

研究課題別評価

1 研究課題名:

リンパ球の分化を制御する転写調節機構の解明と治療への応用

2 研究者氏名: 谷内 一郎

技術員: 室井 佐和子(研究期間 H.15.12.1~H.19.3.31)

秋山 かおり(研究期間 H.17.4.1~H.19.3.31)

3 研究のねらい:

生物の発生・分化プログラムの根幹をなすのは、ゲノム情報から適切な情報を適切な時期に発現させる事であり、遺伝子発現(転写調節)制御機構の解明は広く生物学の重要な課題と言える。本研究課題では、リンパ球分化を研究題材として、高等生物における分化や高次機能制御において、クロマチン構造の修飾を介した遺伝子発現パターンの確立と維持が果たす役割とその分子機構の解明を明らかにすることを一つの目標とした。

また、リンパ球の分化制御における Runx ファミリーの機能解明をもうひとつの目標として研究を行った。Runx ファミリーは核内転写因子ファミリーであり、多くの発生・分化過程に重要な役割を果たすことが知られており、またがんや自己免疫疾患といったヒト疾患の発症との関連が指摘されている核内転写因子ファミリーである。Runx ファミリーは広く血球系細胞に発現しているが、免疫系の分化・機能制御における役割は良く解っていない。本研究課題では、主に遺伝学的なアプローチを用いて、Runxファミリーの免疫系での機能を解明し、その機能不全に起因するリンパ球分化異常や免疫疾患の発症機序を解明し、免疫疾患の新たな制御法の開発につながる成果を得ることを目標に研究を行った。

4 研究成果:

A. Runx ファミリー変異マウスの作製

Runx ファミリーは DNA 結合活性を持つ Runt ドメインを保有する α ユニットが β ユニットとヘテロ二量体形成を形成することで特定の DNA 配列(Runx モチーフ、5'-ACCRCA-3')に結合し、標的遺伝子の発現を正或は負に制御する核内転写調節因子である。哺乳類では α ユニットのコードする遺伝子として Runx1、Runx2、Runx3 の 3 つの遺伝子、 β ユニットのコードする遺伝子として Cbf β 遺伝子が単離されている。いずれの α ユニットも遠位プロモーター(P1)と近位プロモーター(P2)から転写されることで、N 末端に異なるアミノ酸配列を持つアイソフォームタンパクが産生される。Cbf β 遺伝子からは異なるスプライシングドナーシグナルを用いてエクソン 5 からエクソン 6 へ RNA スプライシングすることにより、Cbf β 1 と Cbf β 2 という 2 つのアイソフォームタンパクが産生される。また、Runx1 タンパクは特定のセリン残基にリン酸化修飾を受けることが知られている。更に、Runx ファミリーのヌル変異マウスはいずれも胎生期や生後直後

に死亡する為、免疫系の機能解析を行う為には Cre-loxP の系を用いたいわゆる conditional KO マウスが有用である。これらの背景から、さきがけ研究により以下の Runx ファミリー変異マウスを作製した。

Runx1P1Neo 変異マウス(Runx1P1 プロモーターとエクソン 1 を Neo 耐性遺伝子と置換したマウス)

Runx1P1R 変異マウス(Runx1P1 プロモーター下のエクソン 1 に P2 プロモーター特異的な N 末配列を挿入し、P1 プロモーターからも P2 プロモーター特異的な Runx1P2 が産生される変異マウス)

Runx1 リン酸化部位変異マウス(リン酸化を受けることが知られているセリンをアラニンに置換したもの)

Cbf β flox 変異マウス

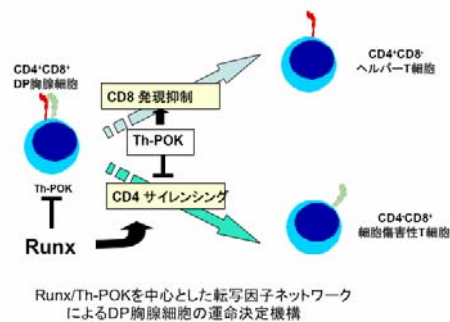
Cbf β 1 特異的 KO マウスと Cbf β 2 特異的 KO マウス

B. Runx ファミリー変異マウスの表現系解析

A で述べた変異マウスや以前に作製した Runx1flox マウス、Runx3flox マウス、供与を受けた Runx1-VWRPY マウス等を用い、免疫系における Runx ファミリー機能不全の表現系解析を行い、以下に述べる Runx ファミリーの新たな機能を同定した。

B-1. CD4+CD8+DP 胸腺細胞の運命決定における Th-POK 遺伝子の発現抑制

CD4+CD8+DP 胸腺細胞で Runx1, Runx3 を共に欠損するマウスや Cbf β を欠損するマウスでは T ヘルパー細胞分化を誘導するマスター遺伝子である Th-POK の発現が脱抑制しており、その結果本来ならば細胞障害性 T 細胞に分化するはずのクラス I 拘束性の TCR を発現している細胞もヘルパー系列に分化していた。これらの結果から、Runx 複合体を介した Th-POK の発現抑制が細胞障害性 T 細胞への分化誘導に必須であることを明らかにした。また、Th-POK 遺伝子は Runx を介した CD4 サイレンシングに対して拮抗的に働き、CD8 遺伝子座に直接結合することで CD8 の発現を負に制御することで、ヘルパー T 細胞の CD4+CD8- の表現型に寄与することを明らかにした。



B-2. CD4+CD8+DP 胸腺細胞の正の選択における Runx 複合体の機能

Runx 変異マウスでは成熟胸腺細胞が著しく低下し、CD69 陽性の分画が激減することから、CD4+CD8+DP 胸腺細胞の正の選択には Runx 複合体の機能が重要であることが明らかとなった。また、Runx 変異マウスでは正の選択後の胸腺細胞の成熟過程も障害されており、IL7R の発現低下が一因と考えられた。

B-3. Runx 複合体の IL4 サイレンサーを介した IL4 発現抑制と喘息様疾患の発症

Cbfβ 2 特異的 KO マウスや T 細胞特異的に Cbfβ や Runx3 を欠損するマウスでは血清 IgE の上昇とリンパ球と好酸球の肺への細胞浸潤といったヒトの喘息と良く似た症状を自然発症することを見出した。これらマウス由来の T 細胞では、IL4 産生亢進と喘息を初めとするアレルギー疾患の発症に関与する 2 型 T ヘルパー細胞(Th2)の分化促進がみられた。Runx 複合体が IL4 の産生を抑制する IL4 サイレンサーに直接結合することが確認され、Runx 複合体の機能不全により本来ならば IL4 は産生しない 1 型 T ヘルパー細胞(Th1)からも IL4 が産生されると考えられ、Runx 複合体の機能不全による IL4 サイレンサーの機能不全が疾患発症の一因と考えられた。

B-4. Runx 複合体機能不全と炎症性腸疾患の発症

Cbfβ 2 特異的 KO マウスでは血清 IgA の上昇が観察された。一方、αβT 細胞を欠損する Cbfβ 2 特異的 KO マウスでは少なくとも血清 IgA の上昇は見られず、また T 細胞特異的に Cbfβ を欠損するマウスでも IgA の上昇が認められたことから、血清 IgA の上昇には T 細胞での Runx 複合体機能不全が関与するが考えられた。興味深いことに Cbfβ 2 特異的 KO マウスでは幼少期から大腸を中心に広範囲に IgA 陽性の形質細胞様細胞の浸潤が見られ、炎症性腸疾患の病態を呈した。このように、Cbfβ 2 特異的 KO マウスは B-3 で述べた喘息様疾患に加え炎症性腸疾患も発症することより、Runx 複合体機能不全に起因する免疫疾患の有用なモデルマウスとなると考えられ、特許申請を行なった。

B-5.リンパ組織形成における Runx 複合体の機能

Cbf β 2 特異的 KO マウスや Runx1P1Neo 変異マウスでは、パイエル板の欠損または数的減少、ソケイ部リンパ節を初めとする末梢リンパ節の形成不全が認められた。これらマウスの胎生期ではリンパ組織形成に重要な役割を果たす LTi(lymphoid tissue inducer)細胞の減少が見られたことより、Runx 複合体の機能不全によりLTi細胞の分化が障害され、リンパ組織形成に異常を来すと考えられた。

C. CD4 サイレンサーを介したエピジェネティックサイレンシングの分子機序

CD4 サイレンサーを介した CD4 遺伝子発現抑制機構に関して、以下の新たな知見を得た。

C-1.不完全なサイレンシング状態は維持されず、オンかオフの状態に収束される

従来、エピジェネティックな機構により特異なクロマチン構造が維持されることでサイレンシング状態は維持されると考えられてきた。ところが、CD4 サイレンサー機能不全によって不完全なサイレンシング状態にあるCD4 遺伝子座は細胞分裂の際、不完全な状態のままでは維持されず、オンかオフのいずれかの状態に収束された。この知見は、エピジェネティックな機構はサイレンシングに関与するすべてのクロマチン構造を維持するものではないことを示すものであり、新たな概念につながるものと考えられる。

C-2. $\gamma\delta$ T 細胞でのエピジェネティック CD4 サイレncing

これまではCD4 サイレンサーを介したエピジェネティックCD4 サイレncingは分化段階特異的であり、成熟CD8⁺T細胞でのみ観察されていた。本研究でCD4 サイレンサー変異マウスを詳細に解析することにより、DN胸腺細胞から分化する $\gamma\delta$ T細胞でもエピジェネティックCD4 サイレncingが起こっていることを見出した。この結果は、サイレンサーの機能が分化段階特異的にエピジェネティックサイレンシングを確立するのではない事を示しており、サイレンシングの確立の分子機序の解明につながる成果といえる。

5 自己評価:

Runx ファミリーを介したリンパ球分化制御における転写調節機構に関しては、当初の計画通りに幾つもの遺伝子改変マウスを作製することが出来た。また、それらマウスの解析により、DP 胸腺細胞の運命決定に際して、Runx ファミリーと Th-POK とのネットワーク形成とそのバランスによる制御機構を明らかに出来たのは、今後の発展につながる大きな成果と言って良いと感じている。また、Runx 機能不全マウスでみられる免疫疾患の発症機序に関して、モデルマウスの作製と分子機序に迫る成果(例えば Runx を介した IL4 遺伝子の発現抑制)を明らかに出来たことは、新たな治療法の開発につながる成果と言える。

一方で、エピジェネティックな遺伝子発現制御機構に関しては、当初想定していたよりもクロマチン構造の修飾が多様であったこと、小グループで二つのプロジェクトをする難しさもあり、到底分子機序に迫るには及ばず、現象論に過ぎない成果に留まったのは大いに反省すべき

点と言える。

これらの成果、特に遺伝子改変マウスの作製と解析には技術員の参加が不可欠であった。言い換えれば、ポスドク参加型でなければ、研究課題の遂行は困難であった。

また、研究成果の発表・発信という意味で、論文発表までの時間を短縮するよう務めるべきであった。

6 研究総括の見解:

本研究は、高等生物における分化や高次機能制御において、クロマチン構造の修飾を介した遺伝子発現パターンの確立と維持が果たす役割とその分子機構の解明、およびリンパ球の分化制御における Runx ファミリーの機能解明を目的として行われた。後者の課題については複数の遺伝子改変マウスを作製し、その解析により、Runx 複合体が関与する喘息様疾患や炎症性腸疾患の新たな治療法の開発につながる研究成果を挙げた。しかし前者の課題については、研究が緒に就いたばかりであった。

7 主な論文等:

論文

1. Fukushima-Nakase Y, Naoe Y, **Taniuchi I**, Hosoi H, Sugimoto T, and Okuda T. (2005) Shared and distinct roles mediated through C-terminal subdomains of Acute Myeloid Leukemia/Runt-related Transcription Factor molecules in murine development. **Blood** 105: 4298-4307.
2. Egawa T, Eberl G, **Taniuchi I**, Benlagha K, Geissmann F, Hennighausen L, Bendelac A and Littman D.R. (2005) Genetic Evidence supporting selection of the Va14i NKT cell lineage from double positive thymocyte precursors. **Immunity** 22: 705-716.
3. Wang X, Blagden C, Fan J, Nowak S, **Taniuchi I**, Littman D.R and Burden S.J. (2005) Runx1 prevents wasting, myofibrillar disorganization, and autophagy of skeletal muscle. **Genes & Dev.** 19: 1715-1722.
4. Grueter B, Petter M, Egawa T, Laule-Kilian K, Aldrian C.J, Wuerch A, Ludwig Y, Fukuyama H, Wardemann H, Waldschuetz R, Moroy T, **Taniuchi I**, Steimle V, Littman D.R and Ehlers M. (2005) Runx3 Regulates Integrin E/CD103 and CD4 Expression during Development of CD4-/CD8+ T Cells. **J. Immunol.** 175:1694-1705.
5. Kramer I, Sigrist M, de Nooij J.C, **Taniuchi I**, Jessell T.M and Arber S. (2006) A role for Runx transcriptional factor signaling in dorsal root ganglion sensory neuron

diversification. **Neuron**, 49:379–393.

特許

免疫疾患モデルマウスとしての Cbf2 アイソフォーム欠損マウスの作製
(出願番号 2006-008654)

学会発表

国内 10 回、国際 6 回