

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790472

研究課題名(和文)自己免疫・慢性炎症に重要なIL-6アンプの新規制御機構の解析

研究課題名(英文)The novel molecular mechanism regulating the Inflammation Amplifier

## 研究代表者

小椋 英樹(Ogura, Hideki)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・特任助教

研究者番号：20573174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：炎症アンプ(IL-6アンプ)は慢性炎症に重要な分子機構であり、線維芽細胞や血管内皮細胞などの非免疫細胞においてNF- $\kappa$ BとSTAT3の活性化によってNF- $\kappa$ Bの過剰活性化が誘導される。炎症アンプは自己免疫疾患の発症や慢性移植片拒絶などに重要であることが示されており、炎症アンプの制御メカニズムの解明は、創薬の上で意義深い知見を与えるものと考えられる。本研究では、ZFP1が血管内皮細胞株においてプロモーター上でNF- $\kappa$ Bと複合体を形成しDNA結合能を調節、炎症アンプを制御していることが分かった。また、NF- $\kappa$ Bのプロモーター会合を調節する因子としてキナーゼXが見出された。

研究成果の概要(英文)：Inflammation amplifier (IL-6 amplifier) is the key mechanism involved in chronic inflammation. In non-hematopoietic cells including fibroblasts or vascular endothelial cells, NF- $\kappa$ B activation together with STAT3 activation hyperactivates NF- $\kappa$ B signaling. Knowing the amplifier is shown to be important for the pathogenesis of autoimmune diseases or chronic graft rejection model, it is important to study the molecular basis of this mechanism, as it is a promising target for drug development. In this study, we found that ZFP1 regulates inflammation amplifier via regulating NF- $\kappa$ B DNA binding activity. We also identified kinase X regulating NF- $\kappa$ B promoter recruitment.

研究分野：自己免疫

キーワード：NF- $\kappa$ B 炎症アンプ

### 1. 研究開始当初の背景

炎症アンブ (IL-6 アンブ) は慢性炎症に重要な分子機構であり、線維芽細胞や血管内皮細胞などの非免疫細胞において IL-17 や TNF $\alpha$ 、また IL-6 などによる NF- $\kappa$ B と STAT3 の活性化で、NF- $\kappa$ B の過剰活性化が誘導される。炎症アンブは自己免疫疾患の発症や慢性移植片拒絶などに重要であることが実験的に証明されており、またヒト疾患においても重要な役割を担っている可能性が GWAS 解析を利用した reverse-direction 法により強く示唆されている。これらのことから、炎症アンブの制御メカニズムの解明は、疾患の発症メカニズムを理解する上で、また新たな創薬標的を提示する上で非常に重要である。

これまでに、炎症アンブを制御する分子を網羅的に探索するため、炎症アンブが強く誘導される血管内皮細胞株において、70000 クローンの shRNA が含まれるノックダウンライブラリによってゲノムワイドスクリーニングが行われた。その結果同定された炎症回路を制御する遺伝子群は、いくつかの指標を基に優先順位づけが行われた。そのうちのひとつが、NF- $\kappa$ B、STAT3 会合分子の網羅的同定である。炎症アンブには核内における NF- $\kappa$ B、STAT3 の相互作用が重要であるという知見が得られていたため、*in vitro* の過剰発現系を用い、核分画において NF- $\kappa$ B、STAT3 と共沈する分子を LC-MS/MS によって網羅的に同定し、ゲノムワイドスクリーニングの結果と合わせて候補遺伝子の絞り込みが行われた。

### 2. 研究の目的

本研究では、上記のゲノムワイドスクリーニングで絞り込まれた遺伝子に着目して研究を行った。そのうち、その昨日が殆ど未知である ZFP1 に特に注目した。ZFP1 による炎症アンブの制御機構を詳細に解析することで、炎症アンブの分子基盤に新規の知見をもたらし、人為的な制御への新たな可能性が拓かれることが期待された。

### 3. 研究の方法

炎症回路が強い血管内皮細胞株、または線維芽細胞を主に用い、ZFP1 などの遺伝子がどのように炎症回路を制御しているのかを明らかにすることで、炎症回路の新規の制御ポイントを見出す。また *in vivo*、疾患モデルなどを用いて、どのように関与するかも明らかにする。

