

平成30年6月5日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11072

研究課題名(和文)重症複合型免疫不全を呈する希少難病(細網異形成症)の病態解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Study on elucidation of the pathophysiology of rare intractable diseases (reticular dysgenesis) with severe combined immunodeficiency and development of therapeutic methods

研究代表者

野間 隆文 (NOMA, Takafumi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・教授

研究者番号：40189428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Tet誘導型FOXP3発現ベクターを血球系Jurkat細胞に種々の方法で遺伝子導入し、薬剤選択を行い、47クローンを得た。得られた細胞クローンを解析したものの、Doxycycline添加によりFOXP3遺伝子発現を有効に誘導したものはなかった。検証実験から、Jurkat細胞ではFoxP3遺伝子完全長型アイソフォーム(v1)はexon2を欠失するv2アイソフォームに比べて発現効率がかなり低く、細胞特異的安定性が関与することが示され、本研究での特異的細胞株樹立における困難さの一因であったと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The inducible FOXP3 expression vector was transduced into T cell-derived Jurkat cells by several methodology. After selection with puromycin, 47 clones were obtained. Although all clones were analyzed for FoxP3 inducibility, no clone effectively induced FOXP3 gene expression by addition of doxycycline. From the verification experiments, it was suggested that the expression efficiency of the full-length isoform (v1) of FOXP3 gene in Jurkat cells is considerably lower than that of the v2 isoform lacking exon 2, possibly due to the involvement of cell-specific stability.

研究分野：医歯薬学

キーワード：幹細胞 ミトコンドリア エネルギー代謝 血球細胞分化制御

1. 研究開始当初の背景

平成 21 年に独, 仏の 2 グループが重症複合型免疫不全症の 1 亜型で, 免疫担当細胞のうち T 細胞と好中球を選択的に欠損する希少難病の細網異形成症 (Reticular Dysgenesis; RD) の患者家族の順遺伝学的スクリーニングによって, AK2 遺伝子とその責任遺伝子であること報告した (Pannicke et al., Nat Genet, 2014, Lagresle-Peyrou C et al., Nat Genet, 2014)。AK2 はミトコンドリア膜間に存在するアデニンヌクレオチド代謝に関わる酵素であるが, AK2 遺伝子変異が RD という病態の発症にどのように関わるのかについては全く不明のままである。同年, わたくしの研究グループでは, モデル動物としてショウジョウバエを用いて, AK2 遺伝子ノックアウトフライを作製し, その発生過程をつぶさに調べ, 幼虫第 2 期に致死性変化をもたらすことを報告していた (Fujisawa et al., Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2009)。このことから, AK2 の個体発生と血球分化との関連性について着目するに至った。平成 26 年には, AK2 遺伝子の欠失が HL-60 細胞の分化誘導系でマクロファージ分化には障害を与えないものの, 好中球特異的に成熟分化障害をもたらすことを見だし, AK2 の役割として bipotent の血球幹細胞の系列細胞特異的な遺伝子発現制御を介した「好中球特異的な分化障害モデル」を提唱し, 報告した (Tanimura et al., PloS One, 2014, Tanimura et al., Keystone Symposia, 2014)。

2. 研究の目的

アデニル酸キナーゼ 2 (AK2) 遺伝子は順遺伝学的に重症複合型免疫不全を呈する希少難病 (細網異形成症) の責任遺伝子であることが報告されたが, その病態発症機序については未だ全く不明のままである。そこで, 本疾患で特徴的な T 細胞の機能的欠損の機序を解明し, 有効な治療法を開発するために, 試験管内疾患モデル細胞系を構築する。AK2 遺伝子欠失前後でのそれぞれの細胞機能の変化をモニターし, AK2 遺伝子欠損が疾患発症機序を明らかにし, 治療法を開発を試みる。

