

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月15日現在

機関番号：13901  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23790290  
 研究課題名（和文）  
 神経発達障害に関連するサイトカイン誘導性膜タンパク質 IFITM3 のシグナル解析  
 研究課題名（英文）  
 Analysis of upstream and downstream signaling of IFITM3  
 研究代表者  
 中島 晶 (NAKAJIMA AKIRA)  
 名古屋大学・医学系研究科・講師  
 研究者番号：20419237

### 研究成果の概要（和文）：

培養アストログリア細胞において、IFN- $\beta$ 、IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  を処置すると濃度依存的に IFITM3 遺伝子の発現が増加した。PolyI:C 誘発性 IFITM3 の遺伝子発現増加は、NF $\kappa$ B の阻害剤である helenalin を前処置しても抑制されなかった。一方、IRF3 の上流に存在する TBK-1 の阻害剤の前処置により PolyI:C 誘発性 IFITM3 の遺伝子発現増加は有意に抑制された。以上の結果より、PolyI:C により誘導される IFITM3 の遺伝子発現には TBK-1 から IRF3 を介した経路が重要であることが示唆された。

### 研究成果の概要（英文）：

Treatment with IFN- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , or TNF- $\alpha$  dose-dependently induced IFITM3 gene expression in cultured astrocytes. Pretreatment with helenalin, an NF $\kappa$ B inhibitor, had no effect on PolyI:C-induced IFITM3 gene expression. In contrast, PolyI:C-induced IFITM3 gene expression was significantly inhibited by pretreatment with BX795, a TBK-1 inhibitor. These results suggest that PolyI:C induces IFITM3 gene expression through TBK-1-IRF3 pathway in cultured astrocytes.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

### 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：IFITM3, 神経発達障害, サイトカイン, 統合失調症, アストログリア

#### 1. 研究開始当初の背景

統合失調症などの精神疾患は、disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1) などの複数の発症脆弱性遺伝子と周産期のウイルス感染や思春期の社会的・心理的ストレスなどの環境因子が加わることにより発症すると考えられている。しかし、周産期のウイルス感染による神経発達障害の分子機構は不明な点が多く、有効な予防・治療法がないのが現状である。

我々は、擬似ウイルス感染を誘発する二本鎖 RNA 様物質であり、toll-like receptor 3 (TLR3) アゴニストの polyriboinosinic-polyribocytidylic acid

(PolyI:C) を生後 2 日目から連続 5 日間新生児マウスに投与することにより、擬似周産期ウイルス感染モデルマウスを作製した。本モデルマウスは、学習記憶障害、情動行動異常およびグルタミン酸神経伝達障害を呈し、統合失調症の臨床症状生理を兼ね備えており、発達障害仮説に基づく新しい統合失調症動物モデルである (Ibi et al., Neurosci. Res. 2009)。本モデルマウスの脳内遺伝子発現の変化をマイクロアレイ法によって網羅的に解析した結果、*interferon-induced transmembrane protein 3* (IFITM3) 遺伝子の発現がコントロール群と比較して顕著に増加していた。また、免疫組織染色法により

IFITM3 の発現を調べると、アストログリア細胞に限局していたが、その機能は未解明である。IFITM3 はタイプ I ( $\alpha$ 、 $\beta$  など) およびタイプ II ( $\gamma$ ) インターフェロンによって誘導され (Liu et al., Mol. Cell Biol. 2002)、生殖細胞では細胞の遊走や分化などを制御していることが知られている (Tanaka et al. Dev. Cell 2005)。神経精神疾患との関連では、統合失調症、双極性障害、自閉症患者の死後脳で IFITM3 の発現増加が報告されているが (Iwamoto et al. Mol. Psychiatry 2004; Arion et al., Biol. Psychiatry 2007; Garbett et al. Neurobiol. Dis. 2008)、その病態生理学的意義はほとんどわかっていない。また、IFITM3 結合タンパク質としては、乳腺および肺血管細胞において osteopontin および pre-B-cell colony-enhancing factor が同定されているが (El-Tanani et al., Oncogene 2010; Zhang et al., FEBS lett 2008)、アストログリア細胞や神経細胞における報告はなく、中枢神経系における IFITM3 の機能や下流シグナルは明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、PolyI:C 誘発性神経発達障害に関連する IFITM3 の誘導シグナルおよび下流シグナルを明らかにし、IFITM3 の神経発達における機能を解明することである。

