

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791360

研究課題名（和文） 低酸素によるインターフェロン・ガンマー誘導性遺伝子の転写抑制機構の解析

研究課題名（英文） Transcriptional repression of interferon-gamma-inducible gene by hypoxia

研究代表者 廣井美紀  
(HIROI MIKI)

研究者番号：30419717

研究成果の概要（和文）：

腫瘍局所へのヘルパー1型T細胞の動員はIFN $\gamma$ により誘導されるケモカインMig/CXCL9およびIP-10/CXCL10が関与している。一方、腫瘍の増大に伴い酸素供給が抑制された腫瘍細胞は低酸素状態に陥る。これまでに口腔扁平上皮癌細胞における低酸素状態がCXCL9およびCXCL10遺伝子の発現を抑制すること、またこの遺伝子発現の抑制がIFN $\gamma$ により活性化される転写因子STAT1シグナル伝達経路の抑制ではなく、コアクチベーターやRNAポリメラーゼIIを含むエンハンセオソームの形成阻害によることを明らかにした。STAT1依存的転写活性は、STAT1のチロシン残基(Tyr 701)のリン酸化だけでなく、セリン残基(Ser727)のリン酸化も関与している。そこで本研究課題では低酸素によるIFN $\gamma$ 誘導性遺伝子発現抑制にSTAT1 Ser 727リン酸化が関与しているかについて検討した。その結果、低酸素によるSer727のリン酸化の抑制は細胞特異的であること、またSTAT1のSer727をGluに変異させた細胞でも低酸素によるCXCL9およびCXCL10の発現抑制は解除されないことが明らかとなった。これらの結果から、低酸素によるIFN $\gamma$ 誘導性遺伝子発現の抑制にSTAT1 Ser 727リン酸化は関与しない可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) is a pleiotropic cytokine that exerts anti-tumor activity to various cancer cells. IFN $\gamma$  induces Mig/CXCL9 and IP10/CXCL10, members of the CXC chemokine family, have been shown to induce potent lymphocyte chemotaxis and play an important role in tumor rejection. In the tumor microenvironment, most solid tumors develop regions of low oxygen tension called hypoxia, which is due to an imbalance in oxygen supply and consumption. We have previously shown that hypoxia inhibited the IFN- $\gamma$  induced expression of chemokines CXCL9 and CXCL10 in human tumor cell lines. Although hypoxia (1% O<sub>2</sub>) markedly inhibited IFN- $\gamma$  -induced expression of CXCL9 and CXCL10 mRNAs in human oral squamous carcinoma cell line, hypoxia had no effect on the levels of tyrosine-phosphorylated and nuclear-translocated STAT1. Furthermore,

Chromatin immunoprecipitation assay demonstrated that although STAT1 was recruited to the promoter region of the CXCL9 and CXCL10 gene under hypoxia, recruitments of RNA polymerase II and coactivator SRC-1 was inhibited under hypoxia. In the present study, we further investigated the mechanisms by which hypoxia down-regulates the IFN- $\gamma$ -induced CXCL9 and CXCL10 gene expression. IFN- $\gamma$ -induced phosphorylation of STAT1 (Ser727) was down-regulated under the hypoxia in HSC-2 cell. However, the inhibitory effect of hypoxia on the phosphorylation was not observed in HSC-3 and T98G cells, suggesting that the inhibition of STAT1 Ser727 by hypoxia is a cell-type specific phenomenon. Furthermore, U3A cells transfected with mutant STAT1 in which Ser727 had been mutated to Glu, which mimics the phosphorylated status of Ser727, were also inhibited by hypoxia for the IFN- $\gamma$ -induced CXCL9 and CXCL10 gene expression. Taken together these results suggest that the inhibition of STAT1 Ser727 does not involved in the inhibition of IFN- $\gamma$ -induced gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

|          | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|----------|-----------|---------|-----------|
| 平成 20 年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 平成 21 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度       |           |         |           |
| 年度       |           |         |           |
| 年度       |           |         |           |
| 総計       | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

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：ケモカイン、低酸素、インターフェロン、転写

1. 研究開始当初の背景

IFN $\gamma$ はヘルパーI型T細胞、NK細胞により産生される抗腫瘍性サイトカインである。このIFN $\gamma$ による抗腫瘍性は、IFN $\gamma$ により活性化される転写因子STAT1により誘導されるSTAT1依存性遺伝子産物により担われている。一方、腫瘍細胞が増大すると、その増大スピードに見合った血管新生がなされないために、腫瘍細胞は低酸素状態に陥る。これまでに低酸素によりIFN $\gamma$ 誘導性遺伝子発現が抑制することを明らかにしたが、その分子機構の詳細は不

