

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592158

研究課題名（和文） 転写因子STAT1による炎症性遺伝子の発現抑制機構

研究課題名（英文）

Mechanism of Transcriptional Repression of Inflammatory Gene Expression by STAT1

研究成果の概要：

免疫担当細胞であるマクロファージは、細菌の菌体成分であるリポ多糖(LPS)やリンパ球から産生される情報伝達因子であるインターフェロン(IFN)の刺激により活性化し、様々な生体防御に関係する遺伝子を発現誘導する。一方、IFNは、マクロファージの遺伝子発現を増強するだけでなく、負の調節にも関与しているがそのメカニズムの詳細は不明であった。本研究課題では、IFN γ によって活性化する転写因子(STAT1)がLPSによって誘導される遺伝子発現の負の制御にも関与していることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計			4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯学

キーワード：シグナル伝達、遺伝子制御、マクロファージ、炎症性遺伝子、リポ多糖、インターフェロン、STAT1、ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

細菌感染などによって惹起された炎症性病変局所では細菌由来の菌体成分や免疫担当細胞由来のサイトカインなど複数の細胞外シグナルによって宿主細胞の機能が制御されている。従来からグラム陰性細菌由来のリポ多糖 (LPS) とヘルパー 1 型 T 細胞 (Th1) 由来のインターフェロン・ガンマー (IFN γ) は抗細菌活性などのマクロファージの活性化を誘導し、ケモカインなどの炎症性遺伝子の発現を相乗的に誘導することが知られている。一方、IFN γ は、マクロファージにおける炎症性遺伝子発現を増強するだけでなく抑制的にも作用することが知られているがその分子機構の詳細は不明であった。

2. 研究の目的

本研究課題では、LPS によって誘導されるケモカイン遺伝子 CXCL1/KC をモデル遺伝子として、IFN γ がどのようなメカニズムにより CXCL1 遺伝子の発現を抑制するのか検討する。特に IFN γ によって誘導される転写因子 STAT1 (Signal Transducer and Activator of Transcription 1) に着目し、その関与と分子機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養：マウス腹腔マクロファージとして STAT1 ノックアウトマウス (Dr. Schreiber, Washington University より分与) 由来ならびに野生型マウス (129/B6) 由来のマクロファージを供試した。腹腔マクロファージは、チオグリコレート培地をマウス腹腔内に投与し、浸潤してくる細胞より通法に従い調製した。またマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞も供試した。

(2) 遺伝子発現解析：Northern Blot 法にて検討した。すなわち、腹腔マクロファージならびに RAW264.7 細胞を LPS、IFN γ にて所定の時間刺激後、グアニジン/CsCl 法により total RNA を調製後、アガロースゲルにて分離し、ナイロンメンブレン上に転写した。その後、 ^{32}P によって標識した特異的 cDNA プロ

ーブにて mRNA の発現を検討した。

(3) 転写因子の DNA 結合活性の検討：

EMSA 法 (electrophoretic mobility shift assay) にて検討した。すなわち、RAW264.7 細胞を LPS、IFN γ にて所定の時間刺激後、細胞より核タンパク質を調製し、 ^{32}P によって標識した CXCL1 遺伝子の NF- κ B 結合配列をもつ DNA プローブあるいは STAT1 の結合配列をもつ DNA プローブと反応後、PAGE にて分離した後、オートラジオグラフィーにて検出した。

(4) ルシフェラーゼレポーターアッセイ：

マウス CXCL1/KC 遺伝子の 5' -転写制御領域を持つルシフェラーゼレポーターコンストラクトをマウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞へ一過性遺伝子導入し、LPS、IFN γ にて所定の時間刺激後、ルシフェラーゼアッセイを行った。

4. 研究成果

(1) マウス腹腔マクロファージにおける LPS によって誘導される CXCL1 の遺伝子発現をノーザンブロット法にて検討した。野生型マウス由来の腹腔マクロファージでは CXCL1 mRNA の発現が LPS 刺激により認められ、この発現誘導は IFN γ 処理により抑制された。一方、STAT1 ノックアウトマウス由来の腹腔マクロファージでは、この IFN γ による CXCL1 mRNA の発現抑制は認められなかった。この結果は、IFN γ による CXCL1 遺伝子の発現抑制には転写因子 STAT1 が関与していることを示している。また、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞においても LPS によって誘導される CXCL1 遺伝子の発現誘導は、IFN γ 処理により抑制された。

(2) この IFN γ によって抑制される CXCL1/KC

遺伝子の転写制御機構を明らかにするため、CXCL1/KC 遺伝子の 5' -転写制御領域のどの領域が必要であるのかルシフェラーゼレポーターコンストラクトを作製し、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞にトランスフェクションして検討した。その結果、LPS によって誘導されるルシフェラーゼ活性は、CXCL1/KC 遺伝子プロモーター領域-474bp を含むレポーターコンストラクトにおいて IFN γ による抑制効果が認められた。この領域の配列解析を行ったが STAT1 の結合配列は認められなかった。一方、この領域には NF- κ B の結合配列が存在し、LPS による CXCL1/KC 遺伝子の転写活性化には NF- κ B が必須であることから IFN γ が NF- κ B の活性化を抑制する可能性が示唆された。

(3)そこで LPS によって活性化する NF- κ B が IFN γ により抑制されるか否かゲルシフトアッセイにより検討を行った。しかしながら IFN- γ は LPS により活性化される NF- κ B の核内移行、DNA 結合活性に対しては影響は認められなかった。

(4)これらの結果は、IFN γ による情報伝達経路、あるいは IFN γ によって誘導される STAT1 が直接 NF- κ B の活性化、DNA 結合活性を抑制するものではなく、IFN γ によって誘導された STAT1 と LPS によって活性化した NF- κ B が核内において転写活性化に必要な共通のコアクチベーターを競合することで NF- κ B 依存性の CXCL1/KC 遺伝子の転写活性を抑制する可能性が示唆された。

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)

[学会発表] (計 1 件)

1) 廣井 美紀、大森 喜弘

マウスマクロファージにおけるインターフェロン γ による炎症性ケモカイン遺伝子の発現抑制機構、第50回歯科基礎医学会総会、2008年9月25日、東京

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

関根 圭輔 (SEKINE KWISUKE)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号 : 00323569