

論文の内容の要旨

論文題目 血管内皮細胞における IL-4/Stat6 シグナルを介した
転写活性化機構の解析

指導教員 児玉 龍彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月進学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 戸澤 英人

研究の背景と目的

近年血管内皮において種々の刺激で引き起こされる炎症反応が動脈硬化等の慢性炎症性疾患の進展に深く関わる事が明らかになってきた。炎症時、血管内皮細胞表面に接着因子が発現誘導され、また、内皮細胞におけるケモカイン、炎症促進性サイトカインの発現上昇によってリンパ球や単球といった炎症細胞の血管壁への動員・接着が促進され、続いて血管外の組織への遊走が引き起こされる。現在のところこれらの一連の流れが動脈硬化初期病変進展過程と考えられている。

このように、動脈硬化症等の慢性的炎症を引き起こしている部位の血管内皮細胞では **vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)** 等の接着因子が発現亢進していることが知られている。ゆえに、このような細胞接着の慢性的な発現上昇は慢性炎症性疾患の進展に寄与することが考えられる。接着因子の 1 つである **VCAM-1** の発現誘導を引き起こすアゴニストは **tumor necrosis factor- α (TNF- α)** 等の急速かつ一過性の発現誘導を行うグループと、**interleukin-4 (IL-4)** 等の持続的な発現誘導を行うグループの 2 つのグループに大別され、その発現誘導パターンから慢性炎症性疾患において重要なのは後者の **IL-4** のような持続的な発現誘導を行うグループだと考えられる。

IL-4 は主に **Th2** 細胞によって分泌され、**Th2** 細胞の細胞分化、**B** 細胞における **IgE** 産生細胞へのクラススイッチなど、複数の機能を持った免疫調節性サイトカインである。慢性炎症性疾患を罹患している患者や動脈硬化病変部位において高い発現が観られ、**VCAM-1** 等

の接着因子の持続的な発現誘導を行うことによって慢性炎症性疾患の進展に重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、IL-4 が血管内皮細胞内においてどのような分子機構で VCAM-1 を発現誘導しているのかについてはまだ解明されていない。そこで、本研究では IL-4 と IL-4 特異的に活性化される転写因子 STAT6 による血管内皮細胞の VCAM-1 等の転写活性化機構の解明を目指して実験を行った。

実験結果と考察

TNF- α 刺激、もしくは IL-4 刺激による VCAM-1 発現誘導パターンの違い

VCAM-1 は血管内皮細胞において TNF- α 、IL-4 などのサイトカインによって発現誘導が行われるが、TNF- α 刺激もしくは IL-4 刺激による VCAM-1 の発現誘導がどのような経時的变化を示すのかを調べるため、HUVEC を TNF- α もしくは IL-4 で刺激し、刺激 4 時間、12 時間、24 時間後における VCAM-1 mRNA の量の経時的变化を real-time PCR によって測定した。TNF- α 刺激の場合、4 時間後をピークとして VCAM-1 の急激な転写誘導が起き、12、24 時間後と時間が経過するに従い VCAM-1 の発現誘導が収まっていることが示している。対して IL-4 刺激の場合、4 時間後で TNF- α と比較して弱い VCAM-1 転写誘導が観られ、12 時間後に若干転写量が減少するものの、24 時間後には再び VCAM-1 転写物の増加が観られた。このことから、TNF- α は急性の VCAM-1 発現誘導を行い、IL-4 では持続的・慢性的な VCAM-1 発現を行っており、2 つのサイトカインは異なる誘導機構によって VCAM-1 の発現誘導を行っていることが考えられる。

各種阻害剤を用いた IL-4 シグナル阻害実験

IL-4 がどのようなシグナル経路を経由して VCAM-1 の発現誘導を行っているのかを調べるために、PKC δ (10 μ M Rottlerin)、PKC (5 μ M Bisindolylmaleimide I (BIM))、PI3K (50 μ M LY294002)、MEK (50 μ M PD98059)、p38 MAPK (20 μ M SB203580) の各種阻害剤を用いてシグナル阻害実験を行った。HUVEC への IL-4 刺激 30 分前に DMSO 溶液の各種阻害剤で処理し、IL-4 刺激 4 時間後の VCAM-1 mRNA の転写量を real-time PCR によって測定した。その結果、刺激前と比較して Rottlerin が 85%、BIM が 67%、LY294002 が 95%、SB203580 が 91% の VCAM-1 の発現誘導を抑制した。また、PD98059 に関しては抑制が観られなかった。このことから、IL-4 による VCAM-1 発現誘導におけるシグナルは PKC、PI3K、p38 MAPK を経由し、MEK を経由しないことが明らかになった。

