

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29日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590824

研究課題名（和文） 循環器・代謝疾患における、転写因子 Mrf-2 による核内受容体
転写機構制御の研究研究課題名（英文） Transcriptional Regulation by Mrf-2/ARID5B in Cardiovascular
and Metabolic diseases

研究代表者

渡辺 昌文 (WATANABE MASAFUMI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60360096

研究成果の概要（和文）：私たちは、ARID5B という転写因子が、生体へのストレスに対応する働きをしていると考えて、研究を開始した。その結果、抗肥満作用のあるアディポネクチンの発現、血管新生のメカニズム、心筋負荷時の線維化抑制といった場面で、重要な働きをしていることを示すことができた。ARID5B の働き方は、少なくとも2種類あるようであり、医学的治療などで介入のポイントになる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We hypothesized that the transcription factor ARID5B has a role in responding to the stress from the outside. Our research revealed that ARID5B was contributed to the expression of adiponectin, angiogenesis, and suppression of cardiac fibrosis by at least two different ways.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	1,500,000	450,000	1,950,000
平成23年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成24年度	700,000	210,000	910,000
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：循環器内科学・分子血管病態学

キーワード：転写因子、アディポネクチン、血管新生、線維化

1. 研究開始当初の背景

私たちは、平滑筋分化を制御する遺伝子として、Mrf-2/ARID5B（現在、ARID5B が一般名）遺伝子をクローニングし、SNP 解析から、この遺伝子が虚血性心疾患や糖尿病の発症に保護的に寄与することを確認した。さらに、基礎実験、既報の論文などから、我々は、ARID5B 遺伝子が、ストレス応答を制御する転写因子

の一つであるという仮説を立てた。その転写メカニズムの予備的な研究に、ARID5B が核内受容体による転写機構を制御している可能性を見出した。

その後も、他研究者から、ゲノム解析で、ARID5B と白血病、関節リウマチ、甲状腺疾患などとの関係が報告されており、疾患に直結する遺伝子であることが示されている。

2. 研究の目的

私たちは、次のような仮説を立てて、培養細胞や遺伝子改変マウスを用いて、研究を進めた。

(1) ARID5B は、平滑筋以外の細胞でも分化を促進するなどして、ストレスに应答して発現し、ホメオスタシスを維持する役割を果たす。

(2) ARID5B は、核内受容体転写制御コンプレックスの一員であり、エピジェネティクス制御に関与したり、翻訳後修飾をうけることで、転写調節に寄与している。

3. 研究の方法

まず、ARID5Bのノックアウトマウスを入手したところ、ホモのマウスの生存率が低いことがわかった。そこで、主にヘテロマウスに対して、心血管系・代謝系における各ストレスをかけて、その表現系を検討した。ヘテロマウスは通常飼育下では、ワイルドと外見には大きな差がなかった。

さらに、細胞ごとのARID5Bの機能を明らかにするために、ARID5B-floxマウスを作製した。各臓器特異的Cre発現マウスと交配し、組織特異的にARID5Bコンディショナルノックアウトマウスを作成し、一部、解析を始めたところである。

転写機構の研究には、siRNAを利用して、細胞中のARID5Bをノックダウンしたり、ノックアウトマウスから採取した細胞を使用して、解析を進めた。

4. 研究成果

1) 代謝性ストレス

普通食下で、ワイルドマウスとヘテロマウスの表現系を検討すると、体重も、白色細胞重量にも違いは認められなかったが、アディポネクチンの血中濃度・白色細胞中の発現ともに、ヘテロマウスでは減少していた。次に、高脂肪食下でのマウスの表現系を比較検討すると、アディポネクチン血中濃度は、通常食下と同様に、ヘテロで野生型よりも低下していた。これが、白色細胞のARID5Bによるものかを検討するために、脂肪組織特異的ARID5B KOマウスを作成し、解析中である。

アディポネクチンの転写制御について、3T3L1細胞などで研究した。3T3L1細胞を脂肪細胞に分化させると、分化初期にARID5B α の一過性発現上昇が認められた。プロモーター解析にて、アディポネクチンプロモーターのPPREを介して転写を活性化することが示された。次に、ARID5Bと他の蛋白との相互作用を調べるために、2 hybrid system, co-IPなどで検討し、ARID5Bが核内受容体転写制御コンプレックスのひとつである、TBL1と結合して、転写制御に寄与していることが示された。

