

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 21 日現在

機関番号：34049

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590858

研究課題名（和文）肝疾患の病態における性差：オステオポンチン転写に関わる女性固有転写因子の同定

研究課題名（英文）Identification of Female-Specific Transcriptional Factors for Osteopontin Translation as a Host Factor to Determine the Difference of Clinical Features of Liver Diseases between Male and Female Patients

研究代表者

持田 智 (MOCHIDA SATOSHI)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：20219968

研究成果の概要（和文）:

ヒト osteopontin 遺伝子の promoter SNPs の allele (nt -155, -433) は肝発癌の性差を規定している。雄 HepG2 細胞と雌 MCF-7 細胞を用いた検討では、何れも両 SNPs の allele で転写活性に差異が見られた。また、核抽出蛋白と nt-155 を含む oligonucleotide の gel-shift assay を実施すると、両細胞共通、雄性 SRY および雌性のシグナルが検出された。共通シグナルは nt -155 の allele で強度が異なり、雌性のシグナルはエストロゲンで増強した。以上より、肝発癌の性差には osteopontin の発現に関わるこれら転写因子が関与すると考えられた。

研究成果の概要（英文）:

Osteopontin promoter SNPs (nt -155, -433) were responsible for the development of sexual difference of carcinogenesis in the liver. Promoter assay using male HepG2 cells and female MCF-7 cells revealed that the activities differed between alleles of either of SNPs in both cells. Also, gel-shift assay with nuclear extracts from both cells showed 3 signals; a common signal for both cells, male-specific SRY and a female-specific indeterminate signal. The intensity of a common signal was different between the allele of nt -155, and that of a female-specific signal was increased following addition of estrogen to MCF-7 cells. These observations suggest that sexual difference of carcinogenesis may develop through these transcriptional factors which play differently between male and female cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：肝臓病学

キーワード：オステオポンチン, 転写因子, 性差, エストロゲン, C型慢性肝炎, SNP

1. 研究開始当初の背景

わが国の「国民病」とみなされるC型慢性肝疾患の病態には性差が認められる。一般に女性では肝炎活動性が軽度であり、肝硬変に進展して肝発癌を生じる時期も男性に比して高齢である。また、リバビリン併用ペグインターフェロン治療の効果も、特に高齢者では男性に比して女性で不良である。C型慢性肝炎ウイルス（HCV）感染に対する免疫応答に性差があるものと推定されるが、これを規定する宿主要因は明らかになっていない。

申請者らはTh1系免疫応答の開始に必須のcytokineであるosteopontinに注目し、肝疾患との関連を検討してきた。C型慢性肝疾患では肝細胞がosteopontinを発現し、その程度は肝炎活動性と相関していた。また、肝細胞にosteopontinを過剰発現するtransgenicマウスを作成したところ、肝炎、肝壊死が自然発症することを見いだした。従って、HCV感染後に生じる肝炎の重症度も、肝に発現するosteopontinによって調節されている可能性がある。

そこで、ヒト osteopontin 遺伝子 promoter 領域の遺伝子配列を解析したところ、nt -155, -443, -616, -1,748 の 4ヶ所に単塩基変異（SNPs）を発見した。これら SNPs のうち、nt -155, -616, -1,748 の 3SNPs は高度の連鎖不平衡を呈しており、これと独立した nt -443 の SNP との allele の組み合わせによって、C型慢性肝疾患における肝炎活動性、リバビリン併用ペグインターフェロン治療の効果、肝発癌時の肝線維化の程度などが規定されることを報告してきた。また、promoter assay を実施したところ nt -155, nt -443 の SNPs は何れも機能的であり、両 SNPs の allele の組み合わせに応じて転写活性には差異が生じることを見出した。一方、gel-shift assay によって nt -155 の近傍に結合する転写因子を検索したところ、allele G, deletion mutation の何れの場合も SRY が

結合するが、deletion mutation に対しては FoxD3 も結合する可能性が明らかになった。SRY は Y 染色体上の遺伝子によってコードされることから、nt -155 の SNPs は C 型慢性肝疾患における病態の性差を規定している可能性がある。

2. 研究の目的

Osteopontin 遺伝子 promoter SNPs を介する転写調節機構を性差との関連で解明し、HCV感染者の肝炎活動性を規定する宿主要因としてのこれら SNPs の意義を明らかにする。

3. 研究の方法

C型慢性肝炎症例の末梢血単核球から単離した DNA を用いて、INVADER 法で nt -155 と nt -443 のアレルを決定した。これらアレルの組み合わせが deletion と C をハプロタイプ-1, deletion と T をハプロタイプ-2, G と T をハプロタイプ-3 とした。各ハプロタイプの cDNA を nt -1 から -658 まで増幅し、pGL3 basic vector (4.8 kb) に組み込み、雄性の HepG2 細胞と雌性の MCF-7 細胞にトランスフェクションし、dual-luciferase reporter assay を実施した。

Nt -155 および nt -433 を含むオリゴヌクレオチドを合成した。各アレルのオリゴヌクレオチドと雄性の HepG2 細胞、LN-CAP 細胞および雌性の MCF-7 細胞、MDA-MB231 細胞の核抽出物を用いて gel-shift assay を実施した。

