

# 熱ストレス応答による炎症の抑制機構

瀧井良祐

山口大学大学院医学系研究科医化学分野（生化学第2講座）

Molecular mechanisms of the suppression of inflammation by thermal stress

Ryosuke Takii

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Yamaguchi University Graduate

School of Medicine, Ube 755-8505, Japan

**Running title :** 熱ショック因子による炎症の抑制

**Key words :** 熱ショック応答、炎症、発熱、転写、遺伝子

図及び表の数 4

連絡先：〒755-8505 宇部市南小串1丁目1-1 山口大学大学院医学系研究科医化学分

野（生化学第2講座） 瀧井良祐

TEL; 0836-22-2215 FAX; takii@yamaguchi-u.ac.jp

## 和文抄録

熱ショック応答は、熱ショック因子 (heat shock factor、HSF) によって転写のレベルで調節され、蛋白質フォールディングを介助する熱ショック蛋白質 (heat shock protein、HSP) の誘導を特徴とし、同時に蛋白質分解を含むさまざまな機能を担う蛋白質の誘導も伴う。したがって、細胞の蛋白質ホメオスタシスの鍵となる因子である。それだけでなく、HSF は、脳、生殖器、感覚器などの個体発生と維持に重要な役割も担っている。我々の研究を含む成果から、HSP の主要な制御因子である HSF1 が免疫・炎症反応の調節に必要であることがわかった。さらに、我々は、温熱ストレスによって活性化した HSF1 が転写因子 ATF3 を発現誘導し、それらが発熱性因子である IL-6 を含む多くの炎症性遺伝子の発現を直接及び間接的に抑制すること、そしてその経路のマウス個体での重要性を明らかにした。生理的な発熱反応が、過剰な炎症反応を抑制する分子機構について議論する。

## はじめに

すべての生物は、様々な外的環境の変化に対応するための適応機構をそなえている。その中でも、温度は生物が存在する上で最も重要な環境要因の一つである。高温ストレスは、それに感受性が極めて高い蛋白質の変性や凝集を引き起こして細胞に致命的な障害を与える。それに対応するため、細胞は、熱ショック因子 (HSF) を介して一群の熱ショックタンパク質 (HSP) を転写のレベルで誘導することが古くから知られている。この応答は熱ショック応答とよばれ、誘導される HSP はタンパク質の正しいフォールディングを介助し、変性や凝集を抑制するシャペロンとして働く。その機能の減衰は、老化や蛋白質ミスフォールド病 (アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患) と密接に関連している<sup>1-3)</sup>。最近では、動物細胞の熱ショック応答が、蛋白質分解に関わる蛋白質の誘導も伴うことが分り、蛋白質ホメオスタシスに重要であることがさらに明らかとなってきた<sup>4,5)</sup>。

HSF は個体の発生や維持にも重要で、脳、生殖器、感覚器などに必須の役割を担う<sup>6-8)</sup>。私たちの研究グループは、HSF1 欠損マウスを作成し、その解析から、HSF1 が抗原刺激による IgG 産生に重要であることを見いだした<sup>9,10)</sup>。HSF1 の欠損は、免疫応答に必要な IL-6 遺伝子の誘導の減弱をまねいた。その分子機構を解析したところ、HSF1 は、刺激のない状態で IL-6 遺伝子のプロモーターに結合し、クロマチン構造を部分的に開いた状態にしていることが分った<sup>11)</sup>。その働きにより、刺激後の転写活性化因子 NF- $\kappa$ B による誘導を介助しているのである。HSF1-IL-6 経路の発見は、HSF1 が免疫反応だけでなく、炎症反応にも重要であることを示唆していた。

