

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 24 年 12 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890098

研究課題名（和文）

インターロイキン 6 によるヒストン修飾と炎症性貧血の病態制御機構の解明

研究課題名（英文）

Analysis of epigenetics induced by Interleukin 6

研究代表者

磯部 智康 (ISOBE TOMOYASU)

大阪大学・大学院工学研究科・特任助教

研究者番号：40402341

研究成果の概要（和文）：

慢性炎症の場では、継続的に産生される炎症性サイトカインにより、様々な遺伝子の発現が攪乱される。我々は炎症性サイトカインによるエピジェネティクス制御に着目し、IL-6 刺激時に特異的に変動する遺伝子プロモーター上のヒストン修飾を見出した。一方、我々は同時に慢性炎症に伴う発癌に着目し、多くの癌で見られるエピジェネティックな異常であるゲノムワイドな DNA の低メチル化について、炎症性サイトカインの作用による DNA 脱メチル化機構を説明する新たなモデルの提示に成功した。

研究成果の概要（英文）：

In chronic inflammation disease, constitutively produced inflammatory cytokines perturb various gene expression mechanisms. We focused on epigenetic regulation of gene expression, and found several modifications on histone which were specifically altered by IL-6. On the other hand, we proposed a novel model which could explain aberrant regulation of epigenetics in inflammatory-associated cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：炎症、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

炎症の場では、免疫担当細胞から炎症性サイトカインが分泌され、これらが相互作用、クロストークしながら局所および全身の炎症反応を惹起する。これらの過剰産生は慢性炎症疾患の原因となり、我々の研究グループは炎症性サイトカイン インターロイキン 6 (IL-6) がキャッスルマン病や関節リウマチ

の病態の中心的役割を果たすことを明らかにしてきた (Yoshizaki et al, 1989 *Blood*; Nishimoto et al, 2000 *Blood* ほか)。炎症性サイトカインは主として標的細胞表面に存在する受容体を介して細胞内のシグナル伝達経路を活性化し、遺伝子発現を制御することで機能を発揮すると考えられている。申請者らは特に分子レベルでの IL-6 下流のシ

グナル伝達経路に焦点を当て、標的遺伝子プロモーター上での転写因子複合体の形成や、ヒストンアセチル基転移酵素 (HAT) の寄与など、標的遺伝子の転写制御の解析を中心にその標的遺伝子発現機序の研究に携わってきた (Nishikawa et al, 2008 *J Immunol*; Hagihara et al, 2005 *Genes Cells* ほか)。

近年、我々の研究室では、キャッスルマン病患者において、鉄代謝を制御する血中ポリペプチド Heparin が IL-6 により過剰産生され、二次性貧血の原因となることを報告し (Song et al, 2010 *Blood*)、その転写制御機構を解析中である。キャッスルマン病では血中 Heparin レベルが高く、約 90% の患者で貧血症状がみられるのに対し、同様に IL-6 の過剰産生がみられる関節リウマチ患者では顕著な Heparin レベルの亢進は認められず、貧血の頻度も低い (Song et al, 投稿中)。

我々はキャッスルマン病患者の血清中に IL-6 以外にも Heparin 発現誘導因子が存在することを示している (Song et al, 2010 *Blood*)。マウスの遺伝学的解析から、IL-6 は骨形成タンパク質 (BMP) 下流シグナルに依存して Heparin の発現を制御することが分かっている。実際に我々もキャッスルマン病患者の血清中に BMP が高レベルに含まれることを確認しており (未発表データ)、BMP はこの有力な候補分子である。しかしながら、我々は BMP シグナルを阻害した場合にも、IL-6 下流の転写因子 STAT3 が Heparin プロモーターへ動員されることを見出しており (未発表データ)、「転写因子の動員」のみでは両シグナルの協調作用の説明がつかない。

従来、炎症性サイトカインによる転写因子の活性化とその標的遺伝子プロモーター上への動員の研究が成され、数々の成果があげられてきたが、種々の慢性炎症疾患で引き起こされる特徴的な二次性の症状や疾患 (炎症性貧血や発癌など) の発症機序を完全に理解するには至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、近年急速に研究が進んできたヒストンのメチル化修飾による転写制御を中心に、炎症性サイトカインによるヒストンおよび DNA 修飾・クロマチン動態の制御にアプローチし、慢性炎症疾患の病態解明を目指す。このため、本研究では第一に、IL-6 による Heparin の発現制御をモデルにヒストン修飾制御を解析する。さらに、種々の慢性炎症疾患で引き起こされる特徴的な二次性の症状や疾患 (炎症性貧血や発癌など) の発症機序の解明を目指して行く。

