

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590345

研究課題名（和文） 自然免疫刺激に伴う *Txnip* の発現抑制と Redox 制御の生理的意義の解明研究課題名（英文） Elucidation of physiological significance of *Txnip* suppression and Redox regulation under innate immune response.

研究代表者

金成 安慶 (YASUYOSHI KANARI)

東北大学・大学院生命科学研究所・助教

研究者番号：60351590

研究成果の概要（和文）：

炎症性の刺激によりサイトカインやケモカインなど多くの遺伝子が活性化する一方で、細胞内の酸化還元環境を制御する *Txnip* 遺伝子の発現が、免疫細胞だけでなくほとんどの細胞種に於いて炎症性の刺激に反応して発現が急激に低下していることを見いだした。この発現抑制は、細胞内のグルコース濃度低下に反応しており、炎症と代謝が非常に密接に関係していることを示唆している。実際に、刺激時に *Txnip* 遺伝子を強制発現すると自然免疫応答が抑制されることから、近年炎症との関係が注目されている生活習慣病治療の分子標的としての可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

Whereas a number of inflammatory genes are induced by activation of nuclear factor- κ B and other transcription factors, *Txnip* are dramatically suppressed by almost proinflammatory stimuli in many types of cells. Suppression of *Txnip* by LPS is accompanied by a decrease of the glucose sensing transcription factor MondoA in the nuclei and dissociation of the MondoA: Mlx complex that bound to the carbohydrate-response elements in the *Txnip* promoter in unstimulated cells. This observation links between inflammatory responses and metabolic regulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：実験病理学、分子生物学、免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学・分子

キーワード：炎症、代謝、Toll 様受容体、解糖系

1. 研究開始当初の背景

細菌由来のリポ多糖 (LPS) などの Toll-like-receptor を介した刺激は、炎症性サイトカイン、ケモカインをはじめとした多くの遺伝子の発現を活性化する。マクロファージ細胞株 RAW264.7 における LPS 刺激前後の遺

伝子発現の変動を網羅的に解析したところ、多くの遺伝子の発現が上昇する中で、Thioredoxin-interacting protein (*Txnip*) の遺伝子発現が急激にかつ劇的に低下していることを見出した。*Txnip* は細胞内の Redox status を制御する Thioredoxin(*Trx*) の活性部位に結合

し、その機能を阻害する遺伝子であり、その発現低下は、細胞内の Redox status を調節する Thioredoxin の活性化を導くことから、この現象は、LPS 刺激直後の細胞内の Redox status 調節が細胞の正常な自然免疫応答に必要であることを示唆するものであった。

2. 研究の目的

本研究は、LPS 刺激により *Txnip* の発現が一過性に低下する現象に焦点をあて、その発現調節機構を明らかにし、自然免疫刺激による細胞内の酸化還元状態の制御が自然免疫応答に与える役割を明らかにする。さらに、Redox 制御機構が、生命の恒常性維持における役割について明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) *Txnip* 遺伝子の発現制御の破綻が、生体に及ぼす影響を分子レベルで理解するためには、*Txnip* 遺伝子の発現制御機構を分子レベルで理解することが必須である。そこで、*Txnip* の発現制御機構を明らかにするために、マクロファージ及び繊維芽細胞を LPS、CpG などの TLR リガンド、IL-1 β 、TNF α 、抗炎症性サイトカインである IL-10 で刺激し、*Txnip* 遺伝子の発現抑制がどのような刺激で引き起こされるか、また種々の阻害剤を用いて、シグナル経路の探索を行った。さらに *Txnip* 遺伝子の発現制御機構を明らかにするために、レポーター解析を行った。

(2) *Txnip* 遺伝子の急激な遺伝子発現抑制に焦点をあて、その生理学的な意味を解明することを目的として、刺激時の *Txnip* 遺伝子の発現抑制が起こらない細胞、マウスを作成し、刺激に応答した細胞内の Redox Status の変化が遺伝子発現や細胞の応答反応、個体レベルでの恒常性維持に与える影響を検証した。

