

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790710

研究課題名 (和文) 心線維化巣への Fibrocyte 遊走における IRF3 の機能の検討

研究課題名 (英文) IRF3 regulates cardiac fibrosis but not hypertrophy in mice during angiotensin II-induced hypertension.

研究代表者

都島 健介 (TSUSHIMA KENSUKE)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50436482

研究成果の概要 (和文)：高血圧は心不全の原因疾患として非常に重要で、慢性的な血圧上昇が長期にわたると心臓は徐々に肥大し、線維化が生じ、心機能は徐々に低下する。この研究では、ウイルス感染などの免疫応答の際に重要な働きを有することが知られている転写因子、Interferon regulatory factor 3 (IRF3) が昇圧ホルモンの一つであるアンギオテンシン II の作用によっても活性化され、心臓の線維化反応においても重要な役割を演じていることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：Hypertension is a typical modern lifestyle-related disease that is closely associated with the development of cardiovascular disorders. Elevation of angiotensin II (ANG II) is one of several critical factors for hypertension and heart failure; however, the mechanisms underlying the ANG II-mediated pathogenesis are still poorly understood. Here, we show that ANG II-mediated cardiac fibrosis, but not hypertrophy, is regulated by interferon regulatory factor 3 (IRF3), which until now has been exclusively studied in the innate immune system. Our present study reveals an unrecognized function of IRF3 in cardiac remodeling, providing new insight into the progression of hypertension-induced cardiac pathogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医薬薬学

科研費の分科・細目：内科臨床医学・循環器内科学

キーワード：心臓、線維化、炎症、アンギオテンシン II、IRF3、Fibrocyte

1. 研究開始当初の背景
心不全は心疾患の終末像として出現する頻度の高い病態で、罹患者数は50～100

万人と言われている。心不全の原因としては高血圧性心疾患や虚血性心疾患など、いわゆる生活習慣病により発症する病態が主

要な原因である。1980年代後半からレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系やカテコラミンを標的として治療が行われるようになり、心不全患者の予後は飛躍的に向上したとは言え、十分な治療効果が出現せず、最終的には心移植を必要とする症例も未だ少なくない。高齢化社会の進行に伴い今後も罹患患者数が増加し続けることが予想されていることを考えると、心不全の新たな治療戦略の開発基盤として、発症メカニズムを解析することは重要課題である。我々は、アンジオテンシン II が有する催炎症作用の機序を検討して行く過程で、今までウイルス感染などの感染ストレス応答で必須の転写因子として知られている **Interferon regulatory factor 3 (IRF3)** が、心臓の線維化形成に重要な働きを有していることを見いだした。

2. 研究の目的

本研究では、心臓のリモデリングにおける転写因子 IRF3 の新規機能とその機序について以下の点に焦点をあて解明する事を目的とした。

- ① IRF3 がアンジオテンシン II により活性化される分子機序
- ② 心臓の間質に遊走する炎症細胞の役割
- ③ IRF3 の新規標的遺伝子の探索

3. 研究の方法

(1) IRF3 遺伝子欠損マウスを用いたアンジオテンシン II 負荷モデルの解析

- ① IRF3 欠損マウスおよびコントロールの野生型マウスに皮下埋め込み型の持続注入ポンプを用いてアンジオテンシン II の持続投与を行い、心肥大および心臓の線維化反応の比較を行った。
- ② 骨髄細胞の線維化における役割を検討するために、アンジオテンシン II 負荷マウスより採取した心臓の凍結切片を作製し、骨髄由来細胞の表面マーカーである CD45 抗原に対する免疫染色を行った。また、同時に活性型平滑筋のマーカーである平滑筋型ミオシンに対する免疫染色もおこなった。

(2) アンジオテンシン II による IRF3 の活性化機序の解析

新生児心臓線維芽細胞およびアンジオテンシン II タイプ 1 レセプターを過剰発現させた HEK293T 細胞を用いて、アンジオテンシン II 刺激を行い、IRF3 のリン酸化や二量体形成などの活性化をウェスタンブロットを用いて解析した。