3. 研究の方法

【材料と方法】

(1) 試薬

誘導型 FOXP3 発現ベクター; Clontech Tet-One Inducible ベクター; トランスフェクション試薬; X-tremeGENE-HP (Roche 社), Doxycycline Hyclate (東京化学工業), 細胞培養 RPMI1640 培地, イーグル MEM 培地, ダルベッコ変法イーグル培地 (ニッスイ) TRI reagent (Molecular Research Center 社), DNaseI (Invitrogen 社) AMV reverse transcriptase (Takara 社), GoTaq DNA polymerase (Promega 社)

抗 FOXP3 抗体 (Santa Cruz 社), 抗 -Actin 抗体 (Sigma 社) PCR プライマーの塩基配列は, 表に示したものをを用いた。

名称	配列
Tet On 3G Forward	5' -AATCGAGATGCTGGACAGGC-3'
Tet On 3G Reverse	5' -CCGCTTTCCGCACTTTAGCTG-3'
FOXP3 Forward	5' -CATGATCAGCCTCACACCAC-3'
Fosp3 Reverse	5' -CCACTTGCAGACACCATTG-3'
18S rRNA Forward	5' -TACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGCAT-3'
18S rRNA Reverse	5' -CCCCTCGGCATGTATTAGCTCTAGAA-3'

表 PCR に使用したプライマーの塩基配列一覧

(2) 細胞培養

Jurkat 細胞は, RPMI1640 に 10%FBS を添加した培地で, HEK293 細胞は, イーグル MEM に 10%FBS を添加した培地で, COS7 細胞は, ダルベッコ変法イーグル培地に 10%FBS を添加した培地で, それぞれ 5% CO2 下, 37 °C で培養した。

FOXP3 の発現を誘導する際には, 100 ng/mL の濃度で Doxycycline を添加して, 48 時間培養した。その後, 細胞を回収し, タンパク質および RNA を抽出した。

(3) 遺伝子導入

安定発現株単離を目的とした誘導型 FOXP3 発現ベクターの遺伝子導入は, Jurkat 細胞に対して, 電気穿孔法である Nucleofector (Lonza 社) を用いてメーカーのマニュアルに従って行った。

遺伝子導入後, 0.62 μg/mL Puromycin 添加培地で 2 日間培養後, Puromycin 耐性細胞クローンを限界希釈法により単離した。単離後の細胞は, スケールアップして培養し, 十分量の細胞数 (3.7 × 10⁶ 細胞) が得られた段階で一旦凍結保存した。全てのクローンが揃ったところで, 再度細胞を起こし, 培養してタンパク質と RNA を調製し, 遺伝子産物の発現確認をウェスタンブロットおよび RT-PCR により行った。

HEK293 細胞, COS7 細胞に対する一過性の遺伝子導入は, X-tremeGENE-HP を用いて, メーカーのマニュアルに従って行った。

(4) ウェスタン・ブロット

FOXP3 タンパク質の発現誘導を確認するため, 抗 FOXP3 抗体を用いてウェスタン・ブロットを行った。タンパク質を 20 μg ずつ 10% ポリアクリルアミド・ゲルに load して泳動した。SDS-PAGE 後, 定法に従い PVDF 膜 (Immobilon-P, Millipore 社) に転写した。その後, PVDF 膜のブロッキングを 5% スキムミルクを含む Blocking buffer で行い, 次いで抗体反応を行った。FOXP3 の発現検出には, 1 次抗体として抗 FOXP3 抗体 (H-190) (sc-28705, Santa Cruz 社) を用いて, 1 時間反応させ, 洗浄後, 2 次抗体として HRP 結合抗ウサギ IgG 抗体 (GEヘルスケア社) を用いて, やはり 1 時間反応後,

洗淨, イモビロン・ウェスタン化学発光 HRP 基質を添加して化学発光を促し, X 線フィルムに感光した。-Actin の検出には, 1 次抗体として抗 -Actin 抗体 (A5441, Sigma 社), 2 次抗体として HRP 結合抗マウス IgG 抗体 (Cell Signaling 社) を用いて, 同様に行った。