2) 血管系ストレス

マトリジェルをマウスの背中皮下などに注入し血管新生を評価するモデルで検討した。siRNAを混入しARID5Bをノックダウンしたマトリジェルでは、コントロールに比較して、血管新生が低下していた。白血球や単核球の数には大きな変化はなかったが、侵入する血管内皮細胞や、ペリサイト様の細胞数に違いがあり、単核球のARID5Bの重要性が示唆された。

siRNAを用いた細胞の遊走を評価する試験でも、単核球のARID5Bをノックダウンすると、内皮の遊走を惹起できにくくなった。そこで、ARID5Bノックアウトマウスからの骨髄移植マウスで、同様なマトリジェル実験を行ったところ、同様な結果となり、血球系のARID5Bが血管新生に重要と考えられた。現在、マクロファージのARID5Bが重要と考え、マクロファージ特異的ARID5B KOマウスを作成し、解析中である。

次に、転写機構の解析については、採取した骨髄細胞をマクロファージに分化させて、cDNA arrayや、RNA sequenceにて、網羅的解析を行った。結果的に、ARID5Bによって、VEGFなどの血管新生因子の発現がコントロールされていることが示されている。そのメカニズムについても、有力な候補が特定され、解析中であるが、予想に反して、核内受容体転写制御とは直接の関係はなく、別の経路であった。

3) 心臓ストレス

マウスの大動脈バイパッシングで圧負荷をかけたところ、心筋細胞・線維芽細胞ともに、ARID5Bの発現が一時的に増加した。大動脈バ

インディングは技術的に習熟が必要であり、まず、マウスにAngiotensin IIを持続的に投与して、圧負荷をかけるモデルを使用した。ヘテロマウスで、圧負荷をかけると、野生型より、左心室の壁肥厚と線維化の進行を認めた。ARID5Bが線維化を起こさないようにしている可能性が考えられた。

どの細胞のARID5Bが重要かを検討するために、骨髄移植マウスで同様な実験を行い、血球系の関与は低いと考えられた。その他の in vitro の実験などから、心筋細胞のARID5Bの重要性が示唆された。現在、心筋細胞特異的 ARID5B KOマウスを作成し、解析中である。

さらに、大動脈バイパッシングで心臓に圧負荷をかけて、マウスの表現系を解析している。

このメカニズムは、さまざまな仮説をたてて検討しているが、結論は出ていない。

4) まとめ

以上から、ARID5Bは、いずれのモデルでも、ホメオスターシスを維持する方向の役割があるように思われる。しかし、その転写機構は、白色脂肪細胞では核内受容体転写制御があると考えられ、また単核球では別の経路が重要なようである。したがって、ARID5Bの役割は、少なくとも2つの経路を通して、発揮されているようである。

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0件)

〔学会発表〕(計5件)

1) 大関敦子, 渡辺昌文, 真鍋一郎, 王国琴, 渡邊綾, 河原崎秀一, 山内敏正, 原一雄, 門脇孝, 永井良三; ARID5BはアディポネクチンプロモーターのPPREを介し転写制御に寄与する 2011年11月25日 第15回日本心血管内分泌代謝学会学術集会(千里ライフサイエンスセンター)

2) Aya Watanabe, Masafumi Watanabe, Ryoza Nagai; The Expression of Mrf-2/ARID5B in Macrophages is Important for Angiogenesis in Matrigel Plugs. 2011年12月10日 第19回日本血管生物医学学会(東京ステーションコンファレンス)

3) Kawarasaki S, Watanabe M, Watanabe A, Ozeki A, Takeda N, Manabe I, Nagai R; The role of Transcription Factor ARID5B in Cardiac Fibrosis 2012年3月16日 第76回日本循環器学会学術集会(福岡国際会議場)

4) 大関敦子, 渡辺昌文, 真鍋一郎, 王国琴, 今井靖, 山内敏正, 原一雄, 渡邊綾, 河原崎秀一, 前村浩二, 門脇孝, 山崎力, 永井良三; ARID5Bヘテロ欠損マウスは高脂肪食下で肥満が抑制されインスリン抵抗性は改善した 2012年10月11日 第33回日本肥満学会大会(京都)

5) 渡邊綾, 渡辺昌文, 真鍋一郎, 武田憲彦, 大関敦子, 河原崎秀一, 永井良三; マクロファージにて発現する転写因子Mrf-2/ARID5Bは血管新生に重要である 2012年11月23日 第16回日本循環器内分泌代謝学会(東京大学, 東京)

〔図書〕(計0件)

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 昌文 (WATANABE MASAFUMI)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60360096

(2) 研究分担者

真鍋 一郎 (MANABE ICHIRO)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：703596258

今井 靖 (IMAI YASUSHI)
東京大学・医学部附属病院・特任講師
研究者番号：20359628

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：