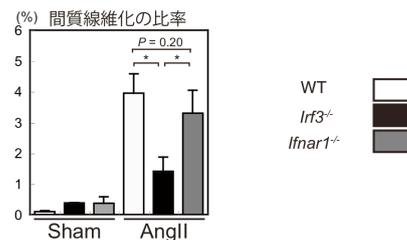
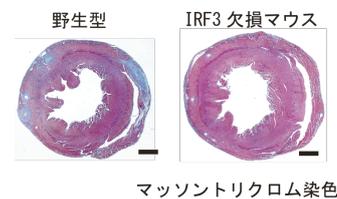
(3) アンジオテンシン II により活性化された IRF3 の新規標的遺伝子の探索

アンジオテンシン II 負荷後の心臓より RNA を採取し、マイクロアレイを用いて網羅的に遺伝子発現を解析した。

4. 研究成果

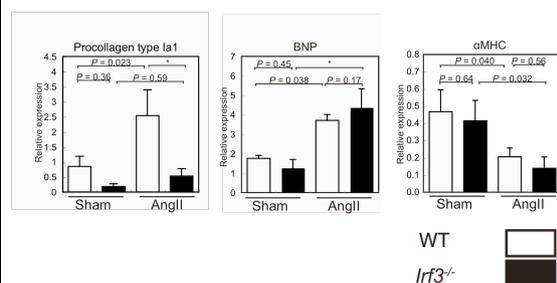
(1) アンジオテンシン II による心臓のリモデリングにおける IRF3 の働き

アンジオテンシン II による心筋の肥大には IRF3 欠損マウスと野生型マウスで差が認められなかったが、線維化反応は IRF3 欠損マウスでは著明に減弱していた。

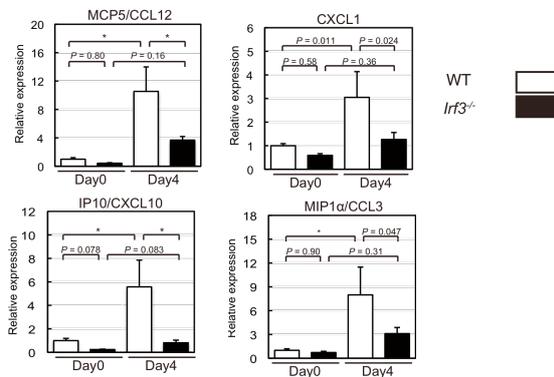


(2) アンジオテンシン II 負荷による心臓での遺伝子発現

アンジオテンシン負荷 7 日目における心臓の遺伝子発現を RT-PCR 法で検討した。線維化巣の細胞外マトリックスであるコラーゲンの産生は IRF3 欠損マウスで減少していた。また、心筋の α ミオシンや心不全のマーカーである BNP の変動に野生型と IRF3 欠損マウスの間で差は認められなかった。

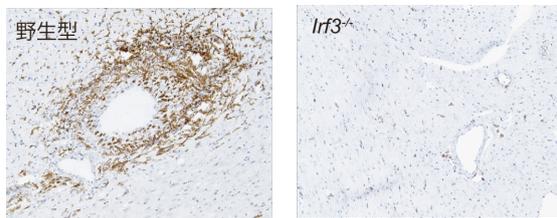


また、IRF3 の標的遺伝子として既知されている炎症性サイトカインの産生についても検討を行ったところ、CCL12をはじめ、IRF3 欠損マウスで発現が低下していた。



(3) 心臓線維化巣への骨髄由来細胞の浸潤

心臓の線維化巣への骨髄由来細胞の浸潤を評価する目的で、骨髄由来細胞の細胞表面マーカーである CD45 抗原で免疫染色をしたところ、野生型マウスの線維化巣には CD45 陽性の骨髄由来細胞浸潤が多数認められた。一方、線維化反応の減弱していた IRF3 欠損マウスでは、CD45 陽性細胞の間質への浸潤も減弱していた (図)。

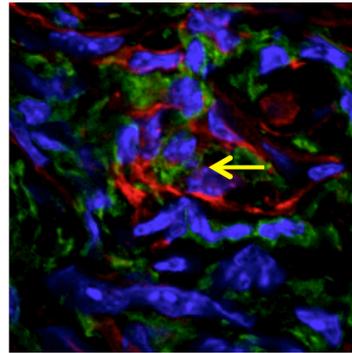


図、CD45 抗原免疫染色

心臓線維芽細胞を採取してアンジオテンシン II 刺激を行ったところ、プロコラーゲンなどの細胞外マトリックスの産生の増加は認められなかった。このことから、アンジオテンシン II による心臓でのコラーゲン産生の増加は、個々の線維芽細胞におけるコラーゲン産生が増加によるのではなく、コラーゲン産生細胞が心臓間質で増加している事が原因である可能性が考えられた。

