

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月10日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390088

研究課題名（和文） 恒常性維持における炎症反応制御とその異常における
誘導型転写制御因子の機能研究課題名（英文） Function of Inducible Transcriptional Regulators in Regulation of
Inflammatory Reactions in Homeostasis and Its Dysregulation.

研究代表者

牟田 達史（MUTA TATSUSHI）

東北大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：60222337

研究成果の概要（和文）：

転写制御因子である I κ B- ζ の遺伝子欠損マウスは、目の周囲に慢性炎症を自然発症する。本研究では、この慢性炎症について解析した。その結果、このマウスの炎症は、ヒトのシェーグレン症候群に酷似した自己免疫疾患によること、この炎症の発症には、リンパ球の存在が必須であるが、リンパ球の異常が原因ではなく、上皮細胞における I κ B- ζ 遺伝子の欠損による涙腺における過剰なアポトーシスがその主要な原因であることを明らかにした。本研究成果は、シェーグレン症候群の発症機序の理解とその治療に大きく貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

I κ B- ζ gene-deficient mice spontaneously develop chronic inflammation around eyes. In this study, we analyzed the chronic inflammation of the mutant mice. We revealed that the inflammation was caused by an autoimmune disease resembling human Sjögren's syndrome, that although lymphocytes were required for the development of the inflammation, I κ B- ζ -deficiency in epithelial cells, but not abnormality of the lymphocytes was the main causes of the disease, and that enhanced apoptosis was induced in I κ B- ζ -deficient lacrimal glands, which resulted in activation of autoreactive lymphocytes. These results will greatly contribute to the understanding of pathogenic mechanism and development of therapy for Sjögren's syndrome.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：分子病態学

1. 研究開始当初の背景

全ての多細胞生物に共通して存在する自然免疫系は、獲得/適応免疫系を備えた哺乳動物でも生体防御系の発動を制御する重要な役割を果たすことが明らかになり、近年、精力的な解析が進んでいる。自然免疫系は、微生物由来成分によって活性化されるが、自己由来の内因性物質をも認識すること、さらに内因性物質による過度の刺激が種々の慢性炎症性疾患の病態に寄与することが最近注目されつつある。自然免疫活性化時には、転写因子 nuclear factor (NF)- κ B が中心的な役割を果たすことが知られているが、発生・分化、ストレス応答など多様な生命現象において活躍する多機能性の NF- κ B による、刺激に応じた選択的遺伝子発現の機構については、未だに不明な点が多い。

研究代表者らは、自然免疫系活性化の制御機構について解析を進め、自然免疫系の病原体センサー刺激時に特異的に発現誘導される新規遺伝子 I κ B- ζ を発見した。I κ B- ζ は、グラム陰性菌のリポ多糖(LPS)など、様々な微生物由来の Toll-like receptor (TLR) 刺激物質によって発現誘導されるほか、B 細胞抗原受容体刺激によっても誘導され、その発現は自己免疫疾患の抑制に必須の抑制性 Fc 受容体によって抑制される。I κ B- ζ は、他の I κ B タンパク質と同様に、C 末端側のアンキリンリピートを介して NF- κ B と結合するが、核内に局在し、NF- κ B の活性化に伴う核移行に影響しない点、これまでに知られていた I κ B ファミリータンパク質とは全く異なる新規因子である。I κ B- ζ は、典型的な NF- κ B 標的遺伝子の転写を抑制する活性を示すが、NF- κ B サブユニット p50 との相互作用を介して他の I κ B タンパク質には存在しない転写活性化活性が発揮される。さらに、遺伝子欠損マウスの解析より、この因子は、interleukin (IL)-6 などのサイトカイン・ケモカインや、転写因子 C/EBP- δ などの二次応答性の遺伝子発現誘導に必須である一方、tumor necrosis factor (TNF)- α に代表される一次応答性遺伝子群の転写を抑制するという二面性をもった炎症応答制御の鍵を握る分子であることを明らかにした。

