

## 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：11101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591175

研究課題名（和文）糸球体腎炎におけるレチノイン酸誘導遺伝子アイを介した病態の解明とその制御

研究課題名（英文）Implication of the expression of retinoic acid-inducible gene-I in human glomerulonephritis

研究代表者

田中 完（TANAKA HIROSHI）

弘前大学・教育学部・教授

研究者番号：50271820

研究成果の概要（和文）：ヒト糸球体腎炎はウイルス感染を契機に発症，または増悪することが知られているが詳細な分子病態学的な機序は不明である．この機序の解明を目的とし，ヒト培養腎メサンギウム細胞（MC）を用い，ウイルス疑似感染を惹起する polyinosinic-polycytidylic acid (poly IC) を刺激因子として発現する各種炎症分子群とシグナリング経路を検討した．Poly IC は MC 上に細胞表面の受容体である Toll-like receptor (TLR) 3 と細胞内受容体の Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)/melanoma differentiation-associated gene-5 (MDA5) の発現を誘導し，これらの受容体を介した各種炎症関連分子群の活性化が示された．今後，これらの炎症経路の選択的抑制が新たな治療選択となる可能性がある．

研究成果の概要（英文）：Viral infections may trigger the development of inflammatory renal disease or the worsening of pre-existing renal disease. Viral double-stranded RNA (dsRNA) can activate not only toll-like receptors (TLR) 3 located within intracellular endosomes and retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like helicase receptors located within the cytosol. RIG-I and melanoma differentiation-associated gene-5 (MDA5) are members of the RNA helicase family in the cytosol, and both act as pathogen recognition receptors. The activation of TLRs and their downstream immune responses can be induced by both infectious pathogens and non-infectious stimuli such as endogenous ligands, and this mechanism may be involved in the pathogenesis of autoimmune renal diseases. Based on our recent experimental studies using cultured normal human mesangial cells (MCs), we found that novel TLR3/RIG-I-mediated signaling pathways in MCs may be involved in the pathogenesis of glomerular diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：小児腎・泌尿器科学

## 1. 研究開始当初の背景

ウイルス感染はヒト糸球体腎炎の発症・進展や増悪に関与することが知られているが、その詳細は不明の点が多い。近年、自然免疫系に関わる Toll 様受容体 (Toll-like receptor: TLR) と腎疾患の検討が進められ興味深い知見が蓄積されつつある。TLR3 は細胞表面に発現しウイルス複製時に形成される二本鎖 RNA (dsRNA) を認識するセンサーであるが、Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) と melanoma differentiation-associated gene-5 (MDA5) は細胞質に発現する RNA ヘリケースファミリー蛋白の一つであり、TLRs と同様に dsRNA を認識する細胞内センサーである。RIG-I (and/or MDA5) 経路を通じたシグナリングは最終的に interferon (IFN)- $\alpha$ , IFN- $\beta$  などの I 型 IFNs の産生誘導を通して抗ウイルス作用を示すとされるが、近年、様々な細胞における炎症機構そのものにも関わっていることが報告されつつある。実際のヒト腎疾患における RIG-I の関わりは C 型肝炎ウイルス関連腎炎を中心に主にウイルスの直接侵襲の面から検討がなされている。一方、われわれはループス腎炎患者の腎糸球体組織上にその急性炎症の程度と相関した RIG-I 蛋白の発現を見出し、これに加えてループス腎炎患者の尿沈渣細胞中に RIG-I の mRNA の有意な発現がみられることを報告し、RIG-I とヒト腎疾患との関わりを検討してきた。

## 2. 研究の目的

本研究は、ヒト腎疾患において自然免疫系が腎病変の進展悪化に関わる機序を RIG-I が介するシグナリング経路を中心において分子病態学的に解明することを目的とする。本研究では、ヒト培養腎糸球体メサンギウム細

胞 (MCs) を用い、ウイルス dsRNA のアナログである polyinosinic-polycytidylic acid (poly IC) を刺激因子として、MCs 上でウイルス疑似感染状態を惹起し RIG-I の発現、および RIG-I を介した炎症経路群の検討を行った。

