



Title	線維芽細胞に存在する炎症增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

線維芽細胞に存在する炎症增幅回路の活性化分子 Hmgcs1 の解析

大阪大学大学院歯学研究科
口腔科学専攻（歯科保存学教室）
指導教官：林 美加子教授

板東秀典

目次

I. 緒言	3
II. 材料および方法	
1. Hmgcs1 遺伝子ノックダウン細胞株の作成	11
2. ELISA(Enzyme-ImmunoSorbent Assay)法	11
3. MTT 試験	12
4. Real-time PCR	13
5. Western Blotting	14
6. ChIP (Chromatin Immuno-Precipitation) Assay	15
7. Chromatin Accessibility Assay	17
8. Reporter Gene Assay	18
9. 蛍光免疫染色	19
10. 統計処理	20
III. 結果	
1. Hmgcs1 遺伝子ノックダウンによる炎症回路の抑制	21
2. Hmgcs1 による炎症回路の制御機構の解析	22
3. Hmgcs1 は細胞質での NF- κ B 活性化経路には関与していない	22
4. Hmgcs1 による転写機構の制御	23
5. Hmgcs1 によるクロマチン構造開裂の制御	24
6. Hmgcs1 過剰発現による NF- κ B 経路の活性化亢進	24
IV. 考察	26
V. 結論	32

VI. 謝辞	33
VII. 参考文献	34
VIII. 図表	48

I. 緒言

一般に細菌感染が生じると、宿主の身体ではそれに対する拒絶反応として炎症反応が引き起こされる。感染局所においては免疫担当細胞が誘導され、Interleukin(IL)-1, IL-6 や Tumor Necrosis Factor (TNF) - α などの炎症性サイトカインを產生し、炎症の場を形成する。こうして炎症反応が進んだ結果として、発赤、腫脹、発熱、疼痛そして機能障害といった炎症の 5兆候が現れる¹。歯科領域においては、例えば根管内から根尖孔外に細菌が侵入すると、根尖周囲の T 細胞の活性化が引き起こされる。そして、活性化した T 細胞は炎症性サイトカインを產生し、その結果、根尖部歯周組織は炎症状態に陥り、この炎症は歯槽骨の吸收を誘発する。このような根尖部歯周組織の炎症および歯槽骨の吸收が根尖性歯周炎の主たる病態である²。

炎症性サイトカインは、細菌の侵入に対して生じる免疫応答の過程で產生され、その免疫応答には自然免疫系と獲得免疫系の 2 つあることがこれまでの研究によりわかっている³⁻⁶。細菌やウイルスなどの病原体が宿主内に侵入すると速やかに自然免疫系が働き、Toll 様受容体やインフラマソームなどによって病原体の構成成分を認識して抗原非特異的な応答を行う⁷⁻¹²。また、マクロファージと好中球などの貪食細胞は感染後比較的迅速に集積し、病原体を貪食することでリソソーム内に取り込んで消化する。このとき、好中球とは異

なり，マクロファージや樹状細胞などは抗原提示能を持ち，T細胞に抗原提示することによってこれを活性化させることができる。こうして獲得免疫が成立し，抗原特異性の高い免疫応答により多様な病原体に対応ができるのと同時に，持続的な免疫記憶により再感染に対してより強力な防御が可能となる¹。

獲得免疫の中心となるリンパ球にはT細胞とB細胞があり，それぞれ胸腺と骨髄で分化する。これらの細胞は多様な抗原に対応したT細胞受容体 (TCR) およびB細胞受容体 (BCR) をそれぞれ細胞表面上に発現している。多様な TCR を発現する T 細胞の中には，自己の体内に存在する自己抗原に対して強い親和性を持つものが現れるが，これらはアポトーシスを起こすことにより除去されることがわかっている¹。しかし，何らかの異常によりこの制御機構が破綻すると，自己抗原に対するリンパ球が活性化し，その結果，組織が破壊されて種々の病的な状況が生じる^{13, 14}。このように自己抗原と強く反応するリンパ球によって生じる疾患は，一般に自己免疫疾患と呼ばれており，ヒトの自己免疫疾患には，関節リウマチ(RA)，全身性エリトマトーデス(SLE)，1型糖尿病，多発性硬化症(MS)等が知られている¹⁵。

獲得免疫において重要な役割を担うT細胞は，機能の異なる2つの細胞集団に大別される。この2つのクラスは，細胞表面に発現する糖タンパク質，CD4 および CD8 の発現によって区別されている。CD4 陽性 T 細胞は他の B 細胞や CD8 陽性 T 細胞を活性化する役割を持

ち、CD8 陽性 T 細胞はパーフォリン/グランザイム経路又は Fas リガンドを発現することによりウイルス感染細胞等を破壊することが報告されている¹⁶。胸腺で分化したナイーブ T 細胞は、血中を循環して末梢リンパ組織へと移行する。そして、宿主が病原体に感染すると、樹状細胞やマクロファージといった抗原提示細胞が提示する抗原ペプチド・主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) および補助刺激分子によって TCR シグナルが活性化され、ナイーブ T 細胞はエフェクタ T 細胞へと分化する¹⁷。活性化した CD4 陽性 T 細胞はヘルパー T 細胞と呼ばれ、抗原提示細胞の MHC クラス II 分子と抗原ペプチドの複合体を認識し、免疫応答の司令塔としての役割を果たす。このヘルパー T 細胞にはいくつかのサブセットがあり、細胞性免疫を担う 1 型ヘルパー T (Th1) 細胞と、体液性免疫を担う 2 型ヘルパー T (Th2) 細胞が主たるヘルパー T 細胞である。Th1 細胞は、Type I interferon や IL-2 を產生し、マクロファージや細胞傷害性 CD8 陽性 T 細胞を活性化することで細胞内寄生体の排除に寄与する。

ナイーブ CD4 陽性 T 細胞からの Th1 細胞分化は、TCR 刺激と IL-12-STAT4 (signal transducer and activator of transcription 4) シグナルによって Type I interferon が產生されることで始まる¹⁸。Type I interferon が STAT1 を活性化することにより、転写因子 T-bet の発現を誘導して Th1 細胞に特異的な遺伝子発現を亢進する¹⁹。一方、Th2 細胞分化は、TCR 刺激と IL-4-STAT6 シグナルによって誘導される転写因子 GATA binding protein 3 (GATA-3) の発現により、

Th2 細胞特異的な IL-4, IL-5, IL-10 および IL-13 等の遺伝子発現が亢進することで生じる。これらのサイトカインは、B 細胞の増殖、分化および抗体産生を誘導し、体液性免疫や細胞外寄生体に対する感染防御に関与する^{1,19}。また、GATA-3 は STAT4 の発現を抑制することで Th1 細胞特異的な遺伝子の発現を抑制したり、T-bet が Th2 細胞分化を抑制したりすることで、Th1 細胞および Th2 細胞への分化のシグナルを互いに制御し合いバランスをとっている²⁰。

近年、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞は TCR 刺激と Transforming growth factor (TGF- β) の刺激による FOXP3 の発現誘導によって制御性 T 細胞 (Treg 細胞) へと分化し、IL-6 と TGF- β の刺激により Retinoic acid receptor-related orphanreceptor (ROR) および ROR γ t を特徴的に発現する Th17 細胞へと分化することがわかつってきた^{21,22}。これら Treg 細胞および Th17 細胞については、自己免疫疾患の病態に関与するという報告が近年数多くなされている²³⁻³⁰。つまり、Treg 細胞は、IL-10 や TGF- β などの抗炎症性サイトカインを産生することおよび細胞維持に必要な IL-7 を他のヘルパーT 細胞サブセットよりも優先的に回収することなどの働きにより、炎症に対して抑制的に働く。それに対して Th17 細胞は自己免疫疾患の発症や増悪に関わると考えられている。また、Th17 細胞から分泌される IL-17 は自己免疫疾患だけではなく、慢性辺縁性歯周炎においても重要な働きをすることが報告されている^{31,32}。前川らによると、血管内皮細胞から産生される抗炎症性タンパク質 Del-1 の接種により歯周炎の進行

が抑制され、骨吸収の有意な抑制が認められ、さらに歯肉溝滲出液中の IL-17 などの炎症性サイトカインが顕著に低下していたと報告している³²。IL-17 は分子量 20–30kDa のペプチドからなるホモダイマーの糖タンパク質であり、現在 IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E(IL-25) および IL-17F の 6 個の相同性を持つファミリー分子が同定されている^{33–35}。特に、IL-17A は、IL-17 受容体ファミリーのうち IL-17RA と IL-17RC のヘテロダイマーに結合し、TNF receptor-associated receptor 6 (TRAF6; E3 ubiquitin protein ligase) を介して NF- κ B 経路や MAPK 経路等を活性化し、炎症性サイトカイン(IL-6, G-CSF, OSM, IL-32) やケモカイン(CXCL1, CXCL2, CXCL5, CCL20) などの発現を誘導することが知られている^{36, 37}。

ところで、炎症性サイトカインの 1 つである IL-6 ファミリーサイトカインは、受容体である gp130 と複合体を形成することにより、細胞内にシグナルを伝達する³⁸。gp130 の細胞内領域には 1 型サイトカイン受容体スーパーファミリー間でよく保存された領域があり、ここにチロシンキナーゼである Janus kinase (JAK) が会合する。IL-6 ファミリーサイトカインと複合体を形成し、gp130 がホモダイマーになることにより、JAK 同士が近接し、このときお互いのチロシン残基をリン酸化する。こうして活性化した JAK は gp130 をリン酸化する³⁹。gp130 の持つチロシン残基のうち細胞膜領域から 3 番目から 6 番目まではすべてチロシンの C 末端側 3 番目の位置にグルタミンを有し(YXXQ モチーフ)，このモチーフが 1 つでも存在し、JAK

によるリン酸化を受けていれば転写因子 signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) が活性化することがわかっている^{40, 41}。また、細胞膜領域から 2 番目のチロシン (Y759) のリン酸化は src homology 2-containing protein tyrosine phosphatase-2 (SHP-2) および suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) との会合に必要であり、JAK によってリン酸化された SHP-2 は下流の ERK/MAPK 経路を活性化することが知られている⁴²。SOCS3 は JAK を抑制することによって、IL-6-STAT3 経路を負に制御している^{43, 44}。そこで、gp130 のシグナル伝達経路を *in vivo* で解析するためにヒト gp130 の 759 番目のチロシンをフェニルアラニンに置換した変異型 gp130 分子 (F759) を全身で発現するノックインマウス (F759 マウス) が作成された³⁸。この F759 マウスは生後 1 年から 1 年半以内にほぼ 100% の個体において、関節リウマチ様自己免疫疾患を発症するという興味深い結果が得られた⁴⁵。F759 マウスにおける免疫系の異常としては、ガンマグロブリン値の上昇、リウマトイド因子の検出、脾腫大、リンパ節肥大およびメモリー・活性化 T 細胞の増加が認められた。そしてこれらの免疫系の異常により、関節炎は慢性的に進行し、関節の病理組織像では、好中球や破骨細胞の浸潤、滑膜線維芽細胞の過形成、パンヌス形成、関節破壊および強直性変異を伴い、ヒトの慢性関節リウマチでみられるような病態を示し、関節リウマチの発症機構を解析するうえで有用な動物モデルであることがわかった。

そして、F759 マウスでは STAT3 が過剰に活性化することで、線維芽細胞による IL-7 産生が亢進し、Th17 細胞などの末梢 CD4 陽性 T 細胞が恒常的に増殖・活性化することがわかった⁴⁶。こうして活性化した Th17 細胞から産生された IL-17 は、線維芽細胞の IL-6 産生を誘導し、その IL-6 と IL17 が協調的に線維芽細胞に作用して、IL-6 やケモカインを過剰産生させることが明らかとなった⁴⁷。

この免疫細胞を引き寄せる炎症性サイトカインやケモカインの産生を增幅する炎症誘導機構は「炎症回路」と呼ばれている(図 1)^{47, 48}。また、関節抗原を認識しない TCR 1 種類のみを発現する F759 マウスにおいても関節炎が発症したことから、F759 関節炎の発症には関節特異的な自己抗原が不要であることがわかった。さらに他の変異マウスを用いた実験から、F759 マウスで関節炎が生じるためには(1) CD4 陽性ヘルパーT 細胞の活性化、(2) 活性化 CD4 陽性ヘルパーT 細胞の関節局所への集積、(3) 関節局所での炎症回路の活性化、(4) 関節での T 細胞由来サイトカイン感受性の亢進が必要であることなど、他の自己免疫疾患においても同様のメカニズムが働いている可能性が示唆された^{49, 50}。こうして炎症回路が自己免疫疾患の発症と憎悪に深く関係していることが明らかとなってきたことから、炎症回路の分子メカニズムを解明することができれば、自己免疫疾患の新規の治療法の開発に繋がると考えた。

先行研究において、炎症回路の分子メカニズムをより詳細に解明するために、65,500 種類(マウスの 16,000 遺伝子に相当)の shRNA

ライブラリーを用いたゲノムワイドスクリーニングが行われた⁴⁸.

そこでは、炎症回路が生じることを確認したマウス大腿骨由来血管内皮細胞株である BC-1 細胞株を用いて各遺伝子をノックダウンした細胞株を作製し、IL-6 と IL-17 の共刺激による IL-6 の産生が抑制されるかを確認されている。その結果、炎症回路を制御する遺伝子として 1,289 個の遺伝子が同定された⁴⁸。その中の 1 つである

Hmgcs1 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase1) は *Hmgcs1* と呼ばれているタンパク質をコードしている。*Hmgcs1* は分子量約 57 kDa の酵素であり、コレステロール合成において重要なメバロン酸合成の前段階で働いていることが知られている⁵¹。*Hmgcs1* は細胞質において、Acetyl-CoA (Acetyl Coenzyme A) と

Acetoacetyl-CoA (Acetoacetyl Coenzyme A) のアルドース反応を触媒することによって HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A) を合成する酵素である⁵¹。その触媒作用において、*Hmgcs1* の 129 番目のシステイン残基が必要であることが知られている^{52, 53}.

Hmgcs1 は細胞質と核内に存在し^{54, 55}、細胞質でコレステロール合成に関係していることがわかつっていたが、核内の働きについては不明のままであった。本研究では、*Hmgcs1* について BC-1 細胞株を用いて *Hmgcs1* 遺伝子をノックダウンし、炎症回路との関連性について解析を行った。

II. 材料および方法

1. *Hmgcs1*遺伝子ノックダウン細胞株の作成

96-well plate(Corning, New York, USA)に、マウス大腿骨皮質由来内皮細胞であるBC-1細胞株を 1.5×10^3 cells/wellで播種し、10% FBS含有DMEMにて24時間培養した。非標的配列および*Hmgcs1*特異的なshRNA(標的配列はsh1:

CCGGGCAGATTATGTGTTGCTTAAACTCGAGTTAACAGAACACATAATCTGCTTTTG

およびsh2:

CCGGGATCTTCACTCACCATTGCTCGAGCAATATGGTGAGTGAAAGATCTTTTG)

を含むレンチウイルスを含むウイルスパーティクルストック

(-80°C)を氷上で10分間静置することで融解し、MOI(multiplicity of infection)が約5となるように培養液にPolybrane(8.0 μ g/ml)を加えて調整し、40 μ l/wellずつ細胞に添加した。5.0 % CO₂, 37°C下で24時間培養後、培養液に最終濃度が5.0 μ g/mlとなるようにPuromycinを加えた培地を100 μ l/wellずつ加えて2日培養した。この薬剤選択で生存していたものを12-well plate(Corning)に播種し、Puromycin(5.0 μ g/ml)を含む培養液で3~4日培養し、細胞を回収した。さらに100 mm dish(Corning)に播種して3~4日間選択を行った。この薬剤選択により得られたクローンを以下の実験に供した。

2. ELISA(Enzyme-ImmunoSorbent Assay)法

96-well plate(Corning)に、BC-1コントロール細胞株(以下mock細胞とする)および2つのHmgcs1遺伝子ノックダウン細胞株(以下sh1細胞、sh2細胞とする)を 1.0×10^4 cells/wellで播種し、10 % FBS含有DMEMにて1昼夜培養した。その後、血清非存在下で2時間培養し、ヒトIL-6(同濃度のヒト可溶性IL-6レセプターa(sIL-6Ra)を添加)、マウスIL-17AおよびマウスTNF- α を最終濃度が各々100, 50, 50 ng/mlとなるように添加し、さらに24時間培養した。24時間刺激後、上清をELISA法に使い、細胞に対しては後述のMTT試験を行った。回収した培養上清中のIL-6濃度を、Mouse IL-6 ELISA Set(BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA)にて測定した。具体的な方法としては、96-well ELISAアッセイ用plateの底面にIL-6のcapture抗体を4°Cで1昼夜静置して固相に吸着させた後、洗浄した。洗浄後、5.0 % FBS含有PBS溶液にてブロッキングを行い、室温で1時間静置した。再度洗浄をした後、回収した上清を添加し、室温で2時間静置した。2時間後に洗浄を行い、HRPを標識したIL-6のdetection抗体を添加し、室温・遮光条件で1時間静置した。その後、洗浄を2回行い、基質を添加し5-10分後に2.0 M H₂SO₄を加えて反応を止めた。測定はマイクロプレートリーダー(model 680, Bio-Rad, Hercules, California, USA)を用いて、450 nm/550 nmの吸光度を計測した。

3. MTT試験

96-well plate(Corning)に, mock細胞, sh1細胞およびsh2細胞を 1.0×10^4 cells/wellで播種し, 10 % FBS含有DMEMにて1昼夜培養した. その後, 血清非存在下で2時間培養し, ヒトIL-6, ヒト可溶性IL-6レセプターa(sIL-6Ra), マウスIL-17AおよびマウスTNF- α を最終濃度が各々100, 100, 50, 50 ng/mlとなるように添加し, さらに24時間培養した. 24時間刺激後, 10 % FCSを含むDMEM培地で希釀したMTT試薬(500 μ g/ml)を70 μ l/wellで加えて, 5.0 % CO₂, 37°C下で2時間呈色反応を行った. その後, 培養上清を除去してDMSOを100 μ l/well加えてホルマザンの沈殿を溶解し, マイクロプレートリーダーを用いて550 nmの吸光度を測定した.

4. Real-time PCR

6-well plate(Corning)に, mock細胞, sh1細胞およびsh2細胞を 2.0×10^5 cells/wellで播種し, 10% FBS含有DMEMにて1昼夜培養した. その後, 血清非存在下で2時間培養し, ヒトIL-6, ヒト可溶性IL-6レセプターa(sIL-6Ra), マウスIL-17AおよびマウスTNF- α を最終濃度が各々100, 100, 50, 50 ng/mlとなるように添加し, さらに3時間培養した. 3時間刺激後, 培養上清を除去し, 2-MEを1/100量添加したLysis solutionで細胞を可溶化し, Mammalian Total RNA Miniprep

Kit (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA に DNase I と Reaction buffer を 1/10 量ずつ加えて室温で 15 分静置し、ゲノム DNA を消化した。その後、Stop solution を 1/10 量ずつ加えて 70°C で 10 分間熱処理をして DNase I を失活させた。この RNA 溶液に対して Oligo dT プライマーを用いて逆転写反応 (42°C 60 分, 95°C 5 分) を行った。得られた cDNA 産物を 鑄型として、マウス *I16*, *Socs3*, *Cxcl15* 遺伝子に対する特異的な プライマーを用いて PCR (95°C 15 秒, 60°C 1 分, 40 サイクル) を行いながら、 経時的な 蛍光強度の変化を 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA) にて測定した。逆転写 反応および Real-time PCR には、それぞれ M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA), KAPA SYBR FAST ABI Prism qPCR kit (Kapa Biosystems, Wilmington, Massachusetts, USA) を使用した。マウスの遺伝子については *Hprt* mRNA を内在性コントロールとして使用した。目的の mRNA 量は、それ ぞれの 遺伝子の プライマーを用いて BC-1 細胞株から精製した cDNA を PCR で 増幅し、 $10^{-12} \sim 10^{-18}$ g/μl の 10 倍希釈系列から作成した 検量線 をもとに 定量した。PCR に 使用した プライマーの 配列を 表 1 に記す。

5. Western Blotting

100 mm dish (Corning) に mock 細胞、sh1 細胞および sh2 細胞を 1.5 ×

10^6 cellsで播種し1昼夜培養した。さらに血清非存在下で2時間培養の後、マウスTNF- α を最終濃度が50 ng/mlとなるように添加し、0, 5, 15, 30分後に細胞を回収した。3,500 rpmで5分間、4°Cにて遠心分離を行った後、上清を除き、Protease inhibitor, Phosphatase inhibitor cocktailおよびPhosphatase inhibitor cocktail (Sigma Aldrich)をそれぞれ1/100量ずつ添加して氷冷したLysis buffer {20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1.0 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1.0 % Triton X-100}を加えて、氷上で15分間静置した。15,000 rpmで10分間、4°Cにて遠心分離した後に回収した上清を試料とし、BSAを用いて作成した検量線をもとにBradford法にてタンパク質濃度を測定した。各試料にSample buffer (2-ME, SDSを含む)を加え、95°Cで5分間熱処理により変性させた。その後、5-20 %ポリアクリルアミドゲル(Wako, 東京)を用いてSDS-PAGEによりタンパク質を分離した。次に、PVDF膜(EMD Millipore, Billerica, Massachusetts, USA)に転写(4°C, 100V, 1時間)し、5.0 % Skim milkを含む0.1 % TBS-T(0.1 % Tween20を含むTBS)を用いて室温で1時間振盪してブロッキングを行った。1次抗体反応は、4°Cで一晩振盪することにより行った。2次抗体反応は、HRP標識したラビットもしくはマウスのIgGに対する抗体を用いて4°Cで1時間振盪した。ECL反応はChemi-Lumi One Lを用いて行い、X線フィルム(RX-U, FUJIFILM, 東京)に感光して、自動現像機(FPM100, FUJIFILM)で現像した。なお、PVDF膜は各操作間に0.1 % TBS-Tで洗浄を行った(10分間×2回)。抗体反応の際に使用した抗体を表2に記

す。

6. ChIP (Chromatin Immuno-Precipitation) Assay

100 mm dish (Corning) に 5.0×10^5 cells の mock および sh-1 細胞を播種し 2 日間 培養した。その後、 血清非存在下で 2 時間 培養し、 マウス TNF- α を 最終濃度が 50 ng/ml となるように 添加した。TNF- α を 0, 60, 120 分 刺激した後の細胞に 最終濃度 1.0 % となるように 37 % ホルムアルデヒドを 添加し、 室温で 10 分間 振盪させた。次に、 2.5 M グリシンを 添加し、 5 分間 室温で 振盪させることにより ホルムアルデヒドによる クロスリンク反応を 止めた。その後、 氷上に 置き、 培養液を 除去してから 氷冷した PBS で 2 回 洗浄し、 1.0 ml の PBS と セルスクレイパーを 用いて 細胞を 回収した。3,500 rpm で 5 分間、 4.0°C にて 遠心分離して 上清を 除き、 1.0×10^6 細胞数あたり 60 μ l の ChIP lysis buffer {10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1.0 % Triton X-100, 1.0 % SDS} を 加えて 氷上で 15 分間 静置した。その後、 溶解物を 超音波処理 (4 サイクル \times 2 回) することにより DNA を 細断し、 15,000 rpm で 10 分間、 4°C にて 遠心分離して 上清を 回収し、 Input 用の サンプルと 免疫沈降用の サンプルに 分けた。Input 用の サンプルに 対しては、 免疫沈降に 使用する クロマチンの 10 分の 1 量を 分取した後、 エタノール 沈殿を 用いることにより DNA を 精製した。免疫沈降用の サンプルに 対しては、 あらかじめ Dynabeads[®] Protein G (Novex,

Waltham, Massachusetts, USA) と各種抗体を4°Cで2時間反応させたものをサンプルの1/10量加え, さらに4°Cで2時間反応させた. その後, ChIP wash buffer {10 mM Tris-HCl (pH7.4), 140 mM NaCl, 1.0 mM EDTA, 1.0 % Triton X-100, 0.1 % SDS} にてビーズを5回洗浄した. Input DNAおよび免疫沈降サンプルに40 μ lの10 % Chelex[®] 100 Resin (Bio-Rad) を加え, 100°Cで10分間熱処理した. 常温で静置した後, 最終濃度50 μ g/mlとなるようにProteinase K (TaKaRa, 滋賀) を加え, 55°Cで30分間振盪させた. そして, 100°Cで10分間処理することにより, Proteinase Kを失活させ, 氷上に静置した. 静置したサンプルをEconoSpin[™] II a (GeneDesign, Inc. 大阪) に通し, Dynabeads[®] Protein GおよびChelex[®] 100 Resinを除去した. 回収したDNAを鑄型としてReal-time PCRにてマウス *I16*プロモーター, *Ccl2*プロモーター領域に対する特異的なプライマーを用いて経時的な蛍光強度の変化を測定した. Real-time PCR後, Inputに対するパーセントを% Input (ChIP沈降物のquantity/Inputのquantity \times 1/10 \times 100) として評価した. PCRで使用したプライマーの配列および免疫沈降に使用した抗体を表3に記す.

