

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：32404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22791797

研究課題名(和文) インターフェロン 誘導性遺伝子の低酸素による発現抑制機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the inhibitory mechanisms of IFN gamma induced gene expression by hypoxia

研究代表者

廣井 美紀 (Hiroi, Miki)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号：30419717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍局所で認められる低酸素環境が、癌細胞のIFN 誘導性CXCL9, CXCL10遺伝子の発現を抑制し、その発現抑制はコアクチベーターSRC-1、RNAポリメラーゼIIのプロモーター上での複合体形成阻害により起こること、一方HIF-1、ヒストンのアセチル化修飾は関与していないことを明らかにした。今回、HIF-2、メチル化転移酵素、メディエーター複合体の関与について検討した結果、活性型HIF-2の強制発現によりCXCL9遺伝子のプロモーター活性が抑制された。またメチル化転移酵素、メディエーター複合体構成因子のmRNAの構成的な発現が認められ、低酸素によりMED12の発現抑制が認められた。

研究成果の概要(英文)：We have previously shown that hypoxia down-regulated the IFN-induced expression of chemokine CXCL9 and CXCL10 genes in human tumor cell lines. We have explored the mechanisms by which hypoxia down-regulates the IFN-induced gene expressions and found that although HIF-1 was not involved in the transcriptional repression of the IFN-induced genes, recruitments of Pol II, coactivator SRC-1 were inhibited under the hypoxia. In this study, we investigated potential involvements of HIF-2, histone methylation at the promoter region of the CXCL9 genes, and mediator complex that participates in the recruitment of Pol II for the hypoxia-mediated transcriptional repression. Over expression of an active form of HIF-2 in HEK293 cells inhibited the CXCL9 promoter activity, suggesting that HIF-2 negatively regulates CXCL9 expression. Real-time RT-PCR analysis showed that constitutive expressions of mRNAs for methyltransferase and members of mediator complex were observed in HSC-2 cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：シグナル伝達 低酸素 インターフェロン ケモカイン 遺伝子制御

1. 研究開始当初の背景

IFN 誘導性ケモカイン CXCL9 および CXCL10 は活性化ヘルパー 1 型 T 細胞 (Th1)、NK 細胞に対するケモカインであり、また血管新生抑制作用も有している抗腫瘍活性を持つケモカインである。腫瘍細胞が組織内で増殖するためには、血液からの酸素、栄養供給が必要であるが、腫瘍細胞の増殖スピードに見合った血管新生が伴わないため、腫瘍内部は低酸素状態となっている。我々は、この低酸素環境が腫瘍局所での免疫担当細胞の抗腫瘍活性や癌細胞のシグナル伝達、遺伝子発現に影響を与えるのではないかという仮説のもと、IFN 誘導性ケモカインの発現について検討を行ってきた。これまでに、低酸素がケモカイン CXCL9、CXCL10 などの IFN 誘導性遺伝子の発現を抑制すること、この遺伝子発現の抑制機構は IFN 刺激によって誘導される STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) のプロモーター/エンハンサーへのリクルートの抑制ではなく、RNA ポリメラーゼ II (Pol II) およびコアクチベーター CBP (CREB binding protein), SRC-1 (steroid receptor coactivator-1) のリクルートの抑制によることを明らかにしてきた。一方、低酸素により誘導される転写因子 HIF-1 (hypoxia inducible factor-1) およびヒストンのアセチル化修飾は関与していないことなどを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

これまでの結果から、低酸素による IFN 誘導性遺伝子発現の抑制が、プロモーター上での Pol II やコアクチベーターを含む複合体形成の阻害により起こる可能性が示唆された。しかしながら低酸素がどのようなメカニズムにより転写複合体形成を阻害するかについてその詳細は不明のままである。そこで、本研究課題では、低酸素による IFN 誘導性遺伝子の発現抑制のメカニズムのさらなる

解明を目指し、低酸素により誘導される転写因子 HIF-2 の関与、低酸素によるヒストンのメチル化修飾および Pol II のリクルートや転写開始複合体の安定化に関与しているメディエーター複合体の低酸素による影響について検討した。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

