

## 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 3 月 31 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21591259

研究課題名（和文）TNF- $\alpha$  誘導性細胞質 RNA 受容体を標的とする関節リウマチの治療法開発研究課題名（英文）Development of therapeutic strategies for RA targeting TNF- $\alpha$ -inducible RNA receptors in cytoplasm

研究代表者

今泉 忠淳（IMAIZUMI TADAATSU）

弘前大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：90232602

研究成果の概要（和文）：Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) と melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) は、tumor-necrosis factor (TNF)- $\alpha$  によりその発現が誘導される、細胞質に存在する RNA 受容体である。RIG-I および MDA5 は、ウイルス感染により発現が高進すること、ウイルス発現により発症の誘導や症状の増悪がおこることが知られる関節リウマチやループス腎炎などの慢性炎症性疾患において、RIG-I や MDA5 の発現が高進していること、また、RIG-I や MDA5 をノックダウンすると、炎症性サイトカインの産生が抑制されること、などが明らかになった。RIG-I と MDA5 は新たな治療の標的になりうる分子と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) and melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) are TNF- $\alpha$ -inducible RNA receptors in cytoplasm. The expression of RIG-I and MDA5 are induced by viral infection, and are increased in chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis and lupus nephritis which can be triggered or worsened by viral infections. Knockdown of RIG-I and/or MDA5 resulted in the induction of inflammatory cytokines, and RIG-I and MDA5 can be molecules which can be new therapeutic targets.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 膠原病・アレルギー内科学

キーワード：リウマチ、ループス腎炎、RIG-I、MDA5、細胞質 RNA 受容体、慢性炎症

## 1. 研究開始当初の背景

Retinoic-acid inducible gene-I (RIG-I) や melanoma differentiation associated gene 5 (MDA5) は、それらの発現が、レチノイン酸、インターフェロン (IFN)、リポポリ

サッカリドなどで誘導される因子として、白血球細胞、血管内皮細胞、皮膚表皮細胞などから同定されてきた。

RIG-I および MDA5 は、そのアミノ酸の配列から、DEXH モチーフを持つ RNA ヘリカーゼ

と考えられているが、それらの生理学的、病理学的な意義はこれまで明らかにされていなかった。

近年、RIG-I や MDA5 が、細胞質内において、二本鎖 RNA に対するパターン認識受容体として働き、自然免疫応答に重要な働きをすることが明らかにされた。すなわち、RIG-I や MDA5 は、細胞質内で二本鎖 RNA と結合することにより下流のシグナルを活性化し、IFN- $\beta$ をはじめとして、様々な機能分子の発現を制御し、その結果、自然免疫応答や、炎症反応を調節していることが明らかになってきた。

したがって、RIG-I や MDA5 は生理的な自然免疫応答や炎症反応のみならず、様々な炎症性疾患の病態に関与していることが想定される。しかし、関節リウマチをはじめとした、自己免疫性疾患や慢性炎症性疾患における RIG-I や MDA5 の意義は十分に明らかにされておらず、また、これらの分子を標的とした治療法も開発されていない。

## 2. 研究の目的

この研究の目的は、自己免疫性の慢性炎症である、関節リウマチや、その類縁疾患の病理病態における RIG-I や MDA5 などの RNA 受容体の意義を明らかにし、それらの上流に位置する発現調節シグナリング機構、また、それらが制御する下流の因子群を同定し、新たな治療法を開発するための基礎研究を行うことである。

## 3. 研究の方法

関節リウマチ患者由来の滑膜細胞、ヒトメサンギウム細胞などを培養し、tumor-necrosis factor (TNF)- $\alpha$  やその他の炎症性サイトカイン、種々のパターン認識受容体のアゴニストなどで刺激を行い、RIG-I や MDA5 の発現調節機構を解析した。その際には、RNA の解析には半定量および定量的 RT-PCR 法を、タンパク質の解析にはウェスタンブロット法や免疫染色法を用いた。

次に、RNA 干渉法を用いて RIG-I や MDA5 の発現をノックダウンし、それらの下流の因子群を同定した。

また、関節リウマチ患者の手術標本の滑膜組織、ループス腎炎患者の腎臓の生検組織などの慢性炎症性疾患の標本を用いて、RIG-I や MDA5 の免疫染色を行い、それらの臨床病理学的意義の解析を行った。

