

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462928

研究課題名(和文)ケモカイン遺伝子の発現制御におけるメディエーター複合体の役割

研究課題名(英文)The role of the Mediator complexes in transcriptional regulation of the chemokine genes

研究代表者

大森 喜弘 (Ohmori, Yoshihiro)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：50194311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：炎症反応や免疫応答には局所の微少環境に存在するサイトカインなど多くの細胞外シグナルによって調節されている。本研究は、様々な細胞外刺激がケモカインなど炎症性遺伝子の発現をどのようにして誘導するのかそのメカニズムの解明を目的としたものである。炎症性サイトカインであるTNF と IFN の共刺激によりケモカイン遺伝子 CXCL9 (Mig)、CXCL10 (IP-10) の発現は相乗的に誘導されたが、転写活性化因子と転写の律速酵素であるRNAポリメラーゼIIとを統合する働きを持つメディエーター複合体 (Mediator complex) CDK8はその発現を負に制御していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory reactions and immune responses are regulated by a diverse array of extracellular stimuli such as cytokines in the tissue microenvironment. The purpose of this study is to elucidate the mechanisms how the extracellular stimuli induce the inflammatory genes including chemokines. Inflammatory cytokines TNF and IFN synergistically induced the expression of chemokine CXCL9, CXCL10 genes and the Mediator complex, which functions to integrate transcriptional activators and RNA polymerase II, negatively regulated the chemokine gene expressions.

研究分野：転写制御

キーワード：転写制御 ケモカイン インターフェロン メディエーター複合体 CDK8 STAT1 CXCL9 CXCL10

1. 研究開始当初の背景

炎症性遺伝子の発現は、サイトカインなど種々な異なる細胞外刺激のクロストークにより正負に制御されている。ヘルパー1型T細胞より産生されるIFN γ とマクロファージ由来のTNF α は、多くの炎症性遺伝子の発現調節において協調的に働くことが知られている。IFN γ により誘導されるケモカインCXCL9(Mig)およびCXCL10(IP-10)遺伝子の発現は、IFN γ とTNF α の共刺激により相乗的に増強する。この相乗的な増強にはIFN γ により誘導される転写因子STAT1とTNF α により誘導される転写因子NF- κ BがコアクチベーターCBPに結合することによりプロモーター上にRNAポリメラーゼを含む転写活性化因子複合体を形成することにより誘導される。

CXCL9およびCXCL10は腫瘍組織での血管新生を抑制し、CD8陽性T細胞やNKT細胞を腫瘍組織に動員し癌の増殖、浸潤を抑制することが報告されており、抗腫瘍性ケモカインとして機能している。また腫瘍局所では腫瘍の増殖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であることが報告されている。これらの知見をもとに我々は低酸素状態におけるこれらIFN γ 誘導性ケモカインの発現を検討した結果、CXCL9およびCXCL10ケモカイン遺伝子の発現抑制が認められた。この低酸素による遺伝子の発現抑制のメカニズムについてクロマチン免疫沈降法を用いて検討したところ上記ケモカイン遺伝子のプロモーター上へのRNAポリメラーゼのリクルートが阻害されることによるものであった。

2. 研究の目的

これら一連の結果から複数の細胞外シグナルによるケモカインなどの炎症性遺伝子の発現制御は、異なる細胞外シグナルにより誘導される転写活性化因子やクロマチン修飾因子、コアクチベーター、さらにメディエーター複合体と呼ばれる介在因子が複雑な転写制御システムを構築することにより制御していると考えられる。これまでにCXCL9およびCXCL10といったIFN γ 誘導性ケモカイン遺伝子の発現に転写活性化因子STAT1とNF- κ Bさらにコアクチベーター等の複合体の形成が必要であることを明らかにしたが、転写活性化因子とRNAポリメラーゼを統合するメディエーター複合体(Fig. 1)の役割に関しては未だ解明されていない。

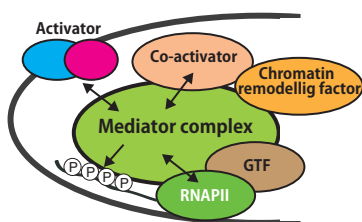


Fig. 1 メディエーター複合体と転写制御因子

そこで本研究はIFN γ およびTNF α により誘導されるケモカイン遺伝子CXCL9、CXCL10の発現誘導ならびに低酸素による発現抑制におけるメディエーター複合体の役割を解明することを目的として行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

