

機関番号：11101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591934

研究課題名（和文） 女性生殖器特異的な新規 I 型インターフェロンの遺伝子制御機構の解明

研究課題名（英文） Study on regulation of gene expression of a novel female reproductive organ-specific Type I interferon

研究代表者

松宮 朋穂 (MATSUMIYA TOMOH)

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30344592

研究成果の概要（和文）：近年女性生殖器に特異的に発現するインターフェロン(IFN)として IFN- ϵ が発見された。性感染症等の観点から局所における免疫応答機構を理解することは極めて重要であるが、詳細不明である。本課題では IFN- ϵ の発現機構の一部を解明した。この結果は女性生殖器における局所免疫機構の解明の一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：IFN (interferon)- ϵ has recently found as a female reproductive-specific Type I IFN. From a point of view including sexually transmitted disease, it is important to understand local immune response in female-reproductive organs such as uterus and ovary; however, it is incompletely understood. We elucidated a part of the mechanism of IFN- ϵ gene expression. This result is expected to understand the local immune response in the female reproductive tissue.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,110,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：婦人科学、婦人科免疫学

1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国では性感染症が増加しており、その予防法および治療法の開発が精力的に行われている。一方で性感染症時の宿主における局所免疫応答機構は十分に解明されていない。

一般に感染局所に到達した病原体は、パタ

ーン認識受容体により認識され、その結果として、宿主は非特異的に I 型インターフェロン(IFN)を産生することで、抗菌・抗ウイルス作用を発揮させる。

(2) ヒト I 型 IFN ファミリーは、 α 、 β 、 ϵ 、 κ 、 ω の 5 つから形成されている。これ

らの産生には組織特異性が認められており、このうち、IFN- ϵ はマウスにおいて子宮、卵巣といった雌性生殖器に特異的に発現することが 2004 年に報告された。一方ですべての I 型 IFN ファミリーは I 型 IFN 受容体に結合し、シグナルを活性化することが知られている。これらのことから、局所における組織特異的な I 型 IFN の産生が局所免疫応答に重要であることが想定される。

(3) 女性生殖器における局所免疫はその器官の複雑性や常在菌の観点から特異的な免疫応答機構の存在が想像されるが、そのような検討はなされていなかった。

(4) 申請者らは子宮頸癌由来細胞株を用いた実験で、IFN- ϵ がオートクラインループを介して遺伝子発現調節を行っていることを発見、2007 年にこれを報告した。この結果は、IFN- ϵ が女性生殖器局所における免疫応答機構に関与している可能性を示唆した。

2. 研究の目的

(1) 申請者らの以前の検討から IFN- ϵ は転写レベルではなく、転写後調節により発現調節されていることが判明していた。

(2) 多くの遺伝子では転写後調節は mRNA の 5' および 3' 非翻訳領域を介して行われることが知られていた。

(3) IFN- ϵ の mRNA はデータベース上での予測に基づく塩基配列が公開されており、その mRNA の全長は実験的に検証されていなかった。

(4) IFN- ϵ の非翻訳領域を介した局所特異的な発現の可能性は十分に考えられた。

(5) そこで、本課題では

- ① IFN- ϵ の mRNA 全長の解析
 - ② IFN- ϵ の転写後調節機構
 - ③ 転写後調節機構を介した組織特異的な発現調節メカニズム
- 以上 3 点の解明を研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) はじめに IFN- ϵ mRNA の 5' および 3' 非翻訳領域のクローニングを行い、IFN- ϵ mRNA 全長の塩基配列を同定した。

(2) IFN- ϵ 5' および 3' 非翻訳領域が mRNA の分解・安定化に及ぼす影響を検討す

るために以下の方法で組換え体を作製し、実験を行った。

- ① レポーター遺伝子の発現ベクターを作製
- ② そのレポーター遺伝子の 5' および 3' 末端に IFN- ϵ の 5' および 3' 非翻訳領域を挿入
- ③ 作製した発現ベクターを培養細胞へ遺伝子導入し、レポーター遺伝子の mRNA 発現量およびタンパク量の変動を測定

(3) IFN- ϵ の 5' および 3' 非翻訳領域に対する様々な欠失変異体を作製し、それぞれの非翻訳領域における転写後調節部位を同定した。

(4) 転写後調節部位に結合する細胞内因子を RNA-pull-down 法および SDS-PAGE 法により分離し、質量分析法により結合タンパク質を同定した。

4. 研究成果

(1) IFN- ϵ の 5' および 3' 非翻訳領域のクローニングを行ったところ、3' 非翻訳領域は困難なく塩基配列が同定されたが、5' 非翻訳領域は予測された塩基配列よりも短かった。この原因として RNA の高次構造が逆転写反応を阻害していることが考えられた。そこで、この逆転写反応を様々な条件で行い、最終的に同定に成功した。5' 非翻訳領域を解析すると、2 つのループ構造の存在が予測された

