



Title	線維芽細胞に存在する炎症増幅回路の活性化分子Hmgcs1の解析
Author(s)	板東, 秀典
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56145
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (板 東 秀 典)

論文題名

線維芽細胞に存在する炎症増幅回路の活性化分子Hmgcs1の解析

論文内容の要旨

(研究目的)

慢性歯周炎等の慢性炎症性疾患の発症には炎症性サイトカイン及びケモカインが重要な働きをしていることが知られている。血管内皮細胞や線維芽細胞などの非免疫系細胞にはその炎症性サイトカインやケモカインの産生を増幅させる働きがあり、このメカニズムは炎症回路と名付けられている。これまでの研究から、非免疫系細胞内でSTAT3とNF- κ Bが同時に活性化することが炎症回路に必要であると分かっている。炎症回路を活性化する分子としてHmgcs1が候補として挙げられており、このHmgcs1は細胞質でメバロン酸経路に関わる酵素として知られていたが、炎症への関与についてはこれまで報告はなかった。そこで、本研究では、Hmgcs1の炎症回路への関与を*in vitro*系にて詳細に解析することを目的とした。

(材料及び方法)

1. Hmgcs1遺伝子ノックダウン細胞株の作製および遺伝子ノックダウンの評価

マウス大腿骨由来血管内皮細胞株BC-1細胞に非標的配列およびHmgcs1特異的なshRNAを含むレンチウイルスを感染させコントロール細胞 (mock細胞) およびHmgcs1遺伝子ノックダウン細胞 (sh細胞) を作製した。各々の細胞からmRNAを回収し、cDNA化した後にReal-time PCRを行い、Hmgcs1遺伝子の発現を評価した。

2. Hmgcs1による炎症回路の制御機構の解析

mock細胞とsh細胞にサイトカイン刺激を24時間行った後の上清を回収し、ELISA法にてIL-6の産生量を評価した。またサイトカイン刺激3時間後にmRNAを回収し、cDNA化した後にReal-time PCRを行い、IL-6の発現を評価した。さらに同様にしてNF- κ B標的遺伝子*Cxcl5*およびSTAT3標的遺伝子*Socs3*の発現を評価した。

3. Hmgcs1によるNF- κ B経路の活性化の評価

mock細胞およびsh細胞にサイトカイン刺激を行い、0、5、15、30分後に細胞を溶解しタンパク質を回収した。ウェスタンブロッティング法にてI κ B α のリン酸化および分解、そしてNF- κ Bサブユニットの一つであるp65のリン酸化を評価した。

4. Hmgcs1による転写機構の制御の評価

mock細胞とsh細胞にサイトカイン刺激を0、60、120分行った後に37%ホルムアルデヒドにて固定し、細胞を溶解した。溶解産物に対して抗p65抗体、抗p300抗体および抗RNA polymerase II 抗体を用いて免疫沈降法を行い、その後タンパク質を分解してDNAのみを回収した。Real-time PCR法にてNF- κ B標的プロモーター領域でのp65、p300およびRNA polymerase II のDNAへの結合を評価した。

5. Hmgcs1によるクロマチン構造の評価

mock細胞とsh細胞にサイトカイン刺激を0、60分行った後に細胞を溶解した。溶解産物に対してDNase I を処理するものと処理しないものに分け、カラムを用いてDNAを回収した。それぞれのサンプルに対してReal-time PCRを行い、それぞれのデータをもとにNF- κ B標的プロモーター領域におけるクロマチン構造の開裂を評価した。

さらに、上記4. 項の実験方法と同様に細胞を溶解した後に、抗ヒストンH3K18アセチル化抗体を用いて免疫沈降法を行い、タンパク質を分解してDNAのみを回収した。Real-time PCR法にてNF- κ B標的プロモーター領域でのヒス

トンH3K18のアセチル化を評価した。

6. *Hmgcs1*過剰発現によるNF- κ B経路の活性化の評価

ヒト胎児腎細胞株であるHEK293T細胞に空ベクター、*Hmgcs1*遺伝子翻訳領域を組み込んだベクターおよびp65遺伝子翻訳領域を組み込んだベクター、そして*Il-6*プロモーター領域またはNF- κ B標的プロモーターの下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだベクターと内在性コントロールとしてウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだベクターをPEI法にて導入した。その後、サイトカイン刺激5時間後に各ルシフェラーゼ活性を評価した。

