LPS 添加による誘導と LPS 添加+温熱処理による誘導抑制を確認する。さらに ATF3 欠損細胞を用い、同定した遺伝子群が ATF3 依存的であるかどうかを明らかにする。また、HSF1 欠損細胞を用い、同定した遺伝子群が HSF1 依存的であるかどうか明らかにする。

- 5) HSF1-ATF3 経路による発熱・炎症性サイトカイン遺伝子群の負の制御の生理的意義の解明。

HSF1 欠損マウス、ATF3 欠損マウス、IL-6 欠損マウスを用い、HSF1-ATF3 経路による発熱・炎症性サイトカイン遺伝子群の負の制御と体温変化を解析し、HSF1-ATF3 経路の生理的意義を明らかにする。

4. 研究成果

- 1) LPS による IL-6 の誘導合成が HSF1 の活性化を介して抑制されることを証明。

我々は、腹腔マクロファージを 42°C で 1 時間前処理すると、LPS 添加による IL-6 の誘導が、TNF・や IL-1・と同様に抑制されるという結果を得た。またマウス繊維芽細胞 (MEF) においても温熱前処理で LPS 添加による IL-6 の誘導が抑制された。そこで、MEF 細胞にウイルスベクターを用い活性型の HSF1 を導入したところ、LPS 添加による IL-6 の誘導が抑制された。一方、不活性型の HSF1 を導入したところ、LPS 添加による IL-6 の誘導が抑制されなかった。これらの結果は、LPS による IL-6 の誘導合成が HSF1 の活性化を介して抑制されることを示す。

- 2) LPS 添加と温熱処理により ATF3 発現が協調的に誘導されることを証明。

我々は、以前に、野生型の MEF と HSF1 欠損 MEF を用い、温熱処理により誘導される遺伝子を同定した (Inouye et al, J Biol Chem, 2004)。今回、そのうちの ATF3 の mRNA やタンパク質は、LPS や温熱処理単独よりも LPS+温熱処理によって、顕著に誘導されること。LPS による ATF3 の誘導は活性型 HSF1 によって増強されること。クロマチン免疫沈降法により HSF1 が ATF3 のプロモーター領域に *in vivo* で結合していること。レポーターアッセイ法により、

ATF3 遺伝子上流にある熱ショックエレメント (HSE) が HSF1 による誘導に必須であることを明らかにした。

- 3) ATF3 が温熱処理による LPS 誘導性の IL-6 産生抑制に必須であることを証明。

ATF3 欠損 MEF を用い、IL-6 産生におよぼす LPS 添加+温熱処理の影響を調べたところ、ATF3 欠損細胞では、野生型細胞に比較して IL-6 産生抑制が解除されていた。ATF3 欠損細胞にウイルスベクターを用い ATF3 を導入したところ、野生型細胞と同様に LPS 添加+温熱処理により、IL-6 産生が抑制されていた。同様の結果は、腹腔マクロファージを用いた実験でも得られた。これらの結果は、ATF3 が温熱処理による LPS 誘導性の IL-6 産生抑制に必須であることを示す。

- 4) HSF1 によって発現制御をうける発熱・炎症性サイトカイン遺伝子群の網羅的探索と同定。

3) で示した HSF1-ATF3 経路が温熱処理による発熱・炎症性サイトカイン遺伝子群の負の制御に関与しているかどうかを DNA マイクロアレイ解析により探索した。LPS により 3 倍以上発現が増加する 100 遺伝子群のうち 86 遺伝子群が LPS 添加+温熱処理により発現が低下していた。そのうち 24 遺伝子群について RT-PCR 法により LPS 添加による誘導と LPS 添加+温熱処理による誘導抑制を確認した。さらに ATF3 欠損細胞を用い、この 24 遺伝子群について RT-PCR 解析を行ったところ、16 遺伝子群が ATF3 依存的であり、8 遺伝子群が ATF3 に依存しないことが明らかとなった。また、ATF3 依存的 16 遺伝子群のうち 8 遺伝子群が HSF1 依存的であることを見出した。これらの結果は、HSF1-ATF3 経路が温熱処理による発熱・炎症性サイトカイン遺伝子群の負の制御に関与していることを示す。

- 5) HSF1-ATF3 経路による発熱・炎症性サイトカイン遺伝子群の負の制御の生理的意義の解明。

HSF1 欠損マウス、ATF3 欠損マウス、IL-6 欠損マウスを用い、HSF1-ATF3 経路による発熱・炎症性サイトカイン遺伝子群の負の制御の生理的意義を解析した。その結果、HSF1 欠損マウスと ATF3 欠損マウスでは、LPS 投与による血清 IL-6 レベルが野生型に比較して増加し、また体温も増加していた。しかし IL-6 欠損マウスでは、LPS 投与による体温増加が観察されなかった。これらの結果は、IL-6 を介しての発熱は、HSF1-ATF3 経路を介していることを示す。

以上の結果から、HSF1 は ATF3 転写因子の

誘導を介して、一連の発熱・炎症性サイトカイン遺伝子群の発現を抑制することが明らかとなった。このネガティブ・フィードバック調節は、生体にとって過剰な反応を防ぐ意味において重要であることを示すことができた。

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4件) (全て査読有り)

