

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2005 ～ 2008
 課題番号：17590773
 研究課題名（和文） 肺・気道の免疫応答における新しい Toll 様受容体関連シグナル分子の意義
 研究課題名（英文） Role of a new Toll-like receptor-related signaling molecule in immune reactions in lung and airway
 研究代表者
 今泉 忠淳（IMAIZUMI TADAATSU）
 弘前大学・大学院・医学研究科・助教
 研究者番号：90232602

研究成果の概要：Retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I) は、気道上皮細胞、血管内皮細胞、マクロファージなどの肺・気道の構成細胞で産生されること、また、ウイルスや細菌の感染により活性化されて、下流のケモカインの発現を調節することにより、肺・気道における免疫応答や炎症反応を誘導すること、が明らかになった。さらに、気道における免疫応答のみならず、関節リウマチなどの自己免疫疾患の病態にも関与していることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	1,000,000	0	1,000,000
2006 年度	1,200,000	0	1,200,000
2007 年度	700,000	210,000	910,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,400,000	360,000	3,760,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：Toll 様受容体、RIG-I、免疫応答、感染症、炎症性疾患

1. 研究開始当初の背景

感染初期に微生物を感知し迅速に対応する自然免疫は、感染に対する生体防御に重要である。この自然免疫は Toll 様受容体 (TLR) と呼ばれる一群の膜タンパク質によって外来微生物を認識することによって活性化することが明らかになってきた。

しかし、気道・肺における自然免疫の応答のメカニズムについては不明の点も少なくない。

一方、我々は、ヒト血管内皮細胞を大腸菌

の内毒素 lipopolysaccharide (LPS) や interferon- γ (IFN- γ) で処理すると、retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I) の発現が誘導され、この RIG-I が TLR3 と同様に感染ウイルスを認識して、自然免疫に関与していることを明らかにした。

したがって、RIG-I は気道・肺の自然免疫応答における key molecule の一つであることが想定された。

2. 研究の目的

この研究の目的は、(1) 気道・肺の重要な構成成分である、気道上皮細胞・マクロファージ・血管内皮細胞を培養し、TLR 群と RIG-I の発現を調べ、細胞間の発現のプロファイルを比較し、(2) そのシグナル伝達経路および下流の因子を探索し、(3) 炎症性疾患の病理標本を用いて生体内での RIG-I の発現を明らかにすることである。

3. 研究の方法

気道上皮細胞、マクロファージ、血管内皮細胞などを培養し、TLR や RIG-I のリガンド、また、tumor-necrosis factor- α (TNF- α) や IFN- γ などの炎症性サイトカインで処理し、RIG-I や下流の因子群の発現を、RT-PCR 法、ウエスタンブロット法などで調べた。また、細胞に RIG-I を過剰発現または、ノックダウンして、下流の因子群を検討した。病理標本における RIG-I の発現を免疫染色法を用いて検討した。

4. 研究成果

気道上皮細胞株 BEAS-2B を培養し、Th1 タイプサイトカインの IFN- γ を添加すると RIG-I の発現が誘導されることを見出した。更に、BEAS-2B に RIG-I を過剰発現させると、IFN- γ によるシグナリングの重要な転写因子である signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) の発現が亢進し、IFN- γ による IFN-inducible protein-10 (IP-10) の発現誘導が著明に増強されることを観察した。このことから、RIG-I が IFN- γ /STAT1 シグナリング経路の調節に重要な働きをしていることを明らかになった (Imaizumi T. ら: Eur Resp J, 2005)。

次に、抗ウイルス応答を引き起こすことが知られている合成 2 本鎖 RNA である polyinosinic-polycytidylic acid (poly IC) で培養 BEAS-2B 細胞を処理すると、IFN-inducible protein-10 (IP-10) の発現が誘導され、更に、BEAS-2B 細胞に RIG-I を過剰発現させると、この poly IC による IP-10 の発現が著明に増強されることを見出した (Taima K., Imaizumi T. ら: Respiration, 2006)。