(結果)

1. *Hmgcs1*遺伝子ノックダウン細胞株の作製および遺伝子ノックダウンの評価

mock細胞に比べsh細胞では*Hmgcs1*遺伝子の発現は有意に抑制された。

2. *Hmgcs1*による炎症回路の制御機構の解析

mock細胞に比べsh細胞ではサイトカイン刺激のIL-6タンパク質の産生量および*Il-6*、*Cxcl5*遺伝子の発現は有意に抑制された。しかし*Socs3*遺伝子の発現はmock細胞とsh細胞間で変化はなかった。

3. *Hmgcs1*によるNF- κ B経路の活性化の評価

mock細胞およびsh細胞間でI κ B α のリン酸化および分解、そしてp65のリン酸化は明らかな差は認められなかった。

4. *Hmgcs1*による転写機構の制御の評価

mock細胞に比べてsh細胞ではサイトカイン刺激後のNF- κ B標的プロモーター領域におけるp65、p300およびRNA polymerase IIのDNAへの結合が抑制された。

5. *Hmgcs1*によるクロマチン構造の状態の評価

mock細胞に比べてsh細胞ではサイトカイン刺激後のNF- κ B標的プロモーター領域におけるクロマチン構造の開裂が有意に抑制された。さらに、mock細胞に比べてsh細胞ではサイトカイン刺激後のNF- κ B標的プロモーター領域におけるヒストンH3K18アセチル化が有意に抑制されていた。

6. *Hmgcs1*過剰発現によるNF- κ B経路の活性化の評価

空ベクターを導入した細胞に比べて、*Hmgcs1*遺伝子を導入した細胞ではサイトカイン刺激後の*Il-6*プロモーターおよびNF- κ B標的プロモーター下流のルシフェラーゼ活性が有意に上昇した。

(考察および結論)

本研究から*Hmgcs1*はSTAT3ではなくNF- κ Bを制御することで炎症回路を活性化することが明らかとなった。*Hmgcs1*ノックダウン細胞を用いた*in vitro*での解析の結果、*Hmgcs1*ノックダウン細胞では、細胞質においてTNF α 刺激後のNF- κ Bサブユニットp65のリン酸化、I κ B α のリン酸化と分解はコントロール細胞と比べて変化は見られなかった。このことから*Hmgcs1*は細胞質でのNF- κ B経路の活性化には寄与していないだろうと考えられた。そこで核内において、NF- κ B標的プロモーター領域でのp65、p300及びRNAポリメラーゼIIのDNAへの結合を調べたところ、コントロール細胞に比べて*Hmgcs1*遺伝子ノックダウン細胞ではそれぞれの現象が抑制されていた。さらに*Hmgcs1*ノックダウン細胞株では、NF- κ B標的プロモーター領域において、クロマチン構造の開裂が抑制され、そしてクロマチン構造の開裂に必要なヒストンH3のアセチル化が抑制されていた。このことから*Hmgcs1*は核内にてNF- κ B標的プロモーター領域特異的にヒストンのアセチル化を制御することによってクロマチン構造の開裂を促進する。その結果、転写が進みNF- κ B標的遺伝子の発現が亢進すると考えられる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (板 東 秀 典)			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	林 美加子
	副 査	大阪大学教授	田熊 一 徹
	副 査	大阪大学准教授	波多 賢二
	副 査	大阪大学講師	久保庭 雅恵

論文審査の結果の要旨

本研究は、慢性炎症時に血管内皮細胞等の非免疫系細胞に存在する炎症回路を活性化する分子である HMGCs1 を in vitro 系にて詳細に解析したものである。

その結果、HMGCs1 は核内において NF-κB 標的プロモーター領域にてヒストンアセチル化を制御することでクロマチン構造を開裂させ、NF-κB 標的遺伝子の転写を促進させることが明らかとなった。

以上の研究成果は、慢性炎症の発症メカニズムを解明するうえで重要な知見を提供するものであり、本研究は博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。