

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	大阪大学歯学雑誌. 64(1) P.13-P.20
Issue Date	2019-10-20
Text Version	publisher
URL	http://hdl.handle.net/11094/77397
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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

板東 秀典*

(令和元年5月20日受付)

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産生し、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。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産生し、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収を誘発する。このような根尖部歯周組織の炎症および歯槽骨の吸収が根尖性歯周炎の主たる病態である。

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産生され、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¹⁾⁻³⁾。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^{4),5)}。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。

ここで、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ことが知られている⁶⁾。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⁷⁾。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^{8),9)}。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¹⁰⁾。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^{11),12)}。

* 大阪大学大学院歯学研究科 歯科保存学教室

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⁶⁾。このF759マウスは生後1年から1年半以内にはほぼ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¹³⁾。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、パンスス形成、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-17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¹⁴⁾。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IL-17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¹⁵⁾。

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増幅する炎症誘導機構は「炎症回路」と呼ばれている (図1)^{16), 17)}。また、関節抗原を認識しないTCR1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¹⁸⁾。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

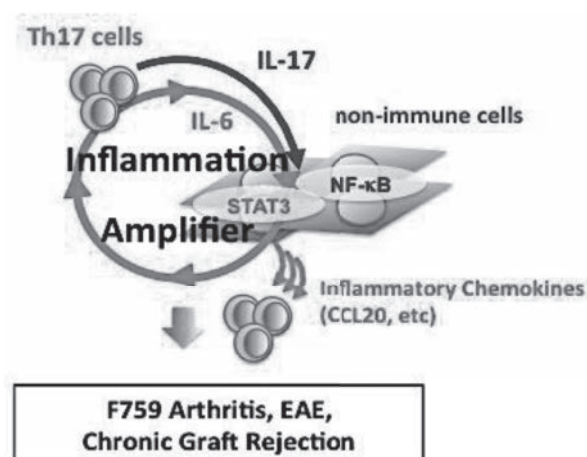


図1 炎症回路の模式図

CD4陽性T細胞由来のIL-17が線維芽細胞に働くことと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)

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¹⁶⁾。ここでは、マウスの線維芽細胞よりも顕著に炎症回路が活性化す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¹⁶⁾。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¹⁹⁾。 *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¹⁹⁾。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²⁰⁾。 *Hmgcs1* は細胞質と核内に存在し²¹⁾、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。

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:CCGGGCAGATTATGTGTTGC TAAACTCGAGTTTAAAGCAACACATAATCTGCTTTTTG および sh2:CCGGGATCTTTCACTCACCATATTGCTCGA GCAATATGGTGAGTGAAAGATCTTTTTTGG) 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を加えて調整し、40 $\mu\text{l}/\text{well}$ ずつ細胞に添加した。5.0% CO_2 , 37°C 下で 24 時間培養後、培養液に最終濃度が 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように Puromycin を加えた培地を 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 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 回を行い、基質を添加し 5-10 分後に 2.0 M H_2SO_4 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 培地で希釈した MTT 試薬 (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を 70 $\mu\text{l}/\text{well}$ で加えて、5.0% CO_2 , 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 $\mu\text{l}/\text{well}$ 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 産物を鋳型とし

て、マウス *Il6*, *Socs3*, *Cxcl5* 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} ~ 10^{-18} g/ μ l 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. 統計処理

実験データは、平均値 \pm 標準偏差 (Mean \pm SD) 又は平均値 \pm 標準誤差 (Mean \pm 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。

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>Il6</i>	Forward: 5'-GAGGATACCACTCCCAACAGACC-3' Reverse: 5'-AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3'
Mouse <i>Socs3</i>	Forward: 5'-GAGATTTTCGCTTCGGGACTA-3' Reverse: 5'-GCTGGTACTCGCTTTTGGAG-3'
Mouse <i>Cxcl5</i>	Forward: 5'-TGCCCTACGGTGGAAAGTCATA-3' Reverse: 5'-TGCATTCCGCTTAGCTTTCTTT-3'

研究結果

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 2A)。

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

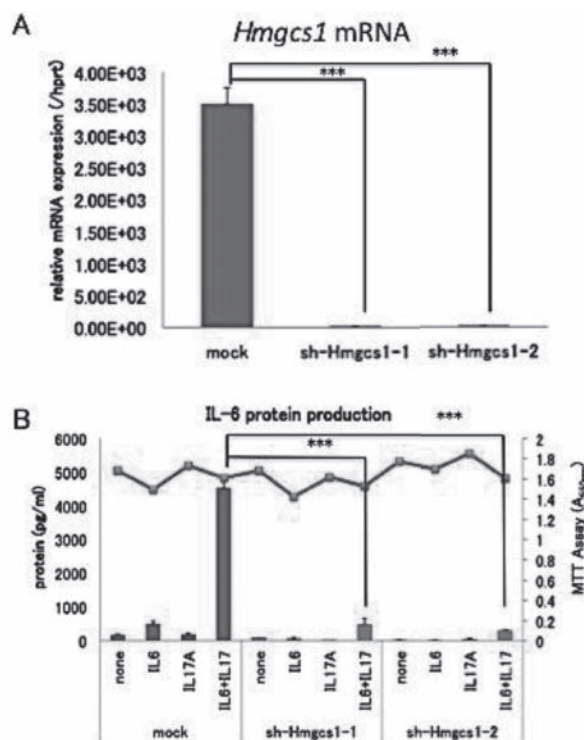


図 2 *Hmgcs1* 遺伝子ノックダウンによる、IL-6 産生量の変化

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: $P < 0.001$ (***)

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 2B)。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 2B)。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 1B 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 3)。

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¹⁶⁾⁻¹⁸⁾。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 *cxcl5* 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ったが, sh1 および sh2 細胞で *cxcl5* の発現量が有意に抑制された (図 4)。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った。

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¹⁶⁾を標的として, その制御因子候補である Hmgcs1 に着目し, 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^{16), 17)}。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

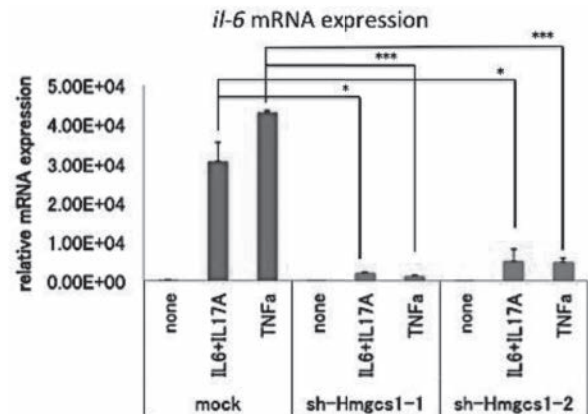


図 3 Hmgcs1 遺伝子ノックダウンによる, *il-6* mRNA 発現量の変化

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

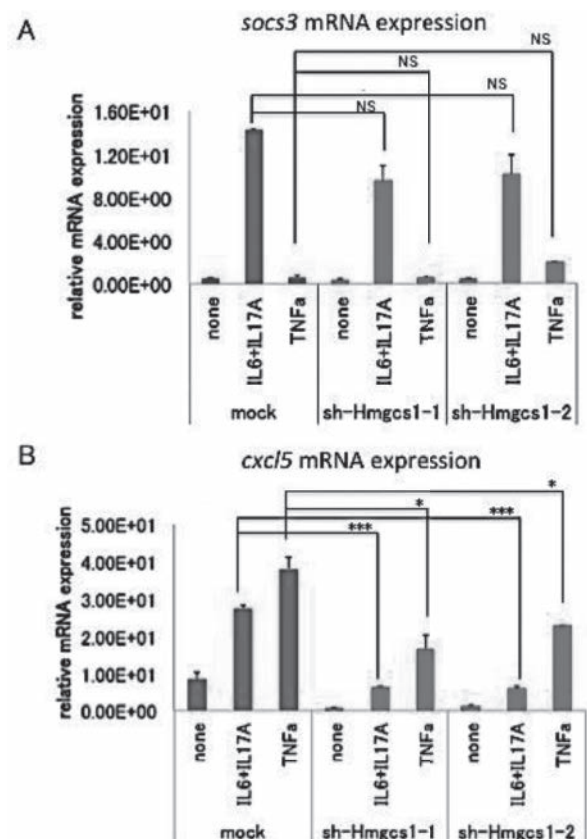


図 4 炎症回路を制御するシグナル伝達経路における Hmgcs1 の機能解析

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 *cxcl5* (B) の mRNA 発現量を Real-time PCR により測定した。