(5) PCR

FOXP3, および Tet On 3G を検出するための PCR は, 最初に 94 °C, 4 分間の変性を 1 サイクル行った後, 変性を 94 °C で 30 秒, アニールを 50 °C で 30 秒, 伸長反応を 72 °C で 30 秒を 30 サイクルで行った。最後に 72 °C で 7 分の伸長反応を行い, 解析は, 1.5% のアガロースゲルを用いた電気泳動により行った。

18S rRNA を検出するための PCR は, 最初に 94 °C, 4 分間の変性を 1 サイクル行った後, 変性を 94 °C で 30 秒, アニールを 65 °C で 30 秒, 伸長反応を 72 °C で 30 秒を 30 サイクルで行った。最後に 72 °C で 7 分の伸長反応を行い, 解析は, 1.5% のアガロースゲルを用いた電気泳動により行った。

4. 研究成果

(1) 誘導型 FOXP3 安定発現株候補の単離

ヒト FOXP3 遺伝子の誘導型発現ベクターを Jurkat 細胞にトランスフェクトして, 誘導型 FOXP3 安定発現株を得ることを目的に, Tet-On システムを応用した pTetOne ベクターのマルチクローニング・サイトにヒト FOXP3 遺伝子のコーディング領域を挿入したベクターを作製した。

ヒト FOXP3 遺伝子の mRNA については, variant 1 (v1) と variant 2 (v2) の 2 種類のアイソフォームが報告されている。v2 は, v1 の第 2 のコーディング・エクソンが存在しない splice variant であり, この遺伝子産物は Treg 分化誘導能活性はないとされている (Arthritis Rheum 65: 1922-1933, 2013)。

本研究では, ヒト FOXP3 (v1), (v2) の双方の発現ベクターを作製し, まず FOXP3 発現ベクターからの FOXP3 遺伝子の発現が, Doxycycline 添加によって誘導されることを RT-PCR で確認した。その結果, 100 ng/mL の Doxycycline で 48 時間培養した場合, いずれの発現ベクターからも mRNA の発現を確認した (図 1)。

そこで, まず Jurkat 細胞に特化したリポフェクション法によるトランスフェクション試薬である TransIT-Jurkat (Mirus 社) を用いてトランスフェクトを試み, 一過性の発現をテストした。しかしながら, GFP 発現ベクターをトランスフェクトし, 全細胞数における GFP 発現細胞数の割合をセルカウンターで計

数し, トランスフェクション効率を調べたところ, その効率は 1 % 程度であった。これは, 期待されるトランスフェクション効率 (10~25%) には, はるかに及ばなかった。

さらに, 安定発現株を得るために, Puromycin 耐性遺伝子とのコトランスフェクションを試みたが, 残念ながら, ポジティブ・クローンは得られなかった。(以上, H28 年度報告)

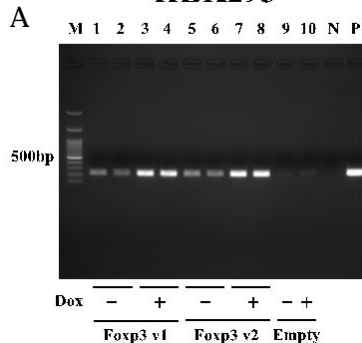
この結果を踏まえ, H29 年度は, 遺伝子導入効率を高める方法として, 電気穿孔法を用いることとした。具体的には, Nucleofector (Lonza 社) を用いて, FOXP3 発現ベクターと Puromycin 耐性遺伝子のコトランスフェクションを行った。この実験では, Treg 細胞誘導能がある FOXP3 (v1) のみを用いた。遺伝子導入後, 0.62 µg/mL Puromycin による選択によって, 遺伝子導入細胞の選択を行った。

