

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31日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590364

研究課題名（和文） TAX1BP1 欠損マウスが形成する心弁膜病変の分子病理学的解析

研究課題名（英文） Molecular pathological examination of valvulitis developed in TAX1BP1 deficient mice.

研究代表者

伊波 英克 (IHA HIDEKATSU)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：50242631

研究成果の概要(和文)：

自然免疫の活性制御を担当する重要な因子、TAX1BP1 の機能不全による慢性炎症の病態形成機序の理解に重要な知見を得た。即ち1. TAX1BP1 欠損マウスは加齢に応じ、炎症性サイトカイン・組織再生促進因子などを含む 428 遺伝子の過剰発現があり、通常は無害な共生細菌が発現誘導に関与。2. 心電図測定にて TAX1BP1 欠損マウスの著しい PQ 間隔の延長を観察。3. 上記二病態は抗菌薬投与により改善。通常の感染性心内膜炎とは異なり、TAX1BP1 欠損マウスの心内膜炎は慢性且つ伝導障害誘導型。

研究成果の概要(英文)： Tax1-binding protein 1 (Tax1bp1) negatively regulates NF- κ B by editing the ubiquitylation of target molecules with its catalytic partner A20. Genetically engineered TAX1BP1-deficient (KO) mice develop age-dependent inflammatory constitutions in multiple organs manifested as valvulitis or dermatitis and succumb to premature death. Laser capture dissection and gene expression microarray analysis on the mitral valves of TAX1BP1-KO mice (8 and 16 week old) revealed 588 gene transcription alterations from the wild type. SAA3 (serum amyloid A3) exhibited a 1,180-fold induction (FI), CHI3L1(361-FI), HP(187-FI), IL1B(122-FI) and SPP1/OPN(101-FI). WIF1 (Wnt inhibitory factor 1) exhibited 11-fold reduction. Intense Saa3 staining and significant I- κ B α reduction were reconfirmed and massive infiltration of inflammatory lymphocytes and edema formation in the area. Antibiotics-induced 'germ free' status or the additional MyD88 deficiency significantly ameliorated TAX1BP1-KO mice's inflammatory lesions. These pathological conditions, as we named 'pseudo-infective endocarditis' were boosted by the commensal microbiota who are usually harmless by their nature. This experimental outcome raises a novel mechanistic linkage between endothelial inflammation caused by the ubiquitin remodeling immune regulators and fatal cardiac dysfunction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学・疾患モデル動物

キーワード：TAX1BP1、心弁膜炎、IL-6、KC

1. 研究開始当初の背景

Tax1bp1 は成人 T 細胞白血病ウイルスが産生するガン遺伝子産物 Tax、自然免疫応答のシグナリング蛋白の TRAF6、A20 らと結合し、NF- κ B の過剰活性化を抑制する新規制御因子である。研究代表者は TAX1BP1 を欠損したマウス (以下 KO マウス) を作成し、全身性の炎症反応の亢進、特に心弁膜の肥厚化と早死の病態を報告した (Iha et al., EMBO J. 2008)

2. 研究の目的

この病態の形成機序を更に詳細に解析するため、KO マウスの病変組織周辺の蛋白質発現・mRNA 発現の変化を 1)免疫組織化学的手法、2)Laser-Captured Microdissection (LCM)及び DNA マイクロアレイで定性・定量解析し、得られたターゲット分子に対する投薬を行い KO マウスの病態緩和を検討することとした。

