

Characterization of dsRNA-induced pancreatitis model reveals the regulatory role of IRF-2 in
trypsinogen5 gene transcription

Hideki Hayashi¹, Tomoko Kohno¹, Kiyoshi Yasui¹, Hiroyuki Murota⁴, Tohru Kimura⁵, Gordon S.
Duncan⁸, Tomoki Nakashima⁷, Kazuo Yamamoto⁸, Ichiro Katayama⁴, Yuhua Ma¹, Koon Jiew Chua¹,
Takashi Suematsu¹, Isao Shimokawa², Shizuo Akira⁶, Yoshinao Kubo¹, Tak W. Mak^{8,9} and
Toshifumi Matsuyama^{1,3,*}

PNAS(米国科学アカデミー紀要)電子版10.31版に掲載

この研究の意義

1. インターフェロンの作用を伝える因子であるインターフェロン調節因子 (IRF) の一つであるIRF2が直接に消化酵素のトリプシンの発現の調節をおこなっていることが世界で初めて明らかにされた。IRF2がない場合、トリプシンファミリーの一つであるトリプシノーゲン5の発現は1000倍以上に増加する。

このようにインターフェロン系因子が消化酵素の発現調節をおこなっていることは今まで全く知られていなかった。この研究をきっかけにインターフェロン系と消化酵素の関係についての知見が広がるかもしれない。

2. ヒトのトリプシンでも同じようなことが起こっているかは未だ不明であるが、そうなら原因不明の急性膵炎がウイルス感染によって引き起こされていることになる。

3. このマウスモデルでインターフェロンの効果を阻害することで急性膵炎の発症が抑えられた。急性膵炎の治療にインターフェロンの効果を阻害する治療が効果的になるかもしれない。

4. トリプシンは膵臓の消化酵素として知られているがわずかながら全身の組織でも発現している。インフルエンザウイルスはトリプシンによって感染性が増加することが知られている。この研究をきっかけにインフルエンザウイルスの感染の新たなメカニズムが明らかになる可能性がある。

5. この研究はグローバルCOE熱帯病・新興感染症の地球規模統合制御戦略の支援を得て林日出喜長崎大学医歯薬学総合研究科准教授らが中心となって行った。

研究の経緯と内容

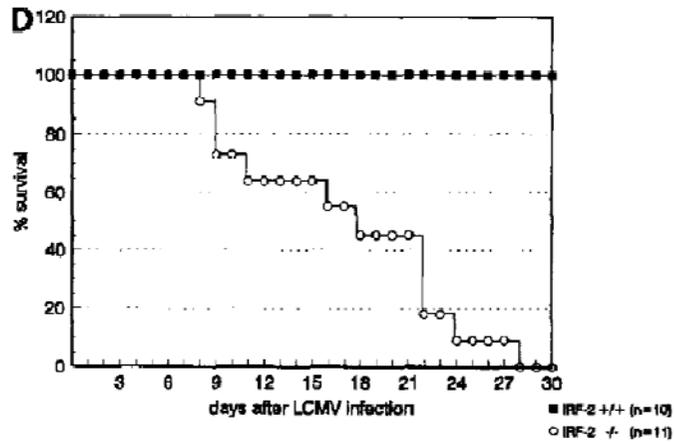
1. ウイルス感染防御、癌の抑制に重要な働きをしている因子はインターフェロンである。
2. インターフェロンそのものはウイルス感染防御や抗癌作用に直接働くものではない。
3. ウイルス感染防御や抗癌作用に直接働く分子はインターフェロンの刺激によって転写誘導されてくるものである。これはインターフェロン誘導遺伝子と呼ばれる。英語でInterferon-stimulated geneであることから短くISGと呼ばれることが多い。
4. ISGとしては1000種を越える遺伝子が知られているが、そのほとんどの作用は未だに不明のままである。
5. 代表的なISGとしてインターフェロンの刺激を伝えて別のISGを誘導するインターフェロン制御因子(Interferon regulatory factor: IRF) というものがある。
6. IRFはISGの上位に位置するISGのマスターレギュレーターである。
7. 最初に発見されたIRFはそれぞれIRF1, IRF2と名付けられたが、何れも東大医学部免疫学教室(当時は大阪大学細胞工学センター)の谷口維紹教授のグループの仕事である。
8. 現在、10個のIRFが知られている。