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

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)。

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²²⁾。この結合には p65 の細胞質でのリン酸化が必要で²³⁾, 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, 転写活性が上がるということが報告されている^{24), 25)}。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。

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, ハウスキープ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²⁶⁾。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。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ることが知られている²⁷⁾⁻³⁰⁾。Hmgcs1 のさらなる解析結果から, コントロールの細胞では刺激に応じてユーク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クロマチンの状態になりにくいことがわかった (data not shown)。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³¹⁾⁻³⁴⁾, 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³⁵⁾。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。

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¹⁶⁾。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¹⁶⁾。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。

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 NF- κ B 経路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。

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感染制御学講座 (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感染制御学講座 (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感染制御学講座 (歯科保存学教室) の教員各位に心から感謝致します。

参考文献

- 1) Janeway Jr, CA. (1989): Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **54**, 1-13.
- 2) Litman, GW., Rast, JP., Fugmann, SD. (2010): The origins of vertebrate adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, **10**, 543-553.
- 3) William, EP. (2011): Bridging Innate and Adaptive Immunity. *Cell*, **147**, 1212-1215.
- 4) Takeda, K. and Akira, S. (2004): TLR signaling pathways. *Seminars in Immunol*, **16**, 3-9.
- 5) Schroder, K. and Tschopp, J. (2010): The Inflammasomes. *Cell*, **140**, 821-832.
- 6) Ohtani, T., Ishihara, K., Atsumi, T., Nishida, K., Kaneko, Y., Miyata, T., Itoh, S., Narimatsu, M., Maeda, H., Fukada, T., Itoh, M., Okano, H., Hibi, M., Hirano, T., (2000): Dissection of signaling cascades through gp130 in vivo: reciprocal roles for STAT3- and SHP2-mediated signals in immune responses. *Immunity*, **12**, 95-105.
- 7) Hirano, T. (1998): Interleukin-6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol*, **16**, 249-284.
- 8) Yamanaka, Y., Nakajima, K., Fukada, T., Hibi, M., Hirano, T., (1996): Differentiation and growth arrest signals are generated through the cytoplasmic region of gp130 that is essential for Stat3 activation. *EMBO J*, **15**, 1557-1565.
- 9) Nakajima, K., Yamanaka, Y., Nakae, K., Kojima, H., Ichiba, M., Kikuchi, N., Kitaoka, T., Fukada, T., Hibi, M., Hirano, T., (1996): A central role for Stat3 in IL-6-induced regulation of growth and differentiation in M1 leukemia cells. *EMBO J*, **15**, 3651-3658.
- 10) Takahashi-Tezuka, M., Yoshida, Y., Fukada, T., Ohtani, T., Yamanaka, Y., Nishida, K., Nakajima, K., Hibi, M., Hirano, T., (1998): Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol*, **18**, 4109-4117.
- 11) Hirano, T. (2010): Interleukin 6 in autoimmune and inflammatory diseases: a personal memoir. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, **86**, 717-730.
- 12) Kershaw, NJ., Murphy, JM., Lucet, IS., Nicola, NA., Babon, JJ., (2013): Regulation of Janus Kinases by SOCS proteins. *Biochem Soc Trans*, **41**, 1042-1047.
- 13) Atsumi, T., Ishihara, K., Kamimura, D., Ikushima, H., Ohtani, T., Hirota, S., Kobayashi, H., Park, SJ., Saeki, Y., Kitamura, Y., Hirano, T., (2002): A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis. *J Exp Med*, **196**, 979-990.
- 14) Sawa, S., Kamimura, D., Jin, GH., Morikawa, H., Kamon, H., Nishihara, M., Ishihara, K., Murakami, M., Hirano, T. (2006): 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.
