

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461204

研究課題名(和文)メサングウム細胞の自然免疫反応におけるRNA認識受容体の意義と慢性腎臓病への関与

研究課題名(英文)Role of mesangial RNA recognition receptors in innate immunity and chronic renal diseases

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：培養メサングウム細胞において、Toll様受容体3シグナルを刺激すると、interferon (IFN)-beta / phosphorylated STAT1 / retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I) / CCL5 axis が活性化されるが、IFN-stimulated genes (ISGs) ファミリーのメンバーである、ISG56, ISG54, ISG60 はこの系を正に制御し、一方、ISG15 はこの系を負に制御する、ということを示唆した。このことは、慢性腎臓病の病態に ISGs が関与していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Innate immune reactions are important in not only in host defense but also inflammatory renal diseases. Recognition of exogenous or endogenously released RNA by Toll-like receptor 3 (TLR3) induces the expression of interferon (IFN)-beta and activates innate immune reaction and downstream inflammatory reactions in mesangial cells. IFN-beta induces hundreds of IFN-inducible genes (ISGs). We examined the role of several ISGs in TLR3 / IFN-beta / phosphorylated STAT1 / retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I) / CCL5 axis in cultured human mesangial cells, and found that ISG56, ISG54 and ISG60 positively regulates this axis, while ISG15 negatively regulates this axis. These results suggest that TLR3-mediated innate immune reactions are tightly regulated by various ISGs and dysregulation of these ISGs may cause the onset and/or worsening of chronic renal diseases.

研究分野：病態生理学

キーワード：ISG IFN RIG-I TLR3 CCL5

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病は、慢性腎不全のみならず虚血性心疾患や脳血管障害とも密接に関連することが明かにされ、その予防法・治療法の開発が望まれている。慢性腎臓病の基本病態には、慢性炎症が重要な役割を果たしており、また、その慢性炎症はウイルス感染や interferon (IFN) の過剰な発現が引き金になって悪化することが知られている。しかしながら、その病態の分子機構はいまだ解明されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、腎系球体における免疫反応に重要な役割を果たしているメサンギウム細胞に注目した。自然免疫応答は、ウイルスなどを構成する成分である pathogen-associated molecular pattern (PAMPs) や 傷害された細胞に由来する内因性の danger-associated molecular pattern (DAMPs) が、パターン認識受容体に認識されることにより開始される。そこで、本研究では、メサンギウム細胞の自然免疫応答やそれに引き続いておこる炎症反応における RNA 認識受容体である Toll 様受容体 3、retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)、melanoma-differentiation associated gene5 (MDA5) の意義を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

ヒト正常メサンギウム細胞を、Lonza 社より購入し培養した。ウイルスの二本鎖 RNA をミミックする人工合成二本鎖 RNA 試薬である ポリイノシニック・ポリシチジリック酸 (poly IC) を細胞に添加し、RIG-I・MDA5 や CCL5、CXCL10、CCL2、CXCL1 などの種々のサイトカイン類の発現誘導を、quantitative reverse transcription (RT)-PCR 法、ウエスタンブロット法、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いて調べ、細胞内情報伝達分子群の各種阻害剤・抗炎症剤や標的遺伝子に特異的な RNA 干渉法を用いて、RIG-I・MDA5 の誘導のシグナル伝達経路を調べた。また、poly IC により誘導される因子群のうち、interferon (IFN)-beta に依存する IFN-stimulated genes (ISGs) と依存しない因子群とを観察した。

次に、RNA 干渉法を用いて、RIG-I・MDA5 の発現をノックダウンし、それらの下流の遺伝子群の特定を試みた。さらに、poly IC により誘導される ISGs のうち、ISG15・ISG56・ISG54・ISG60 などについて、TLR3 / phosphorylated STAT1 / RIG-I or MDA5 / 下流因子群という axis に及ぼす影響を検討した。

また、生検標本における諸因子の発現を、免疫蛍光染色を用いて検討した。

## 4. 研究成果

培養ヒトメサンギウム細胞を培養し、TLR3 のリガンドである poly IC を添加すると、CC ケモカインの CCL2、CCL5 や、CXC ケモカインの CXCL1、CXCL10 の mRNA およびタンパク質の発現が誘導された。また、TLR4 のリガンドである Lipopolysaccharide (LPS) で処理すると、CXCL10 や CXCL8 の発現が誘導された。

Poly IC による CCL2 の発現誘導は、IFN-beta に依存せず、免疫抑制剤の一つでマクロファージの遊走を防いでループス腎炎の悪化を防ぐ作用がある mizoribine であらかじめ前処理しておくことにより、選択的に抑制されることがわかった。この結果は、mizoribine による系球体腎炎の治療効果の一部に、CCL2 の発現抑制が関与している可能性を示していると考えられた。

好中球の遊走因子で proinflammatory なケモカインである CXCL1 も、メサンギウム細胞を poly IC で処理することにより発現誘導され、その発現は IFN-beta に依存しないことが明らかになった。また、生検標本を用いた免疫蛍光染色により、CXCL1 は、ループス腎炎患者の系球体メサンギウム領域に発現していることが確かめられた。

一方、poly IC でメサンギウム細胞を処理すると、innate immunity の key molecule と考えられている IFN-beta の発現が早期に誘導され、その de novo 合成された IFN-beta がオートクラインまたはパラクラインに、細胞表面の IFN 受容体に結合し、STAT1 のリン酸化を引き起こし、そのリン酸化 STAT1 が様々な IFN-stimulated genes (ISGs) の発現を誘導することがわかった。

