

氏名 峯 柴 淳 二

授与した学位 博士
専攻分野の名称 歯学

学位授与の番号 博士 乙 第 号

学位授与の日付 平成 16 年 3 月 25 日

学位授与の要件 博士の学位論文提出者(学位規則第4条第2項該当)

学位論文題名 ヒト上皮細胞株(HeLa細胞)におけるhuman β -defensin-2の遺伝子発現制御に関する研究

論文審査委員 教授 滝川 正春 教授 福井 一博 教授 高柴 正悟

学位論文内容の要旨

【緒言】

感染の初期に機能する非特異的生体防御機構の一つとして、好中球および皮膚や肺などの上皮細胞が産生する抗菌性カチオンペプチドである defensin が注目されている。このペプチドの多量体は、細胞膜（壁）を穿孔することによって菌体に浸透圧変化を引き起こして、殺菌作用を示す。このような殺菌機序のため、defensin はグラム陽性菌、陰性菌、さらには真菌などに対して幅広い抗菌作用を示しとともに、さらに耐性菌を作りにくいという特徴を持つ。

Defensin のなかでも皮膚や気管の上皮細胞で産生されるヒト β -defensin-2 (hBD-2) は、恒常的に産生されている他のタイプの defensin と異なり、細菌のリポ多糖体 (LPS) やサイトカインの刺激によって産生が誘導される。そのため、感染の頻度の高い口腔内においても、hBD-2 は細菌感染時に産生され、感染を抑制する役割を果たしていると考えられる。しかし、感染刺激時にどのような機序によって hBD-2 の産生が誘導されているのかは明らかでない。したがって、その産生機序を解明して産生量を調節することは、口腔細菌の感染症である歯周病の病態解析と治療を考える上で重要な研究課題となる。

そこで、本研究では、細菌感染時の *hbd-2* の発現を制御する機序を解明してすることを目的とし、LPS で刺激したヒト上皮細胞株における *hbd-2* の発現を制御するプロモーター領域とそこに結合する転写因子について解析した。

【材料および方法】

1. 細胞培養と刺激：ヒト上皮系細胞株 (HeLa 細胞) の培養は、ウシ胎児血清を 10% 含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) 中で、5%炭酸ガス存在下、37°Cで行った。細胞の刺激は、*Escherichia coli* 由来の LPS (055:B5 ; SIGMA) を 100 ng/ml の濃度に含む上述の培地中で 1~48 時間培養することによって行った。
2. *hbd-2* プロモーター領域の部分欠損および部分置換クローンの作製：*hbd-2* プロモーター領域は、ヒトゲノムライブラリーを鋳型にネステッド PCR 法で得た。すなわち、既存の *hbd-2* cDNA の塩基配列を基にプライマーを作製し、PromoterFinderTM DNA Walking Kits (CLONTECH) を用いて行った。インサートの部分欠損クローンの作製は、ヒト胎盤アルカリフォスファターゼ遺伝子をレポーター遺伝子とする pSEAP2-Basic ベクター (CLONTECH) に組み換えた後に、Exo Mung Bean Deletion Kit (STRATAGENE) を用いて行った。インサートの部分置換クローンの作製は、pSEAP2-Basic ベクターに組み換えたプロモーター領域の一部を、QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis (STRATAGENE) を用いて変更することによって行った。
3. 塩基配列の決定および相同性遺伝子の検索：塩基配列の決定は dideoxy chain-termination 法で行った。得られた塩基配列を遺伝子データベースに照合し、相同性のある遺伝子を検索した。

4. **LPS 刺激による *hbd-2* プロモーター領域の転写活性の測定**：*hbd-2* プロモーター領域の転写活性の測定は、前述の組み換え pSEAP2-Basic ベクターを用いたレポーターアッセイで行った。すなわち、組み換え遺伝子を導入した HeLa 細胞を LPS で刺激した後、培養上清中のヒト胎盤アルカリホスファターゼの濃度をフルオロメーター (MILLIPORE) で測定した。この値を、内部コントロールとして β -ガラクトシダーゼ遺伝子を持つ pCMV- β Gal ベクターを同時に導入して得た β -ガラクトシダーゼの濃度で除した値をプロモーター活性として表した。なお、HeLa 細胞への遺伝子導入は、LIPOFECTAMIN PLUS™ Reagent (GIBCO BRL) を用いたリポフェクション法で行った。
5. **転写因子の検索**：*hbd-2* プロモーター領域に結合可能な転写因子の候補は、プロモーター領域の塩基配列を基に TRANSFAC データーベースと TFSEARCH プログラムを用いて検索した。
6. ***hbd-2* プロモーター領域に結合する転写因子の決定**：プロモーター領域に結合する転写因子の決定は、ゲルシフト法で行った。すなわち、転写開始点より -300 から -1 までの 300 塩基を 10 bp ずつ重複した 60 bp の遺伝子断片を合成し、末端を 32 P で標識したものをプローブとして、Gel Shift Assay Systems (Promega) を用いて行った。その際に、既知の転写因子が結合する既存の 2 本鎖オリゴヌクレオチドを競合させて、プローブに結合した因子を調べた。なお、細胞からの核タンパクの抽出は、HeLa 細胞から NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (PIERCE) を用いて行った。