4. 研究成果

(1) LPS 刺激に伴う *Txnip* 遺伝子発現抑制機構が LPS 刺激に特異的な現象であるか、自然免疫刺激に普遍的な応答であるか否かを検証するために、マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7、ヒト単球細胞株 THP-1、マウス繊維芽細胞株 NIH3T3、ヒト胎児腎癌細胞株 293 細胞を LPS、CpG、polyI:C、Pam₃CSK₄ などの TLR リガンド、IL-1 β 、TNF α などの炎症性サイトカイン、抗炎症性サイトカイン IL-10 で刺激し、刺激後の *Txnip* 遺伝子の発現を mRNA レベル、タンパク質レベルで調べた。その結果、すべての細胞種で刺激可能な炎症性の刺激で *Txnip* 遺伝子の発現抑制が確認できた。一方、IL-10 では発現は抑制されなかったことから、*Txnip* 遺伝子の発現抑制は炎症性の刺激に於いて普遍的な現象であることがわかった (図 1)。さらに、細胞内の Redox Status に応答している可能性を検証するために、ROS Scavenger である NAC、Tempol で処理した場合でも同様に抑制したことから、こ

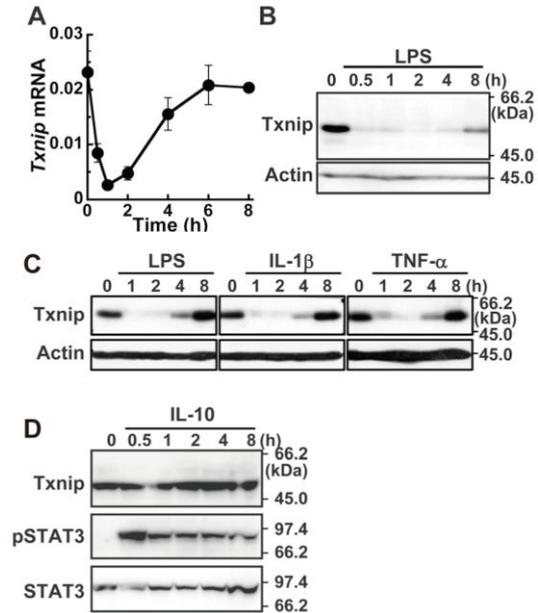


図 1 炎症性刺激に伴う *Txnip* 遺伝子の発現

A, B. LPS 刺激後の RAW264.7 細胞における *Txnip* 遺伝子の発現 C. 刺激後の NIH3T3 細胞における *Txnip* 遺伝子の発現 D. IL-10 刺激後の RAW264.7 細胞における *Txnip* 遺伝子の発現

の現象が、細胞内の Redox status に応答したものではないことが分かった。

さらに *Txnip* 遺伝子の発現制御機構を明らかにするために、ルシフェラーゼ遺伝子を用いたレポーター解析を行った。その結果、*Txnip* プロモーターにある Glucose 応答 element を欠失させた場合、定常状態の転写がなくなり、LPS に応答した転写抑制が見られなくなった。また、Glucose 応答 Element に結合する転写因子 MondoA が LPS 刺激により核から細胞質へ移動することから (図 2)、LPS 刺激に伴う *Txnip* 遺伝子の発現抑制は、細胞内の解糖系が刺激により一過的に活性化し、細胞内のグルコース代謝産物の濃度が著しく低下することに対する応答であると考えられた。実際に、解糖系酵素 GAPDH の阻害

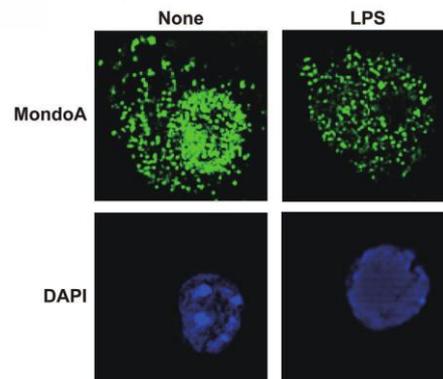
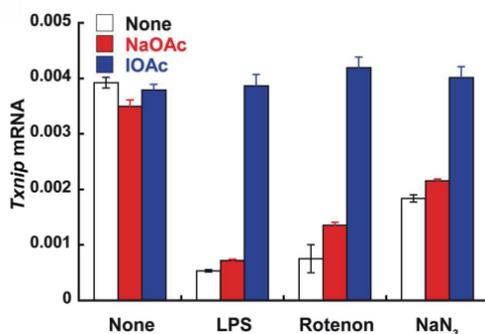