また、気道上皮細胞や樹状細胞において、influenza A virus の感染により誘導されるサイトカインの産生に RIG-I が重要な働きをしていることが明らかになった (Siren J, Imaizumi T. ら: Microbes Infect, 2006)。

培養血管内皮細胞を poly IC で処理すると RIG-I の発現が誘導されること、また、免疫染色により Hantavirus 感染に伴ってラッ

ト脳の血管内皮細胞に RIG-I が発現することを明らかにした (Imaizumi T. ら: Endothelium, 2005)。

更に、培養血管内皮細胞を、脂質メディエーターの一つである 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ で前処理すると、LPS による RIG-I の誘導が抑制されることを見出した (Imaizumi T. ら: Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2005)。

更に、培養歯肉線維芽細胞を LPS や poly IC で処理すると RIG-I の発現が誘導され、その RIG-I は interleukin (IL) -1 β 、IL-6、IL-8 などの炎症性サイトカインの産生に関与していることを見出した (Kubota K, Sakaki T, Imaizumi T. ら: Oral Microbiol Immunol, 2006)。

炎症性サイトカインの一つである IL 8 の、C 型肝炎ウイルスによる発現誘導に、RIG-I が関与していることを見出した (Wagoner J, Austin M, Green J, Imaizumi T. ら: J Virol 2007)。

また、培養アストロサイトに poly IC を添加すると、CC chemokine ligand (CCL)5/RANTES の発現が誘導され、更に、RIG-I の発現を RNA 干渉法により抑制すると、この poly IC による CCL5/RANTES の発現が抑制されることを見出した (Yoshida Y, Imaizumi T. ら: Neurosci Res, 2007)。

次に、グラム陽性桿菌である *Listeria monocytogenes* で培養マクロファージを処理すると、RIG-I の発現が誘導されること、また、*Listeria monocytogenes* 感染に伴ってマウスの肝臓や脾臓のマクロファージに RIG-I が発現することを免疫染色により明らかにした (Imaizumi T. et al: Microbiol Immunol, 2006)。

以上から、ウイルスや細菌の感染に対する初期免疫応答に、サイトカインの発現制御を介して RIG-I が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

更に、培養皮膚表皮細胞や培養滑膜細胞を、炎症性サイトカインである TNF- α や IFN- γ で処理すると RIG-I の発現が誘導され、その RIG-I が下流のケモカインの発現を制御していること、また、皮膚の慢性炎症性疾患である尋常性乾癬の表皮、ループス腎炎の腎糸球体、動脈硬化巣のマクロファージ、関節リウマチ患者の滑膜組織などで、RIG-I の発現が亢進していることを見出した (Kitamura H. ら: J Dermatol Sci, 2007; Suzuki K. ら: Nephrol Dial Transplant, 2007; Imaizumi T. ら: J Atheroscler Thromb, 2007; Imaizumi T. ら: Clin Exp Immunol, 2008; Imaizumi T. ら: Immunol Lett, 2009)。

以上より、RIG-I はウイルスや細菌感染に対する自然免疫反応に重要な役割を果たし

ているのみならず、ループス腎炎、尋常性乾癬、関節リウマチなどの自己免疫性疾患を含めた慢性炎症性疾患の病態にも関わっていると考えられた。

RIG-I タンパク質は、細胞質においてウイルス感染に対する初期免疫応答に重要な役割を果たしているが、その機能の解明には、RIG-I タンパク質の合成のみならず分解の調節機構を明らかにする事が重要である。脱ユビキチン化酵素 CYLD が、RIG-I タンパク質のユビキチン化およびその後のプロテアソームによる分解を抑制し (Zhang M ら: *J Biol Chem*, 2008) また、RIG-I タンパク質の安定性は、シャペロンタンパク質 HSP-90 α (Matsumiya T ら: *J Immunol*, 2009) によって制御されていることが明らかになった。

以上より、ウイルスや細菌の感染に対する防御反応や自己免疫性疾患を含めた慢性炎症性疾患の病態において、RIG-I が重要な役割を果たしており、その分子機構には、タンパク質の分解系や安定性の調節が重要である事が明らかとなった。

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 20 件)

Matsumiya T, Imaizumi T, Yoshida H, Satoh K, Topham MK, Stafforini DM: The levels of retinoic acid-inducible gene-1 are regulated by heat shock protein 90- α . *J Immunol*, 182: 2717-2725, 2009. 査読有

Imaizumi T, Matsumiya T, Yoshida H, Naraoka T, Uesato R, Ishibashi Y, Ota K, Toh S, Fukuda S, Satoh K: Tumor-necrosis factor- α induces retinoic acid-inducible gene-1 in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Immunol Lett*, 122: 89-93, 2009. 査読有

Zhang M, Wu X, Lee AJ, Jin W, Chang M, Wright A, Imaizumi T, Sun SC: Regulation of I κ B kinase-related kinases and antiviral responses by tumor suppressor CYLD. *J Biol Chem*. 283: 18621-18626, 2008. 査読有

Imaizumi T, Arikawa T, Sato T, Uesato R, Matsumiya T, Yoshida H, Ueno M, Yamasaki S, Nakajima T, Hirashima M, Sakata K, Ishibashi Y, Toh S, Ohshima C, Satoh K: Involvement of retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I) in inflammation of rheumatoid fibroblast-like synoviocytes.

Clin Exp Immunol, 153: 240-244, 2008. 査読有

Yuzawa E, Imaizumi T, Matsumiya T, Yoshida H, Fukuhara R, Kimura H, Fukui A, Tanji K, Mori F, Wakabayashi K, Fujii S, Mizunuma H, Satoh K: Retinoic acid-inducible gene-1 is induced by interferon- γ and regulates CXCL11 expression in HeLa cells. *Life Sci*, 82: 670-675, 2008. 査読有

Tsugawa K, Suzuki K, Oki E, Imaizumi T, Ito E, Tanaka H: Expression of mRNA for functional molecules in urinary sediment in glomerulonephritis. *Pediatr Nephrol*, 23: 395-401, 2008. 査読有

Kim MJ, Hwang SY, Imaizumi T, Yoo JY.: Negative feedback regulation of RIG-I-mediated anti-viral signaling by interferon-induced ISG15 conjugation. *J Virol*, 82: 1474-83, 2008. 査読有

Hatakeyama M, Imaizumi T, Terasaki F, Mori F, Tanji K, Sato F, Kijima H, Suma H, Wakabayashi K, Yoshida H, Fukuda I, Satoh K: Interferon- γ upregulates retinoic acid-inducible gene-1 in human pericardial mesothelial cells. *Acta Cardiol*, 62(6): 551-555, 2007. 査読有

Suzuki K, Imaizumi T, Tsugawa K, Ito E, Tanaka H. Expression of retinoic acid-inducible gene-1 in lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 22: 2407-2409, 2007. 査読有

Yoshida H, Imaizumi T, Lee SJ, Tanji K, Sakaki H, Matsumiya T, Ishikawa A, Taima K, Yuzawa E, Mori F, Wakabayashi K, Kimura H, Satoh K: Retinoic acid-inducible gene-1 mediates RANTES/CCL5 expression in U373MG human astrocytoma cells stimulated with double-stranded RNA. *Neurosci Res*, 58: 199-206, 2007. 査読有

Imaizumi T, Yagihashi N, Kubota K, Yoshida H, Sakaki H, Yagihashi S, Kimura H, Satoh K: Expression of retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I) in macrophages: possible involvement of RIG-I in atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*, 14: 51-55, 2007. 査読有

Kitamura H, Matsuzaki Y, Kimura K, Nakano H, Imaizumi T, Satoh K, Hanada K. Cytokine modulation of retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I) expression in human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci* 45, 127-134, 2007. 査読有

