

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25年 5月 10日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590408

研究課題名（和文） エンドトキシンによる炎症反応を制御するがん抑制遺伝子群の役割

研究課題名（英文） Role of tumor-suppressive genes on LPS-induced inflammatory response

研究代表者

横地高志（YOKOCHI TAKASHI）

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：20126915

研究成果の概要（和文）：がん抑制遺伝子である retinoblastoma protein-interacting zinc finger 1 (RIZ1) の LPS 誘発炎症性反応に及ぼす作用を調べ、RIZ1 ががん抑制遺伝子は LPS による NF-kappaB の活性化を p53 と協調して増強し、TNF-alpha などの炎症性サイトカインの産生を亢進することが示唆された。

ADP ribosylation factor-GTPase activating protein (ASAP1) は NF-kappaB の活性化を負の制御をして、LPS によって誘導される炎症反応を恒常的に抑制していることを明らかにした。がん関連遺伝子がエンドトキシンによる炎症反応に密接に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The involvement of retinoblastoma protein-interacting zinc finger 1 (RIZ1), a tumor suppressor, in lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses was investigated by using RAW 264.7 macrophage-like cells. RIZ1 was suggested to augment LPS-induced NF-kappaB activation in collaboration with p53 and enhance the production of proinflammatory cytokines in response to LPS. An ADP ribosylation factor-GTPase activating protein (ASAP1) is constitutively expressed in the cells and the expression was augmented by LPS stimulation. Silencing of ASAP1 enhanced the production of proinflammatory mediators in response to LPS. A series of tumor-associated genes are involved in LPS-induced inflammatory response in macrophages.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：LPS、ASAP1、RAW264.7 NF-kappaB、炎症性メディエーター

1. 研究開始当初の背景

我々は、最近ヒトメタドヘリン (metadherin) として知られる astrocyte elevated

gene-1 (AEG-1) がエンドトキシンシグナルを増強することを見出した (Immunology 2009;128:700-6)。AEG-1 は、多様な細胞に発現しているが、とりわけ悪性神経膠腫 (グ

リオーマ)、乳がん細胞で発現が増強されている。この AEG-1 遺伝子は、エンドトキシン刺激による NF-kappaB の活性化を介してマクロファージに誘導され、この誘導された AEG-1 はさらに NF-kappaB を活性化し、炎症性メディエーター産生を促進する。

我々は、エンドトキシンの炎症誘導にがん遺伝子が関与していることを世界にさきがけて、見出し報告した。このように、エンドトキシンの炎症反応にがん遺伝子が関与していることが明らかになったことから、エンドトキシンシグナルを制御するがん関連遺伝子を系統的に解析した。

2. 研究の目的

今回、がん抑制遺伝子である retinoblastoma protein-interacting zinc finger 1 (RIZ1) や ADP ribosylation factor-GTPase activating protein (ASAP1) がエンドトキシンの炎症性サイトカイン産生に影響を及ぼしている事実を見出した。本研究は、その詳細な誘導メカニズムやエンドトキシンショックの治療法への応用について解析する。

3. 研究の方法

(1) エンドトキシン刺激マウスマクロファージ株における RIZ1 遺伝子発現のメカニズム解析

① エンドトキシン刺激による RIZ1 タンパクや mRNA の発現を免疫ブロット法や real time PCR で解析する。さらに、エンドトキシン濃度や経時的に解析する。

(2) エンドトキシンによる RIZ1 遺伝子発現を導くシグナル経路の解析

① エンドトキシンシグナル経路を MyD88 依存、非依存活性化経路を区別して、RIZ1 活性化経路を各シグナル分子のリン酸化を免疫ブロット法で明らかにする。

② NF-kappaB 阻害剤、IkappaB dominant negative クローンなどを用いて、NF-kappaB を介することを確かめる。

③ RIZ1 発現を導く NF-kappaB を活性化させる上流のシグナル分子を dominant negative clone を用いて明らかにする。

(3) エンドトキシン誘導炎症性サイトカイン産生における RIZ1 の関与

① RAW264.7 マクロファージ細胞に、RIZ1 siRNA を導入し、エンドトキシンで刺激し、炎症性サイトカインとして腫瘍壊死因子 (TNF-alpha) 産生を酵素抗体法で測定する。