9. 最初にクローニングされたIRFであるIRF1, IRF2の遺伝子欠損マウスの作成は当時日本ではまだ技術が確立されていなかったためにトロント大学附属のオンタリオ癌研究所のTak W. Mak教授の元に留学していた松山に依頼された。大阪大学大学院生だった木村透君(現在大阪大学実験病理系講座准教授)が谷口教授の元からトロントに派遣されてきて一緒に作成実験を行った。

11. 1990年当時IRF1はインターフェロン産生そのもの、あるいはISGの転写誘導に必須であり、IRF2はその働きを抑える役割(抑制作用)をするとみられていた。ところがIRF1をノックアウトしてもインターフェロンが産生されたことから当時は大きな驚きをもって迎えられた。

12. 一方、木村君が中心となって作成したIRF2ノックアウトマウスは、特に大きな変化はなく、また抑制作用も見られなかった。困った木村君は当時TAK Mak研究室で行われていたウイルス感染実験を行うこととした。使ったのはリンパ球脈絡膜炎ウイルス(LCMV)弱毒株である。

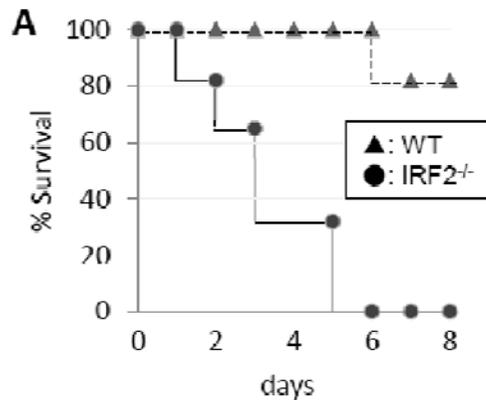
13. LCMV感染実験で野生型は全て生存しているウイルス量で全てのIRF2ノックアウトマウスは死亡した。このデータは1993年に松山が筆頭著者で出したCellの論文の中に掲載された。



14. 左図が1993年にCellに掲載されたデータ。

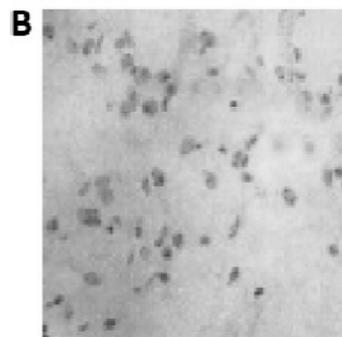
15. しかし同様のことはウイルスではなくウイルス感染様の刺激を与える合成二重鎖RNAを投与しても見られた