7. Chromatin Accessibility Assay

100 mm dish (Corning) にmock細胞およびsh-1細胞を 3×10^5 cells で播種し, 2日間培養した. その後, 血清非存在下で2時間培養し,

マウスTNF- α を最終濃度が50 ng/mlとなるように添加した。試薬添加後の細胞を氷上に起き、培養液を除去してから氷冷したPBSで2回洗浄し、1.0 mlのPBSとセルスクレイパーを用いて細胞を回収した。3,500 rpmで5分間、4°Cにて遠心分離して上清を除き、 1.0×10^6 細胞数に対して400 μ lのLysis bufferに溶解した。その後、サンプルをDNase I処理するもの(Nse)とDNase I処理しないもの(no-Nse)の2つに分け、カラムを用いてDNAを抽出した。そして、抽出したDNAを鋳型としてReal-time PCRにてマウス*I16*プロモーターおよび*Cc12*プロモーター領域に対する特異的なプライマーを用いて経時的な蛍光強度の変化を測定した。Real-time PCR後、Nseサンプルとno-Nseサンプル間のCt値の差をFold enrichment (FE; $FE = 2(Nse\ Ct - no-Nse\ Ct) \times 100$)として評価した。Real-time PCRに使用したプライマーの配列を表4に記す。

8. Reporter Gene Assay

96-well plate(Corning)に 1.0×10^3 cells/wellで播種したヒト胎児腎細胞株であるHEK293T細胞を一昼夜培養した後、flagタグのついた空ベクター(pCMV-tag2B empty), mouse *Hmgcs1*のCDS領域を挿入したベクター(pCMV-tag2B *Hmgcs1*)およびmouse *p65*のCDS領域を挿入したベクター(pCMV-tag2B *p65*)と*I1-6*プロモーター領域の下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を挿入した*I1-6* promoter luciferase

reporter gene (1.0 μ g/well), NF- κ B標的配列を5つタンデムに配列してその下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を挿入した5× κ B promoter luciferase reporter geneおよびウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだpRL-TK (0.1 μ g/well)をPEI法にて導入した。24時間培養後に基礎培養液に置換し、さらに24時間培養した。その後、血清非存在下にて2時間培養し、マウスTNF- α (50 ng/ml)を5時間処理した。PBSで細胞を洗浄し、Passive lysis buffer (100 μ l/well)を加えて4°Cで15分間振盪させ、細胞を溶液した。その後、その細胞溶解液20 μ lと発光基質100 μ lを混合し、ホタルルシフェラーゼ活性をルミノメーター (Glomax multi, Promega)にて測定した。なお、細胞間の導入効率補正のために、遺伝子導入の際同時導入したpRL-TK由来のウミシイタケルシフェラーゼ活性を内在性コントロールとし、これらとの比を算出して *I1-6* promoter luciferase activity又はNF- κ B luciferase activityとした。

9. 蛍光免疫染色

Glass Base Dish (IWAKI, 静岡)に3.0×10⁴ cellsのmock細胞とsh-1そしてsh-2細胞を24時間培養後、1/10量の37 % ホルムアルデヒドを添加し、室温で10分間静置することで固定を行った。その後、氷冷したPBSにて洗浄し、5倍希釀をしたBD Perm/WashTM (BD)に1/50量の抗Hmgcs1抗体 (Sigma Aldrich)を混ぜたものを100 μ l加え、4°Cで

24時間静置した。その後、2回洗浄し、1/200量の2次抗体 (Alexa Flour標識抗ラビットIgG抗体, Abcam, Cambridge, Massachusetts, USA) と1/10,000量のHoechst33342 (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) を1×Perm/WashTMに溶解したものを加え、室温で60分間遮光し静置した。その後、2回洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡下 (LSM5 PASCAL, ZEISS, Germany) にてHmgcs1の発現を確認した。

10. 統計処理

実験データは、平均値±標準偏差 (Mean±SD) 又は平均値±標準誤差 (Mean±SEM) で表示した。一連の実験ではDunnet法あるいはrepeated measures ANOVAおよびTukey法によって有意水準 5.0% で統計学的検定をおこなった。

III. 結果

1. *Hmgcs1*遺伝子ノックダウンによる炎症回路の抑制

マウス大腿骨皮質由来内皮細胞であるBC-1細胞株に非標的配列のshRNAまたは*Hmgcs1*に特異的なshRNAを導入し、*Hmgcs1*遺伝子ノックダウン安定株を作製した。それぞれの細胞からmRNAを回収し、Real-time PCRにて*Hmgcs1*のmRNA発現量を調べたところ、非標的配列のshRNAを導入した細胞（以下mock細胞とする）に比べて*Hmgcs1*に特異的なshRNAを導入した細胞のうち2つの細胞（以下sh1細胞とsh2細胞とする）で発現量が有意に抑制されていた（図 1 A）。

次に、mock、sh1およびsh2細胞に血清非存在下でヒトIL-6とマウスIL-17を24時間刺激し、ELISA法にて培養上清中のマウスIL-6濃度を測定した。その結果、mock細胞に比べてsh1およびsh2細胞ではIL-6産生量が有意に減少していた（図 1 B）。遺伝子ノックダウンにより細胞増殖に異常が生じた可能性が考えられたが、この時細胞増殖の指標であるMTT値は各細胞間でほとんど差がなかった（図 1 B）。さらに、IL-6とIL-17又はTNF- α にて3時間刺激し、mRNAを回収してreal-time PCRにてIL-6のmRNA発現量を測定したところ、図 1 Bの結果と同様に、mock細胞に比べてsh1およびsh2細胞ではIL-6のmRNAの発現量が有意に抑制された（図 2）。

2. Hmgcs1による炎症回路の制御機構の解析

炎症回路の活性化は、2つの転写因子、STAT3とNF- κ Bの活性化により制御されていることがこれまでの報告によりわかっている⁴⁷⁻⁵⁰。そこで、IL-6とIL-17またはTNF- α を3時間刺激した後、STAT3標的遺伝子である*socs3*とNF- κ B標的遺伝子である*cxc15*のmRNA発現量を調べた。その結果、mock細胞とsh1およびsh2細胞間で*socs3*の発現量は有意差がみられなかつたが、sh1およびsh2細胞で*cxc15*の発現量が有意に抑制された(図3)。これらの結果から、Hmgcs1はSTAT3経路ではなく、NF- κ B経路を介して炎症回路を正に制御すること明らかとなつた。

3. Hmgcs1は細胞質でのNF- κ B活性化経路には関与しない

次に、図4において抗Hmgcs1抗体による免疫染色の結果、mock細胞においてHmgcs1を示す緑色蛍光がHoechst33342で染色した核の部分およびそれ以外の細胞質の部分にもみられた。このことから、BC-1細胞株においてHmgcs1は細胞質および核内に存在することがわかつた。そこで、Hmgcs1がNF- κ B経路の制御をする際、細胞質と核のどちらかで機能するかについて調べた。細胞質において、TNF- α やIL-17などの刺激を受けるとIKK α / β が活性化することにより、I κ B α とNF- κ Bのサブユニットの1つであるp65(re1A)がリン酸化される

ことにより、I κ B α はプロテアソーム系による分解され、NF- κ Bは核内へ移行することができるようになる。そこで、TNF- α 刺激後のmock細胞、sh1およびsh2細胞での細胞質におけるNF- κ B活性化をp65、I κ B α のリン酸化およびI κ B α の分解を指標に検討した。血清非存在下で2時間培養した細胞にTNF- α を添加し、0, 5, 15, 30分後のp65(Ser536), I κ B α (Ser32/36)のリン酸化レベルとI κ B α のタンパク質量を評価した結果、各細胞間において差は認められなかった(図5)。

4. Hmgcs1による転写機構の制御

NF- κ Bは核内に移行した後、標的のプロモーターやエンハンサー領域の特異的な配列に結合することが知られている⁵⁶。そして、NF- κ BがDNAに結合するとヒストンアセチル基転移酵素であるp300/CBPがそこへ誘導され、周囲のヒストンをアセチル化する。すると、クロマチン構造が解かれ基本転写因子やRNAポリメラーゼIIが誘導されることにより転写が進んで行く⁵⁷⁻⁶³。そこで、mock細胞とsh1細胞との間でこうした転写機構に差異があるかどうか調べるためにChIPアッセイをおこなった。その結果、mock細胞に比べて、sh1細胞ではp65とp300およびRNAポリメラーゼIIのDNAへの誘導が顕著に抑制されていることが明らかとなった(図6, 7, 8)。この結果から、Hmgcs1はNF- κ B標的プロモーター領域において転写に必要な分子の

DNAへの誘導を制御することがわかった.

5 . *Hmgcs1*によるクロマチン構造開裂の制御

これまでの解析から, *Hmgcs1*遺伝子ノックダウン細胞では, クロマチン構造が開裂していないためにNF- κ Bとさらにそれ以降の転写に必要な分子がDNAに誘導されていないのではないかと推測し, クロマチン開裂解析を行った. その結果, mock細胞ではTNF- α の刺激に応じてNF- κ B標的プロモーター領域のクロマチン構造が緩んでいるのに対して, sh1細胞ではTNF- α 刺激後においてもクロマチン構造は弛緩していないことがわかった(図 9). このことから, *Hmgcs1*がないことでクロマチン構造の開裂のためのシグナルが入っていないと考えられた. クロマチンの開裂にはATP依存性のクロマチン再構成複合体が必要であり, その複合体がコアヒストンH3のリジンのアセチル化を認識することによりプロモーター領域に近接することが知られている⁶⁴. そこで, コアヒストンH3のリジンのうち特に転写に必要とされる18番目のリジン(以下H3K18とする)のアセチル化を調べたところ, mock細胞に対して, sh1細胞ではNF- κ B標的プロモーター領域周辺のH3K18のアセチル化が有意に抑制されていた(図 10).

6 . *Hmgcs1*過剰発現によるNF- κ B経路の活性化亢進

最後に, HEK293T細胞に*Hmgcs1*を過剰発現させて, *IL-6*プロモーターおよびNF- κ B標的プロモーターの活性についてについて解析した。その結果, emptyベクターを導入した細胞よりも*Hmgcs1*遺伝子を導入した細胞において, TNF- α 刺激後のルシフェラーゼ活性が有意に上昇した(図 11)。このことから, *Hmgcs1*の過剰発現により, NF- κ B経路の転写活性が亢進されることがわかった。

IV. 考察

本研究では、非免疫系細胞において確認されている炎症増幅機構である炎症回路^{47, 48}を標的として、その制御因子候補である Hmgcs1 に着目をし、その因子と炎症回路の関係を解析した。炎症回路では、非免疫系細胞に IL-6 と IL-17 が同時に刺激として入ることにより転写因子である STAT3 と NF- κ B が同時に活性化し、ともに協調的に働くことによって標的である炎症性サイトカインやケモカインの過剰産生を導くことがわかっている^{47, 48}。そこで、Hmgcs1 遺伝子ノックダウン BC-1 細胞株を樹立して解析を行ったところ、IL-6 と IL-17 同時刺激下での IL-6 産生が有意に抑制されたことから、Hmgcs1 が炎症回路の制御に関係していることが明らかとなった（図 2）。さらに、Hmgcs1 遺伝子ノックダウン細胞で IL-6 と IL-17 共刺激下での IL-6 mRNA の発現が減少していたことから（図 3）、Hmgcs1 が炎症回路の活性化を転写レベルで制御している可能性が示唆された。次に、Hmgcs1 の炎症回路の制御機構について解析を行った。Hmgcs1 は炎症回路において STAT3 経路ではなく NF- κ B 経路を特異的に制御していることが明らかとなった（図 4）。Hmgcs1 の細胞内での局在を蛍光免疫染色にてイメージングをしたところ、その存在は細胞質および核にみられた（図 5）。このことから、Hmgcs1 は NF- κ B 経路を細胞質または核内で制御しうることが考えられた。まず、細胞質での NF- κ B 経路の活性化を調べるために NF- κ B の抑制因子である I κ B α のリ

ン酸化とリン酸化に伴うユビキチン-プロテアソーム系での分解, そして NF- κ B のサブユニットである p65 のリン酸化を確認した(図 6). その結果, コントロール細胞と Hmgcs1 細胞との間に差はなく, Hmgcs1 は細胞質ではなく核内で NF- κ B 経路を活性化することが考えられた. そこで, 核内での転写機構として転写因子である p65, ヒストンアセチル基転移酵素である p300 および RNA ポリメラーゼ II の NF- κ B 標的遺伝子プロモーター領域への結合を調べたところ, Hmgcs1 遺伝子ノックダウン細胞で有意な抑制が確認された(図 7-9). さらに, Hmgcs1 遺伝子ノックダウン細胞株ではサイトカイン刺激下でも NF- κ B 標的遺伝子のプロモーター領域でのクロマチン構造が緩んでいないこと(図 10), およびプロモーター領域でのヒストン H3K18 のアセチル化が抑制されていたこと(図 11)から, Hmgcs1 は図 13 で示されているメカニズムで NF- κ B 標的遺伝子の転写を制御していることが考えられた. つまり, Hmgcs1 は NF- κ B 標的プロモーター領域周辺のコアヒストン H3 の転写に必要とされるリジンのアセチル化を制御することにより, クロマチン構造の開裂を促進し, NF- κ B 標的遺伝子の転写を亢進させることが示唆された.