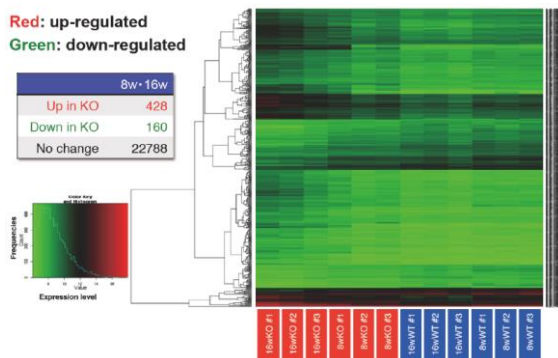
3. 研究の方法

生後 3, 8, 16 週齢の KO マウスおよび同腹野生型対照群の心弁膜を LCM にて単離し mRNA を調製後 DNA マイクロアレイで 24,000 遺伝子の発現量変動を定量化した。大きく変動した遺伝子群について個別の定量 PCR、遺伝子産物の免疫染色による半定量的解析を、炎症が惹起された心弁膜部にて解析した。さらに電顕観察も行った。抗菌薬投与による病態改善について解析した。

4. 研究成果

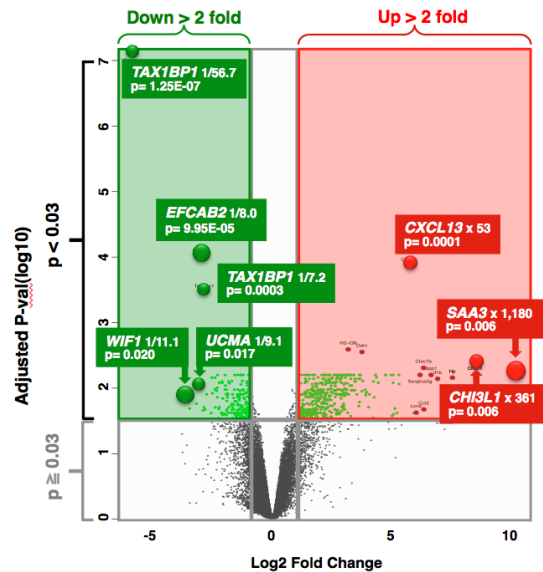
(1) TAX1BP1-遺伝子欠損マウス及び正常マウス心弁膜組織のトランスクリプトーム解析

生後 3, 8, 16 週齢の TAX1BP1-遺伝子欠損マウス (以後 KO マウス)、及び同腹野生型の心臓組織切片を Laser-Capture Microdissection 法により単離・回収し、RNA を抽出精製・アレイ解析、遺伝子発現プロファイルを得た。その結果、428 遺伝子の発現亢進と 160 遺伝子の発現抑制が確認された。



さらに個別の遺伝子発現変動について、Volcano Plot を用いて統計的有意差を視覚化

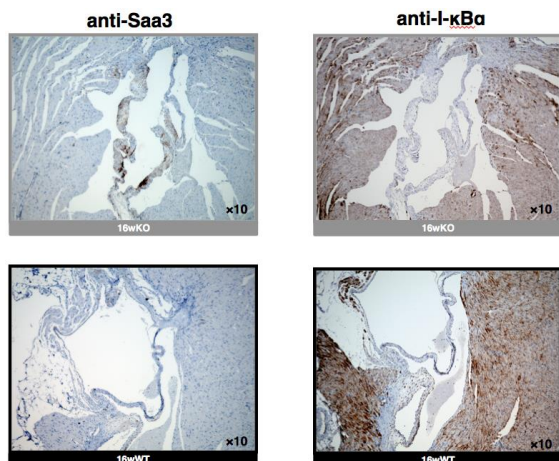
した結果、血清アミロイド A 蛋白 (SAA3, SAA1)、B リンパ球遊走化因子 (CXCL13)、炎症誘発性キチン分解酵素 (CHI3L1) 等、免疫オウと反応や炎症惹起時に誘導される遺伝子群の転写量の過度の上昇が観察された。一方、組織再生を誘導する Wnt シグナルを負に制御する WIF1、心拍動に影響する EFCAB2、軟骨細胞形成因子 UCMA1 などの顕著な発現量低下が観察された。