## 3. 研究の方法

細胞培養：MCs (Lonza, USA) を指示書に従って培養し、poly IC (Sigma, USA) を PBS に 0.08~50  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で溶解、または 1 ng/ml を cationic lipid との複合体 (poly IC/cationic lipid complex) として実験に供した。なお、poly IC を刺激因子とした場合、MCs 上で I 型 IFN として誘導されるのは、IFN- $\beta$  が主であり IFN- $\alpha$  誘導は有意ではないことが確認された。

RNA 干渉法：RIG-I, MDA5, IFN- $\beta$  (Frederick, USA), TLR3 (Hilden, Germany) に対する干渉 RNA を導入した MCs を poly IC, または poly IC/cationic lipid complex で 16 時間 (RT-PCR 法), 24 時間 (Western blot 法) の処理を行った後、実験に供した。

Dexamethasone (DEX) による抑制：DEX による抑制効果をみるため、10  $\mu\text{M}$  の DEX で 1 時間の前処理をした MC の検討も行った。

以上の実験系において、RIG-I, CC chemokine ligand (CCL) 2, CCL5, C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10), IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , TLR3 に対する cDNA を用いた RT-PCR 法, RIG-I to MDA5 に対する Western blot 法を施行、さらに、抗 IFN- $\beta$  抗体 (CALIBIOCHEM, USA) を用いた実験系では CCL5, CXCL10 に対する ELISA 法を行った。

## 4. 研究成果

1) TLR3, RIG-I と CCL5 : poly IC は時間・濃度依存性に MCs 上に RIG-I の発現を誘導した。

この発現はその下流に CCL5 の発現を誘導していた。RIG-I の knockdown は CCL5 の発現を低下させたが、CCL2 の発現には影響しなかった。TLR3 の knockdown は RIG-I, IFN- $\beta$  の発現を抑制、IFN- $\beta$  の knockdown は RIG-I の発現を抑制した。抗 IFN 受容体抗体の前処置を行うと RIG-I, CCL5 の発現は抑制された。一方、IFN- $\beta$  産生 plasmid を感染させると RIG-I, CCL5 の発現が誘導された。DEX による前処置は poly IC 刺激による IFN- $\beta$ , RIG-I の発現を抑制したが、IFN- $\beta$  刺激による RIG-I 発現を抑制しなかった。

以上から、MCs 上には、poly IC 刺激により誘導される TLR3/IFN- $\beta$ /RIG-I/CCL5 経路が存在することが示された。また、DEX は既に産生された IFN- $\beta$  からの下流は抑制しないことが判明した。

2) TLR3, RIG-I, MDA5 と CXCL10 : poly IC, または poly IC/cationic lipid complex は時間・濃度依存性に MCs 上に MDA5 の発現を誘導した。TLR3 の knockdown は poly IC 刺激での MDA5 発現を抑制したが、poly IC/cationic lipid complex で誘導される MDA5 発現は抑制しなかった。一方、RIG-I の knockdown は poly IC/cationic lipid complex 刺激での MDA5 発現を抑制した。逆に MDA5 の knockdown は poly IC/cationic lipid complex 刺激で誘導される RIG-I の発現を抑制しなかった。poly IC と poly IC/cationic lipid complex 刺激は両者ともに MCs 上に IFN- $\beta$  の発現を誘導した。TLR3 の knockdown は poly IC 刺激での IFN- $\beta$  発現を抑制、RIG-I の knockdown は poly IC/cationic lipid complex 刺激での IFN- $\beta$  発現を抑制した。IFN- $\beta$  の knockdown は両者の刺激で発現する MDA5 と CXCL10 の発現を抑制した。一方、IFN- $\beta$  産生 plasmid を感染させると MCs 上の

MDA5 発現が誘導された。MDA5 の knockdown は poly IC と poly IC/cationic lipid complex 両者で誘導される CXCL10 の発現を抑制した。

以上から、MCs 上には poly IC 刺激により誘導される TLR3/IFN- $\beta$ /MDA5/CXCL10 と poly IC/cationic lipid complex で誘導される RIG-I/IFN- $\beta$ /MDA5/CXCL10 経路が存在することが示された。