## 4. 研究成果

培養滑膜細胞や、メサンギウム細胞、腸上皮由来細胞、表皮細胞などを用いた実験により、RIG-I および MDA5 の発現は、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$  などの炎症性サイトカインや、ウイルス RNA のミミックであるポリイノシニックポリシチジリック酸、グラム陰性桿菌の内毒素の成分であるリポポリサッカリドなどで誘導されること、それらの誘導には、Toll-like receptor (TLR) 3、TLR4、IFN- $\beta$ 、転写因子の STAT-1 や Interferon regulatory factor (IRF)3、Interferon stimulated gene (ISG)56、などの因子群が関与しており、ISG56 と MDA5 はポジティブフィードバックループを形成して炎症反応を増幅すること、などが明らかになった (Imaizumi ら 2009、Kawaguchi ら 2009、Imaizumi ら 2010、Imaizumi ら 2011、Imaizumi ら 2012、Kimura ら 2012、Dempoya ら 2012)。

また、時計遺伝子の一つである、DEC2 が、これらの反応を制御していることがわかり、生活習慣やサーカディアンリズムの乱れと、疾患の関連に、これらの因子が関与していることが示唆された (Imaizumi ら 2011)。

RIG-I タンパク質の安定化には heat shock protein (HSP) 90 が関与していることがも明らかとなり、RIG-I は細胞のストレス応答にもかかわっていることがわかった (Matsumiya ら 2009)。

RNA 干渉法を用いた検討により、RIG-I や MDA5 によって引き起こされるシグナリングの下流には、IFN- $\beta$ 、CCL5(RANTES)、CXCL9(MIG)、CXCL10(IP-10)、CXCL11(I-TAC)などのサイトカインやケモカインが存在していること、またその調節には、mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) という因子の転写後調節が重要であること、などが明らかになった (Imaizumi ら 2009、Kawaguchi ら 2009、Imaizumi ら 2010、Imaizumi ら 2011、Imaizumi ら 2012、Xing ら 2012)。

免疫染色により、RIG-I や MDA5 の発現は、関節リウマチの滑膜組織、ループス腎炎の糸球体メサンギウム領域、ヘリコプターピロリ菌感染胃粘膜などで、高進していることが明らかとなった (Imaizumi ら 2009、Kawaguchi ら 2009、Imaizumi ら 2010、Tatsuta ら 2012)。

以上より、RIG-I や MDA5 などの細胞質 RNA 受容体は、関節リウマチ、ループス腎炎、慢性胃炎、炎症性腸疾患などの慢性炎症性疾患の治療法開発における、新たな標的分子となりうると考えられた。

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 20 件)