各細胞で SRY, Fox, Cdx 関連の転写因子の発現を RT-PCR およびウエスタンブロット法で確認した。また、これらをノックダウンした細胞を用いて dual-luciferase reporter assay と gel-shift assay を実施し、各転写因子の機能を評価した。

4. 研究成果

HepG2 細胞, MCF-7 細胞ともに, dual-luciferase reporter assay による転写活性は, エストロゲン添加の有無に関わらず, ハプロタイプ-1, -2, -3 の順に高値であった ($p < 0.01$). MCF-7 細胞ではハプロタイプ-1 の場合はエストロゲンを添加すると, 非添加の場合に比して転写活性が低下した (減少率 26%, $p < 0.01$). ハプロタイプ-2 とハプロタイプ-3 でも同様にエストロゲン添加によって転写活性が低下したが, その程度は軽度であった (9%および 24%).

HepG2 細胞の核抽出物と nt -443 近傍のオリゴヌクレオチドを用いて gel-shift assay を実施すると, CdxA と想定されるシグナルが検出された。ビオチンラベルおよび非ラベルのオリゴヌクレオチドを用いて競合 gel-shift assay を実施すると, nt -443 のアレルが T の場合が C に比して, シグナルは高度であった。一方, HepG2 細胞と MCF-7 細胞の核抽出蛋白を用いて, nt-155 を含む oligonucleotide と gel-shift assay を実施すると, 両細胞に共通した結合シグナルと各細胞に固有の結合シグナルが検出された。これらのうち共通シグナルは nt -155 が G に比して deletion の場合に高度であった。一方, HepG2 細胞に固有のシグナルは, アレルによる差異がなく, Y 染色体でコードされる SRY の中和抗体で核抽出蛋白を前処理することによって消失した。なお, HepG2 細胞における SRY の発現は, RT-PCR とウエスタンブロット法によって確認された。また, MCF-7 細胞に固有のシグナルは, アレルによる差異は認められないが, エストロゲンを添加した細胞の核抽出蛋白では増強していた。

なお, Cdx1, Cdx2, FoxA1, FoxA2, FoxD3, Runx2, Sox9 について RT-PCR を実施しました

ところ, HepG2 細胞では Cdx1 以外はすべて発現していたが, 特に Sox9, FoxA2, FoxA1, FoxD3 の発現が高度であった。MCF-7 細胞も Cdx1 以外は発現していたが, FoxA1 と Runx2 の発現が特に高度で, これらはエストロゲン依存性に増強した。

以上より, 肝におけるオステオポンチン発現は, 男性では SRY を介して転写が調節されていると考えられた。一方, 女性ではエストロゲン応答性の転写因子で抑制されているが, nt -155 が deletion の場合には雄雌両細胞に共通した転写因子を介して亢進すると推定された。これら転写因子によるオステオポンチンの発現調節は, 腫瘍免疫ないしは細胞外マトリックスとしての作用を介して, 肝発癌における性差に関与している可能性がある。なお, エストロゲンの刺激で発現が増強する未知の転写因子による転写活性抑制の程度は, nt -155 のアレルによって差異が見られ, gel-shift assay の成績と解離が認められたことから, 転写活性調節の性差には他の SNPs も関与していると推定された。

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0件)

[学会発表](計4件)

1. Hamaoka K, Nagoshi S, Sugawara K, Inao M, Naiki K, Nakayama N, Fujiwara K, Mochida S. Estrogen-dependent novel transfer factor as well as SRY may be involved in the sexual difference in the development of hepatocellular carcinoma in HCV-infected patients through osteopontin expression in the liver. 61st Annual Meeting of American

Association for the Study of the Liver.
Diseases October 30- November 2 2010,
Boston,USA

2. 濱岡和宏, 名越澄子, 菅原通子, 内木佳代子, 稲生実枝, 中山伸朗, 藤原研司, 持田 智. 肝病態における性差: Osteopontin 遺伝子 promoter SNPs に関連する新規転写因子のエストロゲンによる調節機構. 第 46 回日本肝臓学会総会, 2010 年 6 月 27,28 日, 山形.
3. Hamaoka K, Nagoshi S, Sugawara K, Inao M, Naiki K, Nakayama N, Fujiwara K, Mochida S. An unknown transfer factor up-regulated by estrogen may be involved in the sexual difference in the development of hepatocellular carcinoma in HCV-infected patients through osteopontin expression in the liver. 45th Annual Meeting of European Association for the Study of the Liver. April 14-18 2010, Wien, Austria
- 4 Hamaoka K, Nagoshi S, Sugawara K, Inao M, Naiki K, Nakayama N, Fujiwara K, Mochida S. A novel transfer factor specific to female cells may be involved in the sexual difference in the development of hepatocellular carcinoma in HCV-Infected patients through osteopontin expression in the liver. 60th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, October 30-November 3 2009, Boston.USA

6 . 研究組織

(1)研究代表者

持田 智 (MOCHIDA SATOSHI)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号: 20219968

(2)研究分担者

稲生 実枝 (INAO MIE)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号: 70216037
(H23 : 連携研究者)
菅原 通子 (SUGAWARA KAYOKO)
埼玉医科大学・医学部・助教
研究者番号: 2040645
(H23 : 連携研究者)

(3)連携研究者

()

研究者番号: