

審査の結果の要旨

氏名 仙波 宏章

本研究は、マクロファージにおいて低酸素のみならず炎症刺激下でも重要と考えられる転写因子 hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) について、両刺激下での DNA 結合状態を明らかにし、さらにその結合制御機構および機能的意義の解析を試みたものであり、下記の結果が得られている。

①低酸素・LPS 刺激による HIF-1 α 蛋白の誘導

低酸素刺激下では、早期(刺激 4 時間後)から HIF-1 α 蛋白の発現が認められ、後期(刺激 24 時間後)も継続的に確認された。一方 LPS 刺激下では、低酸素刺激よりも遅れて後期(刺激 24 時間後)から HIF-1 α 蛋白発現が認められた。

②低酸素・LPS 刺激における HIF-1 α の DNA 結合プロファイル

HIF-1 α ChIP シーケンスにより、低酸素刺激または LPS 刺激により誘導された HIF-1 α の DNA 結合プロファイルを解析し、比較検討した。結果、両者に共通なピーク領域、すなわち低酸素刺激または LPS 刺激で誘導された HIF-1 α のどちらもが結合できる領域は 961 ヶ所であった。一方、低酸素刺激特異的な結合領域が 1138 ヶ所、LPS 刺激特異的な結合領域が 435 ヶ所認められ、それぞれに特異的な HIF-1 α 結合領域が存在していることが示された。

③LPS 刺激特異的な HIF-1 α 結合の制御機構

刺激特異的なクロマチン構造変化によって HIF-1 α の DNA 結合が制御されているという仮説のもと、FAIRE(formaldehyde assisted isolation of regulatory elements) シーケンスにより両刺激下におけるマクロファージのクロマチン構造を解析した。結果、LPS 特異的な HIF-1 α 結合領域では、もともと無刺激の段階で他の二群よりもクロマチン構造が閉じた状態にあり、同部位は LPS 刺激によって他の二群と同等に開いてくるものの、低酸素刺激ではクロマチンの開放が認められない傾向にあった。

また、刺激特異的に誘導される共役因子が HIF-1 α の DNA 結合を規定しているという仮説のもと、HIF-1 α ChIP シーケンスのデータをもとに転写因子結合エレメントの解析を行なった。結果、LPS 特異的な HIF-1 α 結合領域には、他の二群にはない特有のエレメント(MTF1 family 等)が高頻度に認められることが明らかとなった。

④LPS 刺激により誘導された HIF-1 α の機能的意義

RNA シーケンスの解析から、LPS 刺激下の HIF-1 α は特に解糖系酵素の遺伝子群を誘導していることが示された。さらにフラックスアナライザーを用いて実際の代謝状態を解析したところ、LPS 刺激を受けたマクロファージは刺激後後期(12~24 時間)にかけて好気性から嫌気性へ代謝をシフトさせており、この代謝リプログラミングは HIF-1 α 依存的であった。さらに、酵素阻害剤を用いて嫌気性代謝へのシフトを抑制すると、LPS 刺激後後期(24 時間)をピークとして誘導される iNOS などの遺伝子発現が減弱した。つまり LPS 刺激後のマクロファージは、HIF-1 α を介して解糖系を亢進し代謝を嫌気性にシフトさせており、この代謝リプログラミングは転写レベルでマクロファージの機能制御に関与していると考えられた。

以上、本研究は、マクロファージにおける低酸素・炎症刺激下での HIF-1 α の DNA 結合状態を全ゲノムレベルで網羅的に解析することで、両者に共通する結合部位だけでなく刺激特異的な結合部位が存在することを示し、さらにその制御機構と機能的意義にも迫るものである。得られた上記の知見は、これまで未知であった炎症プロセスにおける HIF-1 α シグナルの制御機構とその機能的役割の解明に重要な貢献をなすものであり、学位の授与に値すると考えられる。