## 熱ストレスは ATF3 を介して IL-6 の発現を抑制する

私たちは、炎症反応全体に対して、HSF1 がどのような役割を担うかを明らかにしたいと考えた<sup>12)</sup>。初代培養のマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) は、免疫細胞と同様に、LPS (リポ多糖) 刺激によって IL-6 の発現を誘導する。この実験系で、まず、熱ストレスが LPS による IL-6 の誘導を抑制し、その効果は HSF1 を介していることを明らかにした (図 1)<sup>12)</sup>。その経路として、DNA マイクロアレイ解析から、熱ストレスで誘導される ATF3 (Activating transcription actor 3) に着目した。ATF3 は、cAMP 応答配列 (CRE) 結合蛋白質群に属する転写因子で、IL-6 や IL-12 の発現を抑制することが知られている。ATF3 の熱ストレスによる発現誘導は、HSF1 によるものであることが明らかとなった (図 2)。さらに、発熱レベルの熱ストレス (40°C) と LPS 刺激が、相乗的に ATF3 の発現を誘導することも分り、この誘導が生理的に重要であることが強く示唆された。そこで、ATF3 欠損細胞を用いて熱ストレス後の LPS 誘導性の IL-6 の発現量を調べた。その結果、ATF3 欠損細胞では、熱ストレスによる LPS 誘導性 IL-6 発現量の抑制を全く認めなかった (図 3)<sup>12)</sup>。つまり、HSF1-ATF3 経路が熱ストレスによる IL-6 誘導を抑制していることが明らかとなった。

## HSF1-ATF3 経路による炎症性遺伝子発現の抑制

炎症性遺伝子全般の発現調節における熱ストレスの影響を知るために、まずは、MEF細胞のDNAマイクロアレイ解析を行った<sup>12)</sup>。LPS刺激によって3倍以上に発現が上昇した100の炎症性遺伝子のうち86%の遺伝子が熱によって発現が半分以下に低下した。さらに、LPSによる発現誘導と、熱ストレスによる発現抑制の顕著な24遺伝子に絞って解析を進めた。その結果、16(67%)の遺伝子の発現がATF3依存的に熱ストレスで抑制された。つまり、IL-6と同様に多くの炎症性遺伝子がHSF1-ATF3経路で発現制御をうけていることが示された。一方、TNF $\alpha$ やIL-1 $\beta$ を含む8(33%)の遺伝子は、ATF3非依存的な発現抑制を示した。すでにTNF $\alpha$ やIL-1 $\beta$ の発現制御機構で知られているのと同様に、HSF1はこれらの遺伝子に直接結合して発現を抑制することが示唆される<sup>13,14)</sup>。

私たちは、以前の報告で、HSF1がIL-6プロモーターに構成的に結合することでクロマチンを開いた状態に保ち、他の転写因子による制御を受けやすくすることを明らかにしている<sup>11)</sup>。今回、ATF3で発現が抑制されるNOS2とICAM1においても、IL-6同様にHSF1が構成的にプロモーターに結合し、クロマチン構造を開いていることを明らかにした。つまり、通常はHSF1が遺伝子プロモーターに結合することでクロマチンを開いた状態に保ち、熱ストレスでHSF1が活性化されると、HSF1によって誘導されたATF3が効率よくプロモーターへ結合し発現を抑制する。この機構は、フィードフォワード制御(feed-forward regulation)として知られている転写因子ネットワークによる転写調節機構の1つである<sup>15)</sup>。この機構を用いることで、HSF1は、一群の炎症性遺伝子の発現調節を行うことができると考えられる。

### HSF1-ATF3を介する発熱・炎症反応のフィードバック制御

個体では、炎症反応に伴って発熱反応が引き起こされる。そこで、生体内においてもHSF1-ATF3経路が重要な役割を担っていることを調べるために、HSF1およびATF3ノックアウトマウスを用いLPS投与後の体温の変化を観察した。その結果、野生型に比べ、HSF1およびATF3ノックアウトマウスでは有為な体温の上昇と発熱性因子IL-6の産生量の増加を示した。つまり、HSF1およびATF3が、マウス個体においてもLPS投与後のIL-6を介する発熱反応の負の制御因子であることを示している。さらに、IL-6ノックアウトマウスを用いた結果から、発熱性因子IL-6遺伝子の欠損によってHSF1とATF3の活性化が減弱することが明らかとなった。これらの結果は、炎症に伴う発熱が十分でないと、炎症のフィードバック機構が十分に働かないことを示している。

### まとめ

これまで温熱ストレスによる炎症性遺伝子の発現抑制機構について、いくつかの独立した抑制機構が示されていた。私たちのHSF1を中心とする一連の解析により、炎症反応におけるHSF1を介するフィードバック機構の全体像が明らかとなった(図4)<sup>12)</sup>。炎症初期の発熱性因子IL-6の発現は、発熱をひき起すが、それはHSF1を活性化する。活性化を受けたHSF1は、直接遺伝子プロモーターへ結合して発現を抑制する(TNF $\alpha$ やIL-1 $\beta$ )。一方、ATF3の誘導を介して別の一群の炎症性遺伝子(IL-6、NOS2、ICAM1)の発現も抑制する。一連の遺伝子発現の負の制御は、炎症を抑制するだけでなく、発熱性因子IL-6の発現そのものを抑制して発熱反応のフィードバックループを形成している。

本稿では炎症時における生体の発熱反応の意義に注目し、HSF1-ATF3経路が生体における発熱の負の制御経路として働くこと、さらに、HSF1、ATF3が多くの炎症性遺伝子の発現抑制を行うことを明らかにした。発熱反応は、感染症などの予後と関連しており、生体防御に重要であることが知られている。しかし、それに伴う過度の炎症は、個体や組織に有害でもある。熱ショック応答の機構は、蛋白質ホメオスタシスに加え、この炎症反応の抑制に重要な役割を担うことが明らかとなった。

### 謝辞

本研究を行うにあたり、終始適切なお助言をいただきました山口大学大学院医学系研究科医化学分野の中井彰教授に感謝いたします。また、初期の研究の道筋をつけていただきました井上幸江講師(現安田女子大学薬学部教授)、多くのお助言をいただきました藤本充章

講師、林田直樹講師、ならびに多数の共同研究者の方々に心より感謝いたします。さらに、中村賞という名誉ある賞をいただき、また本誌掲載の機会をお与えいただいた山口大学医学会の皆様へ深く御礼申し上げます。

引用文献

1. Morimoto R. I. Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes & Dev.* 2008 ; **22** : 1427-1438.
2. Fujimoto M., and Nakai. A. The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress. *FEBS J.* 2010 ; **227** : 4112-4125.
3. 藤本充章, 中井彰 熱ストレス応答による恒常性維持の機構 生化学 2009 ; 81 : 465-473.
4. Hayashida N, Fujimoto M., Tan K., Prakasam R., Shinkawa T., Li L., Ichikawa H., Takii R, and Nakai A. Heat shock factor 1 ameliorates proteotoxicity in cooperation with the transcription factor NFAT. *EMBO J.* 2010 ; **29** : 3459-3469.
5. Hayashida N., Fujimoto M., and Nakai A. Transcription factor cooperativity with heat shock factor 1. *Transcription* 2011 ; 2 : 91-94.
6. Abane R., and Mezger V. Roles of heat shock factors in gametogenesis and development. *FEBS J.* 2010 ; **277** : 4150-4172.
7. Nakai A. Heat shock transcription factors and sensory placode development. *BMB reports.* 2009 ; **42** : 631-635.
8. 中井 彰, 藤本充章, 井上幸江 熱ショック転写因子 HSF と高次生命現象 実験医学 2007 ; **25** : 1547-1553.
9. Inouye, S., Katsuki, K., Izu, H., Fujimoto, M., Sugahara, K., Yamada, S., Shinkai, Y., Oka, Y., Katoh, Y., and Nakai A. Activation of Heat Shock Genes Is Not Necessary for Protection by Heat Shock Transcription Factor 1 against Cell Death Due to a Single Exposure to High Temperatures. *Mol. Cell. Biol.* 2003 ; **23** : 5882-5895.
10. Inouye, S., Izu, H., Takaki, E., Suzuki, H., Shirai, M., Yokota Y., Ichikawa, H., Fujimoto, M. and Nakai. A. Impaired IgG production in mice deficient for heat shock transcription factor 1. *J. Biol. Chem.* 2004 ; **279** : 38701-38709.
11. Inouye, S., Fujimoto, M., Nakamura, T., Takaki E., Hayashida, N., Hai, T., and Nakai. A. Heat shock transcription factor 1 opens chromatin structure of interleukin-6 promoter to facilitate binding of an activator or a repressor. *J. Biol. Chem.* 2007 ; **282** : 33210-33217.
12. Takii, R., Inouye, S., Fujimoto, M., Nakamura, T., Shinkawa, T., Prakasam, R., Tan, K., Hayashida, N., Ichikawa, H., Hai, T. and Nakai, A. Heat Shock Transcription Factor 1 Inhibits Expression of IL-6 through Activating Transcription Factor 3. *J. Immunol.* 2010 ; **184** : 1041-1048
13. Singh, I.S., He, J.R. Calderwood, S. and Hasday, J.D. A high affinity HSF-1 binding site in the 5'-untranslated region of the murine tumor necrosis factor- $\alpha$  gene is a

- transcriptional repressor. *J. Biol. Chem.* 2002 ; **277** : 4981-4988.
14. Xie, Y., Chen C., Stevenson M.A., Auron P.E., and Calderwood S.K. Heat shock factor 1 represses transcription of the IL-1 $\beta$  gene through physical interaction with the nuclear factor of interleukin 6. *J. Biol. Chem.* 2002 ; **277** : 11802-11810.
  15. MacQuarrie K. L., Fong A. P., Morse R. H., and Tapscott S. J. Genome-wide transcription factor binding: beyond direct target regulation. *Trends Genet.* 2011 ; **27** : 141-148.

## **Summary**

Febrile response is a complex physiological reaction to disease including a cytokine-mediated rise in body temperature and activation of inflammatory systems. Fever has beneficial roles in terms of disease prognosis, partly by suppressing expression of inflammatory cytokines. However, the molecular mechanisms underlining fever-mediated suppression of inflammatory gene expression have not been clarified. We showed that heat shock suppresses lipopolysaccharide (LPS)-induced induction of interleukin-6 (IL-6), a major pyrogenic cytokine, in mouse embryo fibroblasts and macrophages. Heat shock transcription factor 1 (HSF1) activated by heat shock induced activating transcription factor 3 (ATF3), a negative regulator of IL-6, and ATF3 was necessary for heat-mediated suppression of IL-6, indicating a fever-mediated feedback loop consisting of HSF1 and ATF3. When HSF1-null and ATF3-null mice were injected with LPS, they expressed much higher levels of IL-6 than wild-type mice, resulting in an exaggerated febrile response. These results demonstrate a feedback mechanism of the inhibition of inflammatory and febrile response.

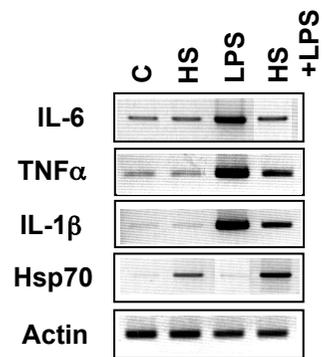


図1 温熱ストレスによるLPS誘導性の炎症性遺伝子の抑制  
MEF細胞を、42°C 1時間、LPS 6時間、42°C 1時間後37°CにおいてLPS 6時間処理した後のIL-6、TNF- $\alpha$ 、IL- $\beta$ のmRNA発現量の変化。熱は、LPS誘導性の炎症関連遺伝子の発現を抑制する。

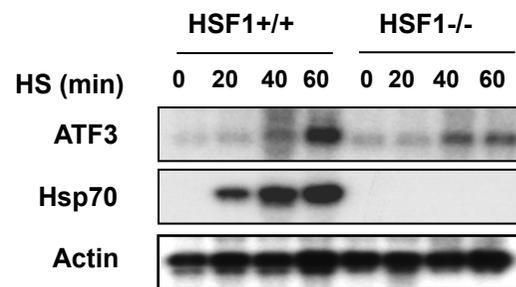
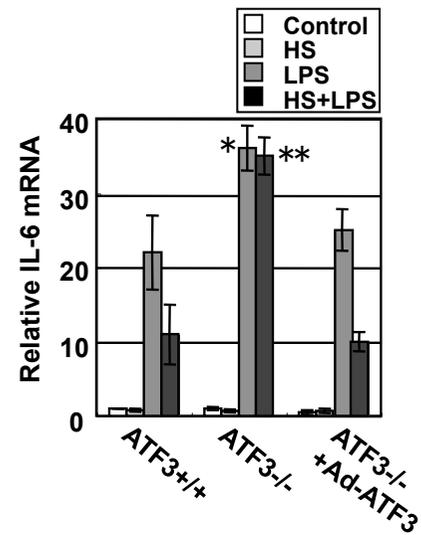


図2 温熱ストレスによるATF3の誘導

MEF細胞を42℃で培養すると、Hsp70と同様に経時的にATF3の発現量が増加する。HSF1を欠損するMEFではATF3の発現誘導が減弱する。



**図3 ATF3によるIL-6の発現抑制**

野生型MEF細胞では、42°C 1時間の温熱ストレスはLPS誘導性IL-6の発現誘導を抑制する。しかし、ATF3欠損MEF細胞では、熱によるLPS誘導性IL-6発現の抑制を認めない。さらに、ATF3欠損MEF細胞にATF3を過剰発現すると、IL-6発現の抑制機能が回復する。

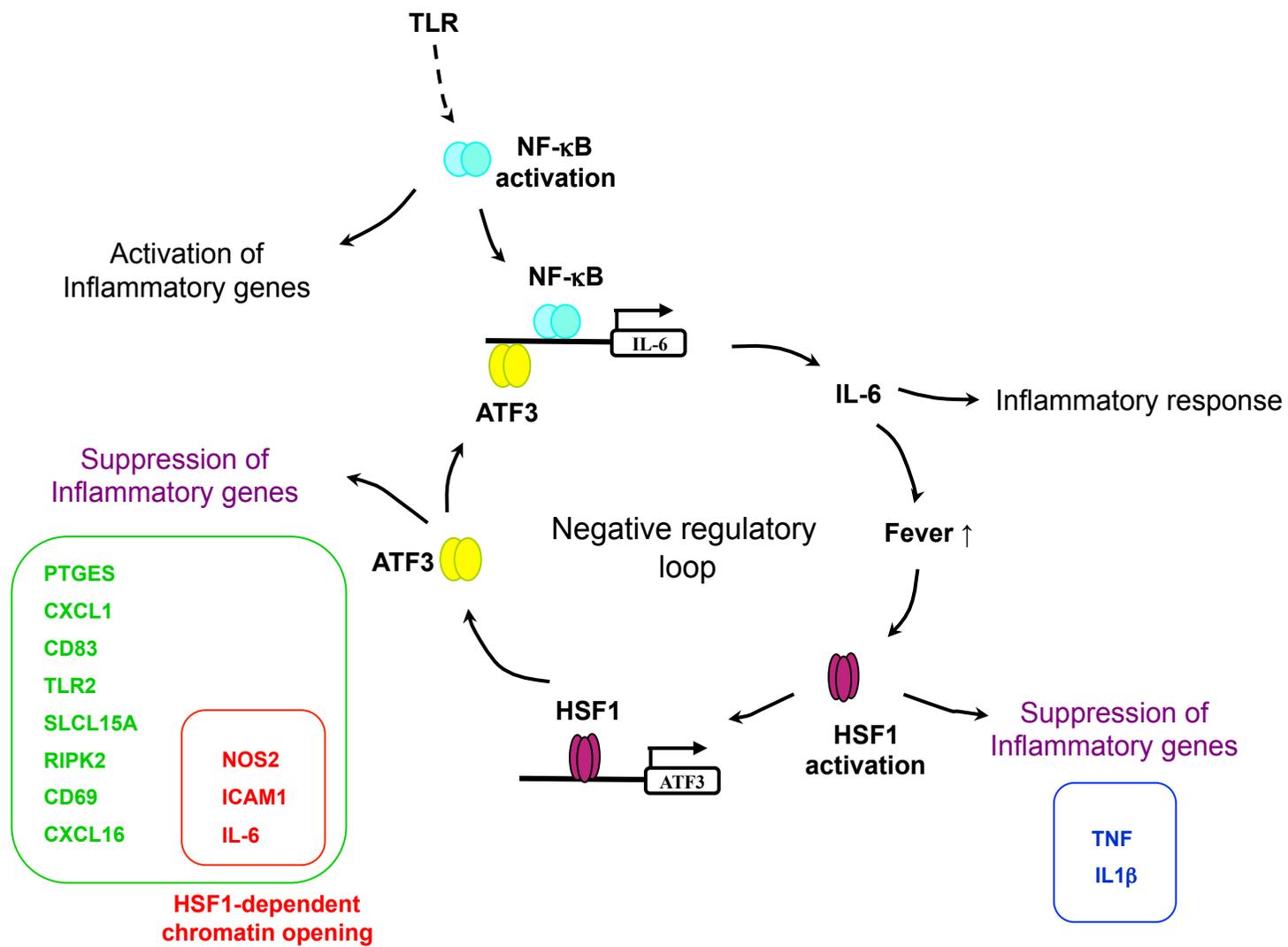


図4 炎症性遺伝子発現のネガティブフィードバック機構

炎症反応により産生されたIL-6は、生体において発熱反応をひき起こす。発熱はHSF1の活性化を生じてHSF1を活性化し、ATF3の発現誘導を行う。さらに、ATF3はIL-6のプロモータへ結合してIL-6の発現を抑制する。このHSF1-ATF3を介したフィードバックループは、多くの炎症性遺伝子発現を抑制する。