次に, Hmgcs1 の NF- κ B 特異的制御性について明らかにするために, Hmgcs1 と STAT3 または NF- κ B との相互作用について免疫沈降法で調べてみたところ, HMGCS1 は STAT3 とは相互作用は認めなかったが, NF- κ B のサブユニットである p65 との相互作用を示した(data not shown). この免疫沈降の結果から, Hmgcs1 が NF- κ B 特異的に制御し

ていると考えられる。また, p65 は核内において p300/CBP と結合していることが知られている⁶⁵。この結合には p65 の細胞質でのリン酸化が必要で⁶⁶, 結合後 p300/CBP は p65 のリジン残基をアセチル化する。その結果, p65 の DNA 結合能が亢進し, 転写活性が上がることが報告されている^{67, 68}。Hmgcs1 は p300 および p65 と相互作用があることが明らかとなっており (data not shown), Hmgcs1 は核内において p300 および p65 と結合することで, NF- κ B 特異的に転写活性を亢進していると思われる。また, *Hmgcs1* をノックダウンするとヒストン H3 のアセチル化が抑制されたことから(図 10), Hmgcs1 は p300 のアセチル化を制御する可能性が考えられる。p300 が p65 をアセチル化することを考えると, Hmgcs1 が p65 のアセチル化も制御している可能性がある。このことを踏まえると, Hmgcs1 遺伝子ノックダウン細胞において p65 の NF- κ B 標的プロモーター領域への誘導が抑制された(図 6)のは, クロマチン構造の開裂が抑制されている(図 9)ためだけではなく, p65 自身がアセチル化されていないために p65 の DNA 結合能が下がっている結果なのかもしれない。Hmgcs1 によって p65 の翻訳後修飾が変化するかどうかは今後の検討課題と思われる。

次に, Hmgcs1 遺伝子ノックダウン細胞で NF- κ B 標的遺伝子の転写が抑制されているメカニズムについて考察していく。刺激に応じて発現が誘導される遺伝子は, ハウスキーピング遺伝子と異なって, 定常状態ではヘテロクロマチンの状態に保たれており, 刺激に応じてユーロクロマチンの状態になり, 転写因子やその他の転写装置が転

写開始領域に誘導されることによって転写が始まる⁵⁷⁻⁶³。その後、転写が終わると Jumonji 遺伝子などがプロモーター領域に結合し、ヒストン H3K9 メチル化酵素を呼び込むことにより、プロモーター領域のヒストン H3K9 がメチル化される⁶⁹⁻⁷¹。その結果、ヒストン H3K9 メチル化を指標に heterochromatin protein 1 (HP1) が誘導されクロマチン構造をヘテロクロマチンの状態にすることで定常状態に戻すことが知られている^{72, 73}。本研究の解析結果から、コントロールの細胞では刺激に応じてユーコロマチンの状態になっているのに対し、Hmgcs1 遺伝子ノックダウン細胞ではユーコロマチンの状態になりにくいことがわかった（図 9）。したがって、Hmgcs1 遺伝子ノックダウン細胞では、刺激に応じたクロマチン構造の開裂が抑制されているために、NF- κ B 標的遺伝子の発現が下がっていると考えられる。

そこで、Hmgcs1 はクロマチン構造の開裂において、どのような役割を持つのかという疑問が生じてくる。クロマチン構造の開裂には、クロマチンリモデリング複合体が重要な働きをしていることが知られている。クロマチンリモデリング複合体は、SWI/SNF, ISWI, CHD そして INO80 の 4 つのサブファミリーに大別され⁷⁴⁻⁷⁷、各々 ATP 依存的にクロマチン構造を変化させ、DNA 結合タンパク質が DNA に結合できるようにすることで、DNA の転写、複製、修復など細胞が生存する際に必要なエピジェネティックな活動を制御している。さらに、ATP 依存性クロマチンリモデリング複合体のプロモーター領域

への誘導にはコアヒストンH3のリジン残基のアセチル化がマーカーとなることが報告されている⁶⁴。図10に示す解析結果から、Hmgcs1が存在しないと、NF- κ B 標的プロモーター領域でのヒストンアセチル化が抑制されることが明らかとなった。以上を踏まえると、Hmgcs1 遺伝子ノックダウン細胞では、NF- κ B 標的プロモーター領域に ATP 依存性クロマチンリモデリング複合体が DNA へ誘導されず、クロマチンの構造が開裂しにくくなっていることが考えられる。

次に、Hmgcs1 が存在しないとなぜヒストンのアセチル化が抑制されるかについて考察を行う。その理由としては、Hmgcs1 遺伝子ノックダウン細胞においてヒストン H3K18 のアセチル化が抑制されたこと(図10)および免疫沈降法によって HMGCS1 と p300 との間に相互作用があったこと、さらにヒストン H3K18 が p300/CBP により特異的にアセチル化を受けること⁷⁸から、Hmgcs1 は p300/CBP の機能を助けることによりヒストン H3K18 のアセチル化を促進することが挙げられる。Hmgcs1 が p300/CBP ヒストンアセチル化を制御する機序として 2 つの機序が考えられる。1 つ目は、Hmgcs1 が p300/CBP を活性化することによって、ヒストンアセチル基転移活性を上げること。p300 のアセチル化により p300 の HAT 活性が上がることおよびコアクチベーターである MAML1 が p300 の自己アセチル化を促進することが報告されており⁷⁹、Hmgcs1 が同様の機能を持つかどうかについては今後の検討課題である。2 つ目は、Hmgcs1 が NF- κ B 標的プロモーター領域におけるヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の機能を下げるという

ことが考えられる。NF- κ B シグナルにおいて HDAC1 が抑制的に働いていることが知られている^{80,81}。さらに興味深いことに、コレステロール合成経路の律速酵素である HMGCR (3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase) の阻害薬として有名なスタチンは HDAC1 および HDAC2 の阻害薬としても働き、スタチンの投与によりヒストン H3 のアセチル化が上昇することが報告されている⁸²。スタチンが HMG-CoA との構造的な類似性を持つことで HMGCR の阻害薬として機能すると^{83,84}、HMG-CoA が HDAC と結合し、その機能を抑える可能性がある。このことから、Hmgcs1 が HDAC1 の DNA への誘導を阻害することによって p300/CBP によるアセチル化の機能を補助している可能性があると思われる。

また、ゲノムワイドスクリーニングおよび DNA マイクロアレイ解析によって得られた炎症回路の制御候補遺伝子を全ゲノム関連解析 (GWAS) で検索した結果、同定された遺伝子の 15% 以上が既知のヒト疾患関連遺伝子であることが示されている⁴⁸。この解析によって、炎症回路が自己免疫疾患だけではなく、代謝性疾患や神経変性疾患さらに慢性辺縁性歯周炎などの慢性炎症性疾患に関与する可能性が示唆されている⁴⁸。本研究の結果から、Hmgcs1 が炎症回路を制御することによって慢性炎症性疾患の病態形成に関与する可能性が示唆された。今後、Hmgcs1 による炎症回路の制御機構が詳細に解明されれば、慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患や歯科領域における慢性炎症性疾患の新規の治療法の開発に繋がることが期待される。

V. 結論

Hmgcs1 遺伝子ノックダウン細胞株を用いた実験から, Hmgcs1 が核内において NF- κ B 標的プロモーター領域特異的にヒストンアセチル化の制御を行うことにより, IL-6/NF- κ B 系を介して炎症回路を亢進させていることがわかった.

VI. 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えて頂き、貴重なるご指導と御高閲を賜りました北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学教室 村上正晃教授並びに大阪大学大学院歯学研究科口腔分子制御学講座(歯科保存学教室) 林 美加子教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究の遂行にあたり、多大なるご指導とご協力をいただきました北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学教室 上村大輔博士、有馬康伸博士、熱海徹博士、並びに大阪大学大学院歯学研究科口腔分子制御学講座(歯科保存学教室) 伊藤祥作博士に謹んで感謝の意を表します。

また、大阪大学未来戦略機構 宮坂昌之教授には実験に使用したBC-1細胞株を供与して頂き心より感謝致します。

最後に本研究に対して御理解、御協力を頂きました北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学教室並びに大阪大学大学院歯学研究科口腔分子制御学講座(歯科保存学教室) の諸先生方に心から感謝致します。

VIII. 参考文献

1. Murphy K. Janeway's Immunobiology, 8th Edition. Garland Science. 1-888 (2011)
2. Hargreaves KM. Berman L. Cohen's Pathways of the Pulp Expert Consult, 11th Edition. ELSEVIER. 1-928 (2015)
3. Janeway Jr. CA. Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 54, 1-13 (1989)
4. Litman GW. Rast JP. Fugmann SD. The origins of vertebrate adaptive immunity. Nat Rev Immunol. 10, 543-553 (2010)
5. William EP. Bridging Innate and Adaptive Immunity. Cell. 147, 1212-1215 (2011)
6. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. Nat Immunol. 16, 343-353 (2015)
7. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. Seminars in Immunol. 16, 3-9 (2004)
8. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. Int Immunol. 17, 1-14 (2005)
9. Schroder K. Tschopp J. The Inflammasomes. Cell. 140, 821-832 (2010)

10. Kawai T. Akira S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity*. 34, 637–650 (2011)
11. Guo H. Callaway JB. Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med.* 21, 677–687 (2015)
12. Luke AJO. Douglas G. Andrew GB. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 13, 453–460 (2013)
13. Anke KR, Robert LR. Disruption of positive selection of thymocytes causes autoimmunity. *Nat Med.* 6, 298–235 (2000)
14. Teshima T. Reddy P. Liu C. Williams D. Cooke KR. Ferrara JLM. Impaired thymic negative selection causes autoimmune graft-versus-host disease. *Blood.* 102, 429–435 (2003)
15. Anderson SM, Wraith DC. Selection and fine-tuning of the autoimmune T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol.* 2, 487–498 (2002)
16. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol.* 2, 735–747 (2002)
17. Miller JFAP. The golden anniversary of the thymus. *Nat Rev Immunol.* 11, 489–495 (2011)

18. Veronica AM, Hermelijn HS, Doreen AC, Catharien MUH. Sustained IL-12 Signaling Is Required for Th1 Development. *J Immunol.* 172, 61–69 (2004)
19. Kanhere A, Hertweck A, Bhatia U, Gokmen MR, Perucha E, Jackson I, Lord GM, Jenner RG. T-bet and GATA3 orchestrate Th1 and Th2 differentiation through lineage-specific targeting of distal regulatory elements. *Nat Commun.* 3, 1268. doi:10.1038/ncomms2260 (2012)
20. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev.* 8, 223–246 (2003)
21. Infante-Duarte C, Horton HF, Byme MC, Kamradt T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol.* 165, 6107–9015 (2000)
22. Chen D. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat Rev Immunol.* 6, 329–334 (2006)
23. Esenstein JH, Wofsy D, Bluestone JA. Regulatory T cells as therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 5, 560–565 (2009)
24. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA.

- Gorman D. Kastelein RA. Sedgwick JD. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 421, 744–748 (2003)
25. Komiyama Y. Nakae S. Matsuki T. Nambu A. Ishigame H. Kakuta S. Sudo K. Iwakura Y. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 177, 566–573 (2006)
26. Nakae S. Nambu A. Sudo K. Iwakura Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17 deficient mice. *J Immunol*. 171, 6173–6177 (2003)
27. Rebaldi A. Coisne C. Baumjohann D. Benvenuto F. Bottinelli D. Lira S. Uccelli A. Lanzavecchia A. Engelhardt B. Sallusto F. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of Th-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol*. 10, 514–523 (2009)
28. Ransohoff RM. Immunology: In the beginning. *Nature*. 462, 41–42 (2009)
29. Yao Z. Fanslow WC. Seldin MF. Rousseau AM. Painter SL. Comeau MR. Cohen JI. Spriggs MK. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity*. 3, 811–821 (1995)

30. Fossiez F. Djossou O. Chomarat P. Flores-Romo L. Ait-Yahia S. Maat C. Pin JJ. Garrone P. Garcia E. Sealand S. Blanchard D. Gaillard C. Das Mahapatra B. Rouvier E. Golstein P. Banchereau J. Lebecque S. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce pro-inflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med.* 183, 2593–2603 (1996)
31. Eskan MA. Jotwani R. Abe T. Chmelar J. Lim JH. Liang S. Ciero PA. Krauss JL. Li F. Rauner M. Hofbauer LC. Choi EY. Chung KJ. Hashim A. Curtis MA. Chavakis T. Hajishengallis G. The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss. *Nat Immunol.* 13, 465–473 (2012)
32. Maekawa T. Hosur K. Abe T. Kantarci A. Ziogas A. Wang B. Van Dyke TE. Chavakis T. Hajishengallis G. Antagonistic effects of IL-17 and D-resolvins on endothelial Del-1 expression through a GSK-3 β -C/ECP β pathway. *Nat Commun.* 6, 8272 (2015)
33. Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol.* 71, 1–8 (2002)
34. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.* 21, 467–476 (2004)
35. Weaver CT. Hatton RD. Mangan PR. Harrington LE. IL-17 Family Cytokines and the Expanding Diversity of Effector T Cell Lineage. *Annu Rev Immunol.* 25, 821–852 (2007)