実際のヒト腎疾患における関わりを検討する一環として腎生検で得られた検体を用いて MDA5, RIG-I の免疫蛍光染色を行ったところ、増殖性ループス腎炎では両者共にメサンギウム領域に陽性、蛋白尿を有する IgA 腎症では MDA5 のみが陽性であった。増殖性ループス腎炎と IgA 腎症では炎症関連経路が異なる可能性が示唆され興味深い所見と考えられた。

3) IFN stimulated gene 56 (ISG56), RIG-I と MDA5 : ISG56 は、ウイルス dsRNA や I 型 IFN で誘導され細胞の機能を調整しているとされている。MCs でも ISG56 の発現が報告されていることから、1)と 2)で得られた結果と ISG56 との関わりを検討した。

poly IC 刺激で MCs 上に時間・濃度依存性に ISG56 の発現が確認された。TLR3 と IFN- $\beta$  の knockdown は ISG56 の発現を抑制した。一方、IFN- $\beta$  産生 plasmid を感染させると ISG56 の発現が誘導された。ISG56 の knockdown は poly IC 刺激で誘導される MDA5, RIG-I, CXCL10, CCL5 の発現を抑制したが、IFN- $\beta$  の発現は抑制されなかった。

以上から、MCs 上で poly IC 刺激で誘導される TLR3/IFN- $\beta$  の下流に ISG56 は関与し、MDA5/CXCL10 と RIG-I/CCL5 の経路を調節していることが示唆された。

以上のように MCs 上ではウイルス疑似感染で惹起される新たに示された炎症経路群が存在することが示唆された。今後、これらの炎症経路群相互の作用やその制御を研究することは、ヒト腎糸球体疾患の将来的な新たな治療戦略構築に寄与する可能性がある。

#### 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 11 件)

1. Imaizumi T, Aizawa-Yashiro T, Matsumiya T, Yoshida H, Watanabe S, Tsuruga K, Tatsuta T, Xing F, Hayakari R, Meng P, Tanaka H. Interaction between interferon-stimulated gene 56 and melanoma differentiation-associated gene 5 in toll-like receptor 3 signaling in normal human mesangial cells. *Am J Nephrol* (査読有), 37, 118-125, 2013
2. Aizawa-Yashiro T, Imaizumi T, Tsuruga K, Watanabe S, Matsumiya T, Hayakari R, Yoshida H, Satoh K, Ito E, Tanaka H. Glomerular expression of fractalkine is induced by polyinosinic-polycytidylic acid in human mesangial cells: possible involvement of fractalkine after viral infection. *Pediatr Res* (査読有), 73, 180-186, 2013
3. Tanaka H, Watanabe S, Aizawa-Yashiro T, Oki E, Kumagai N, Tsuruga K, Ito E. Long-term tacrolimus-based immunosuppressive treatment for young patients with lupus nephritis: a prospective study in daily clinical practice. *Nephron Clin Pract* (査読有), 121, c165-c173, 2012
4. Imaizumi T, Aizawa-Yashiro T, Tsuruga K, Tanaka H, Matsumiya T, Yoshida H, Tatsuta T, Xing F, Hayakari R, Satoh K. Melanoma differentiation-associated gene 5 regulates the expression of a chemokine CXCL10 in human mesangial cells: implications for chronic inflammatory renal diseases. *Tohoku J Exp Med* (査読有), 228, 17-26, 2012
5. Tsuruga K, Watanabe S, Oki E, Aizawa-Yashiro T, Yoshida H, Imaizumi T, Ito E, Tanaka H. Imbalance towards Th<sub>1</sub> pathway predominance in purpura nephritis with proteinuria. *Pediatr Nephrol* (査読有), 26, 2253-2258, 2011
6. Imaizumi T, Tanaka H, Mechti N, Matsumiya T, Yoshida H, Aizawa-Yashiro T, Tsuruga K, Hayakari R, Satoh K. Polyinosinic-polycytidylic acid induces the expression of interferon-stimulated gene 20 in mesangial cells. *Nephron Exp Nephrol* (査読有), 119, e40-e48, 2011
7. Imaizumi T, Sato F, Tanaka H, Matsumiya T, Yoshida H, Aizawa-Yashiro T, Tsuruga K, Hayakari R, Kijima H, Sato K. Basic-helix-loop-helix transcription factor DEC2 constitutes negative feedback loop in IFN- $\gamma$ -mediated inflammatory responses in human mesangial cells. *Immunol Lett* (査読有), 136, 37-43, 2011
8. Imaizumi T, Tanaka H, Tajima A, Yokono Y, Matsumiya T, Yoshida H, Tsuruga K, Aizawa-Yashiro T, Inoue I, Ito E, Satoh K. IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  synergistically induce microRNA-155 which regulates TAB2/IP-10 expression in human mesangial cells. *Am J Nephrol* (査読有), 32, 462-468, 2010
9. Tsuruga K, Oki E, Aizawa-Yashiro T, Yoshida H, Imaizumi T, Tanaka H. Potential Th1/Th2 predominance in children with newly diagnosed IgA nephropathy. *Acta*