口腔扁平上皮癌細胞HSC-2、HSC-3およびヒトグリア芽細胞腫T98G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RPMI1640培地にて24時間前培養した。細胞は通常酸素条件下(20% O₂)ならびに低酸素条件下(1% O₂)にて12時間培養後、IFN γ (10 ng/ml GIBCO)とTNF α (10 ng/ml, R&D Systems)にて8時間刺激し、実験に供試した。

(2) 遺伝子発現解析

細胞を所定の時間低酸素条件下で培養した後、IFN γ (10 ng/ml)とTNF α (10 ng/ml)で8時間刺激後、total RNAをNucleoSpin RNA(Takara)を用いて調製した。抽出したRNAからcDNAを合成し(SuperScript® VIL0 cDNA Synthesis Kit, Invitrogen)、Universal Probe(Roche)を用いてリアルタイム定量RT-PCRを行ない、18S rRNAを内在性コントロールとしてmRNAの発現量を検討した。

(3) タンパク質発現解析

細胞をIFN γ (10 ng/ml)とTNF α (10 ng/ml)にて所定時間培養後、Whole cell lysateを抽出し、SDS-PAGEにて分離、PDVF膜にトランスファー後、抗Med1抗体、抗Med12抗体、抗Med26抗体、抗CDK8抗体(Santa Cruz)を用いてウェスタンブロット法にて検討した。

(4) siRNAによるノックダウン

細胞を6 well plateに播種し、24時間前培養後、コントロールsiRNA(scramble RNA)あるいはCDK8 siRNAをトランスフェクション試薬(Dharmacon)と共に混和し、HSC-2細胞に導入した。siRNAを導入して30時間後、低酸素環境下(1% O₂)あるいは通常酸素環境下(20% O₂)で12時間培養を行い、IFN γ (10 ng/ml)とTNF α (10 ng/ml)で刺激後、total RNAあるいはWhole cell lysateを調整した。

4. 研究成果

(1) メディエーター複合体は構成サブユニットの違いにより、コアメディエーター複合体とコアメディエーター複合体にCDK8モジュールが結合したホロメディエーター複合体が存在する(Fig. 2)。コアメディエーター複合体にはユニークなサブユニットとしてMED26が存在しているが、CDK8モジュールにはCDK8、Cyclin C、MED12、MED13が構成

因子として含まれている。

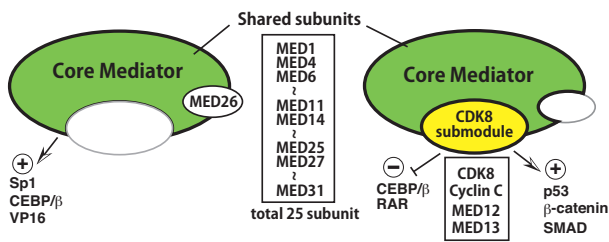


Fig. 2 コアメディエーターと CDK8 メディエーター複合体

まず始めに、口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2 においてどのようなメディエーター複合体のサブユニットの発現が認められるか、またその発現がサイトカイン刺激や低酸素などの影響を受けるのか検討するために、細胞を通常酸素条件下ならびに低酸素環境下 (1% O₂) で前処理後、IFN γ および TNF α にて刺激し、Total RNA を調製し、Real TimePCR 法にて検討した。その結果、HSC-2 では検討したメディエーター複合体すべてのサブユニットの恒常的な発現が認められた。低酸素環境では Med12 の発現が抑制され (Fig. 3A)、逆に Med26 の発現は増強した (Fig. 3B)。また IFN γ と TNF α の刺激では Med26 の発現が抑制された。 (Fig. 3B)