36. Gaffen SL. Structure and signaling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol.* 9, 556–567 (2009)
37. Gaffen SL. Role of IL-17 in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 11, 365–370 (2009)
38. Ohtani T. Ishihara K. Atsumi T. Nishida K. Kaneko Y. Miyata T. Itoh S. Naramatsu M. Maeda H. Fukada T. Itoh M. Okano H. Hibi M. Hirano T. Dissection of signaling cascades through gp130 in vivo: reciprocal roles for STAT3- and SHP2-mediated signals in immune responses. *Immunity.* 12, 95–105 (2000)
39. Hirano T. Interleukin-6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol.* 16, 249–284 (1998)
40. Yamanaka Y. Nakajima K. Fukada T. Hibi M. Hirano T. Differentiation and growth arrest signals are generated through the cytoplasmic region of gp130 that is essential for Stat3 activation. *EMBO J.* 15, 1557–1565 (1996)
41. Nakajima K. Yamanaka Y. Nakae K. Kojima H. Ichiba M. Kikuchi N. Kitaoka T. Fukada T. Hibi M. Hirano T. A central role for Stat3 in IL-6-induced regulation of growth and differentiation in M1 leukemia cells. *EMBO J.* 15, 3651–3658 (1996)
42. Takahashi-Tezuka M. Yoshida Y. Fukada T. Ohtani T. Yamanaka Y. Nishida K. Nakajima K. Hibi M. Hirano T. Gab1 acts as an

- adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol.* 18, 4109–4117 (1998)
43. Hirano T. Interleukin 6 in autoimmune and inflammatory diseases: a personal memoir. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 86, 717–730 (2010)
44. Kershaw NJ. Murphy JM. Lucet IS. Nicola NA. Babon JJ. Regulation of Janus Kinases by SOCS proteins. *Biochem Soc Trans.* 41, 1042–1047 (2013)
45. Atsumi T. Ishihara K. Kamimura D. Ikushima H. Ohtani T. Hirota S. Kobayashi H. Park SJ. Saeki Y. Kitamura Y. Hirano T. A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis. *J Exp Med.* 196, 979–990 (2002)
46. Sawa S. Kamimura D. Jin GH. Morikawa H. Kamon H. Nishihara M. Ishihara K. Murakami M. Hirano T. Autoimmune arthritis associated with mutated interleukin (IL)-6 receptor gp130 is driven by STAT3/IL-7-dependent homeostatic proliferation of CD4+ T cells. *J Exp Med.* 203, 1459–1470 (2006)
47. Ogura H. Murakami M. Okuyama Y. Tsuruoka M. Kitabayashi C. Kanamoto M. Nishihara M. Iwakura Y. Hirano T. Interleukin-17

Promotes Autoimmunity by Triggering a Positive-Feedback Loop via Interleukin-6 Induction. *Immunity*. 29, 628-636

48. Murakami M. Harada M. Kamimura D. Ogura H. Okuyama Y. Kumai N. Okuyama A. Singh R. Jiang JJ. Atsumi T. Shiraya S. Nakatsuji Y. Kinoshita M. Kohsaka H. Nishida M. Sakoda S. Miyasaka N. Yamauchi-Takahara K. Hirano T. Disease-association analysis of an inflammation-related feedback loop. *Cell Rep.* 28, 946-959 (2013)
49. Murakami M. Okuyama Y. Ogura H. Asano S. Arima Y. Tsuruoka M. Harada M. Kanamoto M. Sawa Y. Iwakura Y. Takatsu K. Kamimura D. Hirano T. Local microbleeding facilitates IL-6 and IL-17-dependent arthritis in the absence of tissue antigen recognition by activated T cells. *J Exp Med.* 208, 103-114 (2011)
50. Arima Y. Harada M. Kamimura D. Park JH. Kawano F. Yull FE. Kawamoto T. Iwakura Y. Betz UA. Marquez G. Blackwell TS. Ohira Y. Hirano T. Murakami M. Regional neural activation defines a gateway for autoreactive T cells to cross the blood-brain barrier. *Cell.* 148, 447-457 (2012)
51. Brian JB. An atomic-resolution mechanism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 47, 16399-16400 (2004)

52. Rokosz LL. Boulton DA. Butkiewicz EA. Sanyal G. Cueto MA. Lachance PA. Hermes JD. Human Cytoplasmic 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Synthase: Expression, Purification, and Characterization of Recombinant Wild-Type and Cys¹²⁹ Mutant Enzymes. *Arch of Biochem and Biophysis.* 312, 1-13 (1994)
53. Pojer F. Ferrer JL. Richard SB. Nagegowda DA. Chye ML. Bach TJ. Noel JP. Structural basis for the design of potent and species-specific inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 11491-11496 (2006)
54. Middleton B. Apps DK. Subcellular distribution of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase, acetoacetyl-CoA thiolase and NAD kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem et Biophysica acta.* 177, 276-285 (1969)
55. Clinkenbeard KD. Reed WD. Mooney RA. Lane MD. Intracellular localization of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A cycle enzyme in liver. Separate cytoplasmic and mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A generating systems for cholesterologenesis and ketogenesis. *J Biol Chem.* 250, 3108-3116 (1975)
56. Wang VY. Huang W. Asagiri M. Spann N. Hoffmann A. GlassC. Ghosh G. The Transcriptional Specification of NF- κ B Dimers Is Coded

- within the κ B DNA Response Elements. *Cell Rep.* 25, 824–839 (2012)
57. Tata JR. Signaling through nuclear receptors. *Nature Rev Mol Cell Bio.* 3, 702–710 (2002)
58. Wang Y. Jensen RC. Stumph WE. Role of TATA Box Sequence and Orientation in Determining RNA Polymerase II/III Transcription Specificity. *Nucl Acids Res.* 24, 3100–3106 (1996)
59. Nikolov DB. Burley SK. RNA Polymerase II transcription initiation: A structural view. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 15–22 (1997)
60. Murakami KS. Masuda S. Campbell EA. Muzzin O. Darst SA. Structural Basis of Transcription Initiation: An RNA Polymerase Holoenzyme–DNA Complex. *Science.* 296, 1285–1290 (2002)
61. Bulut-Karslioglu A. Perrera V. Scaranaro M. de la Rosa-Velanzque IA. Van de Nobelen S. Shukeir N. Popow J. Gerle B. Opravil S. Pagani M. Meidhof S. Brablett T. Manke T. Lachner M. Jenuwein T. A transcription factor–based mechanism for mouse heterochromatin formation. *Nat Struct Mol Biol.* 19, 1023–1030 (2012)

62. Zhang Y. Feng Y. Chatterjee S. Tuske S. Ho MX. Arnold E. Ebright RH. Structural Basis of Transcription Initiation. *Science*. 23, 1176–1080 (2012)
63. Sainsbury S. Bernecke C. Cramer P. Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nature Rev Mol Cell Bio*. 16, 129–143 (2015)
64. Chatterjee N. Sinha D. Lemma-Dechassa M. Tan S. Shogren-Knaak MA. Bartholomew B. Histone H3 tail acetylation modulates ATP-dependent remodeling through multiple mechanisms. *Nucleic Acids Res*. 39, 8378–8391 (2011)
65. Gerritsen ME. Williams AJ. Neish AS. Moore S. Shi Y. Collins T. CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94, 2927–2932 (1997)
66. Zhong H. Voll RE. Ghosh S. Phosphorylation of NF- κ B p65 by PKA Stimulates Transcriptional Activity by Promoting a Novel Bivalent Interaction with the Coactivator CBP/p300. *Mol Cell*. 1, 661–671 (1998)
67. Liu Y. Denlinger CE. Rundall BK. Smith PW. Jones DR. Suberoylanilide Hydroxamic Acid Induces Akt-mediated Phosphorylation of p300, Which Promotes Acetylation and

- Transcriptional Activation of RelA/p65. *J Biol.* 281, 31359–31368 (2006)
68. Hwang YJ. Lee EW. Song J. Kim HR. Jun YC. Hwang KA. MafK positively regulates NF- κ B activity by enhancing CBP-mediated p65 acetylation. *Sci Reports.* 3, 3242 (2013)
69. Saksouk N. Simboeck E. Dejardin J. Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics Chromatin.* 8, 3 (2015)
70. Fodor BD. Kubicek S. Yonezawa M. o' Sullivan RJ. Sengupta R. Perez-Burgos L. Opravil S. Mechtler K. Schotta G. Jenuwein T. Jmjd2b antagonizes H3K9 trimethylation at pericentric heterochromatin in mammalian cells. *Genes Dev.* 20, 1557–1562 (2006)
71. Takahashi M. Kojima M. Nakajima K. Suzuki-Migishima R. Takeuchi T. Functions of a *jumonji-cyclin* D1 pathway in the coordination of cell cycle exit and migration during neurogenesis in the mouse hindbrain. *Dev Biol.* 303, 549–560 (2007)
72. Lachner M. o' Carroll D. Rea S. Mechtler K. Jenuwein T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature.* 410, 116–120 (2001)

73. Bannister AJ. Zegerman P. Partridge JF. Miska EA. Thomas JO. Allshire RC. Kouzarides T. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*. 410. 120–124 (2001)
74. Euskirchen G. Auerbach RK. Snyder M. SWI/SNF chromatin-remodeling factors: multiscale analyses and diverse functions. *J Biol Chem*. 287, 30897–30905 (2012)
75. Erdel F. Rippe K. Chromatin remodeling in mammalian cells by ISWI-type complexes—where, when and why? *FEBS J*. 278, 3608–3618 (2011)
76. Ramirez J. Hagman J. The Mi-2/NuRD complex: a critical epigenetic regulator of hematopoietic development, differentiation and cancer. *Epigenetics*. 4, 531–536 (2009)
77. Morrison AJ. Shen X. Chromatin remodeling beyond transcription: the IN080 and SWR1 complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10, 373–384 (2009)
78. Jin Q. Yu LR. Wang L. Zhang Z. Kasper LH. Lee JE. Wang C. Brindle PK. Dent SY. Ge K. Distinct roles of GCN5/PCAF-mediated H3K9ac and CBP/p300-mediated H3K18/27ac in nuclear receptor transactivation. *EMBO J*. 20, 249–262 (2011)
79. Hansson ML. Popko-Scibor AE. Saint Just Ribeiro M. Dancy BM. Lindberg MJ. Cole PA. Wallberg AE. The transcriptional

- coactivator MAML1 regulates p300 autoacetylation and HAT activity. *Nucleic Acids Res.* 37, 2996–3006 (2009)
80. Ashburner BP. Westerheide SD. Baldwin AS Jr. The p65(Re1A) Subunit of NF- κ B Interacts with Histone Deacetylase (HDAC) Corepressors HDAC1 and HDAC2 To Negatively Regulate Gene Expression. *Mol Cell Biol.* 21, 7065–7077 (2001)
81. Zhong H. May MJ. Jimi E. Ghosh S. The Phosphorylation Status of Nuclear NF- κ B Determines Its Association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol Cell.* 9, 625–636 (2002)
82. Lin YC. Lin JH. Chou CW. Chang YF. Yeh SH. Chen CC. Statins Increase p21 through Inhibition of Histone Deacetylase Activity and Release of Promoter-Associated HDAC1/2. *Cancer Res.* 68, 2375–2383 (2008)
83. Istvan ES. Deisenhofer J. Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase. *Science.* 292, 1160–1164 (2001)
84. Friesen JA. Rodwell VW. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. *Genome Biol.* 5, 248 (2004)

VIII. 図表

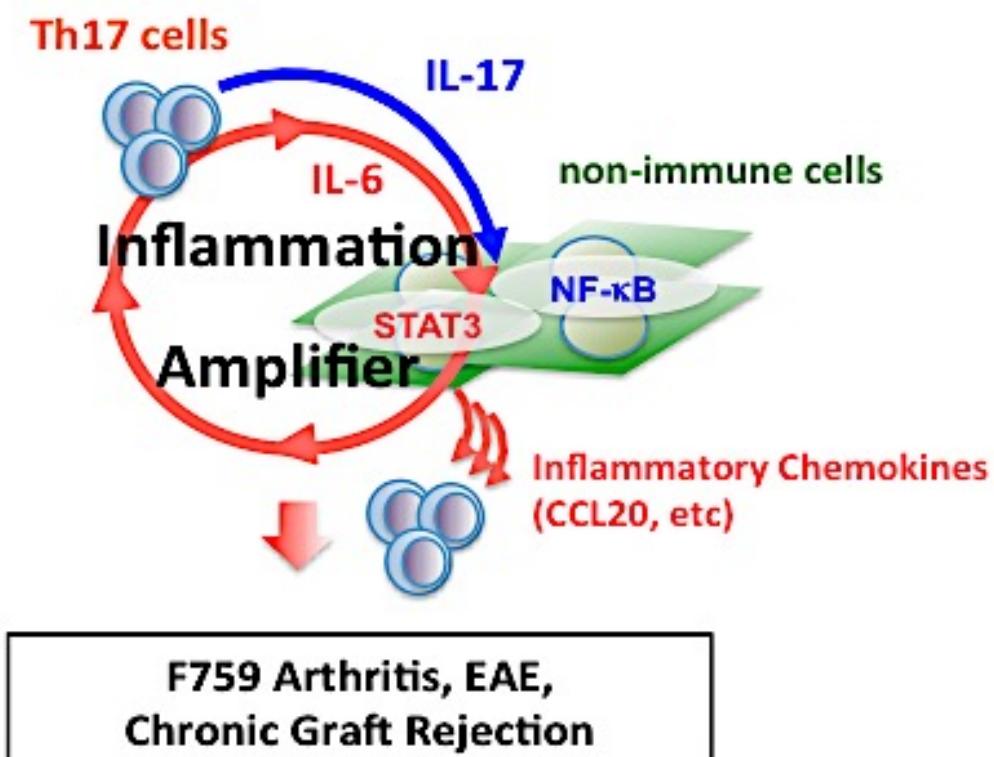


図1 炎症回路の模式図

CD4陽性T細胞由来のIL-17が線維芽細胞に働くとIL-6産生が誘導され、そのIL-6がIL-17と協調的に働いて相乗的なIL-6およびケモカイン産生の亢進を引き起こし、F759関節炎、多発性硬化症モデルEAEおよび慢性移植片拒絶の発症の起点となる (Ogura H., *Immunity*. 29, 628–636, 2009; Murakami M., *Cell Reports*, 28, 946–959, 2013).