- 1) Xing F, Matsumiya T, Onomoto K, Hayakari R, Imaizumi T, Yoshida H, Yoneyama M, Fijita T, Satoh K: Foreign RNA induces the degradation of mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS): the role of intracellular antiviral factors. PLoS One, 7(9): e45136, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0045136.
- 2) Dempoya J, Matsumiya T, Imaizumi T, Hayakari R, Xing F, Yoshida H, Okumura K, Satoh K: Double-stranded RNA induces biphasic STAT1 phosphorylation by both type I IFN-dependent and type I IFN-independent pathways. J Virol 86(23): 12760-12769, 2012. doi: 10.1128/JVI.01881-12.
- 3) Imaizumi T, Aizawa-Yashiro T, Tsuruga K, Tanaka H, Matsumiya T, Yoshida H, Tatsuta T, Xing F, Hayakari R, Satoh K: Melanoma differentiation-associated gene 5 regulates the expression of a chemokine CXCL10 in human mesangial cells: implications for chronic inflammatory renal diseases. Tohoku J Exp Med, 228: 17-26, 2012. doi: 10.1620/tjem.228.17.
- 4) Tatsuta T, Imaizumi T, Shimoyama T, Sawaya M, Tanji K, Matsumiya T, Yoshida H, Satoh K, Fukuda S: Expression of melanoma differentiation associated gene 5 (MDA5) is increased in human gastric mucosa infected with *Helicobacter pylori*. J Clin Pathol, 2012; 65: 839-843. doi: 10.1136/jclinpath-2011-200590.
- 5) Kimura K, Matsuzaki Y, Nishikawa Y, Kitamura H, Akasaka E, Rokunohe D, Nakano H, Imaizumi T, Satoh K, Sawamura D.: Characterization of retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) expression corresponding to viral infection and UVB in human keratinocytes. J Dermatol Sci 2012; 66 (1): 66-70. doi: 10.1016/j.jdermsci.2012.02.006.
- 6) Tsuruga K, Watanabe S, Oki E, Aizawa-Yashiro T, Yoshida H, Imaizumi T, Ito E, Tanaka H: Imbalance towards Th1 pathway predominance in purpura nephritis with proteinuria. Pediat Nephrol, 26: 2253-2258, 2011. doi: 10.1007/s00467-011-1996-5.
- 7) Okabayashi T, Kojima T, Masaki T, Yokota SI, Imaizumi T, Tsutsumi H, Himi T, Fujii N, Sawada N: Type-III interferon, not type-I, is the predominant interferon induced by respiratory viruses in nasal epithelial cells. Virus Res. 160 (1-2): 360-366, 2011. doi: 10.1016/j.virusres.2011.07.011.
- 8) Imaizumi T, Tanaka H, Mehti N, Matsumiya T, Yoshida H, Sato F, Aizawa-Yashiro T, Tsuruga K, Hayakari R, Satoh K: Polyinosinic-polycytidylic acid induces the expression of interferon-stimulated gene 20 in mesangial cells. Nephron Exp Nephrol. 119 (2): e40-e48, 2011. doi: 10.1159/000328923.

- 9) Imaizumi T, Sato F, Tanaka H, Matsumiya T, Yoshida H, Yashiro-Aizawa T, Tsuruga K, Hayakari R, Kijima H, Satoh K: Basic-helix-loop-helix transcription factor DEC2 constitutes negative feedback loop in IFN- $\gamma$ -mediated inflammatory responses in human mesangial cells. *Immunol Lett*, 136: 37-43, 2011. doi: 10.1016/j.imlet.2010.11.009.
- 10) Imaizumi T, Tanaka H, Matsumiya T, Yoshida H, Tanji K, Tsuruga K, Oki E, Yashiro T, Ito E, Satoh K: Retinoic acid-inducible gene-I is induced by double-stranded RNA and regulates the expression of CCL5 in human mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant*, 25: 3534-3539, 2010. doi: 10.1093/ndt/gfq270.
- 11) Imaizumi T, Tanaka H, Tajima A, Yokono Y, Matsumiya T, Yoshida H, Tsuruga K, Aizawa-Yashiro T, Hayakari R, Inoue I, Ito E, Satoh K: IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  synergistically induce microRNA-155 which regulates TAB2/IP-10 expression in human mesangial cells. *Am J Nephrol* 2010; 32: 462-468. doi: 10.1159/000321365.
- 12) Tsuruga K, Oki E, Aizawa-Yashiro T, Yoshida H, Imaizumi T, Tanaka H: Potential Th1/Th2 predominance in children with newly diagnosed IgA nephropathy. *Acta Paediatr*, 99: 1584-1586, 2010. doi: 10.1111/j.1651-2227.2010.01881.x.
- 13) Imaizumi T, Tanaka H, Tajama A, Tsuruga K, Oki E, Sashinami H, Matsumiya T, Yoshida H, Inoue I, Ito E: Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) is induced by IFN- $\gamma$  in human mesangial cells in culture: possible involvement of RIG-I in the inflammation in lupus nephritis. *Lupus*, 19 (6): 830-836, 2010. doi: 10.1177/0961203309360540.
- 14) Matsumiya T, Ota K, Imaizumi T, Yoshida H, Kimura H, Satoh K: Characterization of synergistic induction of CX3CL1/Fractalkine by TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  in vascular endothelial cells: an essential role for TNF- $\alpha$  in post-transcriptional regulation of CX3CL1. *J Immunol*, 184: 4205-4214, 2010. doi: 10.4049/jimmunol.0903212.
- 15) Yoshida H, Metoki N, Ishikawa A, Imaizumi T, Matsumiya T, Tanji K, Ota K, Ohyama C, Satoh K: Edaravone improves the expression of nerve growth factor in human astrocytes subjected to hypoxia/reoxygenation. *Neurosci Res*, 66 (3): 284-289, 2010. doi: 10.1016/j.neures.2009.11.011.
- 16) Papon L, Oteiza A, Imaizumi T, Kato H, Brocchi E, Lawson TG, Akira S, Mehtani N. The viral RNA recognition sensor RIG-I is degraded during encephalomyocarditis virus (EMCV) infection. *Virology*, 393(2): 311-318, 2009. doi: 10.1016/j.virol.2009.08.009.
- 17) Matsuki K, Tamasawa N, Yamashita M, Tanabe J, Murakami H, Imaizumi T, Satoh K, Suda T: Metformin restores impaired HDL-mediated cholesterol efflux due to glycation. *Atherosclerosis*, 206(2): 434-438,