HEK293 細胞は、10 % FBS および 1 % ペニシリン/ストレプトマイシンを含む DMEM 培地で培養した。また口腔扁平上皮癌細胞 HSC-2 は、10 % FBS および 1 % ペニシリン/ストレプトマイシンを含む RPMI1640 培地にて培養した。細胞は低酸素 (1 % O₂) にて 12 時間培養後、IFN (10 ng/ml) にて 8 時間刺激し、実験に供試した。

(2) ルシフェラーゼアッセイ

HEK293 細胞に HIF-2 発現ベクターおよび CXCL9 プロモーター領域を含むルシフェラーゼコンストラクトを遺伝子導入し、24 時間後に低酸素で 12 時間培養し IFN にて刺激した。8 時間後に細胞抽出液を作製し、ルシフェラーゼアッセイを行なった。

(3) HIF-2 発現ベクターおよび HIF-2 miRNA レンチウィルスベクターの作製

活性型 HIF-2 発現ベクターおよび HIF-2 のノックダウンを目的とした HIF-2 siRNA レンチウィルスベクターを作製した。

(4) 遺伝子発現解析

細胞を所定時間刺激後、total RNA を調製した。抽出した RNA から cDNA を合成し、TaqMan Probe を用いてリアルタイム定量 RT-PCR を行ない、mRNA の発現を検討した。

4. 研究成果

(1) 低酸素により誘導される転写因子 HIF-2

の関与を検討するために、HEK293 細胞に活性型 HIF-2 発現ベクターおよび CXCL9 プロモータ領域を含むルシフェラーゼレポーターコンストラクトを遺伝子導入し、ルシフェラーゼアッセイを行なった。その結果、HIF-2 の強制発現により IFN によって誘導された CXCL9 のプロモータ活性が低下した。一方、活性型 HIF-1 の強制発現では抑制作用は認められなかった。この結果から、HIF-2 が CXCL9 遺伝子の発現を負に制御している可能性が示唆された。そこで口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2 細胞を用いて同様の実験を行なったが、遺伝子導入効率が悪いことから安定した結果が得られなかった。そのためレンチウィルスベクターによる遺伝子導入系を用いる実験計画に変更し、現在、解析を行っている。

(2) HSC-2 細胞において CXCL9 遺伝子の発現抑制に HIF-2 が関与しているかをさらに検討するため、miRNA によるノックダウンにより検討する目的で、HIF-2 miRNA ならびに negative control miRNA 発現レンチウィルスベクターを作製した。選択した 3 種類の miRNA の配列の抑制効率を検討するためリアルタイム PCR 法にて HIF-2 mRNA の発現を検討したところ、抑制率はいずれも 30%程度であり、期待した抑制が得られなかった。作製した HIF-2 miRNA を HSC-2 細胞にトランスフェクションし、低酸素による IFN 誘導性 CXCL9 の抑制効果に及ぼす影響を検討したところ、ノックダウン効率が悪いことから低酸素による抑制作用に対する有意な影響は認められなかった。現在、他の miRNA の

配列の検討ならびに複数の siRNA を用いたノックダウン実験を検討している。

(3) メチル化転移酵素およびメディエーター複合体が IFN 誘導性遺伝子の発現抑制に関与するか否かを検討するために、まず HSC-2 細胞におけるメチル化転移酵素 (PRMT-1 および CARM1) およびメディエーター (CDK8, MED12, MED13, MED26, Cyclin C) の発現をリアルタイム RT-PCR 法にて解析を行なった。その結果、これらメチル化転移酵素およびメディエーター複合体の構成的な mRNA 発現が認められ、低酸素により MED12 mRNA の発現抑制が認められた。現在、メチル化転移酵素およびこれらメディエーター複合体構成因子の CXCL9 遺伝子のプロモーターへのリクルートに対する低酸素の影響、ならびにこれら諸因子の機能解析を行っている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

廣井美紀、大森喜弘 低酸素は IFN 誘導性ケモカイン CXCL9/Mig、CXCL10/IP-10 の発現を抑制する
第 52 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2010 年 9 月 22 日 東京都

〔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

廣井 美紀 (Hiroi Miki)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号：30419717

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：