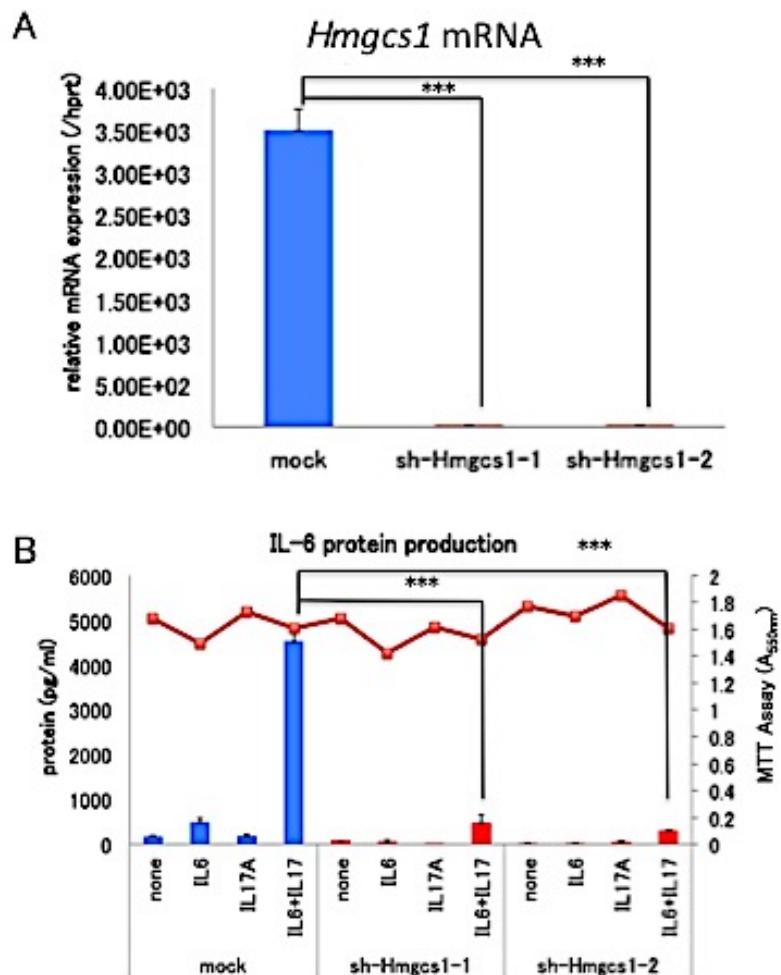


図2 *Hmgcs1*遺伝子ノックダウンによる、IL-6産生量の変化

- A. BC-1細胞に非標的配列のshRNAまたは*Hmgcs1*に特異的なshRNAを導入し、ノックダウン安定株を作製し、*Hmgcs1* mRNAの発現量を計測した。
- B. 血清非存在下でIL-6 (100 ng/ml) およびIL-17 (50 ng/ml)を添加し、24時間後にELISA法にて培養上清中のIL-6濃度(棒グラフ)を、MTT試験により細胞の生存(折れ線グラフ)を計測した。
- Dunnet法: $P < 0.001$ (***)

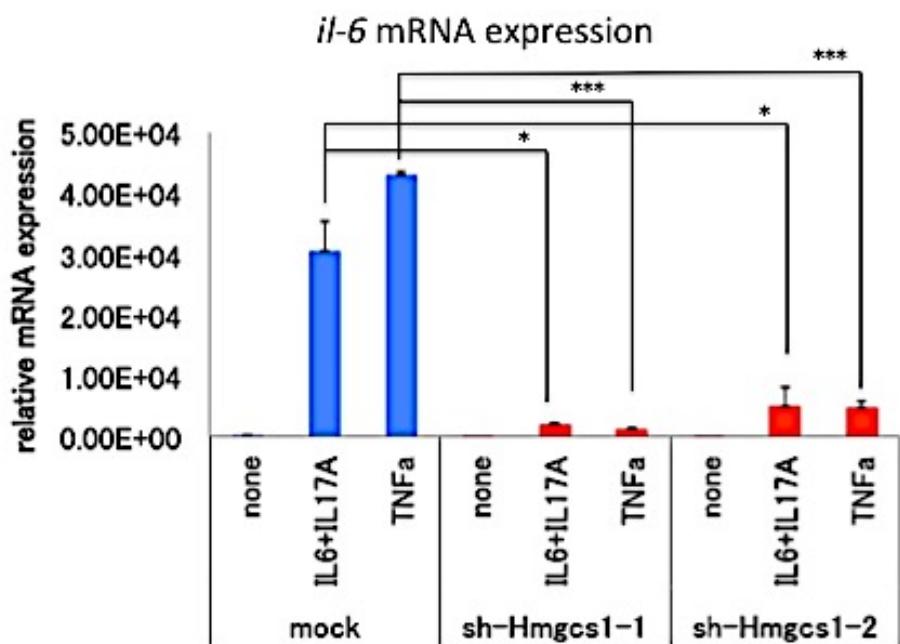


図3 Hmgcs1遺伝子ノックダウンによる*IL-6* mRNA発現量の変化
 Hmgcs1遺伝子ノックダウンBC-1細胞を血清非存在下でIL-6 (100 ng/ml), IL-17 (50 ng/ml)およびTNF- α (50 ng/ml)を添加し, 3時間後にRNAを回収してIL-6 mRNA発現量をReal-time PCRにより測定した。
 Dunnet法: $P < 0.05$ (*), $P < 0.001$ (***)

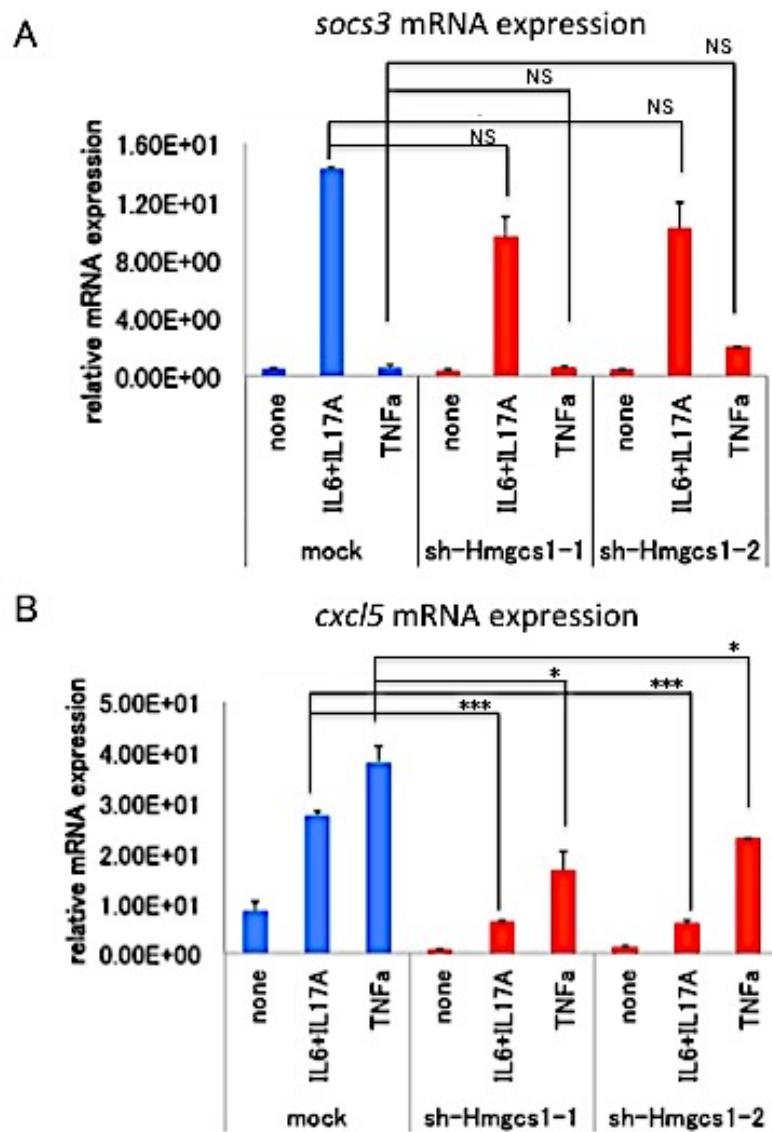


図4 炎症回路を制御するシグナル伝達経路におけるHmgcs1の機能解析

Hmgcs1遺伝子ノックダウンBC-1細胞を血清非存在下でIL-6 (100 ng/ml), IL-17 (50 ng/ml)およびTNF- α (50 ng/ml)を添加し, 3時間後にRNAを回収して*socs3* (A) または*cxc15* (B) のmRNA発現量をReal-time PCRにより測定した.

Dunnet法: $P < 0.05$ (*), $P < 0.001$ (***)

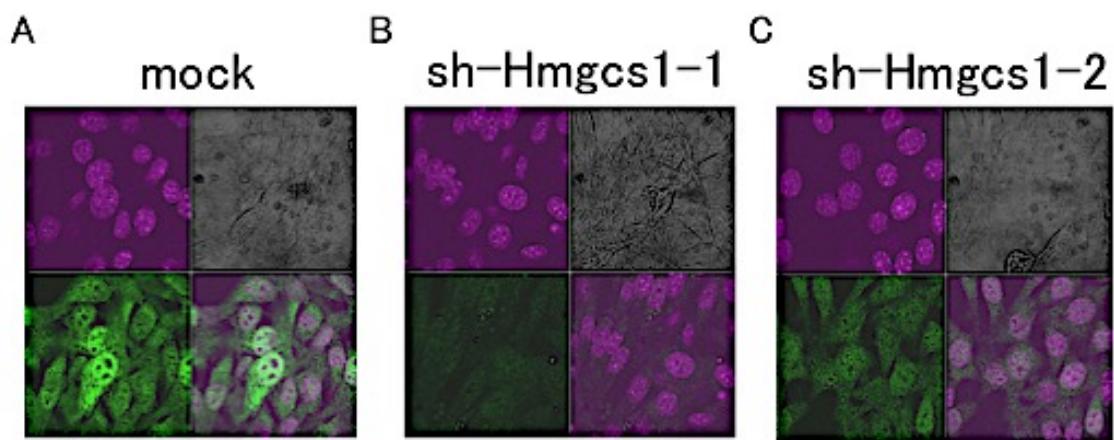


図5 Hmgcs1の細胞内局在

Glass Base Dish (IWAKI)に 3.0×10^4 細胞数のmock細胞 (A) およびsh-1 (B), sh-2細胞 (C) を培養し, 固定後, 抗Hmgcs1抗体にて蛍光免疫染色をおこなった. また, Hoechst33342 (invitrogen)にて核染色をおこない, 共焦点レーザー顕微鏡下 (LSM5 PASCAL, ZEISS)でHmgcs1の発現を確認した。