(左図中)。この実験により、ウイルスの感染そのものではなくウイルス感染に過剰に応答したことが原因であると判明した。

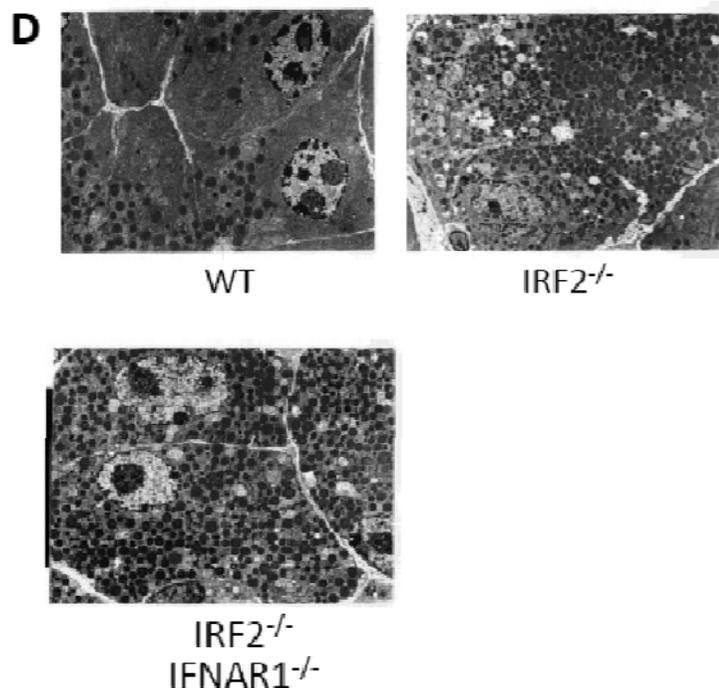


16. 死亡の原因は急性膵炎であることは明らかであった。何故なら全身の脂肪が解けて鹼化していたからである。

確かに膵臓でアポトーシスが起きていた(左図下)。



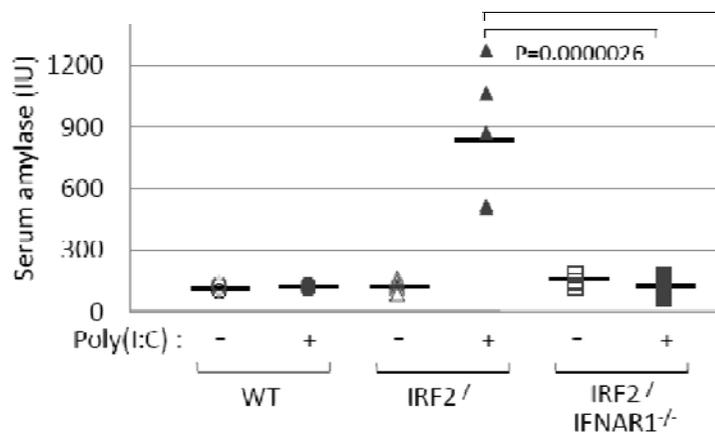
IRF2^{-/-}, poly(I:C)
TUNEL



17. 膵炎の原因の一つは膵臓外分泌細胞の異常な構造に由来するらしいことが電子顕微鏡の解析から明らかになった。(左図上)

18. 合成二重鎖RNAによる膵炎のメカニズムを探るために種々のノックアウトマウスとの交配を行って、二重の遺伝子ノックアウトマウスを作った。

そのうちのインターフェロン受容体のノックアウトマウス(インターフェロンの刺激が入らないマウス)との交配から生まれたIRF2^{-/-}-IFNAR1^{-/-}マウスは膵臓の異常な構造はそのままであったが、膵炎が起こらなくなっていた。(左図中と下)

