

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461497

研究課題名(和文) 新規の線維化・強皮症モデルマウスを用いた炎症-自己免疫-線維化相互関連の解明

研究課題名(英文) Exploring the inflammation-autoimmune-fibrosis interaction by using novel mouse model for fibrosis and scleroderma

研究代表者

芦田 昇 (Ashida, Noboru)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00538978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：線維化におけるNF- κ Bのメカニズムを解明するため、我々はその活性化に必須のキナーゼであるIKK β を筋線維芽細胞において欠失させたマウスを作成したところ、雌に多く皮膚および全身の臓器に著明な線維化と、血清中に自己抗体を観察した。このことから、当マウスを新規の線維化・強皮症モデル動物として国際特許出願・各国移行を行った。またそのメカニズムを探求したところ、キナーゼ活性非依存的なIKK β の役割の喪失が上記の表現型の原因となっていることを見出し、IKK β の結合蛋白としてAMAP1を同定した。

研究成果の概要(英文)：To explore the role of NF- κ B in fibrosis, we made mice with deletion of IKK β , an essential kinase for the activation of NF- κ B, in myofibroblasts. The mice presented massive fibrosis in skin and internal organs more in females, and autoantibodies were detected in serum. We submitted world patent application claiming this mouse as a novel animal model for fibrosis and scleroderma. We tried to unveil the mechanism of this phenotype, and found that kinase-independent function of IKK β is responsible for the phenotypes, and identified AMAP1 as a binding protein with IKK β .

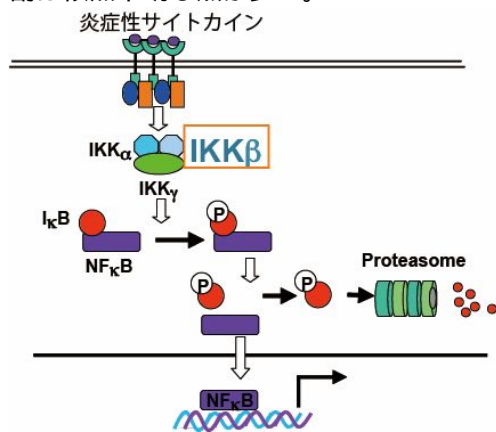
研究分野：循環器内科学、分子生物学

キーワード：線維化 炎症 強皮症 自己免疫

1. 研究開始当初の背景

膠原線維の蓄積による組織の線維化は、生体の防御反応としての炎症の終結プロセスにおいて重要な役割を有している。しかしながら、過度の線維化は膠原病をはじめとして虚血性心疾患・肝硬変・癌・腎炎など様々な疾患の根本的な病態を形成している。そのメカニズムに対してこれまで様々な研究がなされ、また抗炎症による線維化抑制の創薬が試みられてきたが、現在までのところ奏功しているとは言い難い。

その一例として、IKK -NF B シグナルがある。炎症反応制御において中心的な転写因子である NF B は TNF などの炎症惹起物質によってそのシグナル経路が活性化され、IKK α , IKK β , IKK γ 複合体のリン酸化、I κ B のリン酸化及び分解を介して最終的に NF B が核内に移動することによって転写因子として各種蛋白やサイトカインなどの発現を制御している(下図)。これらの分子の中で、IKK は NF B を制御するキナーゼとして同定され、ノックアウトマウスなどの知見によって NF B の活性化に不可欠であることが示されている。この IKK -NF B シグナルは炎症の初期段階における役割はよく解明されているが、炎症の終末段階である線維化における役割は依然不明な点が多い。



2. 研究の目的

線維芽細胞から分化し、線維化において重要な働きをすることが報告されている筋線維芽細胞における NF B シグナル分子の役割を遺伝子改変マウスを用いて解析することにより、これまで明確になっていない線維化における NF B の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

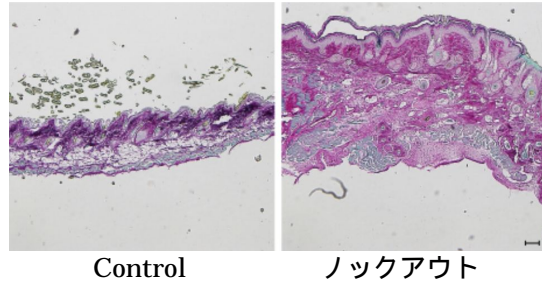
筋線維芽細胞の marker である SM22 を発現した細胞において Cre 蛋白を発現する SM22 Cre マウスと、IKK を loxP で挟んだ IKK flox マウスを掛け合わせ、Cre-LoxP システムにより筋線維芽細胞における IKK をノ