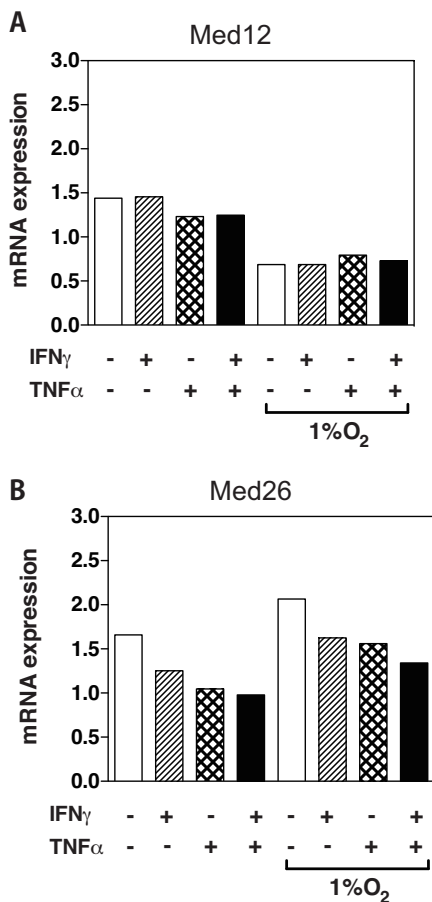


Fig. 3 Med12, Med26 mRNA 発現に及ぼすサイトカイン、低酸素の影響

次に、これらメディエーター複合体のサブユニットのタンパク質が実際に細胞内で発現しているか否かを検討するために、細胞を mRNA 発現解析と同様に通常酸素条件下ならびに低酸素環境下 (1% O₂) で前処理後、IFN γ および TNF α にて刺激し 8 時間後に核抽出液を調製し、ウェスタンブロット法にて検討した。その結果、検討したすべてのメディエーター複合体のタンパク質発現が認められ、mRNA レベルと同様の発現動態を示した。

(2) 本研究を実施中に CDK8 が IFN γ により誘導される転写因子 STAT1 の転写活性に必要なセリン残基 (Ser727) をリン酸化することが報告された。そこで CDK8 の IFN γ 誘導性ケモカイン CXCL9、CXCL10 の発現における役割について検討を行なった。CDK8 の機能解析を行なうために、まず CDK8 siRNA を用いて CDK8 の mRNA レベルでの発現が抑制されるかについて検討した。CDK8 siRNA を HSC-2 細胞に遺伝子導入後、低酸素で 12 時間培養を行ない、CDK8 の発現を Real time PCR 法にて解析した結果、コントロール siRNA を遺伝子導入した場合と比べ、80%以上の抑制が認められた。次に、タンパク質レベルで発現が抑制されるか否かを上記実験条件と同様の方法にて細胞に siRNA を導入し、ウェスタンブロット法にて確認した (Fig. 4)。その結果、CDK8 siRNA を遺伝子導入することにより、CDK8 の発現がタンパク質レベルでも顕著に抑制されていたことから、この条件にて以下の実験を行なった。

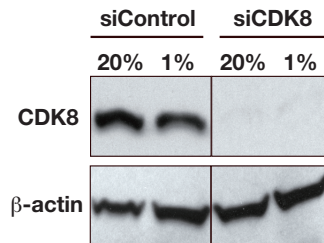


Fig. 4 CDK8 siRNA によるノックダウン

(3) CDK8 が IFN γ および TNF α の共刺激により誘導される IFN γ 誘導性遺伝子の発現に関与しているか否かについて検討するために、上記実験条件にて siRNA を遺伝子導入した細胞を所定時間 IFN γ および TNF α にて刺激後 RNA を抽出し、Real Time PCR 法にて解析した。その結果、IFN γ 単独刺激で誘導される CXCL9、CXCL10 遺伝子発現は CDK8 のノックダウンでは抑制されず、逆に増強傾向が認められた (Fig. 5, Fig. 6)。この結果は、CXCL9、CXCL10 遺伝子は STAT1 依存性であるが転写活性化領域の Ser727 のリン酸化に CDK8 は関与していない、あるいは CXCL9、CXCL10 遺伝子の発現に STAT1 の Ser727 のリン酸化は必要ない可能性が考えられた。