血管内皮細胞における IL-4 による遺伝子発現の経時的変化に対する網羅的解析

IL-4 が血管内皮細胞においてどのような経時的変化を引き起こしているのかを網羅的に解析するため、DNA マイクロアレイ解析を行った。HUVEC に対して IL-4 刺激を行い、1、2、4、8、16 時間後の転写量を刺激前の状態と比較した。2 倍以上の増加が観られた遺伝子が 1 時間で 26、2 時間で 47、4 時間で 60、8 時間で 76、16 時間で 124 種類あった。また、常に発現誘導されるグループと、ある程度誘導された後に誘導が抑制され、その後再び徐々に発現誘導されるグループの 2 つに大別された。

細胞質・核の分画による STAT6 の経時的な局在変化

IL-4 で刺激されると血管内皮細胞を含む多くの細胞では細胞内において STAT6 の 641 番目のチロシンがリン酸化され、二量体を形成することにより STAT6 が核内に移行することが知られている。そこで、血管内皮細胞における IL-4 刺激時の STAT6 の経時的な挙動を調べるため、HUVEC を IL-4 で刺激し、15 分、30 分、1 時間、2 時間、4 時間後に分画を行い、細胞質画分と核画分を得て STAT6 をはじめ、各種に対する抗体で Western Blotting を行うことによって IL-4 による STAT6 の核移行の経時的変化を追った。その結果、STAT6 は刺激 15 分後細胞質では刺激前と比較して減少し、その後増加していた。また、核における STAT6 は 15 分後大きく増加し、その後徐々に減少していた。さらにリン酸化 STAT6 に関して調べると、細胞質におけるリン酸化 STAT6 は 15、30 分後で増加し、その後減少していた。また、核内においても同様な傾向が観られた。これらのことから核における STAT6 はリン酸化 STAT6 の動向と同調していることがわかり、STAT6 は IL-4 によるリン酸化が起こることにより核内に移行していることが示唆された。また、TNF- α 刺激によって核内に移行し、転写の活性化に作用することが知られている p65 についても IL-4 刺激による動向を調べてみたが、p65 の核移行や量の変化は観られなかった。よって、HUVEC における IL-4 刺激によるシグナル伝達では p65 を介さないことが考えられる。

STAT6 ノックダウンにより IL-4 刺激での誘導を抑制された遺伝子に対する網羅的解析

STAT6 のノックダウンにより、どのような遺伝子が IL-4 刺激での発現誘導を抑制されるのかを網羅的に解析するため、siRNA を用いて STAT6 のノックダウンを行い、IL-4 刺激による VCAM-1 発現誘導に対する影響を調べた。HUVEC に対して siRNA の Transfection を行い、その 26 時間後に 0.5% FBS 入り EBM-2 で 18 時間 Serum Starvation を行った。

また、Transfection から 44 時間後に IL-4 で 4 時間刺激した後 RNA を回収し、Real-time PCR により VCAM-1 転写量の測定を行った。その結果 2 種類の siRNA 共にノックダウンの効果が認められ、また VCAM-1 の発現誘導が抑制された。このことから、IL-4 による VCAM-1 の発現誘導において STAT6 が必要であることがわかった。次に、STAT6 のノックダウンにより IL-4 シグナルで誘導される遺伝子発現がどのように変化するかを網羅的に解析するために DNA マイクロアレイ解析を行った。IL-4 により 2 倍以上誘導が観られ、かつ siRNA により誘導が 1/2 倍以下に抑制されたものが、#1 の siRNA では 76、#2 の siRNA では 82 種類の遺伝子が得られた。また、共通 2 種類の siRNA で共通して得られた遺伝子は 62 種類であった。