一方、I κ B- ζ 欠損マウスは、その出生率が期待値の約 10% と低いほか、出生したマウスは SPF 環境下、生後 5-10 週齢で、アトピー性皮膚炎様の皮膚障害や、Stevens-Johnson 症候群に類似した眼瞼結膜における杯細胞の消失を伴う激しい炎症など、慢性炎症が自然発症する。この観察結果は、病原体センサーが恒常的に生体内成分に反応し、恒常性の維持に必須の役割を果たしていることを示唆している。

I κ B- ζ の発現は、LPS 等と同様に IL-1 β 刺激によって誘導されるが、一方、IL-1 β と同

様に NF- κ B や MAP kinase を活性化する炎症性サイトカインである TNF- α では誘導されない。研究代表者らは、I κ B- ζ の誘導機構について解析を進め、NF- κ B の活性化が必須であるが、十分でないこと、TNF- α 刺激の場合にも、I κ B- ζ 遺伝子の転写は活性化されているにも関わらず、mRNA/タンパク質レベルでの発現誘導が観察されないことを発見し、I κ B- ζ 誘導における転写後制御の重要性を指摘した。さらに、LPS/IL-1 β 刺激特異的に I κ B- ζ mRNA の安定化が起きることを証明し、最近、この転写後制御による刺激特異的遺伝子発現に必要十分な I κ B- ζ mRNA 内に存在するシスエレメントの同定に成功した。さらに、C/EBP 結合配列様の配列が I κ B- ζ による転写亢進の決定要因として機能すること、I κ B- ζ は、二次応答遺伝子発現に要求されるクロマチンリモデリングの誘導に必須であることを見出した。

2. 研究の目的

本研究では、恒常性維持における炎症応答制御の生理機能と、この制御機構の破綻によって生じる種々の病態の理解、さらにはその人為的制御へ向けて、炎症応答の選択的遺伝子発現制御の鍵を握る I κ B- ζ の機能を中心に解析を進める。具体的には、(I) I κ B- ζ 遺伝子欠損マウスで観察される慢性炎症や低出生率の原因を特定するとともに、(II) 各種炎症応答における I κ B- ζ 遺伝子の機能解析、(III) I κ B- ζ の特異的遺伝子発現機構の解明を行う。

3. 研究の方法

I κ B- ζ 遺伝子欠損マウスで自然発症する慢性炎症慢性炎症の原因解明

I κ B- ζ 遺伝子欠損マウスは例外なく、SPF 環境下、生後 5-10 週齢で、アトピー性皮膚炎に類似した皮膚障害と、眼瞼結膜の杯細胞の消失など、原因不明のヒトの Stevens-Johnson 症候群様の慢性炎症症状が自然発症する。一方、常在菌と接触する大腸を含めた他の臓器の病理所見には異常が認められず、単に細菌感染に伴う応答不全とは考えられない。また、STAT6 欠損マウスでもこの症状は改善されないことから、この症状はアトピー性皮膚炎とはその原因を異にする。

この慢性炎症症状の原因解明のため、以下の解析を行う。

- (1) 各種の細胞特異的染色による炎症箇所
に存在する細胞種の同定を含めた病理
解析、血液の生化学的解析を進めると
ともに、各種サイトカイン、ケモカインの
動態を DNA マイクロアレイ解析等によ
って詳細に検討する。
- (2) 既に、I κ B- ζ 欠損マウスのマクロファ
ージ及び繊維芽細胞については、その自然

免疫応答について解析を行い、前述の結果を得ているが、樹状細胞や、獲得免疫系の T 細胞、B 細胞については、未だ十分な解析を行っていない。樹状細胞の MHC や副刺激分子の発現誘導、T 細胞活性化能など、自然免疫応答時の抗原提示細胞としての機能解析を行うほか、T 細胞、B 細胞の分化・活性化能、抗体産生能について、細胞レベル、個体レベルで解析を進め、こうした細胞における I κ B- ζ の機能と炎症応答における生理機能を明らかにする。

- (3) 病態を誘導しているシグナル伝達系や細胞種を明らかにするため、現在、TLR シグナルを欠く MyD88 欠損マウス、T・B 細胞を欠く Rag2 欠損マウスの交配を行っている。得られた二重遺伝子欠損マウス及び、下記(3)で作製中の conditional knockout マウスを活用して作製する各種細胞特異的 I κ B- ζ 遺伝子欠損マウスの表現型を解析し、I κ B- ζ が恒常性維持に必須のはたらきをしている細胞種の特定制を行う。
- (4) I κ B- ζ 遺伝子欠損マウスでは、TLR 刺激に伴う血清中の TNF- α の発現上昇が観察される。従って、何らかの刺激に伴って過剰産生される TNF- α が慢性炎症の原因である可能性がある。この作業仮説を検証するため、TNF- α 欠損マウスとの交配を現在進めている。こうした解析により、炎症誘導の直接の原因となる物質を特定する。
- (5) Stevens-Johnson 症候群や癩痕性類天疱瘡(cicatricial pemphigoid)など、I κ B- ζ 欠損マウスの症状と類似したヒト慢性炎症疾患の炎症部位における I κ B- ζ の発現について、mRNA レベルとともに、既に研究代表者らが確立した抗ヒト I κ B- ζ モノクローナル抗体を用い、タンパク質レベルで検討する。

4. 研究成果

シェーグレン症候群は、目の乾燥（ドライアイ）・口の乾燥（ドライマウス）を主訴とする自己免疫疾患の一種である。その原因には不明な点が多く、国が指定する難病（特定疾患）の一つで、潜在的な患者数は、我が国で数十万人にのぼると推定されている。

研究代表者らは、細菌感染刺激に伴って発現誘導される遺伝子 I κ B- ζ を発見し、その機能解析を進めてきた。これまでに、I κ B- ζ は病原体感染応答における一群の炎症関連遺伝子の発現に必須の転写制御因子として機能することを明らかにしていたが、この遺伝子を欠損するマウスは、特定の病原体のいない環境下で、目の周囲に慢性炎症を自然発症することがわかっていた。今回、研究代表者

らは、このマウスで発症する慢性炎症の発症機序に取り組み、このマウスでは、涙腺にリンパ球の浸潤を伴う炎症があり、涙の分泌量が低下していること、血清中には自己抗体が存在することを明らかにした。自己抗体の中でも特に、シェーグレン症候群の鑑別診断に用いられる抗 SSA 抗体、抗 SSB 抗体価が上昇していることが明らかとなり、このマウスの症状は、ヒトのシェーグレン症候群に酷似していることが判明した。

この慢性炎症を引き起こす細胞種を特定すべく、細胞移植実験や遺伝子欠損マウスを用いた解析を行ったところ、この炎症の発症には、免疫応答に重要なリンパ球の存在が必須であることがわかったが、正常マウスのリンパ球を移植した I κ B- ζ 遺伝子欠損マウスでも炎症が観察され、リンパ球以外の別の細胞種の異常が原因と考えられた。各種の細胞で特異的に I κ B- ζ 遺伝子を欠損するマウスを作製して解析を進めたところ、上皮細胞においてのみ I κ B- ζ 遺伝子が欠損するマウスで炎症が発症することが判明した。マウスの涙腺について注意深く調べたところ、I κ B- ζ 遺伝子を欠損するマウスの涙腺ではアポトーシスと呼ばれる細胞死が過剰に誘導されていること、この細胞死は炎症とは無関係に誘導されることがわかった。さらに、この過剰な細胞死が炎症の原因であるのか検討するため、アポトーシスを抑制する薬剤を I κ B- ζ 遺伝子欠損マウスの目に投与したところ、炎症が抑えられ、涙の分泌量も回復することが明らかになった。つまり、涙腺上皮細胞では、I κ B- ζ がアポトーシスを抑制するはたらきをもっており、この遺伝子が欠損するとアポトーシスが過剰に誘導されること、この過剰なアポトーシスによって、自己反応性の異常なリンパ球が産生され、局所的な炎症が誘導されることが明らかになった。

本研究成果は、今なお、多くの患者さんがドライアイ、ドライマウスに苦しむシェーグレン症候群の発症機序の理解とその治療に大きく貢献すると考えられる。

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 13 件、全て査読有。主要なもののみ示す。)

- (1) Hanihara, F., Takahashi, Y., Okuma, A., Ohba, T., and Muta, T.
Transcriptional and Post-transcriptional Regulation of I κ B- ζ upon Engagement of BCR, TLR and Fc γ receptor
Int Immunol. 2013 Jun 1. [Epub ahead of print]. doi: 10.1093/intimm/dxt017

- (2) Kanari Y, Sato Y, Aoyama S, Muta T. Thioredoxin-Interacting Protein Gene Expression via MondoA Is Rapidly and Transiently Suppressed during Inflammatory Responses. PLoS One. 2013;8(3):e59026. doi: 10.1371/journal.pone.0059026. Epub 2013 Mar 8.
- (3) Okuma A, Hoshino K, Ohba T, Fukushi S, Aiba S, Akira S, Ono M, Kaisho T, Muta T. Enhanced Apoptosis by Disruption of the STAT3-I κ B- ζ Signaling Pathway in Epithelial Cells Induces Sjögren's Syndrome-like Autoimmune Disease. Immunity. 2013 Mar 21;38(3):450-60. doi: 10.1016/j.immuni.2012.11.016. Epub 2013 Feb 28.
- (4) Jung M, Weigert A, Tausendschön M, Mora J, Oren B, Sola A, Hotter G, Muta T, Brüne B. Interleukin-10-induced neutrophil gelatinase-associated lipocalin production in macrophages with consequences for tumor growth. Mol Cell Biol. 2012 Oct;32(19):3938-48. doi: 10.1128/MCB.00413-12. Epub 2012 Jul 30.
- (5) Ohba T, Ariga Y, Maruyama T, Truong NK, Inoue J, Muta T. Identification of interleukin-1 receptor-associated kinase 1 as a critical component that induces post-transcriptional activation of I κ B- ζ . FEBS J. 2012 Jan;279(2):211-22. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08416.x. Epub 2011 Nov 30.
- (6) Miyake T, Satoh T, Kato H, Matsushita K, Kumagai Y, Vandenbon A, Tani T, Muta T, Akira S, Takeuchi O. I κ B ζ is essential for natural killer cell activation in response to IL-12 and IL-18. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Oct 12;107(41):17680-5. Epub 2010 Sep 27.
- (7) Okamoto K, Iwai Y, Oh-Hora M, Yamamoto M, Morio T, Aoki K, Ohya K, Jetten AM, Akira S, Muta T, Takayanagi H. I κ B ζ regulates T_H17 development by

cooperating with ROR nuclear receptors. Nature. 2010 Apr 29;464(7293):1381-5. doi: 10.1038/nature08922. Epub 2010 Apr 11.

[学会発表](計 35 件、主要なもののみ示す。)