### 4. 研究成果

血管内皮細胞において ZFP1 をノックダウンすると、IL-17、TNF $\alpha$  誘導性の IL-6 の産生

が顕著に現弱されていることが確認された (図 1)。また、mRNA レベルにおいて IL-6 や ケモカイン等の NF- $\kappa$ B の標的遺伝子の発現が抑制されている一方で、Socs3 などの STAT3 の標的遺伝子の発現はほぼ変化しなかった。

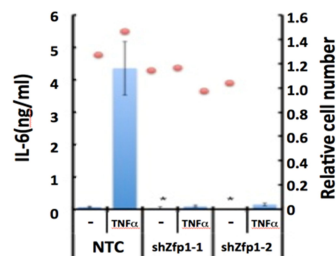


図 1 IL-6 産生における ZFP1 の役割

さらに、マイクロアレイ解析によってどのような遺伝子群が影響を受けているか解析を行うと、やはり NF- $\kappa$ B 標的遺伝子の発現が特異的に障害されていた。これらのことから、NF- $\kappa$ B 経路についてより詳細に調べると、ZFP1 のノックダウンは NF- $\kappa$ B の S536 リン酸化や核内移行には影響を及ぼさないものの、NF- $\kappa$ B の DNA 結合能が強く障害されていることが分かった (図 2)。

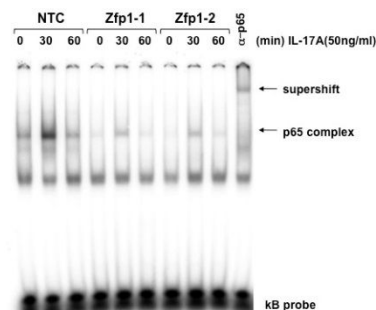


図 2 NF- $\kappa$ B DNA 結合能への影響

以上を踏まえ、ChIP assay により NF- $\kappa$ B の標的遺伝子プロモーターへの会合を調べると、ZFP1 ノックダウン細胞ではこれが顕著に障害されていた。(図 3)

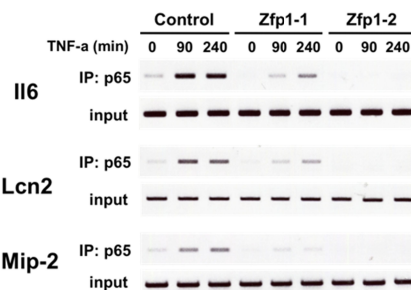


図 3 NF- $\kappa$ B のプロモーター会合

更に、ZFP1 抗体を用いて ChIP assay を行った所、ZFP1 自身も TNF $\alpha$  刺激依存的に  $\kappa$ B プロモーター近傍に会合していることが明らかになった (図 4)。

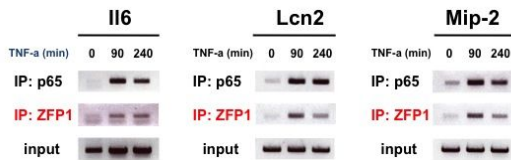


図4 ZFP1のプロモーター会合

ZFP1はLC-MS/MSによってスクリーニングされてきた分子であり、過剰発現系においてZFP1とNF- $\kappa$ Bが核内分画特異的に相互作用することが免疫沈降法により示された。同系で、STAT3との相互作用は確認されなかった(図5)。

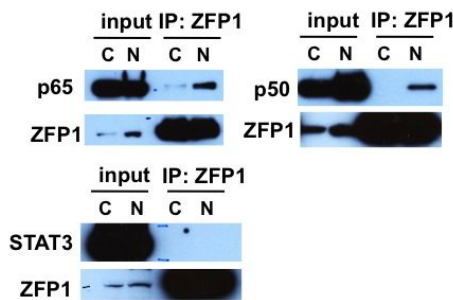


図5 ZFP1とNF- $\kappa$ Bの核内における相互作用

また、内在性分子の相互作用も同法により確認された。またChIP-on-ChIP assayにより、NF- $\kappa$ BとZFP1がプロモーター上で複合体を形成することが示された。