3. 研究の方法

本研究では培養細胞を用い、炎症性サイト

カイン インターロイキン 6 (IL-6) による Heparin の発現制御モデルを中心に、「ヒストン修飾の制御」および「DNA 修飾の制御」という視点から遺伝子発現制御機構を解析している。

4. 研究成果

我々はヒストン修飾に特異的なモノクローナル抗体を用い、2種類の培養肝細胞株を用いてクロマチン免疫沈降法によるヒストン修飾の解析実験を立ち上げた。予備検証としてハウスキーピング遺伝子 GAPDH (転写が盛んに行われている遺伝子の例で、転写型のヒストン修飾を受けていることが予想される) および、成体肝細胞で発現のない遺伝子 β -globin (転写が抑えられている遺伝子の例で、非転写型の修飾を受けていることが予想される) のプロモーター領域のヒストン修飾の解析を行い、機能既知の6種のヒストン修飾について、過去の報告に一致した結果が得られた。

続いて、本題である Heparin プロモーター領域について、上記6種のヒストン修飾の解析を行った。この結果、IL-6、BMP-2とも、Heparin の転写を誘導することを確認済みであるが、解析したヒストン修飾中で IL-6 刺激特異的に変動するものを見出した (図 1)。

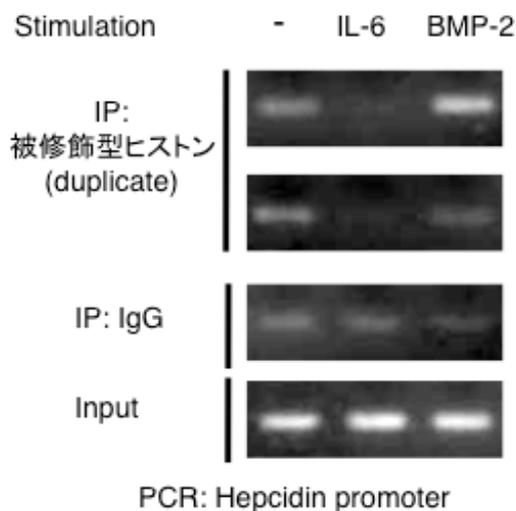


図1 IL-6 刺激特異的に変動するヒストン修飾

Heparin 遺伝子は IL-6 や BMP-2 刺激にตอบสนองして発現が誘導される。我々はこれらの刺激にตอบสนองして変動するヒストン修飾を解析し、遺伝子発現を抑制する修飾のうちの一つに、IL-6 刺激特異的にそのレベルが低下するものを見出した。

上記 GAPDH や β -globin 等、個々の細胞の基本性能を決める静的な転写制御ではなく、

サイトカイン刺激による動的な転写制御について、個々のサイトカインに対応した特異的なヒストン修飾の制御を明らかにした報告は、世界的にもまだ数が少ない。また、本研究結果は IL-6 と BMP-2 による Heparin 発現誘導の差異を、従来の転写因子の活性化とは異なる視点から捉える足がかりとなる。本研究結果は第 36 回日本分子生物学会で発表見込みである。

一方、我々は同時に、慢性炎症に伴う疾患の一つとして、炎症からの発癌に着目し、多くの癌で見られるエピジェネティックな異常である、ゲノムワイドな DNA の低メチル化の誘導について、その分子メカニズムと炎症性サイトカインの寄与の解明にアプローチした。

Activation-induced cytidine deaminase (AID) は、免疫グロブリンの多様化に寄与する遺伝子で、その遺伝子産物は DNA の点変異導入を直接触媒する酵素活性を有する。ヒトの種々の臓器の癌で AID の異所的な発現と、それに伴う癌抑制遺伝子への点変異導入が報告されており、この異所的な発現の少なくとも一部は慢性炎症における炎症性サイトカイン TNF- α の過剰産生によるとされている。近年の遺伝学的な研究で、AID が点変異の導入のみならず、エピジェネティックな遺伝子発現制御の標識の 1 つ、DNA の能動的脱メチル化に寄与することが示唆されている。我々はこれに着目し、AID を異所的に発現させた細胞では、正常な遺伝子発現制御が攪乱されることを示した。さらに、このような細胞では、リンパ球で特異的に発現して AID の発現を正に制御する転写因子 Pax5 の発現が誘導されており、この遺伝子のプロモーター領域のメチル化レベルが低下していることを見出した。すなわち、異所的に発現した AID は、種々の癌抑制遺伝子に点変異を導入するのみならず、DNA の脱メチル化を介して正常な遺伝子発現制御を攪乱し、ひいては自身の発現をさらに増強する、Auto-activation circuit を形成することが示唆された。これにより、癌抑制遺伝子への点変異導入および、異常な遺伝子発現の誘導がより効率的に惹起され、発癌あるいは癌の悪性化が引き起こされると考えられる (図 2)。