ケモカインのうち、CCL5 や CXCL10 は ISGs のメンバーであり、また、細胞質内 RNA 受容体・シグナル分子と考えられている RIG-I や MDA5 も ISGs のメンバーであり、同様に poly IC により発現が誘導され、IFN-beta をノックダウンすることによりその発現誘導は抑制された。また、RIG-I を RNA 干渉法によりノックダウンすると CCL5 の発現が、MDA5 をノックダウンすると CXCL10 の発現が、それぞれ抑制されることがわかった。以上より、TLR3 / IFN-beta / phosphorylated STAT1 / RIG-I / CCL5 および TLR3 / IFN-beta / phosphorylated STAT1 / MDA5 / CXCL10 という axes が存在することがわかった。また、これらの axes の反応は、細胞を炎症性サイトカインの tumor-necrosis factor-alpha (TNF-alpha) で前処理することにより、相乗的に増強した。このことは、腎系球体に慢性炎症がある状態で RNA 受容体が活性化すると、その炎症の

増悪が起こるメカニズムの一端を担っていると考えられた。

次に、ISGs のメンバーである、ISG15、ISG56、ISG54、ISG60 の発現を調べると、いずれも poly IC 処理メサンギウム細胞で発現が増強し、IFN-beta をノックダウンすることにより発現は抑制された。ISG15 の発現を RNA 干渉法により抑制すると、phosphorylated STAT1 および、RIG-I / CCL5、MDA5 / CXCL10 の発現が増強した。ISG15 はコピキチン様構造を持つタンパク質であるが、この作用は、遊離 ISG15 による作用であり、タンパク質と結合した ISG15 による作用ではないことがわかった。一方、ISG56、ISG54、ISG60 をノックダウンすると RIG-I / CCL5、MDA5 / CXCL10 の発現が抑制された。これらのことから、この系は、ISG15 により負に制御され、ISG56・ISG54・ISG60 により正に制御されることが明らかになった。

メサンギウム細胞を TLR4 のアゴニストである LPS で刺激すると、同様に RIG-I・MDA5、CXCL10 の発現が誘導され、これらの発現は IFN-beta に依存していたが、CXCL8 の発現誘導は、IFN-beta に依存していなかった。LPS による CXCL10 の発現は、RIG-I や MDA5 のノックダウンにより抑制されたが、CXCL8 の発現は抑制されなかった。

以上のことから、メサンギウム細胞において、外因性のウイルス RNA や内因性の傷害細胞由来の RNA が RNA 受容体により認識されると、IFN-beta 依存的な経路と非依存的な経路とでケモカインの産生が誘導され、炎症反応が惹起されることが考えられた。IFN-beta 依存的経路は種々の ISGs によって厳密に制御されており、それらの発現のバランスの異常がおこると、糸球体における慢性炎症につながり、慢性腎臓病の病態の悪化や、ひいては合併症の発生に関与すると考えられた。これらの系は、新しい治療法開発のターゲットとなりうる可能性が考えられた。

#### 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 5 件)

Imaizumi T, Aizawa-Yashiro T, Watanabe S, Matsumiya T, Yoshida H, Tatsuta T, Xing F, Meng P, Hayakari R, Tsuruga K, Tanaka H: TLR4 signaling induces retinoic acid-inducible gene-1 and melanoma differentiation-associated gene 5 in mesangial cells. J Nephrol, 26: 886-893, 2013. (査読有)  
Aizawa T, Imaizumi T, Tsuruga K,

Watanabe S, Chiba Y, Matsumiya T, Yoshida H, Tanaka H: Mozoribine selectively attenuates monocyte chemoattractant protein-1 production in cultured human glomerular mesangial cells: A possible benefit of its use in the treatment of lupus nephritis. Nephrology, 19(1): 47-52, 2014. (査読有)

Imaizumi T, Aizawa T, Hayakari R, Xing F, Meng P, Tsuruga K, Matsumiya T, Yoshida H, Wang L, Tatsuta T, Tanaka T. Tumor necrosis factor-alpha synergistically enhances polyinosinic-polycytidylic acid-induced toll-like receptor 3 signaling in cultured normal human mesangial cells: possible involvement in the pathogenesis of lupus nephritis. Clin Exp Nephrol, 19: 75-81, 2015. (査読有)  
Imaizumi T, Aizawa T, Segawa C, Shimada M, Tsuruga K, Kawaguchi S, Matsumiya T, Yoshida H, Joh K, Tanaka H: Toll-like receptor 3 signaling contribute to the expression of a neutrophil chemoattractant CXCL1 in human mesangial cells. Clin Exp Nephrol, 19: 761-770, 2015. (査読有)

Imaizumi T, Shimada T, Matsumiya T, Yoshida H, Tsugawa K, Watanabe S, Tsuruga K, Kawaguchi S, Murakami M, Joh K, Tanaka H: Interferon-stimulated gene 15, a type I interferon-dependent transcript, is involved in the negative feedback loop regulating inflammatory cascades via Toll-like receptor 3 activation in human mesangial cells. Nephron Experimental Nephrol, 132: 144-152, 2016. (査読有)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

今泉 忠淳 (IMAIZUMI, Tadaatsu)  
弘前大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：90232602

### (2) 研究分担者

田中 完 (TANAKA, Hiroshi)  
弘前大学・教育学部・教授  
研究者番号：50271820

島田 美智子 (SHIMADA, Michiko)  
弘前大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：40463765