- 15) Ogura, H., Murakami, M., Okuyama, Y., Tsuruoka, M., Kitabayashi, C., Kanamoto, M., Nishihara, M., Iwakura, Y., Hirano, T. (2008): Interleukin-17 Promotes Autoimmunity by Triggering a Positive-Feedback Loop via Interleukin-6 Induction. *Immunity*, **29**, 628-636.
- 16) 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. (2013): Disease-association analysis of an inflammation-related feedback loop. *Cell Rep*, **28**, 946-959.
- 17) 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. (2011): 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.
- 18) 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. (2012): Regional neural activation defines a gateway for autoreactive T cells to cross the blood-brain barrier. *Cell*, **148**, 447-457.
- 19) Brian, JB. (2004): An atomic-resolution mechanism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **47**, 16399-16400.
- 20) Rokosz, LL., Boulton, DA., Butkiewicz, EA., Sanyal, G., Cueto, MA., Lachance, PA., Hermes, JD. (1994): 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.
- 21) Clinkenbeard, KD., Reed, WD., Mooney, RA., Lane, MD. (1975): 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.
 - 22) Gerritsen, ME., Williams, AJ., Neish, AS., Moore, S., Shi, Y., Collins, T. (1997): CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 2927-2932.
 - 23) Zhong, H., Voll, RE., Ghosh, S. (1998): 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.
 - 24) Liu, Y., Denlinger, CE., Rundall, BK., Smith, PW., Jones, DR., (2006): Suberoylanilide Hydroxamic Acid Induces Akt-mediated Phosphorylation of p300, Which Promotes Acetylation and Transcriptional Activation of RelA/p65. *J Biol*, **281**, 31359-31368.
 - 25) Hwang, YJ., Lee, EW., Song, J., Kim, HR., Jun, YC., Hwang, KA. (2013): MafK positively regulates NF- κ B activity by enhancing CBP-mediated p65 acetylation. *Sci Reports*, **3**, 3242.
 - 26) Saksouk, N., Simboeck, E., Dejardin, J. (2015): Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics Chromatin*, **8**, 3.
 - 27) Fodor, BD., Kubicek, S., Yonezawa, M., O'Sullivan RJ., Sengupta, R., Perez-Burgos, L., Opravil, S., Mechtler, K., Schotta, G., Jenuwein, T. (2006): Jmjd2b antagonizes H3K9 trimethylation at pericentric heterochromatin in mammalian cells. *Genes Dev*, **20**, 1557-1562.
 - 28) Takahashi, M., Kojima, M., Nakajima, K., Suzuki-Migishima, R., Takeuchi, T. (2007): 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.
 - 29) Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., Jenuwein, T. (2001): Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, **410**, 116-120.
 - 30) Bannister, AJ., Zegerman, P., Partridge, JF., Miska, EA., Thomas, JO., Allshire, RC., Kouzarides, T. (2001): Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, **410**, 120-124.
 - 31) Euskirchen, G., Auerbach, RK., Snyder, M. (2012): SWI/SNF chromatin-remodeling factors: multiscale analyses and diverse functions. *J Biol Chem*, **287**, 30897-30905.
 - 32) Erdel, F. and Rippe, K. (2011): Chromatin remodeling in mammalian cells by ISWI-type complexes—where, when and why? *FEBS J*, **278**, 3608-3618.
 - 33) Ramirez, J. and Hagman, J. (2009): The Mi-2/NuRD complex: a critical epigenetic regulator of hematopoietic development, differentiation and cancer. *Epigenetics*, **4**, 531-536.
 - 34) Morrison, AJ. and Shen, X. (2009): Chromatin remodeling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**, 373-384.
 - 35) Jin, Q., Yu, LR., Wang, L., Zhang, Z., Kasper, LH., Lee, JE., Wang, C., Brindle, PK., Dent, SY., Ge, K. (2011): Distinct roles of GCN5/PCAF-mediated H3K9ac and CBP/p300-mediated H3K18/27ac in nuclear receptor transactivation. *EMBO J*, **20**, 249-262.