

機関番号：31201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780045

研究課題名（和文）環境ストレス応答分子によって発現調節される細胞内感染防御遺伝子の探索

研究課題名（英文）Genetic analysis of defense response against intracellular infection, induced by environmental stress response pathway.

研究代表者

寺島 潤（TERASHIMA JUN）

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：60400272

研究成果の概要（和文）：

我々はエクジステロイドホルモン応答遺伝子の一つである *E75B* が *Drosophila* 消化管細胞内での感染防御に重要であることを明らかにした。*E75B* は *Drosophila* が栄養飢餓状態におかれたときに、生殖器官においてストレス応答の役割を担い、*E75B* 変異体の産卵数は栄養飢餓状態で大きく減少することが明らかとなっている。これらの結果と、現在までの知見からストレス応答は、栄養飢餓、熱、感染それぞれに独自の応答経路があるが、同時に共通する応答経路も存在すると考えられる。昆虫においてはステロイドホルモンに対する応答経路、または代謝経路がそれに該当すると考えられ、我々はこのステロイドホルモン関連経路が種を越えて、ヒトでもストレス応答経路として作用しているのではないかと予想した。これら昆虫におけるストレス応答の研究を医療面へ応用することを考え、研究材料を肝ガン由来細胞株、HepG2 を用い、血管新生に関わるグルコース飢餓への応答を *Drosophila* で得られた知見を元にして解析した。この結果、ステロイドホルモンの代謝に関与する CYP1A1 を含む経路、aryl hydrocarbon receptor（AhR）経路がグルコース飢餓に応答することが明らかとなった。グルコース飢餓によって、核内受容体である AhR は核に移行し、CYP1A1 などの酵素遺伝子の発現を誘導、そして酸化ストレス応答経路を活性化する。またこの経路が飢餓条件下での HepG2 生存と、血管新生に関与していることを示唆する結果を得た。AhR によって発現が誘導される CYP1 family は、薬物代謝酵素としての機能がよく知られており、将来、これらの研究によってガン細胞のストレス耐性、血管新生のメカニズムの解明と、創薬のターゲットとなる知見、抗がん剤に対するガン細胞の薬物代謝経路の応答などに有用な知見が得られることが予想される。

研究成果の概要（英文）：

Ecdysone inducible protein 75B (E75B) is one of the ecdysone response genes and relates to metamorphosis in the insects. *E75B* has a role for nutritional shortage response, regulates the development of ovary in *Drosophila* under nutritional stress. Ecdysone is the insect steroid hormone and adjusts not only the metamorphosis but also stress response in *Drosophila*. We expected that steroid related pathway has possibility to response against various stress in not only the insect but also mammalian cell, tried to apply the microarray analysis data to the investigation of stress response in human cancer, a human liver carcinoma cell line (HepG2). In this project, we show that *E75B* has important role for defense response against obligate intracellular parasite, *Nosema bombycis* in *Drosophila melanogaster* and low-glucose conditions induce the translocation of AhR into the nucleus in the human carcinoma cell line HepG2 and that AhR activates CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 expression. The activation of CYP1 family member expression indicates that AhR binds to a ligand and successfully functions as a transcription factor. These results suggest that an endogenous AhR ligand is produced in HepG2 cells under low-glucose conditions and that AhR's role as a transcription factor is related to the low-glucose response of HepG2 cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2009 年度	800,000	240,000	1040,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総 計	1500,000	450,000	1950,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：昆虫分子生物学

キーワード：昆虫分子生物学、感染防御

1. 研究開始当初の背景

自然免疫は原始的な動物から哺乳類まで幅広い動物種が有する異物感染防御機構である。昆虫は自然免疫機構のみを使って感染から身を守っており、これを理解することは昆虫が媒介する様々な病原体の防除に重要である。自然免疫の経路は Toll、Imd の 2 つの経路がよく知られており、Imd 経路は Diaminopimelic acid (DAP)-type peptidoglycan を持つバクテリア、寄生虫の感染に対して防御機構として作用すると考えられている (Takehana et al., 2004, Hu and Aksoy 2006)。寄生虫の感染に対しては、マラリア原虫、トリパノソーマを使った研究によって、感染防御に imd 経路が重要であることが示唆されている (Meister et al., 2005, Hu and Aksoy 2006)。しかし、寄生虫が細胞内に侵入したときの細胞内防御機構に着目した研究は行われていない。我々は寄生虫が細胞内に侵入したときの感染防御に着目し、カイコガの偏性細胞内寄生体である *Nosema bombycis* をショウジョウバエに経口感染させる系を確立して解析を行った。また、感染はストレスの一つとされ、他のストレスと共通する応答経路を持つ場合がある。研究代表者は英エジンバラ大学において栄養飢餓状態が *Drosophila* 生殖細胞の発生に与える影響についていくつかの報告をしており (Terashima and Bownes, 2004, 2005 and 2006, Terashima et al., 2006)、感染、栄養飢餓ストレスに共通経路の特定は、農学、医学への応用が期待されるとしてこの研究テーマを提案した。

