

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840001

研究課題名(和文) マクロファージの炎症促進/抑制に伴う、Nrf2転写因子による状況依存的な転写制御

研究課題名(英文) Nrf2-mediated anti-inflammation through transcriptional repression of proinflammatory cytokine genes

研究代表者

小林 枝里 (H. Kobayashi, Eri)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70634971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：活性酸素種による酸化ストレスなどから細胞を保護する転写因子Nrf2は、炎症の抑制にも重要であることが知られている。私達はその分子機構を明らかにするため、炎症応答におけるNrf2標的遺伝子の同定を行った。マイクロアレイ解析およびChIP-seq解析により、Nrf2活性化マクロファージではIl6、Il1b、Il1aなどの炎症性サイトカイン遺伝子の近傍にNrf2が結合し、発現を抑制することが明らかになった。これらの結果から、従来考えられていた活性酸素種の消去による炎症制御モデルと異なり、Nrf2が炎症性サイトカイン遺伝子の発現を直接に抑制するという新規の炎症制御メカニズムが働いていることが示された。

研究成果の概要(英文)：Nrf2 is a key transcription factor that regulates oxidative/xenobiotic stress-response and prevention/resolution of inflammation. However, the mechanisms how Nrf2 prevent inflammation or how Nrf2 target genes contribute to the anti-inflammatory process are still unclear. Here we demonstrate that Nrf2 represses lipopolysaccharide-induced expression of proinflammatory cytokines, including Il6, Il1b and Il1a, which exacerbate inflammation. ChIP-seq analysis revealed that Nrf2 binds to the proximity of Il6, Il1b and Il1a genes. The Nrf2-mediated transcriptional repression of proinflammatory genes was independent from the inducers or inhibitors of reactive oxygen species accumulation. Thus, contrary to the widely accepted view that Nrf2 is an activator of transcription, our results demonstrate that Nrf2-mediated anti-inflammation is achieved through direct transcriptional repression of proinflammatory cytokine genes by Nrf2.

研究分野：分子生物学

キーワード：転写制御 炎症 ストレス応答 ChIP-seq

1. 研究開始当初の背景

炎症応答は、病原体などから生体を防御する一方で、過剰になると炎症性疾患・自己免疫性疾患などを引き起こすほか、生活習慣病などの憎悪にもつながる。そのため、炎症が適切に制御されることが私達の健康に重要である。転写因子 Nrf2 は、活性酸素種などによる酸化ストレスに対する細胞保護の中心を担う因子であり、経口投与の可能な低分子化合物を用いて活性化できることから、薬剤標的としても期待されている。Nrf2 はストレス応答のほか炎症の抑制にも働くことが知られており、近年では、Nrf2 活性化剤であるフルル酸ジメチルが多発性硬化症の治療薬として認可された。しかし、Nrf2 が炎症を抑制する詳しいメカニズムは明らかにされていない。Nrf2 標的遺伝子に多くの抗酸化遺伝子が含まれるため、これまでは、Nrf2 は活性酸素種の消去を介して炎症を抑制すると考えられてきた。その一方で、炎症の促進および抑制に重要な細胞系列であるマクロファージにおいては、スカベンジャー受容体である CD36 など抗酸化遺伝子以外の標的遺伝子も報告されており、酸化ストレス制御を介さない炎症抑制機構の存在も示唆される。そこで本研究では、マクロファージに LPS および IFN γ 刺激によって炎症促進型の遺伝子発現変化を誘導し、炎症応答特異的に発現する遺伝子群の発現に対する Nrf2 活性化の影響を検討すると共に、ChIP-seq 解析によって Nrf2 が直接に発現を制御する遺伝子を探索した。

2. 研究の目的

炎症促進型マクロファージにおける Nrf2 の標的遺伝子を同定し、Nrf2 による炎症抑制メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

Nrf2 の分解に必要な Keap1 タンパク質を骨髓球で欠損したマウスの骨髓から調製した Nrf2 活性化マクロファージを用い、マイクロアレイ解析および Nrf2 の ChIP-seq 解析を行った。

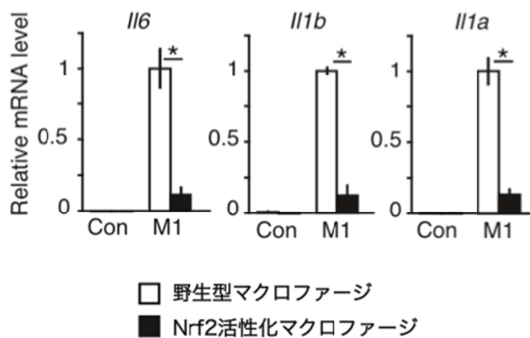
4. 研究成果

(1) Nrf2 活性化による炎症性サイトカイン遺伝子の発現抑制

マイクロアレイ解析を行ったところ、Nrf2 活性化によって LPS・IFN γ 刺激による IL-6、IL-1 β 、IL-1 α などの炎症性サイトカイン遺伝子の発現上昇が著明に抑えられた (図 1)。炎症性サイトカイン遺伝子の発現抑制は、Keap1 遺伝子欠損による Nrf2 活性化だけでなく、Nrf2 活性化剤である diethyl maleate (DEM) や 15d-PGJ $_2$ によっても確認された。また、

Nrf2 欠損マウス由来のマクロファージでは Nrf2 活性化剤による炎症性サイトカイン遺伝子の発現抑制が見られなかった。これらの結果から、炎症性サイトカイン遺伝子の発現抑制は Nrf2 に依存した現象であり、Nrf2 活性化剤の副作用や Nrf2 以外の Keap1 標的因子を介した効果ではないことが確認された。

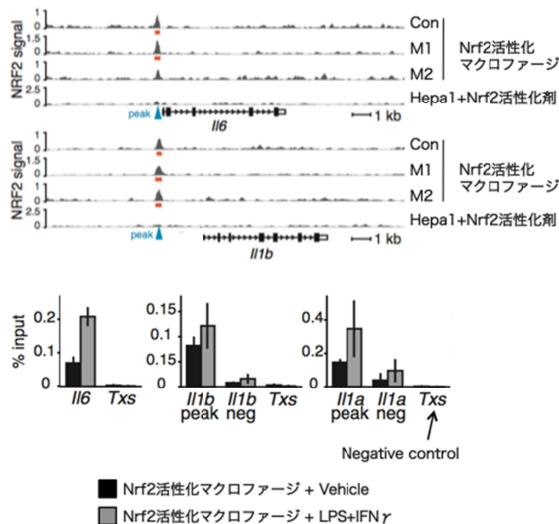
図 1 Nrf2 による炎症性サイトカイン遺伝子の発現抑制



(2) 炎症性サイトカイン遺伝子近傍への Nrf2 の結合

ChIP-seq および ChIP-qPCR 解析から、IL-6、IL-1 β 、IL-1 α などの炎症性サイトカイン遺伝子近傍に Nrf2 の結合が認められ、Nrf2 がこれらの遺伝子の発現上昇を直接的に抑制していることが示唆された (図 2)。炎症性サイトカイン遺伝子近傍への Nrf2 結合は、LPS・IFN γ 刺激の有無に関わらず検出された。また、これまでに発表された Hepa1 細胞を用いた ChIP-seq ではこれらの遺伝子近傍への Nrf2 結合は検出されておらず、マクロファージ特異的な結合であることが示唆された。

図 2 炎症性サイトカイン遺伝子近傍への Nrf2 結合

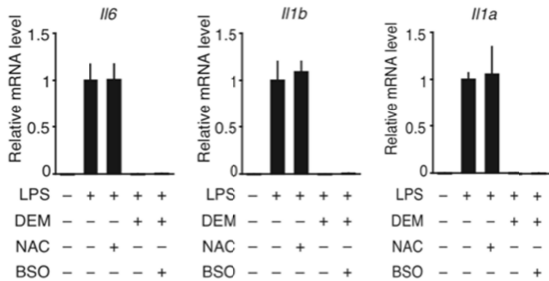


(3) Nrf2 の抗酸化作用によらない炎症抑制メカニズム

Nrf2 の既知の機能である酸化ストレス制御の影響を検討するため、炎症性サイトカイン遺伝子の発現抑制と、既知の Nrf2 標的遺伝子の発現上昇のタイミングについて検討した。Nrf2 活性化剤および LPS・IFN 刺激からの時間経過に従って遺伝子発現変化を観察した結果、既知の Nrf2 標的遺伝子群の発現が上昇し始める刺激後 3 時間の時点で、炎症性サイトカイン遺伝子の発現はすでに抑制されていた。既知の Nrf2 標的遺伝子の発現誘導による二次的な効果であれば Nrf2 活性化から発現抑制までに時間がかかることが予想されるので、この結果からも炎症性サイトカイン遺伝子の発現抑制が既知の Nrf2 標的遺伝子の発現に依存しないことが支持される。

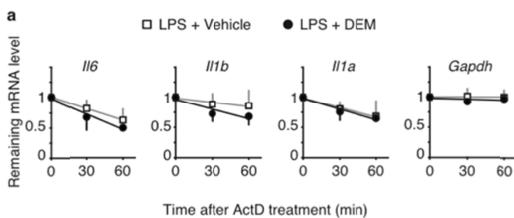
さらに、活性酸素種を減少させる NAC および活性酸素種を増加させる BSO を投与したところ、いずれも炎症性サイトカイン遺伝子の発現に大きく影響しなかったことから、Nrf2 が酸化ストレス制御とは別に炎症性サイトカイン遺伝子の発現抑制を行っていることが明らかになった (図 3)。

図3 Nrf2による炎症性サイトカイン遺伝子の転写抑制は活性酸素種の消去に依存しない



さらに、Nrf2 による転写抑制のメカニズムを検討するため、mRNA 安定性への Nrf2 活性化剤の影響を検討した。その結果、Nrf2 の活性化は炎症性サイトカイン遺伝子 mRNA の安定性に影響しないことが明らかになった (図 4)。