Puromycin 選択後の細胞を, 限界希釈法により 96 well plate に播種し, 培養を継続したところ 47 クローンで細胞増殖が確認された。次いで, それぞれの細胞クローンを 35 mm ディッシュに 2 × 10⁵ cells/mL の濃度で播種し, 1 日培養し, 100 ng/mL Doxycycline 添加, および無添加条件でさらに 48 時間培養後, タンパク質と RNA を抽出し, ウェスタンブロットおよび RT-PCR を行った。

(2) ウェスタンブロット

単離した 47 クローンのうち, 細胞増殖に問題のあった 2 クローンを除き, 45 クローンを 35 mm ディッシュにて培養し, 100 ng/mL Doxycycline 添加, および無添加条件で 48 時間培養後, タンパク質を抽出し, これを用いて, FOXP3 の発現をウェスタンブロットにより確認した。なお, 単離した 47 クローンのうち 2 クローンは, おそらくクローン化後の凍結保存が上手くいかず, 細胞増殖しなかったものと考えられた。抽出したタンパク質は, 定量後, それぞれ 20 µg ずつ 10% ポリアクリルアミドゲルに load し, 電気泳動した後, 定法に従ってウェスタン・ブロットを行った。その結果, いずれのクローンからも FOXP3 の発現は確認できなかった。(図 2)

HEK293



Jurkat

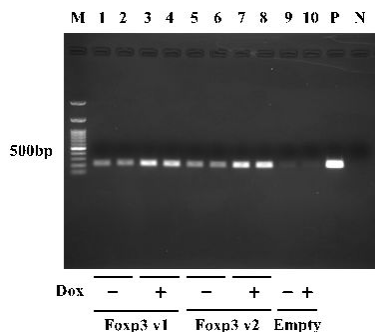


図1 FOXP3 mRNAの発現

誘導型 FOXP3 variant1 発現ベクターおよび、誘導型 FOXP3 variant 2 発現ベクターを HEK293 細胞 (A) および Jurkat 細胞 (B) にトランスフェクトし、100 ng/mL Dox 添加,あるいは無添加の条件で培養後、回収した細胞より調製した mRNA を用いて FOXP3 の発現を RT-PCR で確認した。期待されるバンドサイズは 223 bp。