アンジオテンシン II 負荷後の心臓において線維芽細胞のマーカーである平滑筋アクチンと CD45 抗原の二重染色をおこなったところ、一部平滑筋型アクチンと CD45 抗原を併せ持つ細胞が認められた (図、黄矢印)。骨髄由来細胞が、心臓の間質で線維芽細胞に形

質変換している可能性も示唆された。

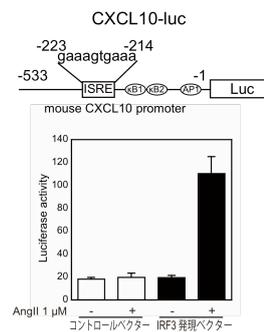


図、CD45 抗原 (緑) と平滑筋型アクチン (赤) の二重染色。細胞核: 青

IRF3 により CCL12 を始め、CXCL10、CXCL1、CCL3 などのサイトカインが制御されている。今後、アンジオテンシン II による骨髄由来線維芽細胞の遊走、分化におけるこれらのサイトカインの働きについても、各種ケモカインレセプター阻害剤等を用いて検討を行っていく予定である。

(4) アンジオテンシン II による IRF3 の活性化機序の検討

IRF3 はウイルス感染などの免疫応答の際には、TBK1 や IKK ε などのリン酸化酵素の働きによりリン酸化される事により活性化され、細胞質より核内に移行し転写を活性化することが知られていたが、アンジオテンシン II による活性化の報告はない。本研究で行った心臓線維芽細胞およびアンジオテンシン II 受容体を発現した HEK293 細胞を用いた実験から、IRF3 はアンジオテンシン II により RAS-ERK 経路を介する新規経路により活性化する事が初めて明らかとなった。



図、アンジオテンシン II による IRF3 の転写活性化反応

(5) IRF3 の新規標的遺伝子の探索

ウイルス感染などの刺激により IRF3 はインターフェロンや CXCL10 などの炎症を惹起するサイトカインの発現を制御している事が知られている。アンジオテンシン II の刺

激によっても、CXCL10 や CCL12 などのケモカインの発現は制御されており、これらのケモカインの産生が骨髄細胞の心臓間質への遊走を誘導していることが考えられた。

さらに、アンギオテンシン II 刺激独自の新規標的遺伝子を探索するために、アンギオテンシン II 負荷を行ったマウスの心臓より RNA を採取し、マイクロアレイによる網羅的解析を行った。その結果、野生型マウスでは、心臓の肥大が生じるまえの早期より、解糖系を促進する因子の遺伝子の増加が認められたが、IRF3 欠損マウスでは減弱しており、代謝のリモデリングにも IRF3 が深く関与している可能性が示唆された。

以上より、本研究により以下の事が新規に解明された。

(1) アンギオテンシン II により IRF3 が直接活性化され、そのメカニズムはウイルス感染とは異なるメカニズムであること。

(2) IRF3 は心臓での炎症性サイトカインの発現を制御しており、線維芽細胞の分化、遊走に重要な働きを有している事が示唆された。

(3) IRF3 は、アンギオテンシン II による心臓の代謝リモデリングも制御している可能性が示唆された。

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 Kensuke Tsushima, Tomoko Osawa, Hideyuki Yanai, Akira Nakajima, Akinori Takaoka, Ichiro Manabe, Yusuke Ohba, Yasushi Imai, Tadatsugu Taniguchi and Ryozo Nagai,

IRF3 regulates cardiac fibrosis but not hypertrophy in mice during angiotensin II-induced hypertension.

FASEB J. 査読有、2011 May;25(5):1531-43

[学会発表] (計 1 件)

①第 75 回 日本循環器学会総会
発表場所 京都
発表年月日 平成 22 年 3 月 5 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

都島 健介 (TSUSHIMA KENSUKE)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 50436482