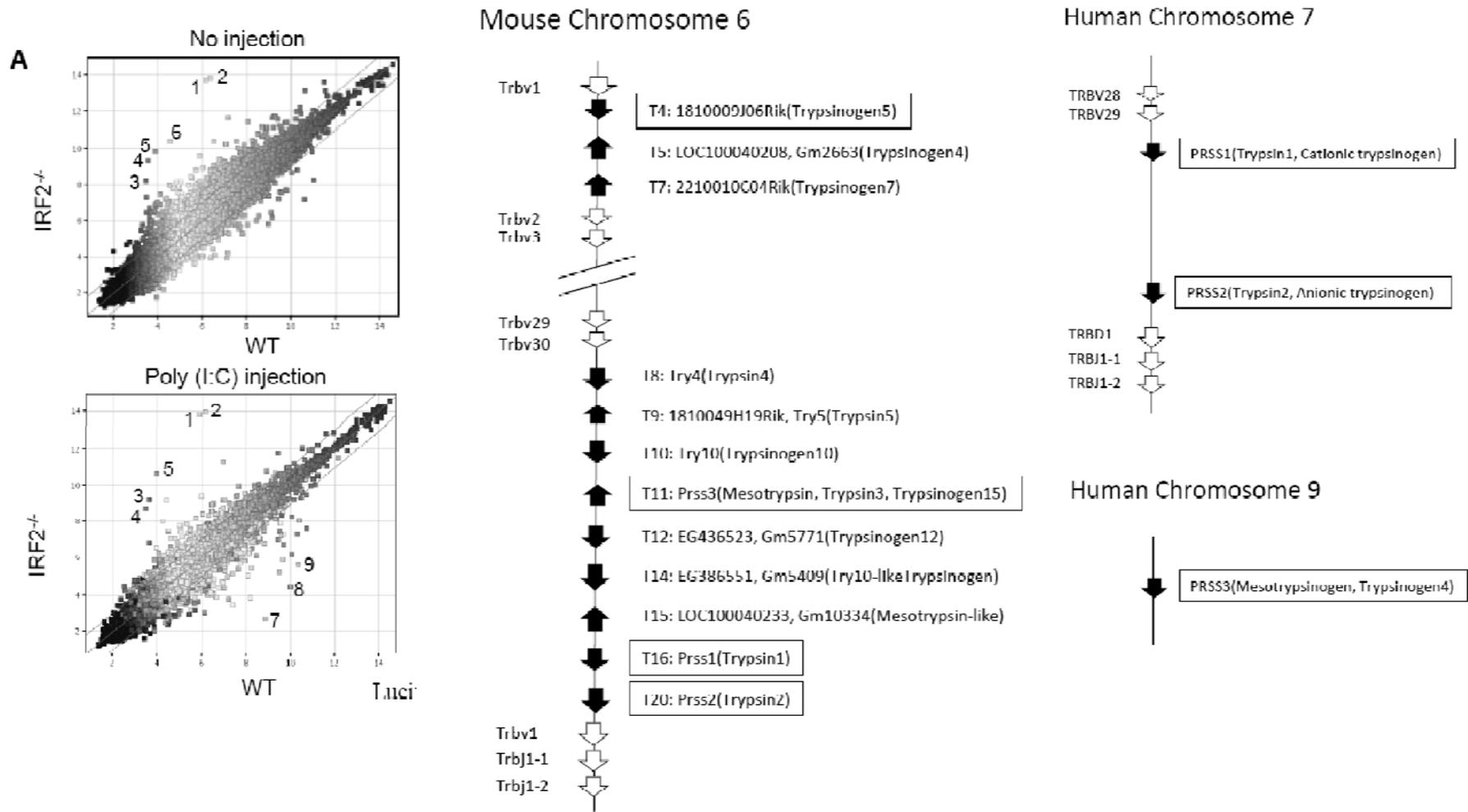


結論1.

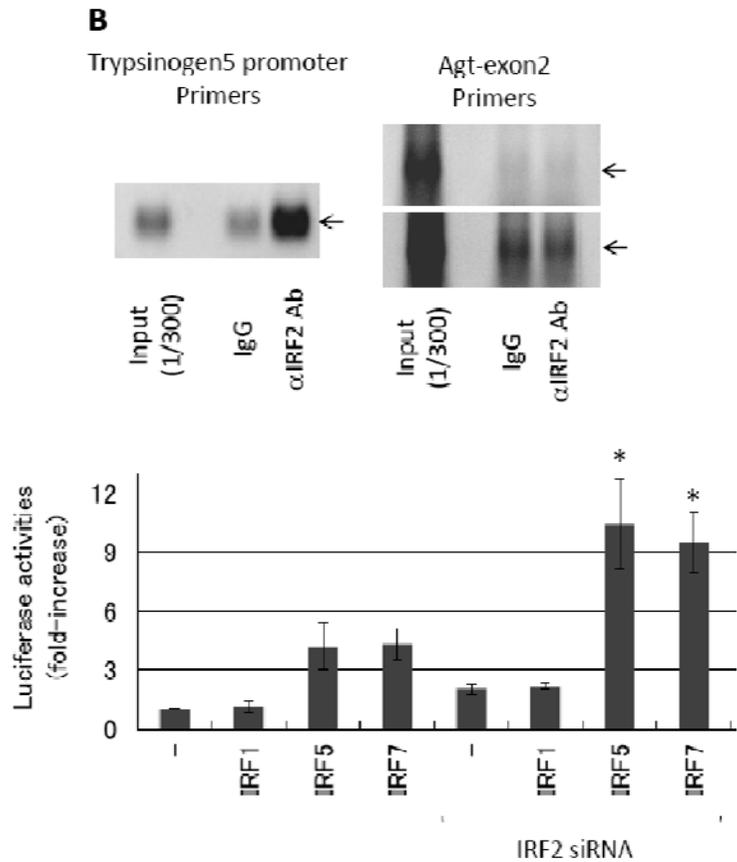
IRF2^{-/-}マウスは膵臓外分泌細胞に異常顆粒の蓄積がみられる。しかし、それはインターフェロン刺激が入らない状態でも同じであることからインターフェロンとは無関係である。