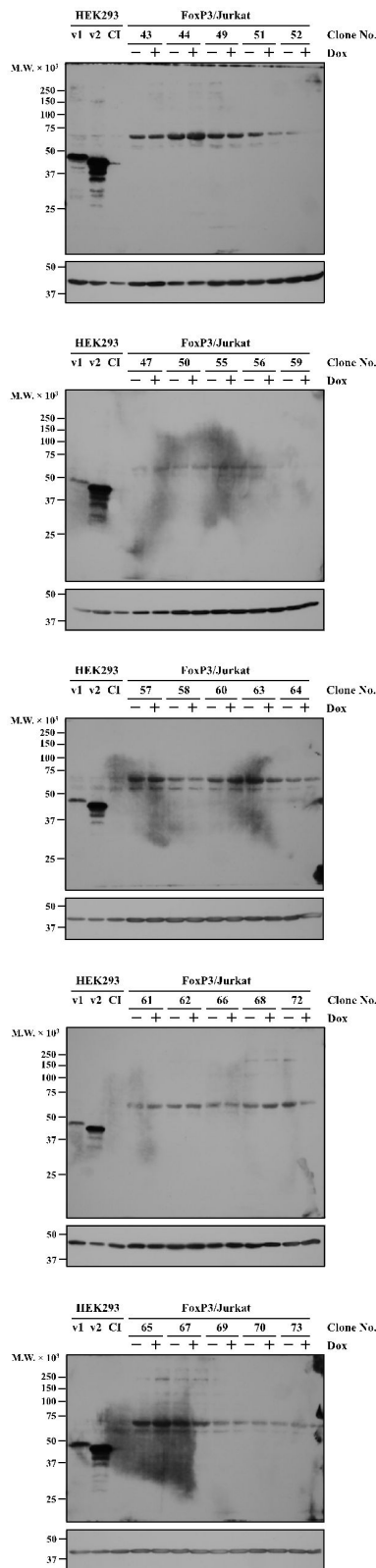
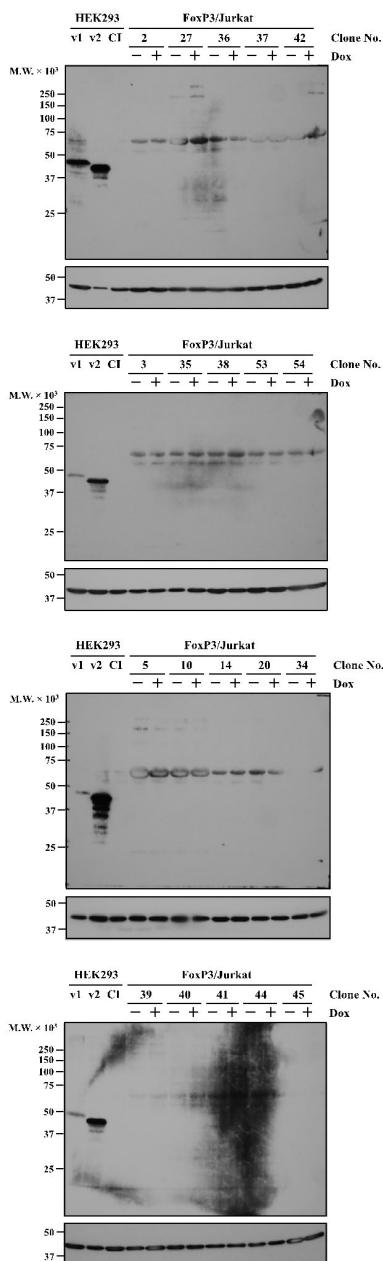


図2 ウェスタン・ブロットによる FOXP3 タンパク質の発現確認

v1, v2 は、それぞれ、FOXP3 の variant 1, variant 2, CI は、空ベクターによるネガティブ・コントロール。上段は、抗 FOXP3 抗体による検出、下段は抗 -Actin 抗体による検出。期待されるバンドサイズは、FOXP3 (v1)が 47.2×10^3 , FOXP3 (v2)が 43.4×10^3 , -Actin は、 42×10^3 。

(3) Tet-OnシステムによるFOXP3タンパク質発現誘導の確認

ウェスタン・プロットでは、単離した、いずれのクローンからもFOXP3タンパク質の発現が確認できなかった。

そこで、この原因を探るために、本研究に用いているTet-Onシステムが確かに機能しているかどうかを検討した。HEK293細胞およびCOS7細胞に、誘導型FOXP3発現ベクターを一過性に遺伝子導入し、100 ng/mL Doxycyclineの添加をして48時間培養し、FOXP3の発現を誘導した。タンパク質抽出後、ウェスタン・プロットによりFOXP3の発現を確認した。

その結果、HEK293細胞を用いた場合もCOS7細胞を用いた場合も、FOXP3 variant 2の発現ベクターからは、Doxycyclineの添加によりFOXP3(v2)の発現が確認できた。一方、FOXP3 variant 1の発現ベクターからは、短時間露出ではFOXP3(v1)の確かな発現は確認できなかった。(図3)しかし、長時間露出によりHEK293細胞を用いた場合FOXP3(v1)の発現を確認することができた。COS7細胞では長時間露出でもFOXP3(v1)の発現は検出できなかった。これらの結果から、Treg細胞誘導能があるFOXP3の発現にはタンパク質の安定性に関わる調節機序の存在が示唆された。