- ① R. Takii, S. Inouye, M. Fujimoto, T. Nakamura, T. Shinkawa, R. Prakasam, N. Hayashida, H. Ichikawa, A. Nakai.
Heat shock transcription factor 1 inhibits expression of IL-6 through activating transcription factor 3.
J Immunol. 184: 1041-1048, 2010.
- ② M. Fujimoto, N. Hayashida, T. Katoh, K. Oshimda, T. Shinkawa, R. Prakasam, K. Tan, S. Inouye, R. Takii, A. Nakai.
A novel mouse HSF3 has the potential to activate nonclassical heat-shock genes during heat shock.
Mol. Biol. Cell 21: 106-116, 2010.
- ③ M. Fujimoto, K. Oshima, T. Shinkawa, B. Wang, S. Inouye, N. Hayashida, R. Takii, and A. Nakai. Analysis of HSF4 binding regions reveals its necessity for gene regulation during development and heat shock response in mouse lenses. **J. Biol. Chem.** 283, 29961-29970, 2008.
- ④ T. Mikuriya, K. Sugahara, K. Sugimoto, M. Fujimoto, T. Takemoto, M. Hashimoto, Y. Hirose, H. Shimogori, N. Hayashida, S. Inouye, A. Nakai, H. Yamashita.
Attenuation of progressive hearing loss in a model of age-related hearing loss by a heat shock protein inducer, Geranylgeranylacetone.
Brain Research, 1212:9-17, 2008.

[学会発表] (計14件)

- ① 井上幸江、太野路子、藤本充章、中井彰、赤木玲子「ストレスタンパク質ヘムオキシゲナーゼの熱ショック転写因子による発現制御」日本薬学会第131回年会(2011年3月28日~31日、静岡)
- ② 譚克、新川豊英、林田直樹、藤本充章、Ramachandran Prakasam、滝井良祐、井上幸江、中井彰「熱ショック転写因子 HSF2 はタンパク質ホメオスタシスに必要である」第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会(2010年12月7日~10日、神戸)
- ③ 井上幸江、赤木玲子、太野路子、藤本充章、中井彰「消化管上皮細胞のエタノール障害とグルタミンによる保護作用」第

33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会(2010年12月7日~10日、神戸)

- ④ 赤木玲子、太野路子、桂昌司、中井彰、井上幸江「様々なストレス応答における熱ショック転写因子の関与」第5回臨床ストレス応答学会(2010年11月19日~20日、徳島)
- ⑤ 譚克、新川豊英、林田直樹、藤本充章、Ramachandran Prakasam、滝井良祐、井上幸江、中井彰「熱ショック転写因子 HSF2 はタンパク質ホメオスタシスに必要である」第51回日本生化学会中国・四国支部例会(2010年5月14日~15日、山口)
- ⑥ 赤木玲子、太野路子、桂昌司、中井彰、井上幸江「グルタミンによる消化管保護作用効果発現のメカニズム」第51回日本生化学会中国・四国支部例会(2010年5月14日~15日、山口)
- ⑦ 井上幸江、滝井良祐、藤本充章、林田直樹、市川仁、中井彰 熱ショック転写因子 H S F 1 による発熱・炎症反応の抑制的制御 日本薬学会第129回年会(2009年3月26~28日、京都)
- ⑧ 林田直樹、藤本充章、王倍倍、大島功司、新川豊英、市川仁、井上幸江、瀧井良祐、中井彰 HSF1による新しい蛋白質ホメオスタシスの維持機 09' 遺伝情報 DECODE・冬のワークショップ(2009年1月19~21日、越後湯沢)(口演)
- ⑨ 林田直樹、藤本充章、王倍倍、大島功司、新川豊英、市川仁、井上幸江、瀧井良祐、中井彰 熱ショック転写因子 HSF1 の新たなターゲット遺伝子群による蛋白質ホメオスタシスの調節 第31回日本分子生物学会大会・第81回日本生化学会(2008年12月9日~11日、神戸)
- ⑩ 瀧井良祐、井上幸江、藤本充章、大島功司、王倍倍、新川豊英、市川仁、林田直樹、中井彰 温熱ストレスによる炎症性サイトカイン発現の抑制機構 第31回日本分子生物学会大会・第81回日本生化学会(2008年12月9日~11日、神戸)
- ⑪ 藤本充章、大島功司、新川豊英、王倍倍、林田直樹、瀧井良祐、井上幸江、中井彰 熱ショック転写因子 HSF4 の発生過程と熱ショック応答での役割 第31回日本分子生物学会大会・第81回日本生化学会(2008年12月9日~11日、神戸)
- ⑫ M. Fujimoto, T. Katoh, H. Naoki, R. Takii, I. Ohshima, T. Shinkawa, B. B. Oh, S. Inouye, and A. Nakai. Mouse HSF3 can protect cells against detrimental stresses. Jacques Monod Conference; New ideas for an old family: Heat Shock Factors at crossroads between stress, epigenetics and development. (Roscoff, France, September 17-21, 2008)

トピックス口演

- ⑬ 藤本充章、大島功、新川豊英、王倍倍、井上幸江、林田直樹、瀧井良介、中井彰
熱ショック転写因子によるレンズの恒常性維持機構 大学共同利用機関法人・自然科学研究機構（生理学研究所）研究会
「上皮膜輸送制御の分子機構：体内環境恒常性維持機構解明を目指して」
(2008.7.16-17、岡崎)
- ⑭ 藤本充章、大島功司、新川豊英、王倍倍、林田直樹、井上幸江、中井彰 レンズ発生過程におけるHSF群による転写制御の機構 08' 遺伝情報 DECODE・冬のワークショップ (1月21—23日、越後湯沢)
(口演)

〔図書〕(計1件)

井上幸江 第22章タンパク質の合成と成熟、ベーシック生化学(化学同人、畑山功編著)
2009

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件) 取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 幸江 (Inouye Sachiye)
安田女子大学・薬学部・教授
研究者番号：60159978