結論2.

IRF2^{-/-}でみられる合成二重鎖RNAによる膵炎はインターフェロンの刺激に依存している。

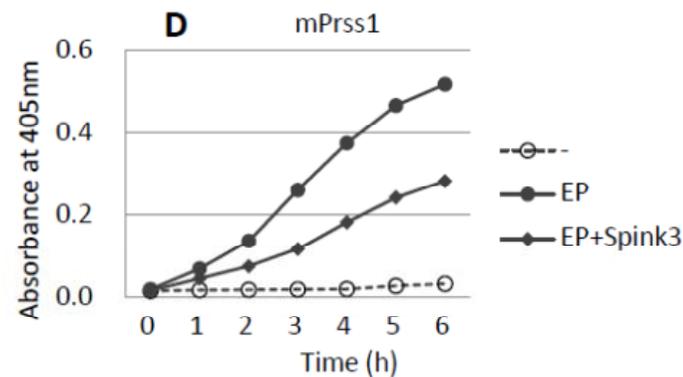
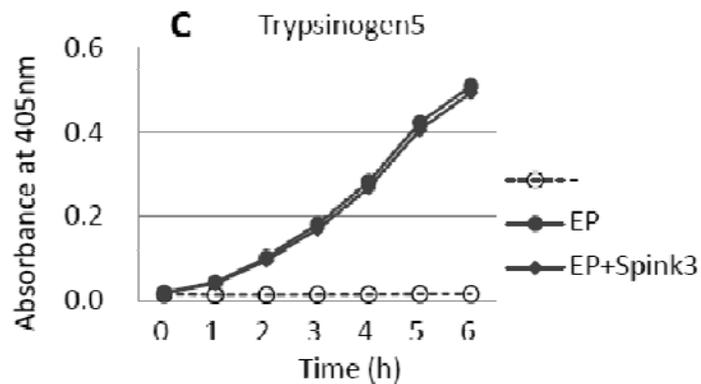