## 3. 研究の方法

(1) 培養アストログリア細胞における炎症性サイトカインおよびリポポリサッカライド (LPS) による IFITM3 の誘導

実験には ICR 系マウスを使用した。生後 2-3 日の新生仔マウスから海馬および大脳皮質を取り出し、髄膜を剥がし dispase および DNase を用いて酵素処理をした後、初代培養としてフラスコに播いた。90-95%コンフルエントになった時点で二次培養を行った。全ての実験には二次培養アストログリア細胞を用いた。培養アストログリア細胞にインターフェロン- $\beta$  (IFN- $\beta$ )、腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ )、インターロイキン- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) あるいは LPS を処置し、24 時間後に細胞を回収し、リアルタイム PCR 法により IFITM3 遺伝子発現量の解析を行った。培養アストログリア細胞から抽出した RNA を SuperscriptIII (Invitrogen) を用いて cDNA に変換した後、7300 real-time PCR (Applied Biosystem) を用いて IFITM3 mRNA 量を定量した。データは平均±標準誤差で示した。統計解析は以下のように行った。独立多群間の比較には一元配置分散分析 (one-way analysis of variance, ANOVA) を用い、有意差が認められた場合には Tukey の検定を行った。いずれの検定においても危険率 5%以下の場合を

有意差ありと判定した。

(2) 細胞内シグナル伝達分子に対する阻害剤を用いた解析

NF $\kappa$ B, IFN-regulatory factor 3 (IRF3), ERK, p38 kinase, c-Jun N-terminal kinase (JNK), PI3K, Janus-activated kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription (STAT) 等、PolyI:C および IFN- $\beta$ 、IL- $1\beta$  等のサイトカインにより活性化される細胞内シグナル分子に対する阻害剤を用いて、PolyI:C による IFITM3 の発現増加に関与する細胞内シグナル伝達経路を検討した。NF $\kappa$ B の阻害剤 helenalin および TANK-binding kinase (TBK-1) の阻害剤 BX795 は PolyI:C 処置の 1 時間前にアストログリア細胞に処置した。

## 4. 研究成果

(1) 培養アストログリア細胞における炎症性サイトカインによる IFITM3 の誘導

培養アストログリア細胞において PolyI:C 処置により発現が誘導されたサイトカインである IFN- $\beta$ 、IL- $1\beta$  および TNF- $\alpha$  をアストログリア細胞に処置すると濃度依存的に IFITM3 遺伝子の発現が増加した (図 1-3)。

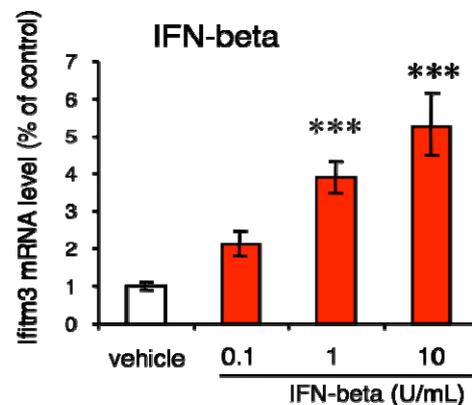


図1. 培養アストログリア細胞における Ifitm3 mRNA レベルに対する IFN-beta の効果

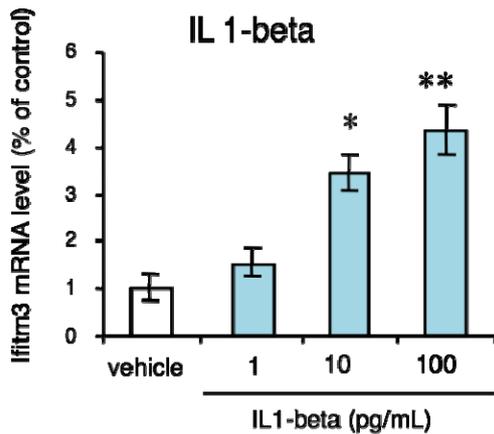


図2. 培養アストログリア細胞におけるIfitm3 mRNAレベルに対するIL1-betaの効果

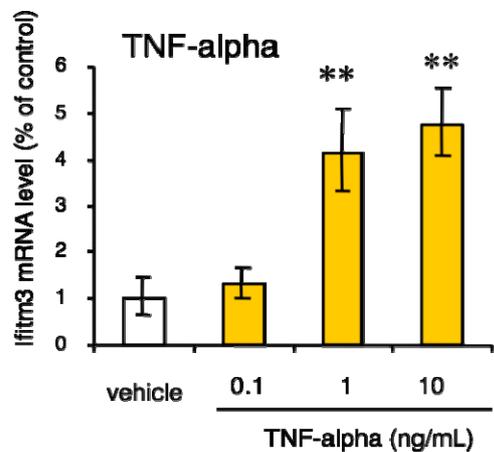


図3. 培養アストログリア細胞におけるIfitm3 mRNAレベルに対するTNF-alphaの効果

さらに、TLR4 アゴニストであり、炎症性サイトカインを誘導する LPS 処置により、培養アストログリア細胞において IFITM3 の遺伝子発現が誘導された (図4)。LPS の処置により炎症性サイトカインの遺伝子発現は上昇していた。