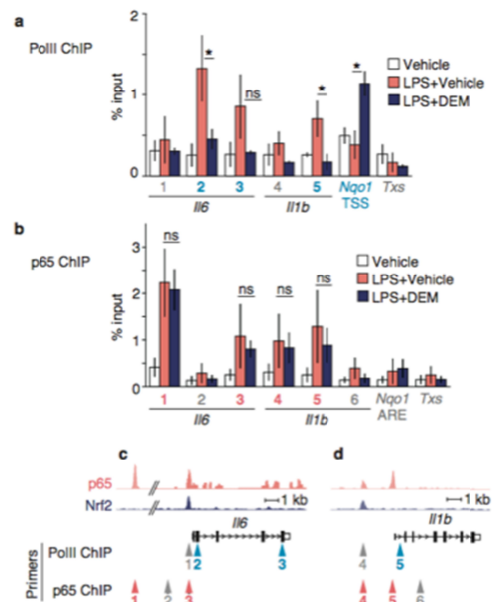
図4 Nrf2は炎症性サイトカイン遺伝子のmRNA安定性に影響しない



以上の結果から Nrf2 が炎症性サイトカイン

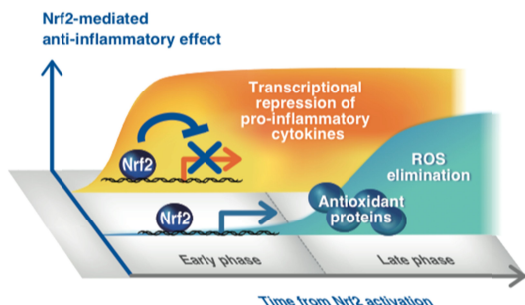
遺伝子の転写開始を阻害していることが予想されたため、DNA ポリメラーゼ II のリクルートメントが Nrf2 活性化によって影響されるかどうかを検討した。また、これらの炎症性サイトカイン遺伝子の転写開始点に DNA ポリメラーゼ II をリクルートする因子として、炎症に応答して活性化する転写因子である NF-κB が知られているため、NF-κB の構成因子である p65 の局在に着いても検討した。その結果、Nrf2 の活性化は炎症性サイトカイン遺伝子の転写開始点周辺への DNA ポリメラーゼ II のリクルートメントを阻害することが明らかになった。一方、NF-κB のリクルートメントには Nrf2 活性化の影響は見られなかった。したがって、Nrf2 は NF-κB による転写活性化機構に非依存的に、DNA ポリメラーゼ II のリクルートメントを阻害することで、炎症性サイトカイン遺伝子の転写を阻害することが明らかになった (図 5)。

図5 Nrf2は炎症性サイトカイン遺伝子制御領域へのDNAポリメラーゼIIのリクルートメントを阻害する



従来の Nrf2 による炎症制御の研究では、転写活性化因子である Nrf2 が抗酸化遺伝子群の発現を誘導することで、活性酸素種の減少などの二次的な効果によって間接的に炎症が抑制されると考えられてきた。これに対して、本研究からは Nrf2 が炎症性サイトカイン遺伝子の遺伝子近傍に結合して直接的に発現を抑制するという、新たな炎症制御機構が明らかになった。この知見は Nrf2 活性化剤を炎症性疾患の治療に適用する際の作用機序を検討する上で重要な情報になると予想される (図 6)。

図6 Nrf2は炎症性サイトカイン遺伝子の転写抑制によって炎症を抑制する



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0件)

〔学会発表〕(計4件)

Eri H. Kobayashi, Takafumi Suzuki, Ryo Funayama, Takeshi Nagashima, Keiko Nakayama, and Masayuki Yamamoto, Myeloid-specific transcriptional regulation by Nrf2, The Keap1/Nrf2 Pathway in Health and Disease, 2015年1月6-8日, ケンブリッジ (英国)

小林枝里、鈴木隆史、舟山亮、長嶋剛史、中山啓子、山本雅之、転写因子 Nrf2 による炎症性サイトカイン遺伝子の発現抑制 Nrf2-mediated transcriptional repression of inflammatory cytokine genes., 第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 15-18 日、国立京都国際会館 (京都府京都市)

小林枝里、鈴木隆史、舟山亮、長嶋剛史、中山啓子、山本雅之、ストレス応答型転写因子 Nrf2 による炎症性サイトカイン遺伝子の発現抑制、「修飾シグナル病」若手ワークショップ、2014 年 9 月 30 日-10 月 2 日、湯河原温泉「ホテル あかね」(神奈川県足柄下郡)

Eri H. Kobayashi, Takafumi Suzuki, and Masayuki Yamamoto, Myeloid-specific transcriptional regulation by Nrf2, The environmental Response IV, 2014 年 2 月 28 日-3 月 2 日、東北大学さくらホール (宮城県仙台市)

〔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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

小林 枝里 (KOBAYASHI H., Eri)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：70634971

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：