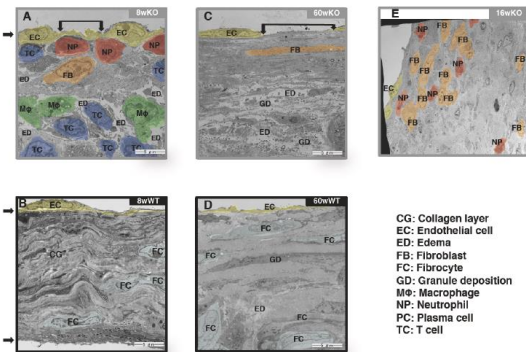


一部機能の相関に疑問が残る分子もあるが、総じて炎症の惹起とそれに付随する組織の破壊と再生に関与する遺伝子群の大きな変動が観察されることとなった。

(2) KO マウス及び正常マウス心弁膜組織の免疫染色学的観察

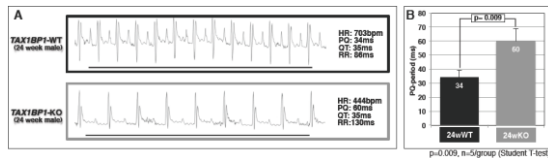
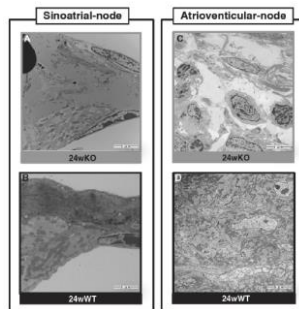
トランスクリプトーム解析の結果、野生型に比べ KO マウスでは炎症惹起時に発現誘導が起る転写量の増大が観察された。最も高値を示した SAA3 及び炎症制御蛋白質 I- κ B α の発現を免疫組織学的に観察したところ、KO マウスは前者の著しい亢進と後者の消失が確認された。





また電子顕微鏡による観察では、弁膜周辺に好中球・マクロファージの集積と浮腫及び繊維化組織の形成が確認された。

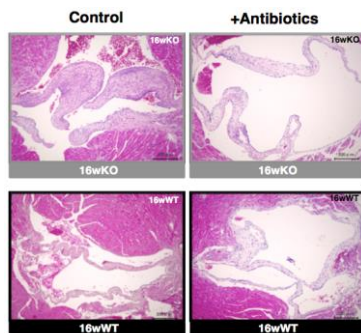
心臓の拍動を制御する洞結節および房室結節周辺をさらに電顕観察したところ同腹野生型では層状に形成された筋繊維が広範に及び破壊され浮腫で満たされる像も観察された。24週齢のKOマウスおよび同腹野生型対象群の心拍動を心電図で計測したところ、KOマウスは明らかな除脈の傾向があり特にPQ間隔の延長が観察された。



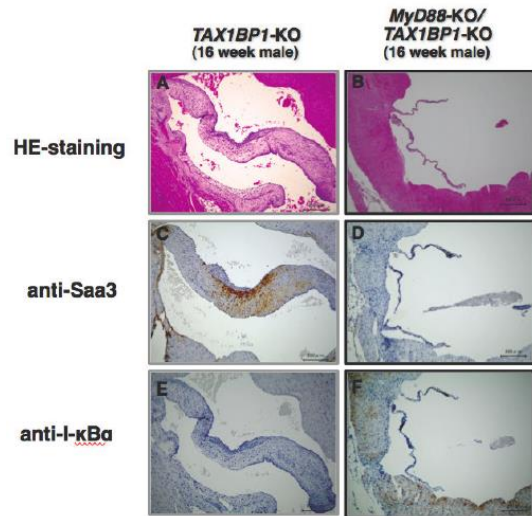
以上の結果はマイクロアレイで得られた遺伝子変動の結果を形態学的に裏付けることとなった。