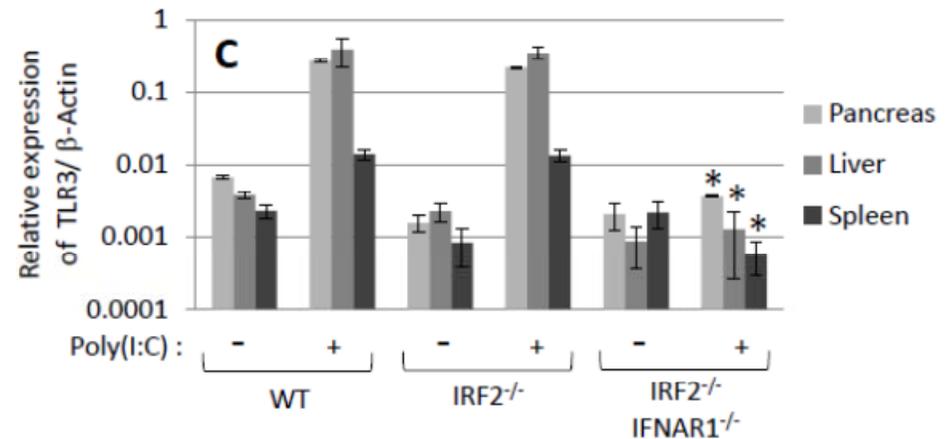
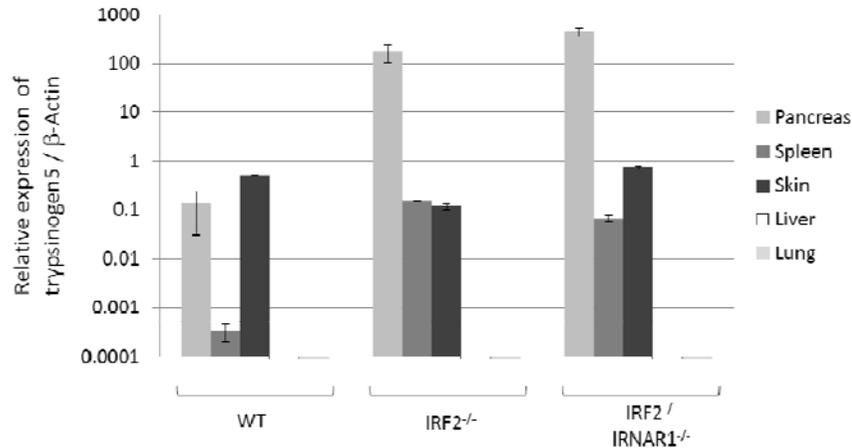
19. DNA microarrayを用いて網羅的なmRNAの発現量の解析を行った結果、IRF2KOの膵臓ではトリプシノーゲン5という膵臓消化酵素の遺伝子発現が野生型の数百倍あることが判明した(左図)。マウスはトリプシノーゲン遺伝子を20個もっており、そのうち12個が蛋白質をコードしている(中図)。ヒトでは8個あるが蛋白質をコードしているのはわずか3個(右図)。



20. IRF2はトリプシノーゲン5のプロモーターに実際に結合し(左上図)、活性化に働くIRF5,IRF7と拮抗して抑制的に働いていることが判明した(左中図)。

21. IRF2がない状態で作られるトリプシノーゲン5は、生体内でフェイルセーフとして機能しているSpink3の抑制作用が全く働かなかった(下図左)。対してmPrss1では抑制作用を示した。



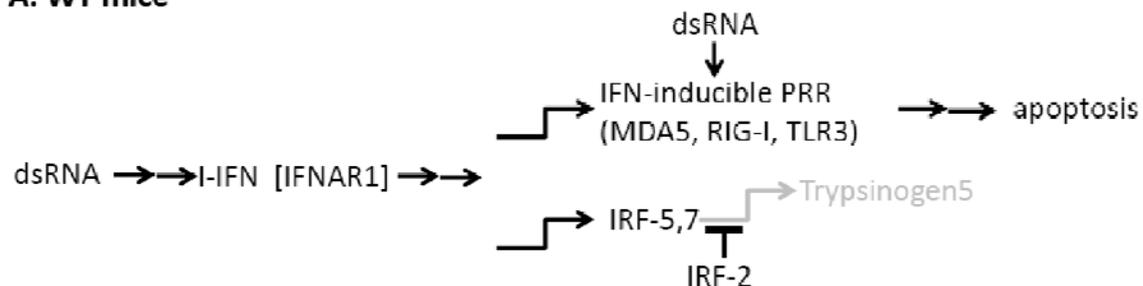


22. トリプシノーゲン5はIRF2KOによって膵臓で1000倍以上の転写が起こっていた。また脾臓でも量は膵臓の1/1000ながら野生型の100倍量転写されていた。しかしながら膵炎が誘導されないIRF2^{-/-}-IFNAR1^{-/-}においても同様であった(左図)。