図 2 LPS 刺激に伴う MondoA の核外移行

剤の添加により LPS に応答した *Txnip* 遺伝子の発現抑制が見られなくなったことから (図 3)、炎症性の刺激が細胞内のエネルギー代謝に大きな影響を及ぼしていることがわかった。(Kanari et al *PLoS One*. 2013)。



(2) LPS 刺激に伴う *Txnip* 遺伝子の急激な遺

図 3 GAPDH 阻害の *Txnip* 遺伝子発現抑制阻害 RAW264.7 細胞を GAPDH 阻害剤 IOAc 添加し、LPS、酸化的リン酸化阻害剤で刺激 1 時間後の *Txnip* 遺伝子の発現

伝子発現抑制を補填するために、マクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞に *Txnip* 遺伝子をレトロウイルスベクターで導入した。この細胞を LPS 刺激したところ、IL-6、IL-1 β などのサイトカイン遺伝子の発現が上昇した。

Txnip 遺伝子は、細胞へのグルコースの取り込みを負に制御する遺伝子である報告もあることから、*Txnip* 遺伝子の急激な発現抑制は、炎症応答に伴うエネルギー代謝制御によるものと考えられ、*Txnip* が、生活習慣病治療における分子標的となる可能性があることが分かった (Kanari et al *PLoS One*. 2013)。近年、社会問題となりつつある生活習慣病の多くは、炎症がその発症と症状と非常に密接な関係を持つことが示され、その治療や予防の標的となりうる事が多くの研究で示されてきており、炎症時の代謝制御は炎症応答に Essential であることが分かってきている。今後、*Txnip* 遺伝子の機能や制御機構が明らかになることで、今までとは違う概念の予防や治療へと繋がる事が期待できる。

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 11 件)

(1) Thioredoxin-interacting protein gene expression via MondoA is rapidly and transiently suppressed during inflammatory responses.

Kanari Y, Sato Y, Aoyama S, Muta T.

PLoS One. 2013;8(3):e59026.

doi: 10.1371/journal.pone.0059026. 査読有

(2) Enhanced apoptosis by disruption of the STAT3-I κ B- ζ signaling pathway in epithelial cells induces Sjögren's syndrome-like autoimmune disease.

Okuma A, Hoshino K, Ohba T, Fukushi S, Aiba S, Akira S, Ono M, Kaisho T, Muta T.

Immunity. 2013;38(3):450-60.

doi: 10.1016/j.immuni.2012.11.016. 査読有

(3) Identification of interleukin-1 receptor-associated kinase 1 as a critical component that induces post-transcriptional activation of I κ B- ζ .

Ohba T, Ariga Y, Maruyama T, Truong NK, Inoue J, Muta T.

FEBS J. 2012 ;279(2):211-22.

doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08416.x. 査読有

(4) An evolutionary analysis of RAC2 identifies haplotypes associated with human autoimmune diseases.

Sironi M, Guerini FR, Agliardi C, Biasin M, Cagliani R, Fumagalli M, Caputo D, Cassinotti A, Ardizzone S, Zanzottera M, Bolognesi E, Riva S, Kanari Y, Miyazawa M, Clerici M.

Mol Biol Evol. 2011;28(12):3319-29.

doi: 10.1093/molbev/msr164. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

(1) Kanari Y, Sugahara-Tobinai A and Takai T Autoimmune disease in B6.Slamf129 mice CREST Workshop on Inflammation and Autoimmunity. Sendai. November 15th (Thu), 2012

[図書] (計 1 件)

(1) 生態適応科学 自然のしくみを活かし、持続可能な未来を拓く

東北大学生態適応グローバルCOE

日経 BP 社 2013 年 2 月発行 A5 版/243 頁 ISBN 978-4-8222-0869-1

第 II 部第 5 章執筆担当 (128 頁-153 頁)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

金成 安慶 (YASUYOSHI KANARI)
東北大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号：60351590

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

牟田 達史 (TATSUSHI MUTA)
東北大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号：60222337