2. 研究の目的

昆虫のステロイドホルモンの一つである、エクジステロイドホルモン (脱皮ホルモン) は、後胚発生の調節だけでなくストレス環境下で体内濃度が上昇し、抗ストレス遺伝子群の発現調節を行うと考えられている (Terashima and Bownes, 2005 and 2006, Terashima et al, 2005)。栄養飢餓状態では、*Drosophila* の卵巣を構成する細胞群はアポトーシスによって死に至るものが多いが、*Ecdysone inducible protein 75B (E75B)* が発現した egg chamber では卵細胞は発生を継続し、産卵される。*E75B* はストレス誘導アポトーシスを抑制し、飢餓と共に体内濃度が上昇するエクジステロイドホルモンによって発現が調節されている。エクジステロイドホルモンの体内濃度上昇は熱ストレスによっても誘導され、*Drosophila* ではエクジステロイドホルモンはストレス応答ホルモンでもあると考えられている。我々はこのエクジステロイドホルモンが感染ストレスに対しても重要な役割を持っていると予想し、昆虫の感染防御機構である自然免疫の経路との関連があるかを解析した。また、これらのストレスについての研究を医学・薬学へ応用的に発展させるために、*Drosophila* で得られた栄養飢餓、感染ストレスについてのデータをもとにヒト肝ガン由来細胞 HepG2 でストレスとガン細胞血管新生の關係に着目して研究を展開した。

3. 研究の方法

偏性細胞内寄生体である *Nosema bombycis* はカイコガへ寄生する寄生虫である。我々はこの *Nosema bombycis* を *Drosophila* 消化管細胞へ寄生させる実験系を確立し、感染させた消化管細胞を使ってマイクロアレイ解析を行った。この解析ではエクジステロイドホルモンに応答する遺伝子群の発現パターンに着目し、感染に対して応答する遺伝子の候補を絞り込んだ。候補の遺伝子は、*Drosophila* を使った変異体解析、エピスタシス解析を行い、自然免疫経路との関連があるかどうかを確認した。また、ストレスに応答する経路は種をこえて保存されているものがあり、ヒトと昆虫でも類似の経路がストレスに応答していることを予想し、ヒトへの応用を視野に入れた研究を展開した。ヒト肝ガン細胞は、栄養飢餓、低酸素環境にさらされることによって血管形成が誘導されるという報告があり、栄養飢餓、感染ストレスによって *Drosophila* から得られた遺伝子発現データを参考にして、ヒト肝ガン由来細胞である HepG2 を用いて環境要因に対しての応答についてマイクロアレイ解析などを用いて解析した。

4. 研究成果

我々はエクジステロイドホルモン応答遺伝子の一つである *E75B* が *Drosophila* 消化管細胞内での *Nosema bombycis* 感染防御に重要であることを明らかにした（論文準備中）。マイクロアレイ解析の結果、*E75B* の発現が *Drosophila* 消化管細胞で上昇しており、*Drosophila E75B* 変異体では、*Nosema bombycis* の感染によって生存率が低下した。*Drosophila relish* 変異体でも同様の生存率低下が確認され、*Nosema bombycis* の消化管細胞における感染防御には Imd 経路と、*E75B* の発現を誘導するエクジステロイドホルモン応答経路が重要であることが明らかとなった。*Nosema bombycis* 感染時、消化管細胞において *E75B* の発現が上昇するが、この発現上昇は *rel* 変異体では誘導されなかったことから、*E75B* の発現上昇には Imd 経路が関与していることが考えられる。*E75B* はエクジステロイドホルモンによって発現が調節されるという性質上、Imd 経路が直接 *E75B* の発現