② エンドトキシン刺激後の TNF-alpha 産生を経時的に追う。

③ TNF-alpha の mRNA やタンパク発現を real time PCR、免疫ブロット法で解析する。

(4) RIZ1 によるサイトカイン抑制のメカニ

ズムの解析

① RIZ1 siRNA 導入マクロファージを用いて、RIZ1 遺伝子の抑制がエンドトキシンシグナルにおよぼす影響を解析する。

② 炎症性サイトカイン産生において中心的役割を果たす NF-kappaB におよぼす RIZ1 の作用を検討する。

③ RIZ1 が NF-kappaB 活性化を導く標的分子を明らかにする。

(5) RIZ1 遺伝子以外のがん関連遺伝子の発現の解析

① RIZ1 以外のがん抑制連遺伝子、p53、BRCA1 遺伝子などの発現を免疫ブロット法で調べる。

② プロテインキナーゼなどがん関連タンパクの発現を調べる。

③ RIZ1 遺伝子の抑制による他のがん関連遺伝子の発現を調べる。ASAP1 遺伝子においても同様な解析を行う。

4. 研究成果

がん抑制遺伝子である retinoblastoma protein-interacting zinc finger 1 (RIZ1) の LPS 誘発炎症性反応に及ぼす作用を調べた。マクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞を LPS で刺激し、解析した。LPS は RIZ1 発現を増強し、NF-kappaB や Akt の活性化により誘導された。RIZ1 発現を抑制すると、LPS による NF-kappaB 活性化の不活化を導いた。また RIZ1 の発現抑制は p53 活性化を抑制した。p53 阻害剤は RIZ1 発現を減弱した。RIZ1 siRNA は LPS 誘発 TNF-alpha 産生を抑制した。これらのことから RIZ1 ががん抑制遺伝子は LPS による NF-kappaB の活性化を p53 と協調して増強し、TNF-alpha などの炎症性サイトカインの産生を亢進することが示唆された。さらに、マウス、ヒト単球系白血病細胞の増殖に対する RIZ1 の作用を調べた。RIZ1 は p53 の活性化を介して単球系白血病の増殖を抑制していることが示唆された。RIZ1 の receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) 誘導破骨細胞分化に及ぼす作用も検討した。RIZ1 が RANKL 刺激による破骨細胞分化を NFATc1 を介して制御していることが明らかになった。

他方、ADP ribosylation factor-GTPase activating protein (ASAP1) 遺伝子が LPS による炎症反応に及ぼす作用を RAW264.7 マクロファージ細胞株を用いて調べた。ASAP1 はマクロファージに恒常的に発現しており、LPS 刺激によってその発現が増強された。siRNA による ASAP1 発現の抑制は、LPS による腫瘍壊死因子 (TNF-alpha)、インターロイキン 6、インターフェロン beta、一酸化窒素など炎症性メディエーターの産生を増強した。また、siRNA による ASAP1 発現の抑制は、

RAW264.7細胞においてLPSによるNF- κ B活性化を増強した。このことから、ASAP1はNF- κ Bの活性化を負の制御をしていることが示唆された。他方、p38、SAPK/JNKの活性化を増強したが、ERK1/2の活性化には影響を及ぼさなかった。LPS以外のtoll-like receptor (TLR)リガンドによってもASAP1の発現はLPS同様増強し、LPS以外のTLRリガンドによる炎症性反応もASAP1は負の制御をしていることが明らかになった。今後、RIZ1やASAP1を制御する各種遺伝子群を解析し、エンドトキシンショックの治療に結びつく新しい治療法の開発の応用にしたい。

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5件)

1. Noman AS, Koide N, Iftakhar-E-Khuda I, Dagvadorj J, Tumurkhuu G, Naiki Y, Komatsu T, Yoshida T, Yokochi T. Retinoblastoma protein-interacting zinc finger 1 (RIZ1) participates in RANKL-induced osteoclast formation via regulation of NFATc1 expression. *Immunol Lett.* 2010;131:166-9. doi: 10.1016/j.imlet.2010.04.006.
2. Khuda II, Koide N, Noman AS, Dagvadorj J, Tumurkhuu G, Naiki Y, Komatsu T, Yoshida T, Yokochi T. Seladin-1 is a novel lipopolysaccharide (LPS)-responsive gene and inhibits the tumour necrosis factor- α production and osteoclast formation in response to LPS. *Immunology.* 2010;131:59-66. doi: 10.1111/j.1365-2567.2010.03274.x.
3. Noman AS, Koide N, Iftakhar-E-Khuda I, Dagvadorj J, Tumurkhuu G, Naiki Y, Komatsu T, Yoshida T, Yokochi T. Retinoblastoma protein-interacting zinc finger 1, a tumor suppressor, augments lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine production via enhancing nuclear factor- κ B activation. *Cell Immunol.* 2010;264:114-8. doi: 10.1016/j.cellimm.2010.05.007.
4. Shadat NM, Koide N, Khuda II, Dagvadorj J, Tumurkhuu G, Naiki Y, Komatsu T, Yoshida T, Yokochi T. Retinoblastoma protein-interacting zinc finger 1 (RIZ1) regulates the proliferation of monocytic leukemia cells via activation of p53. *Cancer Invest.* 2010;28:806-12. doi: 10.3109/07357907.2010.494323.
5. Haque A, Noman AS, Koide N, Odkhuu E, Naiki Y, Hashimoto S, Komatsu T, Yoshida T, Yokochi T. An ADP ribosylation

factor-GTPase activating protein negatively regulates the production of proinflammatory mediators in response to lipopolysaccharide. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60:1439-46. doi: 10.1007/s00262-011-1048-9.

[学会発表] (計3件)

Erdenezaya Odkhuu et al. The novel inhibitory effect of pifithrin (PFT)- α , an inhibitor of p53, on lipopolysaccharide-induced nitric oxide via reducing interferon- β production.

第12回国際エンドトキシン自然免疫学会
平成24年10月24日(東京)

Bilegtsaikhan Tsolmongyn et al. Lipopolysaccharide prevents valproic acid-induced apoptosis via activation of NF- κ B and inhibition of p53 activation.

第12回国際エンドトキシン自然免疫学会
平成24年10月24日(東京)

他1件

[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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横地高志 (YOKOCHI TAKASHI)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：20126915

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：