2009. doi:  
10.1016/j.atherosclerosis.2009.03.003.
- 18) Kawaguchi S, Ishiguro Y, Imaizumi T, Mori F, Matsumiya T, Yoshida H, Ota K, Sakuraba H, Yamagata K, Sato Y, Tanji K, Haga T, Wakabayashi K, Fukuda S, Satoh K: Retinoic acid-inducible gene-I is constitutively expressed and involved in IFN- $\gamma$ -stimulated CXCL9-11 production in intestinal epithelial cells. *Immunol Lett*, 123(1): 9-13, 2009. doi:  
10.1016/j.imlet.2009.01.008.
- 19) Matsumiya T, Imaizumi T, Yoshida H, Satoh K, Topham MK, Stafforini DM: The levels of retinoic acid-inducible gene-I are regulated by heat shock protein 90- $\alpha$ . *J Immunol*, 182(5): 2717-2725, 2009. doi:  
10.4049/jimmunol.0802933.
- 20) Imaizumi T, Matsumiya T, Yoshida H, Naraoka T, Uesato R, Ishibashi Y, Ota K, Toh S, Fukuda S, Satoh K: Tumor-necrosis factor- $\alpha$  induces retinoic acid-inducible gene-I in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Immunol Lett*, 122: 89-93, 2009. doi:  
10.1016/j.imlet.2008.12.005.

[学会発表] (計 5 件)

- 1) Fei XING 2 本鎖 RNA による mitochondrial antiviral signaling protein 発現調節の検討 第 96 回弘前医学会総会 2012 年 6 月 16 日 黒石市
- 2) 立田哲也 *Helicobacter pylori* 感染と胃粘膜における melanoma differentiation associated gene 5 (MDA5) の発現 第 109 回日本内科学会講演会 2012 年 4 月 13 日 京都市

- 3) 傅法谷純一 Retinoic acid-inducible gene-I 誘導は早期反応相においてインターフェロン非依存的な経路を有する 第 149 回弘前医学会例会 2012 年 1 月 27 日 弘前市
- 4) 立田哲也 *Helicobacter pylori* 感染と自然免疫 第 95 回弘前医学会総会 2011 年 6 月 18 日 十和田市
- 5) 早狩亮 ウイルスセンサー RIG-I の転写調節機構に関する研究 第 148 回弘前医学会例会 2011 年 1 月 28 日 弘前市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

今泉 忠淳 (IMAIZUMI TADAATSU)  
弘前大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・教授  
研究者番号: 90232602

### (2) 研究分担者

石黒 陽 (ISHIGURO YOU)  
弘前大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・研究員  
研究者番号: 10312498

石橋 恭之 (ISHIBASHI YASUYUKI)  
弘前大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・教授  
研究者番号: 80292142

吉田 秀見 (YOSHIDA HIDE MI)  
弘前大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・講師  
研究者番号: 40201008

松宮 朋穂 (MATSUMIYA TOMOHO)  
弘前大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・助教  
研究者番号: 30344592

佐藤 敬 (SATO KEI)  
弘前大学・事務局・学長  
研究者番号: 20125438

### (3) 連携研究者

なし