- (1) ○Tatsushi Muta
Roles for the nuclear I κ B family protein I κ B- ζ in inflammation. (Invited)
第 85 回日本生化学会大会(招待講演)
2012 年 12 月 14-16 日、福岡
- (2) ○Tatsushi Muta
Regulation of inflammatory gene expression by the nuclear I κ B family protein I κ B- ζ . (Invited)
The 12th Biennial International Endotoxin and Innate Immunity Society Meeting
The Homeostatic Inflammation Symposium
The 18th Japan Endotoxin and Innate Immunity Society Meeting
The 11th Japanese Biochemical Society Bio-Frontier Meeting
October 23-26, 2012, Tokyo.
- (3) ○Fumito Hanihara and Tatsushi Muta
Transcriptional and Post-transcriptional Activation of I κ B- ζ by Toll-like Receptor and B Cell Antigen Receptor. (Poster)
The 12th Biennial International Endotoxin and Innate Immunity Society Meeting
October 23-26, 2012, Tokyo.
- (4) ○Atsushi Okuma, Katsuki Hoshino, Tsuneyasu Kaisho and Tatsushi Muta
I κ B- ζ -deficient Mice Develop Sjögren's Syndrome-like Chronic Inflammation Caused by Dysregulation of Epithelial Homeostasis. (Poster)
The 12th Biennial International Endotoxin and Innate Immunity Society Meeting
October 23-26, 2012, Tokyo.
- (5) ○牟田達史
感染防御応答における多段階遺伝子発現制御機構
第 85 回日本細菌学会総会(招待講演)
2012 年 3 月 27-29 日、長崎

- (6) ○牟田達史
炎症応答における核内 IκB ファミリータンパク質 IκB-ζ の機能とその破綻
The 7th Tsukuba Hematologic Disease Seminar in Autumn, 2011 (招待講演)
2011年9月15日、つくば
- (7) Kimura, T., Watanabe, E., Hanihara, F., Ohba, T., and ○Muta, T.
Chemokine Induction in Macrophages as a Response to Necrotic Cells
Toll2011 Meeting-Decoding Innate Immunity (Poster)
Riva del Garda, Italy, May 4-7, 2011
- (8) ○Hanihara, F., Takahashi, Y., Ohba, T., and Muta, T.
Stimulus-specific
Post-transcriptional Regulation of IκB-ζ in Innate and Adaptive Immune Responses.
2010 Joint Annual Meeting between the Society for Leukocyte Biology and the International Endotoxin & Innate Immunity Society
October 6-9, 2010, Vancouver, Canada
- (9) ○Okuma, A., Ohba, T., and Muta, T.
Roles for Lymphocytes and Non-hematopoietic Cells in the Pathogenesis of Chronic Skin Inflammation in IκB-ζ-deficient Mice.
2010 Joint Annual Meeting between the Society for Leukocyte Biology and the International Endotoxin & Innate Immunity Society
October 6-9, 2010, Vancouver, BC, Canada
- (10) ○Kimura, T., Watanabe, E., Hanihara, F., Ohba, T. and Muta, T.
Chemokines Induction of Macrophages in Response to Dead Cells
14th International Congress of Immunology (Poster)
August 22-27, 2010, Kobe, Japan
- (11) ○ Okuma, A., Ohba, T., Ono, M., Shibuya, S., Aiba, S., and Muta, T.
Analysis on the Pathogenesis of Chronic Skin Inflammation that Spontaneously Develops in IκB-ζ Gene-deficient Mice
14th International Congress of Immunology (Poster)
August 22-27, 2010, Kobe, Japan
- (12) ○Hanihara, F., Takahashi, Y., Ohba, T., and Muta, T.
Stimulus-specific
Post-transcriptional Regulation of IκB-ζ, an Essential Regulator on Inflammatory Responses.
14th International Congress of Immunology (Poster)
August 22-27, 2010, Kobe, Japan
- (13) Ariga, Y., Hanihara, F., Ohba, T., and ○Muta, T.
Molecular Dissection of the MyD88-dependent Signaling that Leads to Specific mRNA Stabilization
Keystone Symposium “Innate Immunity”
June 7-12, 2010, Dublin, Ireland
- (14) ○牟田達史
自然免疫における炎症応答制御とその破綻
第33回日本血栓止血学会学術集会 (ランチョンセミナー、招待講演)
2010年4月22-24日 鹿児島
- (15) Okuma, A., Ohba, T., and ○Muta, T.
Chronic Skin Inflammation Developed in Mice Lacking IκB-ζ, a Crucial NF-κB Regulator
Keystone Symposium “NF-κB in Inflammation and Disease” (Poster)
January 5-10, 2010, Santa Fe, New Mexico, USA
- (16) ○牟田達史
誘導型転写制御因子 IκB-ζ による炎症応答制御とその破綻により自然発症する慢性炎症
第82回日本生化学会大会 シンポジウム 4S2p 「自然炎症」-病原体センサーと内因性リガンドによる非感染性炎症反応の分子基盤- (招待講演)
2009年10月21-24日、神戸
- (17) ○牟田達史
誘導型転写制御因子 IκB-ζ による炎症応答における選択的遺伝子発現機構
第8回四国免疫フォーラム (特別講演)
2009年6月27日、高松
- (18) ○牟田達史
自然免疫による感染微生物に対する認識・応答とその制御の分子機構
第32回日本血栓止血学会学術集会 (招待講演)