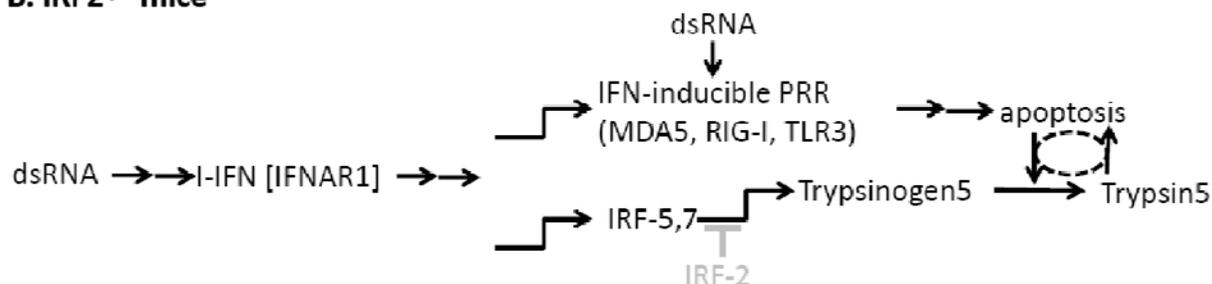
23. 膵炎が誘導されるIRF2KOと膵炎が誘導されないIRF2^{-/-}-IFNAR1^{-/-}の膵臓での遺伝子発現で最も顕著な差があったのは二重鎖RNAの受容体であるTLR3(右図)やRIG-IというISGであった。

24. それらの過剰発現だけでアポトーシスが誘導される。

A. WT mice



B. IRF2^{-/-} mice



25. 説明図

IRF2は通常代表的なISGであるIRF5, IRF7がトリプシノーゲン5遺伝子プロモーターに結合して、この遺伝子が転写されるのを防いでいる。しかしIRF2がない状態では次々にトリプシノーゲン5が転写され膵臓外分泌細胞に異常蓄積する。そこに合成二重鎖RNA、またはウイルス感染刺激が入ると外分泌細胞でその受容体らが誘導され、アポトーシスが起こる。

アポトーシスによってトリプシノーゲン5がトリプシン5になり、それがアポトーシスを引き起こすという負のスパイラルが起こり、致死性膵炎に至る。

Table 1. Expressions of relevant genes to Pancreatitis

Genes	WT	WT	IRF2^{-/-}	IRF2^{-/-}
	(-)	(poly I:C)	(-)	(poly I:C)
Prss1 (T16, Trypsin1)	11,161	13,863	10,388	13,788
Prss2 (T20, Trypsin 2)	16,041	15,661	15,857	15,494
Prss3 (T11, Trypsin 3)	1,155	1,131	3,059 ↑	2,395 ↑
Trypsinogen5 (T4, 1810009J06Rik)	70	57	13,514 ↑	14,287 ↑
Chymotrypsin C (Ctrc)	545	368	87 ↓	119 ↓
Chymotrypsinogen B1 (Ctrb1)	19,417	18,772	20,457	19,919
Amylase2-2, pancreatic (Amy2b)	19,101	18,488	17,092	18,261
Calcium-sensing receptor (Cacr)	37	37	30	26
Cystic fibrosis membrane conductance regulator (Cftr)	7	6	11	8
Cathepsin B (Ctsb)	349	443	848 ↑	794 ↑
Serine protease inhibitor, Kazal-type3 (Spink3)	4,716	3,957	7,497	7,774
Inter α-trypsin inhibitor, heavy chain4 (Itih4)	375	212	78 ↓	71 ↓
Galanin (Gal)	879	1057	213 ↓	71 ↓

The levels of gene expressions in the pancreas are shown in Affymetrix unit.