に関与しているとは考えにくい。また、*Nosema bombycis* 感染時には *Drosophila* 消化管細胞において *Diptericin*, *Attacin*, *Defensin* の発現が上昇する。*Drosophila rel* 変異体ではこの発現が抑制されるが、*E75B* 変異体では野生型と同様の発現パターンを示す。これらのことから、*Nosema bombycis* 感染時に即応する経路は Imd 経路であり、*E75B* は間接的に Imd 経路の下流に存在すると考えられる。おそらくは、Imd 経路の活性化によって *Drosophila* 体内の *ecsydteroid hormone* 濃度が上昇し、その結果 *E75B* の発現が誘導されるのではないかと考えている。*E75B* 変異体では *Diptericin*, *Attacin*, *Defensin* が発現しているのにも関わらず、生存率が低下しているということは、抗菌ペプチドの発現とは別の感染防御機構が存在し、2 つの経路が活性化されることが個体生存の必須条件であると予想される。

エクジステロイドホルモンが熱、飢餓ストレスのみならず、感染防御にも関与していることを示唆する結果を得たことから、ステロイドホルモンまたは核内受容体は種をこえてストレスに応答する経路である可能性を考え、*Drosophila* で得た知見をヒトに応用しようとした。ターゲットとして、ヒト肝ガン由来細胞を用い、栄養飢餓から肝細胞の血管新生への機構を解明する研究を *Drosophila* で得られた知見をもとに行った。*Drosophila* でのマイクロアレイの結果、ステロイドホルモン合成経路と、代謝経路に関与する遺伝子群の発現が大きく変動しており、まずはヒトのステロイドホルモン代謝経路に着目した。CYP1A1, CYP1B1 など酸化酵素群は、ステロイドホルモン群の生合成、分解に関与することが知られている。ヒト肝ガン由来細胞である HepG2 において、低グルコース条件下ではこの 2 つの酵素をコードする遺伝子、*CYP1A1*, *CYP1B1* の発現が上昇しており、この発現上昇を誘導するとされる *aryl hydrocarbon receptor* (AhR) が低グルコースで誘導される *CYP1A1*, *1B1* の発現誘導にも必要であることが明らかとなった。AhR は低グルコースによって核への移行が活性化されており、AhR 経路の活性化が低グルコース条件下で確認された。また、低グルコースに応答して、酸化ストレス応答遺伝子の一つである *Nrf2* の発

現が HepG2 で上昇するが、*Nrf2* の発現上昇に AhR の核移行が必要であることも明らかとなった（論文投稿中）。

現在は NB 感染時に *E75B* の下流に存在すると思われる感染ストレスに対するエフェクター分子の特定が進行中である。*Drosophila* 野生型と *E75B* 変異体の間でマイクロアレイ解析を行い、そのデータをもとに候補分子の特定を行っている。また平行して、熱、飢餓、感染という多岐にわたるストレスに対する応答経路はいったん酸化ストレスに応答する経路に集約されると予想し、感染、飢餓ストレスから酸化ストレスへシグナルが変換されるメカニズムを *Drosophila* とヒト肝ガン由来細胞で行ったマイクロアレイ解析のデータをもとに解明しようとしている。

今後、このプロジェクトで得られたデータをもとに、環境要因に対する中心的な応答メカニズムの解明を行い、環境ストレス（栄養飢餓、低酸素）が誘導するとされているヒトガン細胞血管新生のメカニズムにターゲットを絞り、医学・薬学への応用を視野に入れた研究を展開する予定である。

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 2 件）

Involvement of promoter methylation in the regulation of Pregnane X receptor in colon cancer cells. (2011)

Habano W, Gamo T, Terashima J, Sugai T, Otsuka K, Wakabayashi G, Ozawa S. BMC Cancer. 11:81-90.

Cooperative regulation of the induction of the novel antibacterial listericin by PGRP-Le and the JAK-STAT pathway. (2010)
Goto A, Yano T, Terashima J, Iwashita S, Oshima Y, Kurata S
J Biol Chem 285 15731-15738

〔学会発表〕（計 1 件）

Terashima J., Habano W., Gamou T. and Ozawa S. (2010)

Nutritional stress signaling induces

CYP1A1 and *CYP1B1* through AhR-mediated mechanisms.

日本薬物動態学会 第 25 回年会、さいたま市

〔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 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

マイクロアレイデータベース（東北大学）

http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seimei/m_array/index.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺島 潤 (TERASHIMA JUN)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：60400272

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：