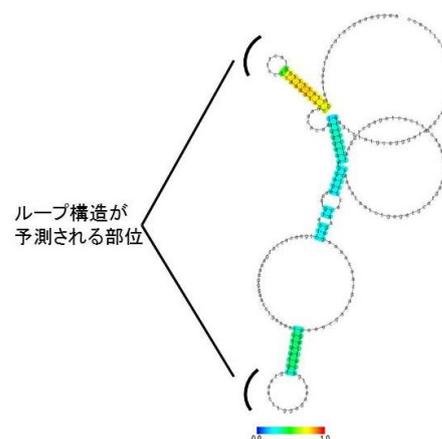


図1. IFN- ϵ 5'非翻訳領域の高次構造予測

(図1)。

(2) IFN- ϵ の 5' および 3' 非翻訳領域を挿入した組換え体のレポーター遺伝子発現量を検討し、以下の結果が得られた。

- ① 3' 非翻訳領域は極めて軽微ではあるが、遺

- 伝子の安定化を抑制
- ② 5' 非翻訳領域は遺伝子・タンパク質ともに発現を強力に抑制

(3) IFN- ϵ 5' 非翻訳領域に関してはさらに詳細に遺伝子の発現制御配列を決定することにして、同部位に対する変異体を用いた実験を行ったところ、2つのループ部位がそれぞれ遺伝子の転写後調節、またはタンパク質合成のレベルの調節と関係していることが判明した。

(4) ループ部位の RNA を合成し、細胞抽出液と反応させたのち、RNA pull-down 法で沈降した RNA 結合タンパク質を電気泳動法で分離したところ、複数のバンドが確認された。これを質量分析法により解析したところ、細胞質・核のタンパク質が確認された。(現在個々のタンパク質について解析中)

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 11 件)

- ① Matsumiya T, Imaizumi T, Yoshida H, Satoh K. Antiviral signaling through retinoic acid-inducible gene-I-like receptors. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2011; 59(1):41-8.
- ② Imaizumi T, Matsumiya T, (他 10 名、5 番目). IFN- γ and TNF- α synergistically induce microRNA-155 which regulates TAB2/IP-10 expression in human mesangial cells. *Am J Nephrol*. 2010; 32(5):462-8..
- ③ Matsumiya T and Stafforini DM. Function and regulation of retinoic acid-inducible gene-I. *Crit Rev Immunol*. 2010; 30(6):489-513.
- ④ Matsumiya T, Ota K, Imaizumi T, Yoshida H, Kimura H, Satoh K. Characterization of synergistic induction of CX3CL1/fractalkine by TNF- α and IFN- γ in vascular endothelial cells: an essential role for TNF- α in post-transcriptional regulation of CX3CL1. *J Immunol*. 2010; 184(8):4205-14.
- ⑤ Imaizumi T, Tanaka H, Tajima 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*. 2010; 19(7):830-6.
- ⑥ Ota K, Matsumiya T, Sakuraba H, Imaizumi T, Yoshida H, Kawaguchi S, Fukuda S, Satoh K. Interferon- α 2b induces p21cip1/waf1 degradation and cell proliferation in HeLa cells. *Cell Cycle*. 2010; 9(1):131-9.
- ⑦ 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*. 2010; 66(3):284-9.
- ⑧ 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*. 2009; 182(5):2717-25.
- ⑨ 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*. 2009; 122(1):89-93.
- ⑩ Imaizumi T, Mechti N, Matsumiya T, Sakaki H, Kubota K, Yoshida H, Kimura H, Satoh K. Expression of interferon-stimulated gene 20 in vascular endothelial cells. *Microbiol Immunol*. 2008; 52(1):30-35.
- ⑪ Yuzawa E, Imaizumi T, Matsumiya T, Yoshida H, Fukuhara R, Kimura H, Fukui A, Tanji K, Mori F, Wakabayashi K, Fujii S, Mizunuma H, Satoh K. Retinoic acid-inducible gene-I is induced by interferon-gamma and regulates CXCL11 expression in HeLa cells. *Life Sci*. 2008; 82(11-12):670-5.

[学会発表] (計 2 件)

- ① Matsumiya T, Imaizumi T, Yoshida H, Topham MK, Stafforini DM, Satoh K. Heat shock protein 90 protects degradation of retinoic acid-inducible gene-I. 96th Annual meeting of the American Association of Immunologist. May 11, 2009. Seattle, USA.
- ② Matsumiya T, Imaizumi T, Yoshida H,

Satoh K. HuR regulates synergistic induction of CX3CL1 by TNF-alpha and IFN-gamma in vascular endothelial cells. 14th International Congress of Immunology. Aug 24 2010. Kobe Japan.

[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

松宮 朋穂 (MATSUMIYA TOMOH)
弘前大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：30344592

(2) 研究分担者

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

吉田 秀見 (YOSHIDA HIDEMI)
弘前大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：40201008

佐藤 敬 (SATO KEI)
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20125438

(3) 連携研究者