

低酸素誘導因子(HIF)-1 α によるマクロファージスカベンジャー受容体の発現調節

白土 健¹ 木崎節子¹ 櫻井拓也¹ 小笠原準悦¹ 大石修司² 松岡 健²
長澤純一³ 斎藤大蔵⁴ 今泉和彦⁵ 大野秀樹¹

(¹杏林大医学部, ²東京医科大学霞ヶ浦病院, ³電気通信大学電気通信学部, ⁴防衛医科大学防衛医学研究センター, ⁵早稲田大学人間科学学術院)

Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 α Regulates Expression of Macrophage Scavenger Receptor

Ken Shirato¹, Takako Kizaki¹, Takuya Sakurai¹, Junetsu Ogasawara¹, Shuji Oh-ishi², Takeshi Matsuoka²
Junichi Nagasawa³, Daizoh Saitoh⁴, Kazuhiko Imaizumi⁵ and Hideki Ohno¹

(¹Kyorin University, School of Medicine, ²Tokyo Medical University, Kasumigaura Hospital, ³School of Electro-Communications, University of Electro-Communications, ⁴National Defense Medical College, National Defense Medical College Research Institute, ⁵Faculty of Human Sciences, Waseda University)

【目的】生体内へ侵入した細菌は、まずマクロファージによって貪食・分解される。このとき、細菌の捕捉には細胞膜上のマクロファージスカベンジャー受容体1 (macrophage scavenger receptor 1:MSR1)が重要な役割を果たしている。このような感染防御応答は組織において行われる。一般に、酸素分圧勾配は大気、肺胞、血管、組織、組織内でも血管から距離が遠い細胞ほど低下することから、組織マクロファージのMSR1の発現が低酸素によって如何に調節されるか、その調節因子は何かを明確にすることは、生体の感染防御機構を解明する上でも極めて重要である。そこで本研究では、マクロファージ細胞株であるRAW264細胞を用いて、特に低酸素誘導転写因子であるhypoxia-inducible factor (HIF)-1 α のMSR1発現に及ぼす影響を検討した。

【方法と結果】まずRAW264細胞を100 μ Mの塩化コバルト (CoCl₂) を含む培養液で3~24時間培養して低酸素応答を誘導し、核内HIF-1 α タンパク質およびMSR1 mRNAの発現量をそれぞれWestern blot法、real-time RT-PCR法を用いて経時的に分析したところ、核内HIF-1 α タンパク質の発現量は処理3時間後に顕著に上昇し24時間後まで高い状態を維持した。一方、MSR1 mRNAの発現量は、核内HIF-1 α タンパク質の発現量と逆の応答パターンを示し、未処理に比べて1/2~1/3の有意に低い状態を維持した。そこで、CoCl₂によるMSR1 mRNA発現量の抑制に対するHIF-1 α の影響を明らかにするために、HIF-1 α 阻害剤であるYC-1およびHIF-1 α siRNAを用いて検討した。RAW264細胞を50 μ MのYC-1で1時間前処理した後、6時間CoCl₂およびYC-1を同時に処理すると、MSR1 mRNAの発現量はコントロールレベルまで回復した。さらにHIF-1 α siRNAによっても有意に回復した。以上の結果より、HIF-1 α はMSR1発現を調節していることが示唆された。そこで、HIF-1 α の影響をさらに詳しく検討するため、HIF-1 α 強発現株を樹立した。まず、HIF-1 α のcDNAをpcDNA4/TO/*myc*-His vectorに組み込み、これをRAW264細胞に導入し、Zeocinセクションを行い、HIF-1 α 強発現株 (RAWHif細胞) を樹立した。そのコントロール

として空の発現ベクターを同様にRAW264細胞に導入してRAWvec細胞を樹立し比較・検討した。まず、ゲノムDNAを抽出し、ベクター側のCMV領域およびHIF-1 α cDNAのreverseプライマーを用いてHIF-1 α 発現ベクターがRAWHif細胞のみ導入されていることを確認した。RAWHif細胞のHIF-1 α mRNAの総発現量はRAWvec細胞に比べ5.5倍高く、核内HIF-1 α タンパク質の発現量も顕著に高いことを確認した。これらの細胞間でMSR1 mRNAの発現量を比較すると、RAWHif細胞ではRAWvec細胞に比べ87%と有意に低かった。次にHIF-1 α のMSR1遺伝子転写活性への影響を調べるため、pGL3 luciferase reporter vectorにMSR1遺伝子プロモーター領域932bpを組み込み、これをRAWHif細胞およびRAWvec細胞にそれぞれ一過性に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。RAWHif細胞のルシフェラーゼ活性、すなわちMSR1遺伝子の転写活性はRAWvec細胞に比べ62%と有意に低かった。次にHIF-1 α のリスチア生菌貪食能に対する影響をgentamicin-protection assayを用いて検討したところ、RAWHif細胞の貪食能はRAWvec細胞に比べ36%と有意に低かった。一方、RAWHif細胞およびRAWvec細胞をそれぞれ1 μ g/mlのリボ多糖 (LPS) で処理すると、MSR1 mRNAの発現量はいずれも同レベルまで顕著に上昇した。同様に、LPSはRAWHif細胞におけるMSR1遺伝子転写活性およびリスチア生菌貪食能の抑制を解除し、RAWvec細胞をLPS刺激したときと同じレベルまで回復した。

【考察】HIF-1 α はMSR1遺伝子発現を抑制し、その働きを抑えることが明らかとなった。MSR1は酸化LDL受容体としても機能することから、この抑制機構は血中から組織へと定着したマクロファージの組織内における泡沫化を予防する上で重要な役割を果たしていると考えられる。一方、LPS刺激を受けるとHIF-1 α による抑制効果は解除され、MSR1遺伝子転写活性、mRNA発現量および貪食機能はいずれも増強されたことから、抗原が侵入した際はHIF-1 α によるMSR1発現の抑制効果は速やかに解除され、十分な感染防御機能を獲得するものと推定される。