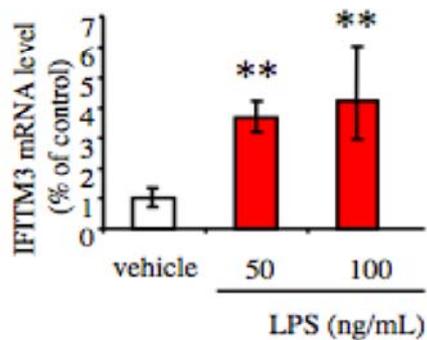


図4. 培養アストログリア細胞における Ifitm3 mRNAレベルに対する LPSの効果

これらの結果より、培養アストログリア細胞における IFITM3 の遺伝子発現増加に炎症性サイトカインの関与が示唆される。

(2)細胞内シグナル伝達分子に対する阻害剤を用いた解析

PolyI:C は TLR3, melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) および retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) の3つの分子により認識され、転写因子である NF $\kappa$ B および interferon-regulatory factor 3 (IRF3)を介して、IFN- $\beta$ 、IL-1 $\beta$ および TNF- $\alpha$ 等の遺伝子発現を誘導する事が知られている (Kawai and Akira, 2006)。

そこで、PolyI:C 誘発性 IFITM3 の遺伝子発現増加に対する NF $\kappa$ B 阻害剤 helenalin および IRF3 の上流に存在する TANK-binding kinase (TBK-1)の阻害剤 BX795 の効果について検討した。NF $\kappa$ B の阻害剤である helenalin を前処置しても PolyI:C 誘発性 IFITM3 の遺伝子発現増加は抑制されなかった (図5)。

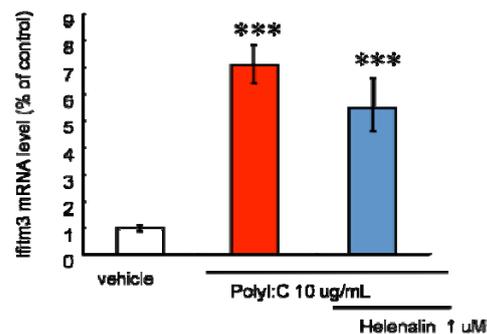


図5. PolyI:CによるIfitm3 mRNA発現増加に対するNF $\kappa$ B阻害剤helenalinの効果

一方、TBK-1 の阻害剤である BX795 の前処置により PolyI:C 誘発性 IFITM3 の遺伝子発現増加は有意に抑制された (図6)。

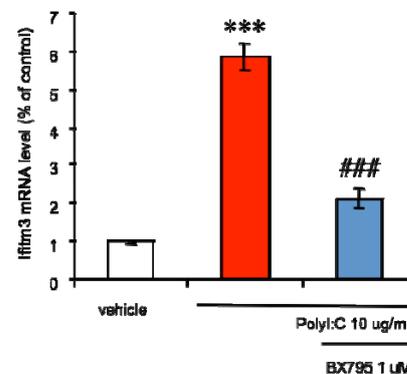


図6. PolyI:CによるIfitm3 mRNA発現増加に対する TANK-binding kinase阻害剤BX795の効果

また、IFN- $\beta$  の中和抗体を前処置することにより、PolyI:C 誘発性 IFITM3 遺伝子発現は顕著に抑制された。さらに、LPS 処置により誘導される IFITM3 遺伝子発現も同様に、IFN- $\beta$  の中和抗体の前処置により抑制された。

以上の結果より、培養アストログリア細胞において PolyI:C により誘導される IFITM3 の遺伝子発現には TBK-1 から IRF3 を介した経路が重要であることが示唆された。さらに、PolyI:C および LPS 誘発性 IFITM3 遺伝子発現増加は転写因子である IRF3 を介して誘導されるサイトカインである IFN- $\beta$  が関与することが示唆された。

IFITM3 がクラスリン依存性およびクラスリン非依存のエンドサイトーシスを抑制し、アストログリア細胞からの分泌因子を制御する事により神経発達障害を引き起こす事が明らかとなっているが (Ibi et al., 2013)、今後は、IFITM3 相互作用タンパク質の同定、IFITM3 によるエンドサイトーシス制御機構の解明および IFITM3 によりその分泌が制御され神経発達障害を引き起こす因子の同定が課題である。

## 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 1 件)

1. Ibi D, Nagai T, Nakajima A, Mizoguchi H, Kawase T, Tsuboi D, Kano SI, Sato Y, Hayakawa M, Lange UC, Adams DJ, Surani MA, Satoh T, Sawa A, Kaibuchi K, Nabeshima T, Yamada K (2013) Astroglial IFITM3 mediates neuronal impairments following neonatal immune challenge in mice. **Glia**. 61:679-693. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. 中島晶ら、培養アストログリア細胞における Toll 様受容体刺激は神経発達障害関連膜タンパク質 IFITM3 の発現を誘導する、第 85 回日本薬理学会年会、平成 24 年 3 月 14 日-16 日、京都
2. 中島晶ら、神経発達障害に関連する膜タンパク質 IFITM3 の TLR リガンドによる発現誘導、第 41 回日本神経精神薬理学会年会、平成 23 年 10 月 27 日-29 日、東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中島 晶 (NAKAJIMA AKIRA)  
名古屋大学・医学系研究科・講師  
研究者番号：20419237

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし