

機関番号 : 82603

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008 年度 ~ 2010 年度

課題番号 : 20590081

研究課題名 (和文) インターフェロン制御転写因子 IRF-2 の生物学的機能

研究課題名 (英文) The Biological role for Interferon regulatory factor 2

研究代表者 益見 厚子 国立感染症研究所、血液・安全性研究部、主任研究官  
( MASUMI ATSUKO )

研究者番号 : 70165728

研究成果の概要 (和文) : 炎症や感染症によって産生されるサイトカインに応答して転写因子が上昇し、標的遺伝子が活性化され、これらが細胞内因子を調節することによって免疫制御などの生体防御機構が担われる。炎症や IFN- $\gamma$  などのサイトカインで血小板産生誘導が促進されることが知られている。IRF (interferon regulatory factor)-2 がマウス骨髄中の造血幹細胞分画に 特異的に高発現していることを見だし、IFN- $\gamma$  による CD41 発現誘導に伴う巨核球細胞誘導には IRF-2 による制御が関連していることを明らかにした。感染症や炎症による造血機能の変化において IRF-2 が重要な役割を担っているという新しい知見を得た。

研究成果の概要 (英文) : Megakaryopoiesis is associated with inflammation, and certain inflammatory cytokines stimulate hematopoietic progenitors to differentiate into megakaryocytes. Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) is an inflammatory cytokine that stimulates megakaryocyte development, and interferon regulatory factors (IRFs), IRF-1 and IRF-2 are typical transcription factors that are involved in IFN- $\gamma$  response. We investigate the role of IRFs in megakaryopoiesis. To investigate the role of IRFs in megakaryopoiesis, mouse bone marrow hematopoietic stem cells (HSCs) were prepared and stimulated with IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  treatment induced IRF-2 expression as well as CD41 although their induction levels were much lower than that of IRF-1. When IRF expression levels were studied in mouse bone marrow cell fractions, IRF-2 expression was relatively high in HSCs. An in vitro clonogenic assay showed that IRF-2 overexpressed cells increased the number of megakaryocytic colonies, but not IRF-1 overexpressed cells, suggesting that IRF-2 is involved in megakaryopoiesis. Mechanistic analysis

showed that IRF-2 transfection up-regulated CD41 promoter activity in hematopoietic cell lines through its binding to an ISRE-like site in the CD41 promoter. These findings suggest that IRF-2 plays an important role in megakaryocytic cell commitment or differentiation from hematopoietic stem cells by regulating CD41 expression in an inflammation state.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1500000	0	1500000
2009年度	1400000	0	1400000
2010年度	700000	0	700000
年度			
年度			
総計	3600000		3600000

研究分野：基盤研究（C）

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：インターフェロン制御転写因子、造血幹細胞、血液細胞分化

1. 研究開始当初の背景

抗ウイルス薬、及び抗癌剤として用いられているインターフェロン(IFN)は細胞に作用させると細胞核内で種々の遺伝子を発現誘導し、それらの遺伝子産物がタンパク質合成阻害及び、細胞増殖阻害などの効果を発揮する。IFNで発現レベルが制御される因子のうち転写因子IRFはDNA共通結合配列ISREに結合して転写を調節する。現在IRFファミリーは9種類クローニングされ、その機能の解析が進められている。その中でIRF-2はインターフェロン産生誘導を負に制御することで発見されたが、申請者は細胞増殖分化の系において正の制御因子として機能することについて研究を進めてきた。すなわちIRF-2が細胞核内でヒストンアセチル化酵素やその他の核内タンパク質と結合し複合体を形成し、転写活性促進等を介して細胞増殖機能を発揮し

ていることを明らかにしてきた。さらに最近他の研究者によってIRF-2が未分化の培養血液細胞を巨核球、血小板に分化誘導するという報告がなされた(Stellacci, E. et al. Biochem. J. 2004)。この報告はIRF-2を培養血液細胞に発現させた研究なので、さらには動物(マウス)の骨髄細胞を用いた研究を行う必要があると考えられたことから、IRF-2の血液分化へ及ぼす影響を調べるという着想に至った。動物から初代培養細胞を用いることによって、再生医療分野におけるIRF-2の機能研究にも発展し、IRFの生体機能における重要性を明らかにすることにより、さらにはIFNの疾患治療への応用研究に役立てることを目的とした。

2. 研究の目的

インターフェロン制御転写因子IRF-2はインターフェロン(IFN)の作用とIFNで誘導されるIRF-1に対して拮抗するという機能解析においてかなり進んでいる。しかしながら、ここ数年の間にIRF-2のIFN系以外での転写機構が見いだされ、H4, gpPhox91, VCAM, CIITAなどの遺伝子の上流にも作用し、細胞増殖などを制御しているという報告がされた。申請者もこれまでH4遺伝子の系を用いて細胞増殖におけるIRF-2の機能解析を転写活性と共役因子の探索ということで研究成果を示してきた(A. Masumi et al. Mol. Cell Biol. 1999, A. Masumi et al. J. Biol. Chem. 2001, A. Masumi. et al. J. Biol. Chem. 2003, and A. Masumi et al. Oncogene 2006)。IRF-2は生体において広く発現分布しており、またIRF-1と異なり半減期も長く安定で、サイトカイン刺激等による発現変動も少ないことから通常においてもなんらかの生体機能に関わっていることが示唆される。さらに最近IRF-2の血液分化に及ぼす影響に関する内容が他の研究者によって報告されたことから、IRF-2の細胞分化、特に血液細胞分化に及ぼす影響を調べることは、生体機能解析に非常に役立つと考えられる。IRFの研究はそのノックアウトマウスのphenotypeなどからもインターフェロン(IFN)応答と切り離せないため、多くの研究者はIFN応答性との関係で行っているが、別の観点からすなわちIFN反応、感染ということから全く切り離して解析することにより、IRF-2の別の機能が明らかになり、IFNの疾患治療への応用にもつながると考えられる。本研究はIRFというインターフェロン系で見いだされた因子を血液分化系関連因子としての可能性を推定し、既に知られている血液

系分化因子との相互作用を見だし、IRF-2の血液分化制御における重要性を新規に見いだすことを目的とした独創的な研究である。

### 3. 研究の方法

(1) IRF-2が血液分化にかかわる因子を遺伝子レベルで制御しているかどうかをその因子の上流の配列を検索し、IRF-2結合制御配列を見いだす。すなわちその因子の機能調節を検討するために、血液培養細胞にIRF-2を高発現させる系またはノックダウンさせる系を用いて、細胞分化誘導因子の遺伝子またはタンパク質レベルの変動を見ることによってIRF-2制御因子を推察する。推定された因子の上流の配列にIRF-2結合部位が存在するかどうかを検討し、IRF-2の転写活性上昇作用が認められることを確認する。IRF-2が制御する血液分化系因子が見いだされれば、血液前駆細胞の赤血球または巨核球への分化誘導機能に関わっているか否かを明らかにする。

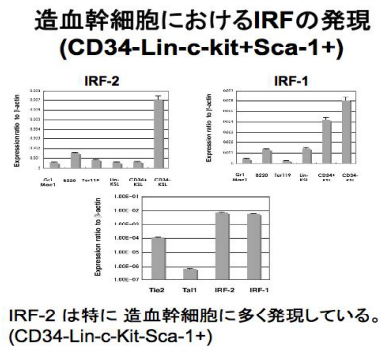
(2) また別にIRF-2が血液分化系に重要な転写因子と相互作用することを見だし、IRF-2の血液分化に及ぼす機能と重要性を明らかにする。IRF-2と相互作用する転写因子が見いだされれば、その転写因子の制御する別の因子とIRF-2との関連が解明される。これらのin vitroまたは培養細胞での結果をもとに次に実験動物のマウスの骨髄細胞等を用い、IRF-2の発現程度を調節する系(IRF-2高発現、IRF-2ノックダウン)を用いてアッセイを行い、IRF-2の生体における役割を解析し、IRF-2が生体における造血系に不可欠なタンパク質であることを証明する。IRF-2結合転写因子が見いだされたならば、それぞれ

のcDNAからDNA結合ドメイン、N末、C末の欠損した変異cDNAを作成し、これらの遺伝子にタグをつけて293T細胞に遺伝子導入し、抗体アガロースを用いたbinding assayをすることで2つのタンパク質の結合部位を明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) マウス骨髄細胞由来の造血幹細胞において IRF-1とIRF-2の発現が高いことが明らかとなった(図1)。

図1



(2) 造血幹細胞にIFN- $\gamma$  刺激を行うとCD41とともにIRF-1,2が誘導されることが確認された。レトロウイルスベクターを用いた系で骨髄造血幹細胞にIRF-1,2を高発現させ、コロニーアッセイを行ったところ、IRF-2を発現した細胞において巨核球コロニーの数がコントロールに比べ50-80% 増加した。この機構について検討したところ、IRF-2がCD41のプロモーター領域中のISRE配列を正に制御することによってCD41の発現量を調節していることが見出された(図2)。他の巨核球分化に関与するいくつかの遺伝子もIRF-2高発現によって上昇することがreal-time PCRで確認され、IRF-1およびIRF-2の変異体発現細胞ではこれらの遺伝子に変化は認められなかった(図3)。IRF-2を高発現導入し

た骨髄幹細胞をマウスに移植すると、抹消血細胞の血小板増加までは見られなかったが、骨髄細胞においてCD41発現細胞数の有意な増加が認められた。

図2

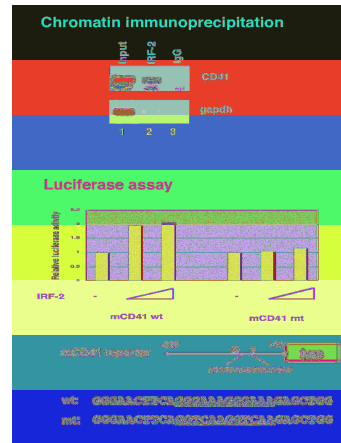
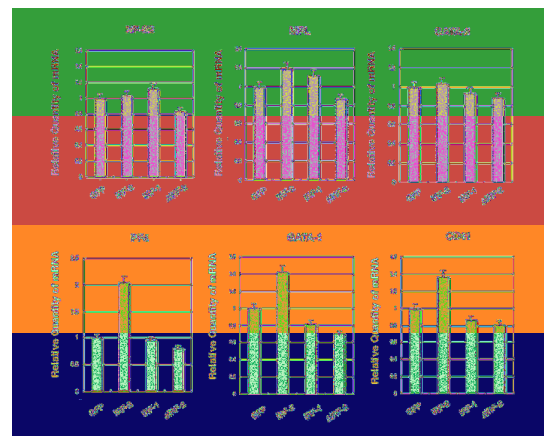
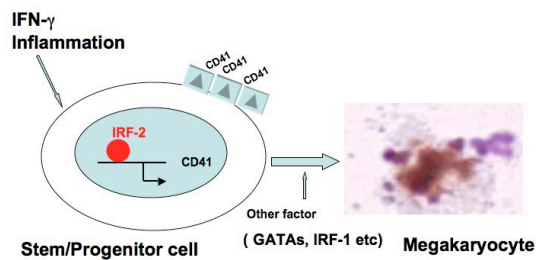


図3



(3) さらにIFN- $\gamma$  によるCD41発現誘導に伴う巨核球細胞誘導にはIRF-2による制御が関連していることが明らかになった。IRF-2は骨髄細胞の中でも造血幹細胞に特異的な発現が見られることから、他の造血系特異的因子との相互作用も示唆される。以上のことから感染症や炎症による造血機能の変化においてIRF-2が重要な役割を担っているという新しい知見を得た(図5)。以上の研究成果はFEBS Lett. (2009)で発表され、続く研究成果はBook, Hematopoietic Stem cells (In Tech社)の Chapter proposalで発表しているところである。

図 5



## 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 9 件)

- 1) Masumi A. NS5A interacting proteins and progress in anti-hepatitis C virus research. *Curr. Topics in Virology. In press* (2011)
- 2) Masumi A. Histone acetyltransferases as regulators of nonhistone proteins: The Role of Interferon Regulatory factor acetylation on gene transcription. *J.Biomed. Biotech. Review article, In press* (2011)
- 3) Masumi A. The role for Interferon regulatory factor-2 on hematopoietic stem cells in an inflammation state. *Japanese Society of Inflammation and Regeneration. Mini-review, 30, 531-535* (2010)
- 4) Ito M., Masumi A., Mochida K., Kukihara H., Moriishi K., Matsuura Y., Yamaguchi K., Mizuochi T. Peripheral B cells may serve as a reservoir for persistent hepatitis C virus infection. *J. Innate Immunity, 2, 607-617* (2010).
- 5) Fumiaki Uchiumi, Kayo Enokida, Takuma Shiraishia, Atsuko Masumi, and Sei-ichi Tanuma, Characterization of the promoter region of the human IGHMBP2 (Smbp-2) gene and its response to TPA in HL-60 cells, *Gene, 463, 8-17* (2010).
- 6) Masumi, A., Ito, M., Mochida K., Hamaguchi I., Mizukami T., Momose H., Kuramitsu M.,

Tsuruhara M., Kato A., Yamaguchi K. Enhanced RIG-I is mediated by interferon regulatory factor-2 in peripheral blood B cell from HCV-infected patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun. 391,1623-1628* (2010).

7) Masumi, A., Hamaguchi, I., Kuramitsu M., Mizukami T., Takizawa K., Momose H., Naito S., Yamaguchi K. Interferon Regulatory factor-2 induces mouse hematopoietic cell differentiation in mouse hematopoietic stem cells. *FEBS Lett. 583, 3493-3500* (2009).

8) Yamazaki J., Mizukami T., Kuramitsu M., Takizawa K., Momose H., Masumi A., Hasegawa H., Hamaguchi I., Yamaguchi K. Identification of Cancer Stem Cells in a Tax-transgenic (Tax-Tg) Mouse Model of Adult T- Cell Leukemia / lymphoma (ATL). *Blood 114, 2709-2720* (2009).

9) Kuramitsu, T., Hamaguchi, I., Mizukami T., Masumi, A., Momose, H., Takizawa, K., Mochizuki, M., Naito, S., Yamaguchi, Y. Deficient RPS19 Protein Production Induces Cell Cycle Arrest in Erythroid Progenitor Cells. *British J. Hematology. 140, 348-359* (2008).

[学会発表] (計 9 件)

1. 日本血液学会、インターフェロン制御転写因子 IRF-2 の造血系に及ぼす影響について, 2010, 10
2. FEBS meeting, The role for Interferon regulatory factor -2 on mouse megakaryopoiesis in an inflammation state, Viena, 2010, 2
3. 日本薬学会、インターフェロン制御転写因子 IRF-2 の造血系に及ぼす影響について, 2010, 3
4. 国際炎症・再生医学会、The role for Interferon regulatory factor -2 on mouse hematopoietic stem cells in an

- inflammation state、2009, 7
5. 日本生化学会、インターフェロン制御転写因子 IRF-2 の造血系に及ぼす影響について、2009, 10
  6. 日本血液学会、インターフェロン制御転写因子 IRF-2 の造血系に及ぼす影響について、2009, 10
  7. 日本分子生物学会、インターフェロン制御転写因子 IRF-2 の造血系に及ぼす影響について、2009, 12
  8. 日本血液学会、インターフェロン制御転写因子 IRF-2 の造血系に及ぼす影響について、2008, 10
  9. International Society for Interferon and Cytokine Research (ISICR), The role for Interferon regulatory factor-2 on mouse megakaryopoiesis in an inflammation state, Canada, 2008, 10

[図書] (計 1 件)

Masumi A. Interferon regulatory factor-2 regulates hematopoietic stem cell in mouse bone marrow cells. Chapter proposal. Book, Hematopoietic Stem Cells, In Tech. 2011

[その他]

ホームページ等

<http://www.nih.go.jp/niid/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

益見 厚子 (MASUMI ATSUKO)

研究者番号 : 70165728