ックアウトしたマウスを作成し、これを解析した。

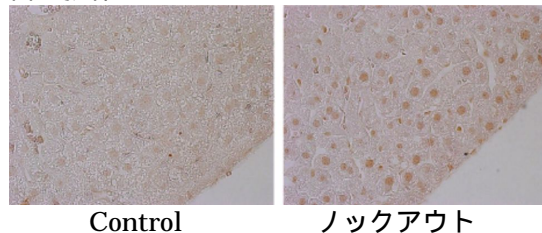
4. 研究成果

上記のマウスは、NF B 活性が抑制されているにもかかわらず、意外にも皮膚および内臓において著明な線維化をきたし、また血清中に自己抗体を観察した(下図)。

皮膚コラーゲン染色



自己抗体



また、表現型の発現は雌に優位に多かった。以上の結果から、当マウスは強皮症・線維化マウスとして有用であると考えられたため、これについて国際特許出願を行った。

また、そのメカニズムの解析も行った。興味深いことに同じ SM22 発現細胞において、I κ B に変異を入れていることによって NF B が活性化されないマウスが報告されているが、そのマウスは外見上特に表現型がないこと記載されている (*J Am Heart Assoc.* 2013;2:e000230)。このことから、本マウスの表現型は IKK のキナーゼ活性非依存的な役割の喪失によるものであることが推察された。このため、IKK がノックアウトされた筋線維芽細胞においてキナーゼ活性不活性化 IKK を過剰発現させたマウスを作成したところ、上記の表現型が認められなくなったことを確認した。この結果はこれまで知られていない IKK の NF B 活性化以外の役割が存在し、それが線維化に影響を及ぼしていることを示していることを示唆していると考えられた。

次に IKK の NF B 活性化以外の役割がターゲットとする分子を同定するために、HEK293 細胞に恒常的キナーゼ活性化 IKK・キナーゼ活性不活性化 IKK・正常型 IKK のそれぞれを過剰発現させ、その結合蛋白をプロテオミクスを用いて解析したところ、

そのいずれにも結合するものとして AMAP1 が同定された。AMAP1 は低分子量 G 蛋白質である Arf の GTPase 活性化蛋白質 (GAP) であり、臨床的には特に乳がんとの関連が多く報告されているが、炎症との関わりは知られていない。このため IKK と AMAP1 について解析したところ、NF B の活性化によって AMAP1 が細胞膜/核内から細胞質内に移動すること、AMAP1 が IKK / と IKK の結合部位に競合的に結合することによって IKK / -IKK の結合を阻害し、その結果 NF B の活性化を抑制することを見出した。これは、AMAP1 が negative feedback 機構による NF B 活性化制御を担っていることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

① Tien DN, Kishihata M, Yoshikawa A, Hashimoto A, Sabe H, Nishi E, Kamei K, Arai H, Kita T, Kimura T, Yokode M, Ashida N. Amap1 as a negative-feedback regulator of nuclear factor-kappa B under inflammatory conditions. *Scientific reports*. 2014;4:5094

② Ashida N, Kishihata M, Tien DN, Kamei K, Kimura T, Yokode M. Aspirin augments the expression of adenomatous polyposis coli protein by suppression of ikkbeta. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014;446:460-464

③ 芦田 昇: 炎症シグナルの多彩な役割にみる抗炎症治療の問題点
医学のあゆみ 246 巻 3 号 Page261-262 (2013.7)

〔学会発表〕(計12件)

①第1回 J-ISCIP(国際心臓血管薬物療法学会日本部会) 学術集会 2015.6.20-21 京都

芦田昇, Dat Nguyen Tien, 岸畑雅子、横出正之、木村剛

「線維化における炎症シグナルの二面的役割」

②第47回日本結合組織学会学術大会 2015.5.15-16 東京

Dat Nguyen Tien, Masako Kishihata, Takeshi Kimura, Noboru Ashida

"Kinase-independent function of IKK in fibrosis"