(4) RT-PCRによる挿入遺伝子の発現確認

ウェスタン・プロットでは、単離した、いずれのクローンからもFOXP3の発現が確認できなかった。そこで、各クローンの染色体に誘導型FOXP3発現ベクターが挿入されていることをRT-PCRにより確認した。

誘導型FOXP3発現ベクターにはFOXP3遺伝子の他に、転写制御因子のTet-On 3Gが含まれている。Tet-On 3Gは、構成的に発現し、Doxycyclineが存在すれば、これと結合する。Doxycycline結合型Tet-On 3Gは、FOXP3遺伝子の上流にあるTRE3GSプロモーターに結合して、FOXP3遺伝子の発現を誘導する。

そこで、FOXP3、Tet-On 3Gに特異的なPCRプライマーを設計し、それらを用いて、FOXP3とTet-On 3GのmRNAの発現を検討した。

その結果、いずれのクローンについても、Doxycyclineの添加の有無によらず、FOXP3、およびTet-On 3Gの発現は確認できなかった。(図4)

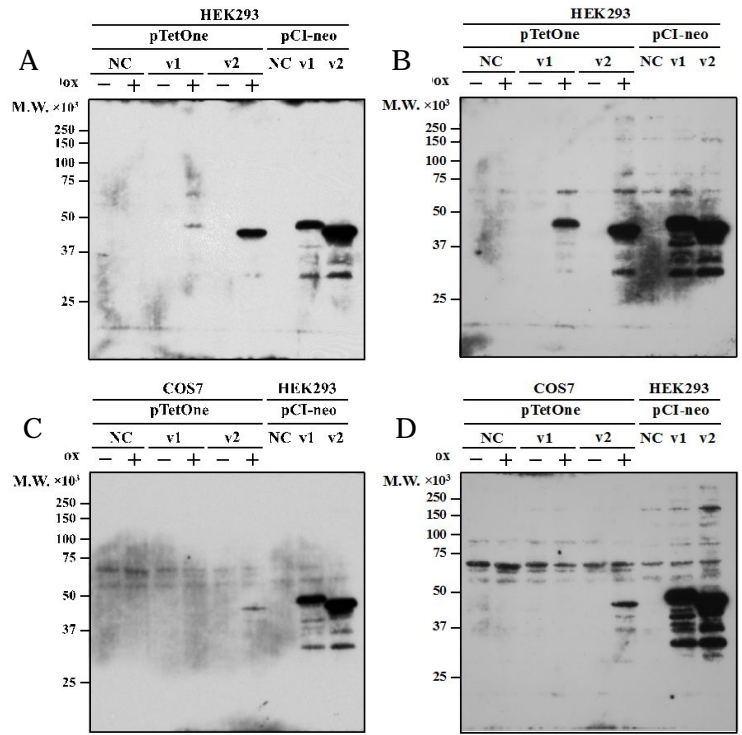


図3 ウェスタン・プロットによるTet-Onシステムの確認
v1, v2は、それぞれFOXP3 variant 1, variant 2。NCは、ネガティブ・コントロール。pTetOneに挿入したFOXP3遺伝子は、Doxycycline添加によって発現誘導したもの(+)としないもの(-)の2サンプルずつ。pCI-neoに挿入したFOXP3は構成的に発現。A, C, 短時間露出; B, D, 長時間露出。