さらに、*in vivo*におけるZFP1の働きを調べるため、炎症回路への依存性が既に確認されているF759関節炎モデル(参考1)を用いて関節内にZFP1に対するshRNA発現レンチウイルスを投与し、関節炎の発症を評価したところ、著明に現弱することが分かった。このことから、ZFP1は*in vitro*、*in vivo*相方において炎症アンプの形成に重要であり、その機序としては核内でNF- $\kappa$ Bと相互作用し、プロモーター上でDNA結合能を調節している可能性が考えられた。ChIPの結果から、ZFP1自身もTNF $\alpha$ 刺激にダイナミックに応答していることが想定されており、この経路は創薬の標的になり得る。今後、炎症回路の形成時にZFP1とNF- $\kappa$ Bの相互作用がどのような機構で調節されているのが焦点となる。

ZFP1のノックアウト技術を用いた更なる検証については、今後喫緊の課題としたい。また、ゲノムワイドスクリーニングにより既に炎症回路に重要である可能性が示唆され、実際にNF- $\kappa$ Bを制御することが明らかになったこのZFP1について、reverse-direction法によって疾患との連鎖を調べた(参考2)ところ、残念なことに既知の連鎖は報告されていなかった。今後はZFP1に相互作用する分子群について同様にreverse-direction法によって解析を行うことで、ZFP1の重要性をよ

り強く提示できる可能性がある。また、並行して解析を行っていたキナーゼXが、炎症アンプにおいてZFP1と同じポイントに作用する可能性が示唆されており、この分子とZFP1との関連についても明らかにしたい。

#### 参考文献

- (1) Murakami M, Okuyama Y, Ogura H, et al., J Exp Med 208(1):103-114 (2011)
- (2) Ogura H, Atsumi T, Bando H, et al., "The reverse-direction method links mass experimental data to human diseases." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 62(1):41-45 (2014)

#### 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) Murakami M, Harada M, Kamimura D, Ogura H, Okuyama Y, Kumai N, Okuyama A, Singh R, Jiang JJ, Atsumi T, Shiraya S, Nakatsuji Y, Kinoshita M, Kohsaka H, Nishida M, Sakoda S, Miyasaka N, Yamaguchi-Takahara K, Toshio Hirano, "Disease-Association Analysis of an Inflammation-Related Feedback Loop." Cell Reports 3. 946-959 (2013), 査読有、doi:10.1016/j.celrep.2013.01.028

[学会発表](計4件)

- (1) Ogura H et al., "IL-6 amplifier, NF- $\kappa$ B-triggered positive-feedback for IL-6 signaling, is a key player in inflammation associated with various human diseases" 第41回日本免疫学会、2012年12月5-7日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)
- (2) 小椋英樹、板東秀典、孟潔、Lavannya Sabharwal、熱海徹、村上正晃 NAF-1のクロマチンリモデリングを介した炎症回路の制御、日本エピジェネティクス研究会、2014年5月25-27日、東京大学伊藤国際学術研究センター(東京都・文京区)
- (3) Hideki Ogura, Rajeev Singh, Lavannya Sabharwal, Noriko Kumai, Azusa Okuyama, Yoshio Hirano, Masaaki Murakami

“ Genome-Wide Screen of Negative Regulators of Inflammation Amplifier, a Chemokine Inducer in Non-Immune Cells ”  
第42回日本免疫学会、2013年12月11-13日、  
幕張メッセ（千葉県・千葉市）

(4) Hideki Ogura, Toru Atsumi, Jie Meng, Daisuke Kamimura, Masaaki Murakami  
ZFZ (zinc finger motif containing protein Z) promotes the inflammation amplifier by regulating NF- $\kappa$ B DNA binding activity  
第43回日本免疫学会学術集会、2014年12月10-12日、国立京都国際会館（京都府・京都市）（ベストプレゼンテーション賞受賞）

〔図書〕（計2件）

(1) 上村 大輔、小椋 英樹、村上 正晃：“炎症と免疫 IL-6 アンプと血液脳関門への病原 Th17 の侵入口形成” 先端医学社、炎症と免疫 21、108-116、2013

(2) 小椋 英樹、村上 正晃：“臨床免疫・アレルギー科 インフラメーションアンプルートと関与分子” 科学評論社、臨床免疫・アレルギー科 59(3)、265-273、2013-03

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小椋 英樹 (OGURA, Hideki)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・特任助教

研究者番号：20573174