2009年6月4-6日、北九州

〔図書〕(計3件)

- (1) 牟田 達史 (2010) :
核内 I κ B タンパク質 I κ B- ζ を介したサイトカイン産生制御
実験医学 (増刊) 28 巻、12 号、1863-1868.
- (2) 牟田 達史 (2010) :
核内 I κ B 蛋白質 I κ B- ζ を介したサイトカイン産生制御
医学のあゆみ 234 巻、5 号、372-378.
- (3) 牟田 達史 (2010)
炎症における転写制御とその破綻
炎症と免疫 18 巻、3 号、228-233.

〔その他〕

ホームページ等

- (1) 東北大学大学院生命科学研究科牟田研究室
http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/muta_lab/
- (2) 東北大学プレスリリース
組織特異的自己免疫疾患の病因解明(上皮細胞の過剰な細胞死によってシェーグレン症候群が誘導される)
<http://www.tohoku.ac.jp/japanese/2013/03/press20130228-02.html>
- (3) 東北大学大学院生命科学研究科研究成果
http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/research_ja/14954/

報道関連情報

- (1) 共同ニュース(共同通信)
ドライアイ、涙腺の細胞死が原因 東北大、薬剤治療に道
<http://www.47news.jp/CN/201302/CN2013022801001848.html>
- (2) 日経プレスリリース
東北大など、上皮細胞の過剰な細胞死によってシェーグレン症候群が誘導されることを解明-組織特異的自己免疫疾患の病因解明-
<http://release.nikkei.co.jp/detail.cfm?relID=331799&lindID=5>
- (3) 産経デジタル
ドライアイの原因は涙腺での過剰細胞死
<http://www.zakzak.co.jp/society/dom>

estc/news/20130301/dms1303011208013-n1.htm

他多数

主要なアウトリーチ活動

- (1) 長崎県立長崎北高等学校
2011年10月13日(木) 14:40~15:50
参加者:長崎北高等学校2年生・3年生
計22名
講師:牟田 達史
演題:「自然免疫:カニからハエ、ヒトまで保存されている自己を守る仕組み」
 - (2) 長崎県立長崎西高等学校
2011年1月20日(木) 11:15~12:05
及び 12:50~13:40
参加者:長崎西高等学校2年生
計74名
講師:牟田 達史
演題:「カニからハエ、ヒトまで保存されている自己を守る仕組み」
 - (3) 仙台市立吉成中学校
2010年8月11日(水)
参加者:仙台市立吉成中学校1年生
計6名
講師:牟田 達史、川崎 智之
特別講師:河田 雅圭教授
内容:
 1. 講義「生物学の面白さと大切さ」
 2. 実験「遺伝子の切断と増幅」
 3. 体験「細胞を顕微鏡でみる」
 4. 見学「細胞から遺伝子を取り出す」
 5. 見学「分子細胞生物学の研究に使用する機器」
 6. 見学「生物進化の研究対象の生物」
 7. 体験「電子顕微鏡で生き物を見てみよう」
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
牟田 達史 (MUTA TATSUSHI)
東北大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号:60222337
 - (2) 連携研究者
大場 誠介 (OHBA TOMOYUKI)
東北大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号:80380666