【結果と考察】

1. **LPS 刺激時の *hbd-2* プロモーター領域の転写活性**：*hbd-2* の転写開始点から上流約 1.3 kbp までの領域には、既知の遺伝子 (NF- κ B, NF-IL6, AP-1, AP-2) が結合する配列が複数存在した。転写活性は、転写開始点より -352 から +35 塩基までのプロモーターを含んだクローンを導入した場合に最も高かった。この部分に結合する可能性のある転写因子は、AP-1, NF-IL6 および NF- κ B であった。この領域に活性が高いのは 2 カ所の NF- κ B の結合部位が AP-1 および NF-IL6 の結合部位と近傍に存在するためと考えられる。
2. **LPS 刺激時の *hbd-2* プロモーター領域の転写因子の特定**：転写開始点の -352 から -62 塩基までの間に存在する NF-IL6 および 2 カ所の NF- κ B が結合する 3 カ所の領域において、それぞれの因子が結合するために重要な塩基を置換したクローンを導入した細胞では、3 カ所とも正常な場合においてのみ高い転写活性を示した。1 カ所でも変異させると、転写活性が低下した。これはどちらか一方の転写因子のみが *hbd-2* の発現を制御しているわけではないことを示している。
3. ***hbd-2* プロモーター領域に結合する転写因子の決定**：LPS 刺激時に *hbd-2* のプロモーター領域への結合量が最も大きく変化した転写因子は、NF- κ B であった。それは刺激後 2 時間で最も顕著に表れた。これは NF- κ B が *hbd-2* の発現に関わっていることを示唆している。

近年 *hbd-2* の発現制御には諸説が発表されている。2002 年には Krisanaprakornkit らが、ヒト歯肉上皮を *Fusobacterium nucleatum* の外膜蛋白で刺激する系において、*hbd-2* の発現制御はミトジェン活性蛋白酵素が関与しており NF- κ B は関係ないと述べている。2003 年には Tsutsumi-Ishii らが、マウスの単球系細胞株を *E. coli* 由来の LPS で刺激する系において、*hbd-2* の発現制御は NF- κ B が関係していると述べている。今回我々はヒト上皮系細胞株 (HeLa 細胞) に対して *E. coli* 由来の LPS を用いて刺激を行ったところ、*hbd-2* の発現制御は主に NF- κ B が関わっているが、このもの単独で制御しているわけではないという結果を得た。これは細胞株の違いや刺激の違いはあるものの、*hbd-2* の発現制御の解明の一つとなる。

【結論】

ヒト上皮系細胞における LPS 刺激時の *hbd-2* の発現は、プロモーター上で転写開始点の -352 から -62 塩基までの範囲に近接して結合する NF- κ B および NF-IL6 の共働によって制御されている。

論文審査結果の要旨

近年, human β -defensin-2 (*hbd-2*) の発現に nuclear factor kappa B (NF- κ B) が関与するとする研究結果と, 関与しないとする研究結果が発表されている。このように全く相違した見解が示され, 感染刺激によってどのような機序により *hbd-2* の発現が誘導されているのかは明らかでない。本研究は, 細菌感染時の *hbd-2* の発現制御領域を解明することを目的とし, LPS で刺激したヒト上皮系細胞株における *hbd-2* の発現制御領域と転写因子について調べたものである。

申請論文は次の内容を示すものであった。 1) 約 1.3kb の *hbd-2* プロモーター領域のうち LPS 刺激時に高い転写活性があったのは, 転写開始点より -352 から -62 塩基上流の部分であった。 2) その領域に対して部分置換クローンを用いたレポータージーンアッセイを行うことにより, NF- κ B と NF-IL6 が共働して転写を活性化していることが判明した。 3) これらの転写因子のうち, NF- κ B が主に働き, 刺激後 2 時間でプロモーター領域への結合量がピークとなった。一方, NF-IL6 は刺激後 4 時間で結合量の増加があった。

これらの結果は NF- κ B と NF-IL6 が *hbd-2* の発現を制御する転写因子であることを示したものであり, *hbd-2* 発現の制御機構の一端を解明したものである。

よって, 本申請論文は, 学位論文として価値があると認めた。