アデノウィルスによる常時活性化型 STAT6 の強制発現下における遺伝子発現の網羅的解析

547 番目のバリンと 548 番目のスレオニンをどちらもアラニンに置換した常時活性化型 STAT6 を強制発現させるためのアデノウィルスを作成し、HUVEC に感染させ、48 時間後に RNA を回収して DNA マイクロアレイ解析によっていかなる遺伝子発現が観られるか網羅的に解析した。2 倍以上の発現誘導が観られた遺伝子は 1000 種類以上あった。

上述の結果合わせて、STAT6 ノックダウンによって顕著に誘導抑制され、かつ、常時活性化型 STAT6 の強制発現によって顕著に誘導された遺伝子として、特に CCL26、POSTN、PMCH、SOCS1、VCAM1、CISH、HAS3、SELP、ARG99(TMTC1)などが挙げられ、これらの遺伝子は IL-4/Stat6 シグナルの下流にあることが示唆された。

全ゲノムクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-Seq) 法を用いたゲノム上における STAT6 結合部位の網羅的解析

IL-4 刺激によって核移行した STAT6 がゲノム上のどの部位に結合し、STAT6 下流の遺伝子の転写に関与しているのかを解析するために、HUVEC を 50 ng/ml IL-4 で刺激し、その 1 時間後に細胞を固定化、回収し、抗 STAT6 抗体を用いたクロマチン免疫沈降実験を行い、ChIP-Seq 法を用いてゲノム上における STAT6 結合部位について網羅的な解析を行った。この結果、上述した IL-4/Stat6 シグナル下流にあることが示唆された 9 遺伝子全ての遺伝子近傍に STAT6 結合可能性を示すピークが得られた。よってこの ChIP-Seq 法による解析結果は妥当なものであると考えられ、上に挙げた 9 遺伝子が STAT6 下流にあることを強く示唆するものである。

VCAM-1 遺伝子近傍における STAT6 結合領域に対する転写活性化機能の検討

ChIP-Seq 法による STAT6 結合領域の網羅的解析の結果、VCAM-1 遺伝子近傍には転写開始点から上流-16 kb、-11 kb、第 8 イントロン(int 8)の 3 領域にピークが観られ、これらの領域は enhancer であることを示すヒストン H3 の 4 番目のリジンのモノメチル化 (H3K4me1)も観られている。この領域について real-time PCR による ChIP-PCR 法で実際に STAT6 が結合していることが確認できた。そこで、レポーターベクター pGL3-Basic を基に、Luciferase 遺伝子上流に VCAM-1 core promoter を組み込んだレポーターベクターを作製し、さらにその上流に-16 kb 領域、-11 kb 領域、もしくは int 8 領域の各領域を組み込んだレポーターベクターを用いて HUVEC において Luciferase Reporter Assay を行い、各領域の転写活性化機能について検討を行った。その結果、常時活性型 STAT6(STAT6VT)の強制発現下で-16 kb 領域を組み込んだ場合にのみルシフェラーゼ活性が上昇し、-16 kb 領域の STAT6 依存的な転写活性化機能が示唆された。

また、-16 kb 領域についてさらに詳細に検討するため、-16 kb 領域に存在する 2 箇所の STAT6 コンセンサス配列にそれぞれ変異を入れたコンストラクトを用いて STAT6VT の強制発現下、同様な実験を行った。その結果、VCAM-1 転写開始点のより近位に位置する STAT6 コンセンサス配列に変異を入れた場合には活性がベースラインにまで下降した。一方転写開始点から遠位に位置する STAT6 配列に変異を入れた場合には活性はほぼ半減した。また、STAT6VT の代わりに IL-4 刺激を行って同様な実験を行った場合には近位の STAT6 配列に変異を入れると活性がベースラインにまで下降し、遠位の STAT6 配列に変異を入れると顕著な差は観られなかった。以上の結果から、どちらの STAT6 配列も STAT6 依存の転写活性化機能に関与すると考えられるが、特に近位の STAT6 配列が重要であると言える。この領域は enhancer として機能していることが考えられることから、STAT6 は-16 kb 領域の enhancer に結合し、VCAM-1 の転写活性化を引き起こしているのではないだろうか。

結論

血管内皮細胞において、IL-4 刺激は VCAM-1 遺伝子上流-16 kb 領域の enhancer に STAT6 の結合を引き起こし、VCAM-1 の転写活性化を行い、慢性炎症性疾患の進展に寄与する。