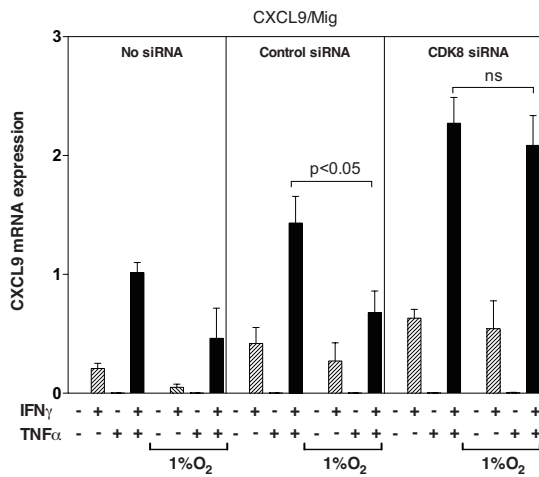


Fig. 5 CDK8 のノックダウンは CXCL9 mRNA の発現を増強する

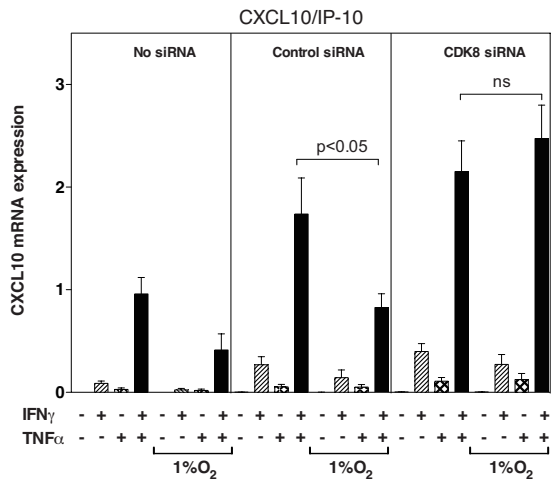


Fig. 6 CDK8 のノックダウンは CXCL10 mRNA の発現を増強する

次に IFN γ 単独刺激による CXCL9、CXCL10 の発現は低酸素で抑制されたが、その発現抑制は CDK8 のノックダウンで回復傾向が認められた。さらに IFN γ と TNF α の共刺激で誘導される CXCL9 遺伝子の発現は、CDK8 のノックダウンで増強した。そしてこの相乗的な CXCL9、CXCL10 遺伝子発現も低酸素により有意に抑制されたが、この発現抑制は CDK8 をノックダウンすることによりほぼ完全に回復した。

これら結果は、IFN γ 、TNF α の共刺激により誘導される転写因子 STAT1 と NF- κ B を介した CXCL9、CXCL10 遺伝子発現ならびに低酸素による抑制に CDK8 が負に制御していることを示唆している。CDK8 を介した IFN γ と TNF α の共刺激で誘導される CXCL9 遺伝子の発現抑制メカニズムとして、CDK8 が RNA ポリメラーゼの CTD をリン酸化する事により RNA ポリメラーゼの転写開始前複合体へのリクルートを阻害すること、あるいは CDK8 が転写制御因子やヒストンをリン酸化する事により転写を抑制する可能性が考えられる。今後これらの可能性について CXCL9、CXCL10 遺伝子のプロモーター上に CDK8 がリクルートされているのか、また RNA ポリメラーゼの CTD のリン酸化状態やメディエーター複合体の他のサブユニットのリクルート、ヒスト

ンの修飾に関してもクロマチン免疫沈降法にて検討する必要がある。

(4) この CDK8 による負の制御が CXCL9、CXCL10 以外の IFN γ 誘導性遺伝子の発現にも認められるのか検討するために、CDK8 siRNA にてノックダウン後、所定時間 IFN γ および TNF α の共刺激を行ない、Real time PCR 法にて検討した。その結果、CXCL9、CXCL10 遺伝子と同様に CDK8 の関与が認められる遺伝子と CDK8 の関与のない遺伝子群が存在していた。これらの遺伝子群はいずれも STAT1 依存性である事から、その発現制御にはプロモーター/エンハンサー領域における CDK8 以外のメディエーター複合体サブユニットや他の転写制御因子が深く関与している可能性が考えられた。

今後の予定としては CDK8 が関与するケモカイン遺伝子 CXCL9、CXCL10 遺伝子発現における制御メカニズムを解析してゆくだけでなく、CDK8 の転写制御に細胞特異性が認められるかなどについても解析を進めて行く。本研究では口腔癌扁平上皮癌細胞における CDK8 の役割を検討したが他の固形腫瘍由来の細胞株においても負の制御に関与しているのか、また正常上皮細胞においても腫瘍細胞と同様の CDK8 による制御機構が存在するのかなど検討する必要がある。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

1) ケモカイン遺伝子のメディエーター複合体による転写制御. 廣井美紀、大森喜弘. 歯科基礎医学会学術大会 2014、福岡国際会議場

〔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

大森 喜弘 (Yoshihiro Ohmori)
明海大学・歯学部・教授
研究者番号：50194311

(2) 研究分担者

廣井 美紀 (Miki Hiroi)
明海大学・歯学部・講師
研究者番号：30419717

(3) 連携研究者

なし