明であった。

2. 研究の目的

これまでIFN $\gamma$ 誘導性ケモカインCXCL9およびCXCL10遺伝子における低酸素による遺伝子発現の抑制メカニズムについて検討を行ってきた。その結果、IFN $\gamma$ により活性化される転写因子STAT1のシグナル伝達経路を抑制しないが、コアクチベーターやRNAポリメラーゼIIを含むエンハンセオソーム形成阻害により起こることを明らかにした。本研究課題では、低酸素によるIFN $\gamma$ 誘導性遺伝子の転写抑制に関

与するメカニズムをさらに詳細に検討することを目的とし、STAT1 の転写活性にとって必須である Ser727 のリン酸化が低酸素による抑制に関与しているか否か検討を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養

口腔扁平上皮癌細胞 HSC-2、HSC-3 およびヒト神経膠芽腫細胞株 T98G 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。また、STAT1 欠損細胞株 U3A 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。細胞は、低酸素(1%O<sub>2</sub>)にて 12 時間培養後、IFN $\gamma$  (10 ng/ml)にて 8 時間刺激し実験に供試した。

#### (2) レンチウイルスベクターの作製

STAT1 Ser727 をアラニンに置換した発現ベクター(S727A)ならびにセリン残基のリン酸化を模倣するためグルタミン酸に置換した発現ベクター(S727E)を作製した。

#### (3) STAT1 Ser727 リン酸化の検討

細胞を所定時間刺激後、Whole cell lysate を抽出し、抗 STAT1 抗体、抗 STAT1 Ser727 リン酸化抗体を用いてウェスタンブロット法にて検討した。

#### (4) 遺伝子発現解析

STAT1 欠損細胞株 U3A 細胞に上記 STAT1 野生型および変異型発現ベクターを遺伝子導入し、48 時間後に低酸素および IFN $\gamma$  にて所定の時間刺激を行い、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 real time PCR を行い、mRNA の発現を検討した。

また、低酸素による IFN $\gamma$  誘導性遺伝子発現抑制にヒストンアセチル化が関与しているか否かを検討するために、トリコスタチン A(1  $\mu$  M)にて 1 時間前処理後、低酸素および IFN $\gamma$  にて所定の時間刺激を行ない、同様の方法で検討した。

### 4. 研究成果

(1) 低酸素による IFN $\gamma$  誘導性遺伝子発現抑制に STAT1 Ser727 リン酸化が関与するかを検討するために、STAT1 Ser727 のリン酸化が低酸素により抑制されるか否かをウェスタンブロット法により検討した。HSC-2 細胞では低酸素による STAT1 Ser 727 リン酸化の抑制が認められた。しかしながら、低酸素による IFN $\gamma$  誘導性遺伝子の発現抑制が認められる他の癌細胞株(HSC-3 および T98G)では低酸素による STAT1 Ser 727 のリン酸化抑制が認められなかった。この結果は、低酸素による STAT1 Ser 727 リン酸化の抑制が細胞特異的に影響している可能性が考えられた。

(2) 次に STAT1 Ser727 のリン酸化が IFN $\gamma$  誘導性遺伝子発現に影響するか否かについて検討を行なった。すなわち、STAT1 野生型、STAT1 Ser727Glu および STAT1 Ser727Ala 変異体を有するウイルスベクターを作製し、U3A 細胞に感染させリアルタイム PCR 法を行なった。その結果、Ser727 を Glu に変異させリン酸化状態を模倣した変異体 STAT1 (Ser727Glu)を過剰発現させた細胞でも、低酸素により IFN $\gamma$  誘導性遺伝子発現の抑制が認められた。

上記(1)および(2)の結果から、低酸素による

IFN $\gamma$  誘導性遺伝子発現抑制に STAT1 Ser727 リン酸化の抑制は関与していない可能性が示唆された。そこで次に低酸素による CXCL9 および CXCL10 遺伝子発現抑制に関与するメカニズムとしてアセチル化、脱アセチル化の関与およびメチル化修飾などの関与が考えられたのでまずアセチル化について検討を行った。

(3) 低酸素による IFN $\gamma$  誘導性遺伝子発現抑制にアセチル化、脱アセチル化が関与するか否かを検討するために、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)抑制剤であるトリコスタチン A (TSA)を用いてリアルタイム PCR 法により検討した。その結果、TSA 処理により IFN $\gamma$  誘導性 CXCL9、CXCL10 遺伝子発現は抑制された。しかしながら低酸素によるこれら IFN $\gamma$  誘導性遺伝子発現の抑制は回復しなかった。この結果は、低酸素による IFN $\gamma$  誘導性 CXCL9、CXCL10 遺伝子発現の抑制に HDAC の関与はない可能性が示唆された。現在は低酸素によるメチル化修飾の関与について検討を行っている。

#### 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 0 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

#### 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：