Wagoner J, Austin M, Green J, Imaizumi T, Casola A, Brasier A, Khabar KS, Wakita T, Gale M Jr, Polyak SJ: Regulation of CXCL-8 (Interleukin 8) induction by dsRNA

signaling pathways during Hepatitis C virus infection. **J Virol.** 81: 309-318, 2007. 査読有

Kubota K, Sakaki H, Imaizumi T, Nakagawa H, Kusumi A, Kobayashi W, Satoh K, Kimura H: Retinoic acid-inducible gene-1 is induced in gingival fibroblasts by LPS or poly IC: possible roles in interleukin-1 β , -6 and -8 expression. **Oral Microbiol Immunol**, 21: 399-406, 2006. 査読有

Imaizumi T, Sashinami H, Mori F, Matsumiya T, Yoshida H, Nakane A, Wakabayashi K, Oyama C, Satoh K: *Listeria monocytogenes* induces the expression of retinoic acid-inducible gene-1. **Microbiol Immunol**, 50: 811-815, 2006. 査読有

Samanta M, Iwakiri D, Kanda T, Imaizumi T, Takada K: EB virus-encoded RNAs (EBERs) are recognized by RIG-1 and activate signaling to induce type I IFN. **EMBO J**, 25:4207-4214, 2006. 査読有

Siren J, Imaizumi T, Sarker D, Pietila T, Noah DL, Lin R, Hiscott J, Krug RM, Fisher PB, Julkunen I, Matikainen S. RIG-1 and *mda-5* are involved in influenza A virus-induced expression of antiviral cytokines. **Microbes Infect**, 8: 2013-2020, 2006. 査読有

Taima K, Imaizumi T, Yamashita K, Ishikawa A, Fujita T, Yoshida H, Takanashi S, Okumura K, Satoh K: Expression of IP-10/CXCL10 is upregulated by double-stranded RNA in BEAS-2B bronchial epithelial cells. **Respiration**. 73 (3): 360-364, 2006. 査読有

Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Foy E, Loo YM, Gale Jr. M, Akira S, Yonehara S, Kato A, Fujita T: Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-1, MDA5 and LGP2 in antiviral innate immunity. **J Immunol** 175: 2851-2858, 2005. 査読有

Imaizumi T, Kumagai M, Taima K, Fujita T, Yoshida H, Satoh K: Involvement of RIG-1 in IFN- γ /STAT1 signaling pathway in BEAS-2B cells. **Eur Resp J**, 25: 1077-1083, 2005. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

今泉忠淳、「関節リウマチにおける retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-1) の意義」, 弘前医学会総会、2008年6月15日、弘前市

今泉忠淳、「Double-stranded RNA induces the expression of retinoic

acid-inducible gene-1 in cultured astrocytes」, International Conference of Neuroimmunology、2006年10月18日、名古屋市

今泉忠淳、「免疫応答・炎症反応を制御する新しい因子 retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-1)」, 弘前大学遺伝子実験施設シンポジウム、2006年6月30日、弘前大学

今泉忠淳、「*Listeria monocytogenes* induces the expression of retinoic acid-inducible gene-1」, International Congress of Biochemistry and Molecular Biology、2006年6月21日、京都市

今泉忠淳、「BEAS-2B 気道上皮細胞における IFN- γ /STAT1 への RIG-1 の関与」, 日本生化学会、2005年10月20日、神戸市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今泉 忠淳

弘前大学・大学院・医学研究科・助教
研究者番号：90232602

(2) 研究分担者

吉田 秀見

弘前大学・大学院・医学研究科・講師
研究者番号：40201008

佐藤 敬

弘前大学・大学院・医学研究科・教授
研究者番号：20125438

高梨 信吾

弘前大学・大学院・医学研究科・准教授
研究者番号：10187982

亀井 克彦

千葉大学・真菌医学研究センター・教授
研究者番号：10214545

(3) 連携研究者

なし