③第79回日本循環器学会学術集会、2015.4.24-26 大阪

Nguyen Tien Dat, Masayuki Yokode, Takeshi Kimura, and Noboru Ashida

"NF- B Activation both in Embryonic Cardiomyocytes and Fibroblasts Induces Congenital Cardiac Defects"

④第3回御茶ノ水動脈硬化フォーラム(招待

講演) 2015.2.28 東京

Noboru Ashida

"Diverse roles of IKK in fibrosis"

⑤第37回日本分子生物学会年会、2014.11.25-27 横浜

Dat Nguyen-Tien, Masako Kishihata, Megumi Nishio, Kaeko Kamei, Kenji Kabashima, Yoshiki Miyachi, Masayuki Yokode, Takeshi Kimura, Noboru Ashida: "Roles of IKK in fibrosis"

9th Metabolic Syndrome, Type2 Diabetes and Atherosclerosis Congress 2014.9.12-14 京都

Noboru Ashida, Dat Nguyen Tien, Masako Kishihata, Ayumu Yoshikawa, Ari Hashimoto, Hisataka Sabe, Eiichiro Nishi, Kaeko Kamei, Hidenori Arai, Toru Kita, Takeshi Kimura, Masayuki Yokode

"AMAP1 as a negative-feedback regulator of nuclear factor-kappa B"

第5回 Molecular Cardiovascular Conference II 2014.9.5-6 神戸

Noboru Ashida, Dat Nguyen Tien, Masako Kishihata, Takeshi Kimura

"Deletion of IKK in myofibroblasts induces fibrosis and autoantibodies"

⑧第46回日本結合組織学会・第61回マトリックス研究会 合同学術集会(招待講演) 2014.6.5-7 名古屋

Dat Nguyen Tien, Satoshi Nakamizo, Akihiko Kitoh, Kaeko Kamei, Kenji Kabashima, Yoshiki Miyachi, Atsushi Utani, Hidenori Arai, Takeshi Kimura, Masayuki Yokode, Noboru Ashida

"The roles of NF B in Fibrosis and Systemic Sclerosis"

第51回臨床分子医学会学術集会 2014.4.11-13 東京

芦田昇

「新規NF B抑制メカニズムとしてのAMAP1」

第78回日本循環器学会学術集会 2014.3.21-23 東京

Noboru Ashida, Masayuki Yokode, Takeshi Kimura "Fibrosis induced by deletion of IKK"

第36回日本分子生物学会年会 2013.12.3-6 神戸

Dat Nguyen Tien, Masako Kishihata, Hisataka Sabe, Kaeko Kamei, Hidenori Arai, Toru Kita, Takeshi Kimura, Masayuki Yokode, Noboru Ashida

"AMAP1 as a negative-feedback regulator of NF- B"

第45回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2013/07/18-19 東京

Noboru Ashida, Masako Kishihata, Nguyen Tien Dat, Megumi Nishio, Masayuki Yokode
"Gender difference in regulation of MMP9 by NF B signaling-implication for mechanism of cardiac and aneurysm rupture"

(3)連携研究者
なし

〔図書〕(計 0 件)
なし

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称:"Invention and Usage of Non-human Animal Model for Fibrosis"

発明者: 芦田昇、Nguyen Tien Dat、横出正之、Michael Karin

出願人: 京都大学、University of California, San Diego

種類: 米国仮出願

番号: 61/721,321

出願日: 2012 年 11 月 1 日

名称:"NON-HUMAN ANIMAL MODEL FOR FIBROSIS AND USE THEREOF"

発明者: 芦田昇、Nguyen Tien Dat、横出正之、Michael Karin

出願人: 京都大学、University of California, San Diego

種類: PCT (Patent Cooperation Treaty) 国際出願及び日・米・欧各国移行

番号: PCT/JP2013/079623

出願日: 2013/10/31

各国移行:

日本: 出願番号: 2014-544591 移行日: 2015/04/20

米国: 出願番号: 14/439,885 移行日: 2015/04/30

欧州: 出願番号: 13851788.3 移行日: 2015/05/21

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://kyoto-u-cardio.jp/kisokenkyu/inflam/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

芦田 昇 (ASHIDA, Noboru)

京都大学・大学院医学研究科・特定講師

研究者番号 00538978

(2)研究分担者

なし