(3) KOマウス心弁膜病変形成と常在細菌叢の関連性

電子顕微鏡による観察からも免疫系細胞の著しい浸潤が心弁膜病変部に観察されたので、通常では病原性を示さない共生細菌が産生するLPSなどの構成成分が「擬似的な感染性心内膜症」をKOマウスに発症させているのではないかと考え、4種類の抗菌薬を同時投与し3ヶ月の継続投与による影響を観察したところ、KOマウスの弁膜症状は著しく改善された。さらに、細菌やウイルスの感染を感知し



細胞内に免疫応答反応の誘導を指令する伝達系の必須因子 MyD88 を欠損するマウス MyD88-KO と交配した結果、TAX1BP1 の単独欠損で形成された心弁膜炎症病変の著しい改善が観察された。



以上の結果より TAX1BP1 の一部機能欠損による炎症病変は、宿主免疫環境の変化による共生細菌に対する過剰反応性が原因であると結論づけられた。

以上、今回の研究事業で得られた成果は学術誌に投稿され、最終的な校正作業が進行中である。

5. 主な発表論文等

【雑誌論文】(計2件)

① MiR-29c is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell proliferation by targeting RCC2. (査読有) Matsuo M, Nakada C, Tsukamoto Y, Noguchi T, Uchida T, Hijiya N, Matsuura K, Moriyama M. Mol Cancer. 2013 Feb 25;12:15. doi: 10.1186/1476-4598-12-15.

② Genomic profiling of submucosal-invasive gastric cancer by array-based comparative genomic hybridization. (査読有)

Kuroda A, Tsukamoto Y, Nguyen LT, Noguchi T, Takeuchi I, Uchida M, Uchida T, Hijiya N, Nakada C, Okimoto T, Kodama M, Murakami K, Matsuura K, Seto M, Ito H, Fujioka T, Moriyama M. PLoS One. 2011;6(7):e22313

【学会発表】(計7件)

① TAX1BP1 欠損マウスが形成する自己免疫病態 および心機能不全は常在細菌によってもたらされる. 伊波英克他, 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11日, 福岡国際会議場, 福岡。

② TAX1BP1-deficiency evokes spatiotemporal development of systemic inflammatory symptoms and functional failures of cardiovascular

system in mice、伊波英克他、第42回日本免疫学会学術集会、2012年12月05日、幕張メッセ、千葉。

- ③ ATL細胞におけるTax1bp1の過剰異所性発現、伊波英克他、第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月13日、大阪国際会議場、大阪。
- ④ TAX1BP1-deficiency evokes spatiotemporal development of inflammatory symptoms and functional failures in the murine cardiac system. 伊波英克他、第41回日本免疫学会学術集会、2011年11月29日、神戸国際会議場、兵庫。
- ⑤ TAX1BP1 遺伝子欠損は全身性の炎症亢進と心機能不全を誘発する。第18回MPO研究会、伊波英克他、2011年10月28日、京都大学紫蘭会館別館、京都。
- ⑥ Tax1-bp1 欠損マウスは時空間的に全身炎症を発生し、その心弁膜炎症は心機能不全をもたらす、第5回HTLV-1研究会、伊波英克他、2011年9月18日、東京大学医科学研究所、東京。
- ⑦ Tax1bp1欠損マウス」を用いたエンドトキシン誘発ぶどう膜炎の解析、中野聡子、伊波英克他、第45回日本眼炎症学会学術集会、2011年7月10日、京王プラザホテル、東京。

〔図書〕(計1件)

① Glycan Profiling of Adult T-Cell Leukemia (ATL) Cells with the High Resolution Lectin Microarrays. 2012.
Iha H, Yamada M. T-Cell Leukemia - Characteristics, Treatment and Prevention, pp89-103.

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.med.oita-u.ac.jp/biseibut/HIHA/HIHA_Home/Index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊波 英克 (IHA HIDEKATSU)
大分大学・医学部・准教授

研究者番号：50242631

(2) 研究分担者

塚本 善之 (TSUKAMOTO YOSHIYUKI)
大分大学・医学部・助教
研究者番号：00433053

(3) 連携研究者 なし