癌細胞においては部位特異的な DNA の高メチル化とゲノムワイドな低メチル化が起こり、遺伝子発現制御やゲノムの不安定性に寄与することは古くから知られていたが、特に後者については、そのメカニズムはほとんど不明であった。

また、慢性炎症が発癌の重要なリスクファクターであることは古くから指摘されており、かつ広く受け入れられているが、そのメカニズムも明らかにされていない。AID は炎症性サイトカイン TNF- α によって発現が誘導

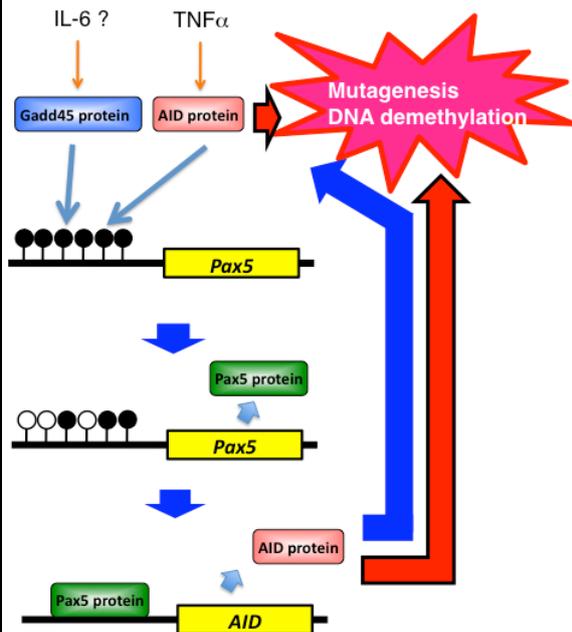


図2 AIDの自己活性化回路の形成モデル

Pax5はリンパ球で特異的に発現し、AIDの発現を正に制御する転写因子である。リンパ球以外の細胞では、Pax5 のプロモーター領域は高度にメチル化され、その発現が抑制されている。炎症性サイトカインの作用等で異所的に発現が誘導されたAIDは、Pax5プロモーターに作用し、そのメチル化レベルを下げる。これにより Pax5の異所的な発現が誘導され、AIDプロモーターに作用してAIDの発現を増強する。こうして発現が増強されたAIDにより、点変異の導入や癌関連遺伝子プロモーターの低メチル化が、より効率的に行われる。

されることが報告されている。我々はAIDのメチル化プロモーターへの作用が、ストレスシグナルのモジュレーターGadd45 と協調的に起こることを示しているが、ある種の細胞において、Gadd45 の発現が TNF- α と並ぶ代表的な炎症性サイトカイン IL-6 により誘導されることが報告されている。我々が本研究で得た知見は、炎症性サイトカインによるエピジェネティックな遺伝子発現制御炎症性サイトカインの作用による DNA 脱メチル化機構を説明する新たなモデルを提案するもので、さらなる発展が期待される。本成果は、*FEBS Letters* 誌に採択され、現在印刷中である。

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 2 件)

1. Isobe, T., Soken-Nakazawa, J-S., Tiwari, P., Ito,

H., Yamaguchi Y. and Yoshizaki, K. Activation-induced cytidine deaminase auto-activates and triggers aberrant gene expression. *FEBS Lett* in press.

2. Tiwari, P., Tripathi, LP., Nishikawa-Matsumura, T., Ahmad, S., Soken-Nakazawa, J-S., Isobe, T., Mizuguchi, K. and Yoshizaki, K. Prediction and experimental validation of putative non-consensus binding site for transcription factor STAT3 in Serum amyloid A gene promoter. *Biochim Biophys Acta* **1830**, 3650-3655, 2013.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯部 智康 (ISOBE TOMOYASU)

大阪大学・大学院工学研究科・特任助教

研究者番号：40402341

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

()

研究者番号：