Paediatr (査読有), 99, 1584-1586, 2010

10. Imaizumi T, Tanaka H, Matsumiya T, Yoshida H, Tanji K, Tsuruga K, Oki E, Aizawa-Yashiro T, Ito E, Satoh K. Retinoic acid-inducible gene-I is induced by double-stranded RNA and regulates the expression of CC chemokine ligand (CCL) 5 in human mesangial cells. Nephrol Dial Transplant (査読有), 25, 3534-3539, 2010
11. Imaizumi T, Tanaka H, Tajima A, Tsuruga K, Oki E, Sashinami H, Matsumiya T, Yoshida H, Inoue I, Ito E. Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) is induced by IFN- $\gamma$  in human mesangial cells in culture: possible involvement of RIG-I in the inflammation in lupus nephritis. Lupus (査読有), 19, 830-836, 2010

[学会発表] (計 5 件)

1. 田中 完, タクロリムスを基盤としたより非侵襲的なループス腎炎の治療, 第 55 回日本腎臓学会学術総会ランチョンセミナー 4, ループス腎炎における治療の変遷, 2012 年 6 月 1-3 日, 横浜市
2. 田中 完, 若年者の糸球体腎炎に対する効果と侵襲性のバランスを考慮した免疫抑制療法への期待, 第 41 回日本腎臓学会東部学術大会ワークショップ 1, 糸球体腎炎の新しい治療法, 2011 年 10 月 15-16 日, 東京都
3. Tanaka H, Treatment of pediatric-onset lupus nephritis: A new option of less cytotoxic immunosuppressive therapy, The 11<sup>th</sup> congress of Asian Pediatric Nephrology, June 2-4, 2011, Fukuoka, Japan
4. 田中 完, 敦賀和志, 沖 栄真, 相澤知美, 今泉忠淳, 培養ヒトメサンギウム細胞における retinoic acid-inducible gene-I の

発現と CCL5: RANTES の制御, 第 45 回日本小児腎臓病学会学術集会, 2010 年 7 月 2-3 日, 大阪市

5. 田中 完, 敦賀和志, 沖 栄真, 相澤知美, 培養ヒトメサンギウム細胞における retinoic acid-inducible gene-I の発現と CCL5: RANTES の制御, 第 53 回日本腎臓学会学術総会, 2010 年 6 月 16-18 日, 神戸市

[図書] (計 2 件)

1. Tanaka H, Imaizumi T. Toll-like receptor 3 and retinoic acid-inducible gene-I implicated to the pathogenesis of autoimmune renal diseases. In: Genes and Autoimmunity - Intracellular signaling and microbiome contribution. Stanilova SA Eds. pp.59-74, InTec Open Access Publisher, Rijeka, Croatia, 2013.
2. Tanaka H, Imaizumi T. Treatment of pediatric-onset lupus nephritis: New option of less cytotoxic immunosuppressive therapy. In Autoimmune Disorders: Current concepts & advances from bedside to mechanistic insights. Huang FP Eds. pp.275- 288, InTec Open Access Publisher, Rijeka, Croatia, 2011.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

田中 完 (TANAKA HIROSHI)  
弘前大学・教育学部・教授  
研究者番号 : 50271820

### (2)研究分担者

今泉 忠淳 (IMAIZUMI TADAATSU)  
弘前大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号 : 90232602

吉田 秀見 (YOSHIDA HIDEMI)

弘前大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：40201008