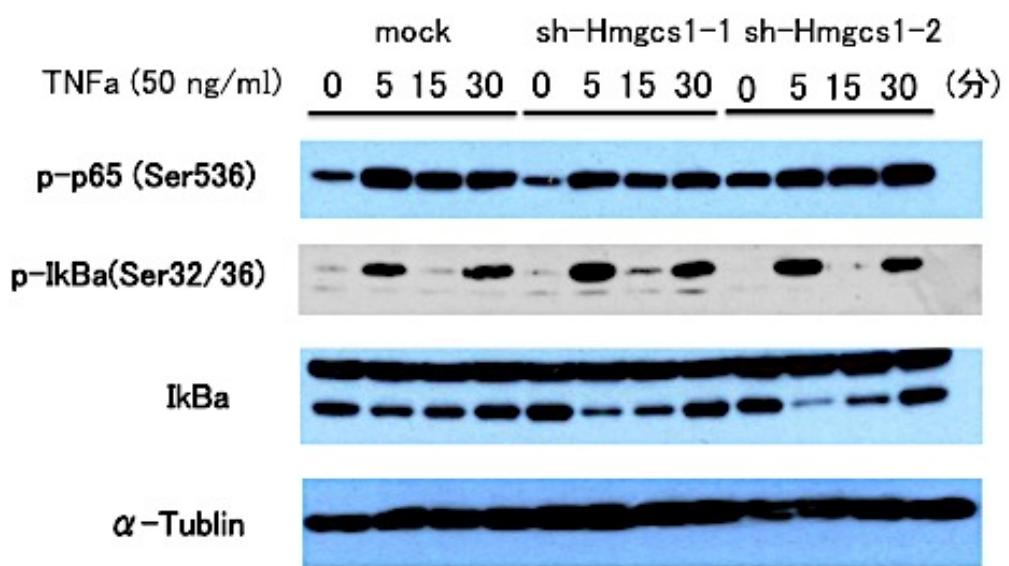


図6 NF- κ Bの細胞質での活性化に対するHmgcs1の機能解析
 Hmgcs1遺伝子ノックダウンBC-1細胞を血清非存在下でTNF- α (50 ng/ml)を添加し, その0, 5, 15, 30分後に細胞を溶解した. 細胞溶解物をSDS-PAGEでタンパク質を分離し, 図に示す抗体にてそれぞれのタンパク質の発現を検出した. (矢印: I κ B α を示す)

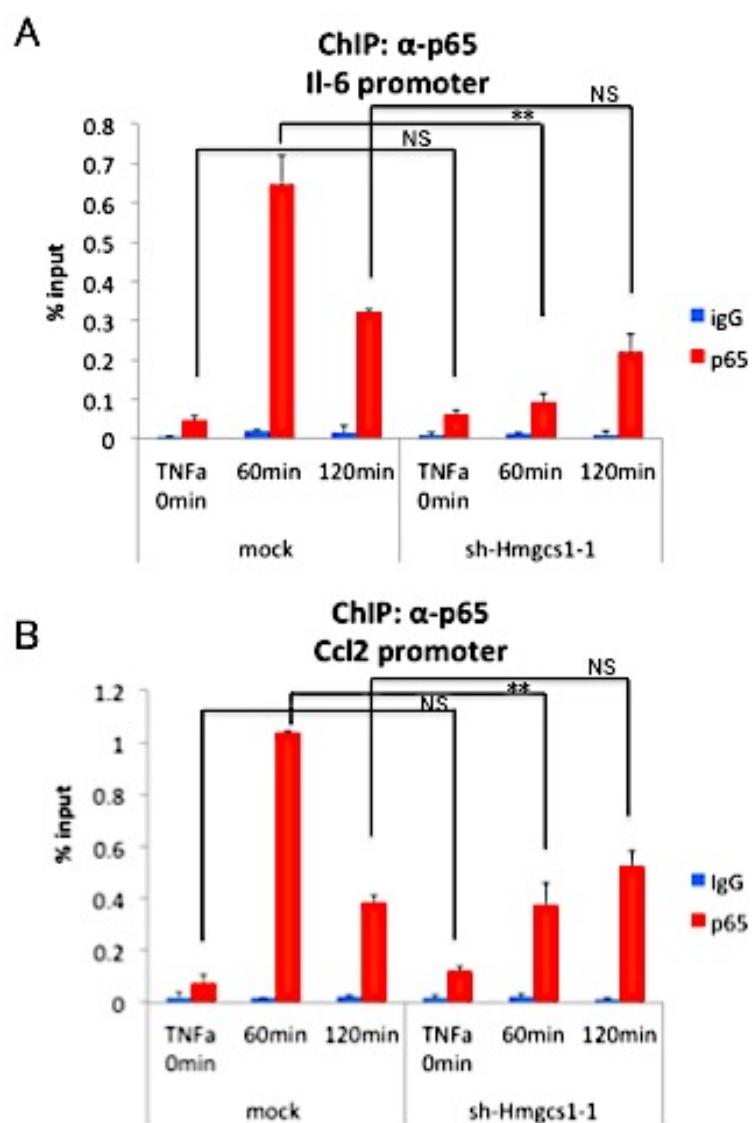


図7 Hmgcs1遺伝子ノックダウンBC-1細胞におけるNF- κ B標的プロモーター領域へのNF- κ BサブユニットRelA(p65)のリクルートメント解析

Hmgcs1遺伝子ノックダウンBC-1細胞を血清非存在下でTNF- α (50 ng/ml)を添加し, 0, 60, 120分後に細胞を固定した。固定後に細胞を回収し, 超音波処理でDNAを細断後細胞を溶解した。抗p65抗体にて免疫沈降後, DNAを回収し, Real-time PCRにてNF- κ B標的プロモーター領域部分を測定した (A:Il-6, B:Ccl2)。

Repeated measures ANOVA+Tukey法: $P < 0.01$ (**)

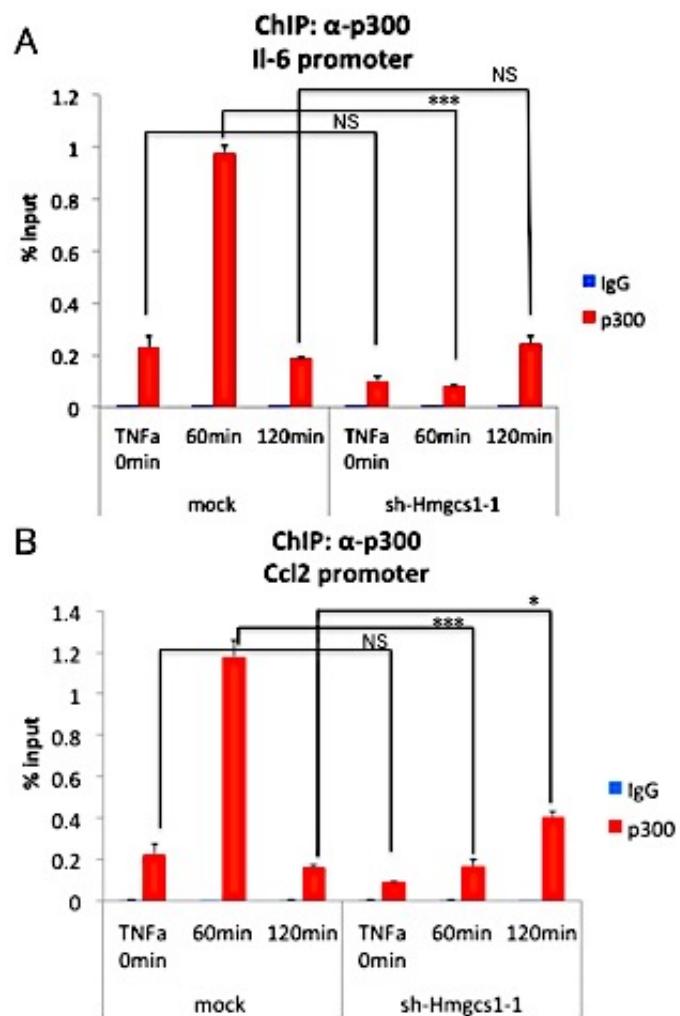


図8 Hmgcs1遺伝子ノックダウンBC-1細胞におけるNF- κ B標的プロモーター領域へのヒストンアセチル基転移酵素p300のリクルートメント解析

Hmgcs1遺伝子ノックダウンBC-1細胞を血清非存在下でTNF- α (50 ng/ml)を添加し, 0, 60, 120分後に細胞を固定した。固定後に細胞を回収し, 超音波処理でDNAを細断後細胞を溶解した。抗p300抗体にて免疫沈降後, DNAを回収し, Real-time PCRにてNF- κ B標的プロモーター領域部分を測定した (A:IL-6, B:Ccl2)。

Repeated measures ANOVA+Tukey法: $P < 0.05$ (*), $P < 0.001$ (***)

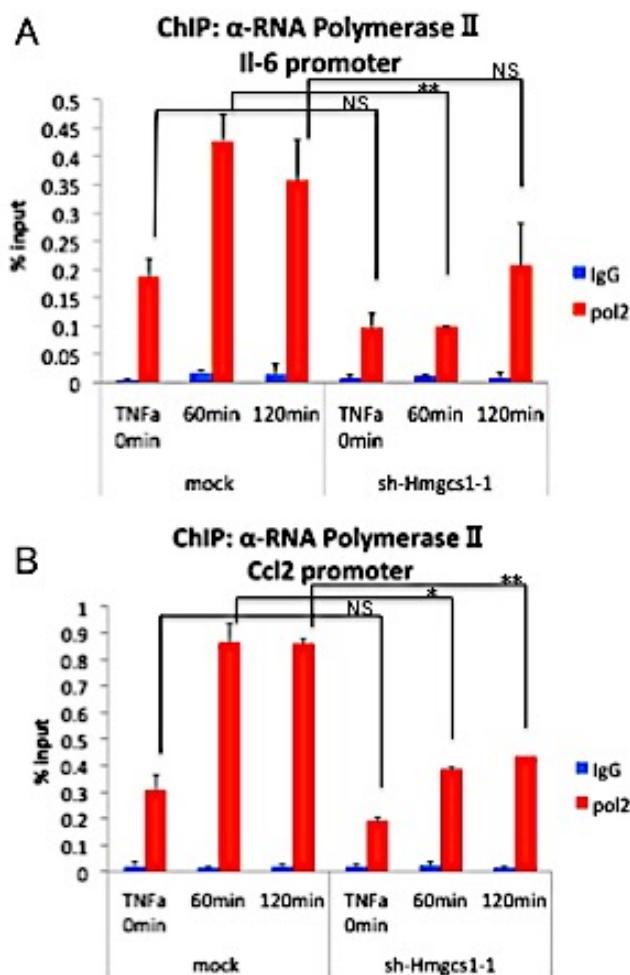


図9 Hmgcs1遺伝子ノックダウンBC-1細胞におけるNF- κ B標的プロモーター領域へのRNAポリメラーゼIIのリクルートメント解析
 Hmgcs1遺伝子ノックダウンBC-1細胞を血清非存在下でTNF- α (50 ng/ml)を処理し, 0, 60, 120分後に細胞を固定した。固定後に細胞を回収し, 超音波処理でDNAを細断後細胞を溶解した。抗RNA polymerase II抗体にて免疫沈降後, DNAを回収し, Real-time PCRでNF- κ B標的プロモーター領域部分を測定した (A:Il-6, B:Ccl2)。

Repeated measures ANOVA+Tukey法: $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**)

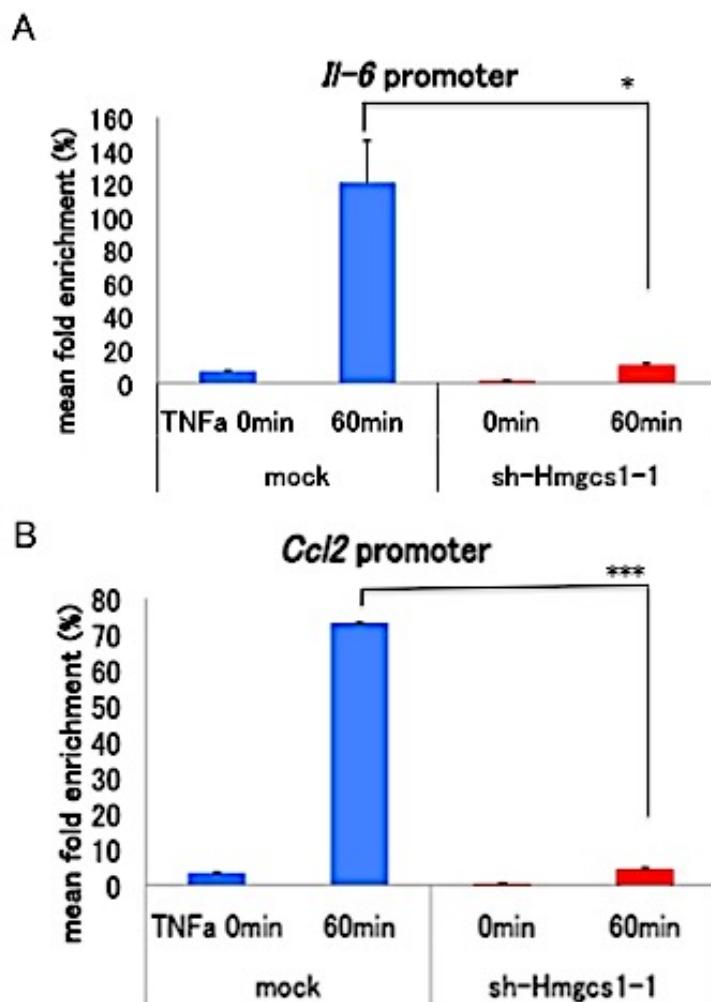


図10 Hmgcs1遺伝子ノックダウンBC-1細胞におけるNF- κ B標的プロモーター領域でのクロマチン構造の開裂解析

Hmgcs1遺伝子ノックダウンBC-1細胞を血清非存在下でTNF- α (50 ng/ml)を添加し, 0, 60分後に細胞を溶解した。細胞溶解物をDnase処理するものとDnase非処理のものに分け, それぞれからDNAを回収し, Real-time PCRでNF- κ B標的プロモーター領域部分を測定した (A:IL-6, B:Ccl2)。

Repeated measures ANOVA+Tukey法: $P < 0.05$ (*), $P < 0.001$ (***)

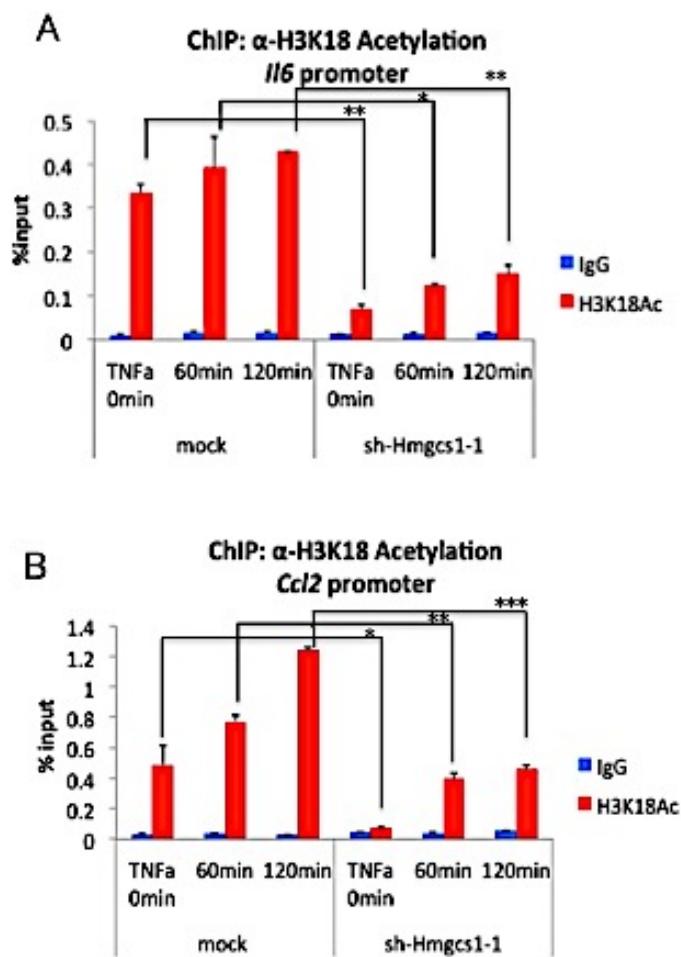


図11 Hmgcs1遺伝子ノックダウンBC-1細胞におけるヒストンH3K18のアセチル化の解析

Hmgcs1遺伝子ノックダウンBC-1細胞を血清非存在下でTNF- α (50 ng/ml)を添加し, 0, 60, 120分後に細胞を固定した。固定後に細胞を回収し, 超音波処理でDNAを細断後細胞を溶解した。各抗体にて免疫沈降後, DNAを回収し, Real-time PCRでNF- κ B標的プロモーター領域部分を測定した (A:*Il-6*, B:*Ccl2*)。

Repeated measures ANOVA+Tukey法: $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)

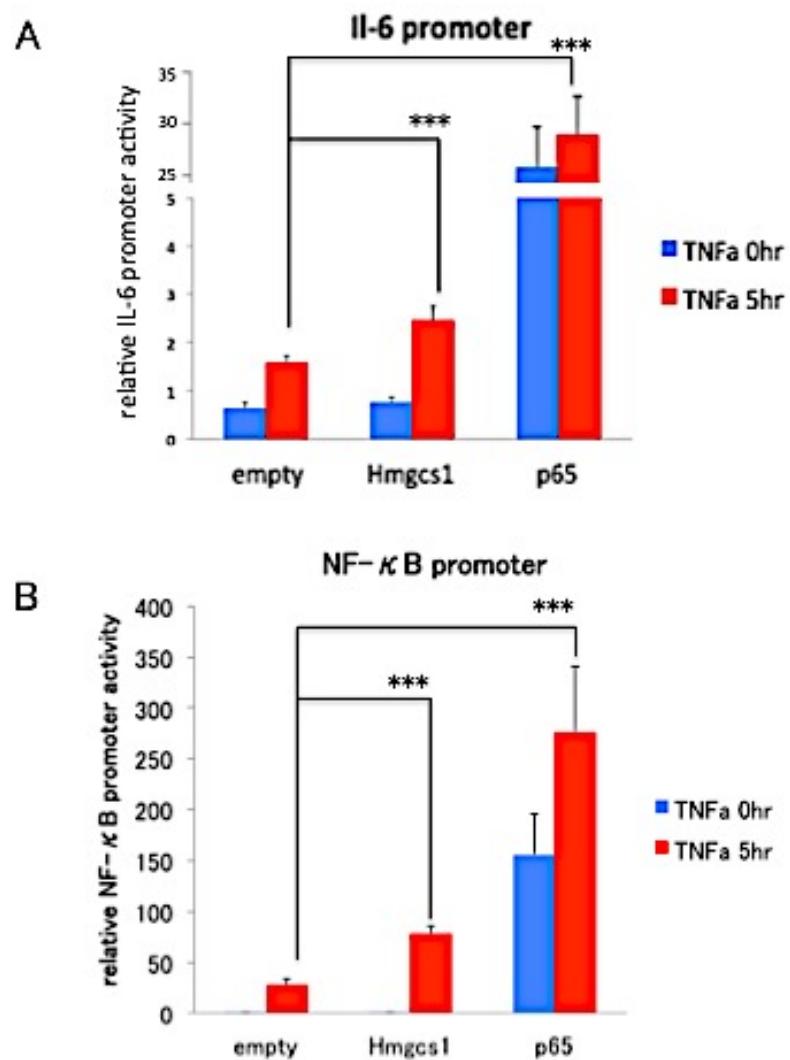


図12 *Hmgcs1*の過剰発現によるNF- κ B標的プロモーター活性の解析

HEK293T細胞にIL-6 promoter luciferase gene, または, 5×NF- κ B luciferase geneとpRL-TKおよび各遺伝子を導入し, 48時間後にマウスTNF- α (50 ng/ml)を添加した. 培養5時間後にレポーター活性を調べた (A:IL-6, B:NF- κ B).

Dunnet法: $P < 0.001$ (***)

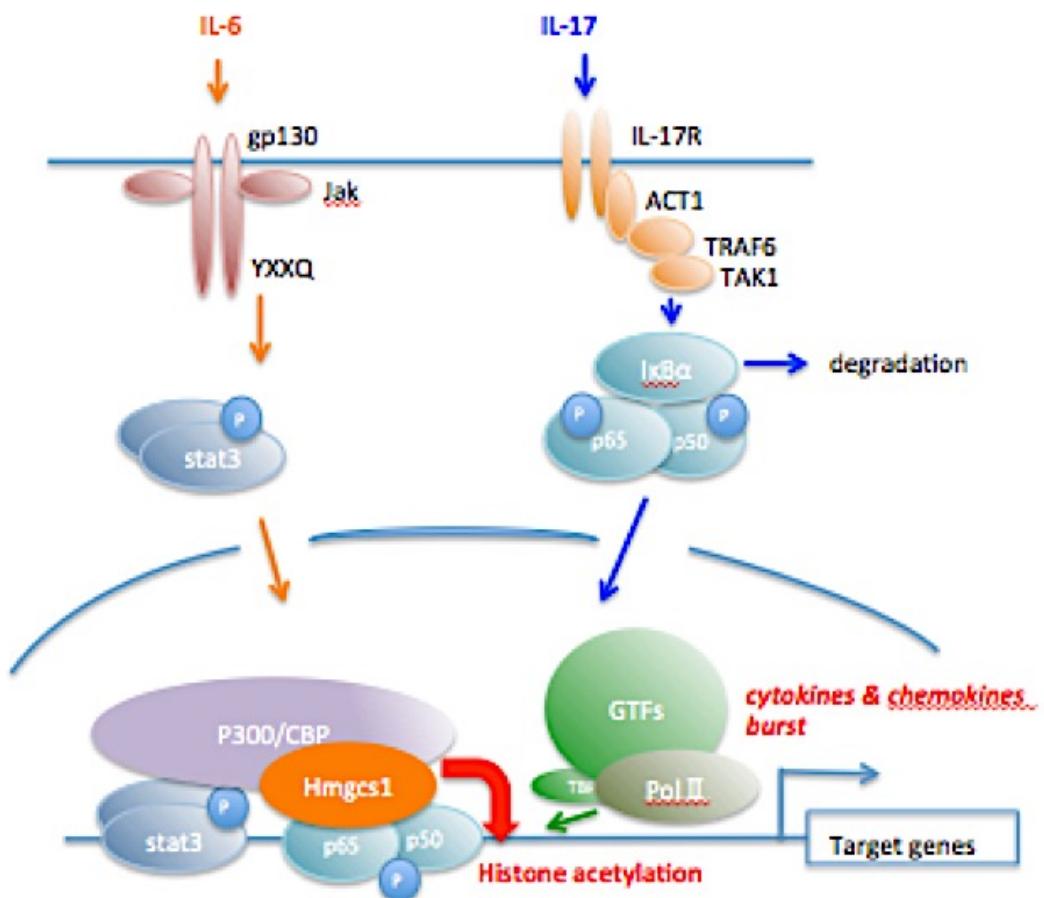


図13 炎症回路のメカニズム

IL-6とIL-17の刺激により、それぞれSTAT3とNF- κ Bが活性化する。すると、STAT3とNF- κ Bが核内に移行し、核内の炎症性サイトカインおよびサイトカイン遺伝子のプロモーター領域に結合する。そこで、ヒストンアセチル基転移酵素p300/CBP及びHmgcs1が誘導され、周囲のヒストンのリジン残基をアセチル化する。アセチル化を指標にクロマチン構造が開かれると基本転写因子やRNAポリメラーゼIIが誘導され、最終的に標的遺伝子の過剰発現が生じる。

表 1. Real-time PCR に使用したプライマー配列

遺伝子	配列
Mouse <i>Hprt</i>	Forward: 5' -GATTAGCGATGAACCAGGTT-3' Reverse: 5' -CCTCCCATCTCCTTCATGACA-3'
Mouse <i>Hmgcs1</i>	Forward: 5' -AACTGGTGCAGAAATCTCTAGC-3' Reverse: 5' -GGTTGAATAGCTCAGAACTAGCC-3'
Mouse <i>I16</i>	Forward: 5' -GAGGATACCACTCCAACAGACC-3' Reverse: 5' -AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA-3'
Mouse <i>Socs3</i>	Forward: 5' -GAGATTCGCTTCGGGACTA-3' Reverse: 5' -GCTGGTACTCGCTTTGGAG-3'
Mouse <i>Cxcl5</i>	Forward: 5' -TGCCCTACGGTGGAAAGTCATA-3' Reverse: 5' -TGCATTCCGCTTAGCTTCTTT-3'

表2. Western blotting に用いた抗体

抗体	使用濃度	メーカー
1 次抗体		
ラビット抗マウス phospho-p65 (Ser536) 抗体 (93H1)	1/3,000	Cell Signaling (Danvers, Massachusetts, USA)
マウス抗マウス phospho-I κ B α (Ser32/Ser36) 抗体 (5A5)	1/3,000	Cell Signaling
ラビット抗マウス p65 抗体 (c-20)	1/3,000	Santa Cruz (Santa Cruz, California, USA)
ラビット抗マウス I κ B α 抗体 (c-15)	1/3,000	Santa Cruz
マウス抗マウス α -tubulin 抗体 (T5168)	1/10,000	Sigma Aldrich
2 次抗体		
HRP 標識抗ラビット IgG 抗体	1/10,000	Southern Biotech (Birmingham, Alabama, USA)
HRP 標識抗マウス IgG 抗体	1/5,000	Southern Biotech

表3. ChIP Assay に用いたプライマー配列および抗体

プライマー配列	
抗体	メーカー
Mouse <i>I16</i> promoter	Fw: 5' -TCGATGCTAACGACGTCAC-3' Rv: 5' -TGAGCTACAGACATCCCCAGT-3'
Mouse <i>Cc12</i> promoter	Fw: 5' -TGGCCCAGAGTAAGCACTAG-3' Rv: 5' -TAAGTCGGCTGAGTCCTTGG-3'
抗マウス p65 抗体 (C-20)	Santa Cruz
抗マウス p300 抗体 (N-15)	Santa Cruz
抗マウス RNA Polymerase II (H-224)	Santa Cruz

表4. Chromatin Accessibility Assay に用いたプライマー配列

プライマー配列	
Mouse <i>I16</i> promoter	Fw: 5' -TCGATGCTAACGACGTCAC-3'
Mouse <i>I16</i> promoter	Rv: 5' -TGAGCTACAGACATCCCCAGT-3'
Mouse <i>Cc12</i> promoter	Fw: 5' -TGGCCCAGAGTAAGCACTAG-3'
Mouse <i>Cc12</i> promoter	Rv: 5' -TAAGTCGGCTGAGTCCTTGG-3'