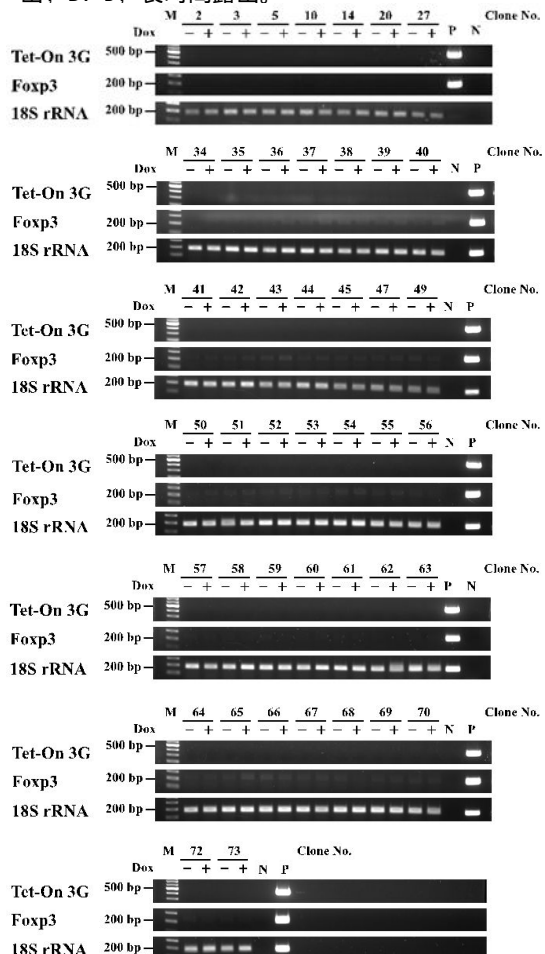


図4 RT-PCRによる、染色体への遺伝子挿入の確認

FOXP3 遺伝子は、Doxycycline 添加によって発現誘導したもの(+)としないもの(-)の2サンプルずつ。Nはネガティブ・コントロールで、cDNAの代わりに蒸留水を用いたもの。Pはポジティブ・コントロールで、各遺伝子の発現ベクターをPCRの鋳型として用いたもの。期待されるバンドサイズは、Tet-On 3Gが451 bp、FOXP3が224 bp、18S rRNAが185 bp。

(5) 結果のまとめ

誘導型FOXP3発現ベクターを血球系Jurkat細胞にリポフェクション法や電気穿孔法(Nucleofector)によって遺伝子導入し、puromycinによる選択を行い、puromycin耐性の細胞を限界希釈法によりシングル・クローンを得て、得られた細胞クローンを解析したものの、Doxycycline添加によりFOXP3遺伝子発現を有効に誘導したクローンは得られなかった。しかしながら、詳細な検証実験から、いくつかの興味深い知見が得られた。まず、FoxP3遺伝子に存在する完全長型アイソフォーム(v1)はexon2を欠失するv2アイソフォームに比べて発現効率がかなり低いことが分かった。これは、細胞系統が異なるHEK293細胞に遺伝子導入して調べたところ、HEK293細胞では、両アイソフォームで発現効率に差が極めて小さいのに対して、顕著であることが認められた。このことは細胞特異的安定性が関与することが示唆され、当初想定していなかった点であった。また、技術的な点として、遺伝子導入クローンの選抜はpuromycin耐性を指標とした安定的遺伝子導入株の選抜とテトラサイクリンによるFoxP3遺伝子誘導を示す細胞クローン選抜という2段階選抜が必要であった。この点で、既知のプロトコルで推奨されているpuromycin量は、Jurkat細胞では、効きが弱いことが適切なクローンを選抜できなかった理由の1つとして考えられた。並行して進めていた好中球分化障害モデル系を用いた準備検討から障害の機序の1つにER stressの制御の問題が明らかになった

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Tanimura A, Miyoshi K, Horiguchi T, Hagita H, Fujisawa K, Noma T, Mitochondrial activity and unfolded protein response are required for neutrophil differentiation, CELL PHYSIOL BIOCHEM 2018, in press, 査読有

Oshima K, Saiki N, Tanaka M, Imamura H, Niwa A, Tanimura A, Nagahashi A, Hirayama A, Okita K, Hotta A, Kitayama S, Osawa M, Kaneko S, Watanabe A, Asaka I, Fujibuchi W, Imai K, Yabe H, Kamachi Y, Hara J, Kojima S, Tomita M, Soga T, Noma T, Nonoyama S, Nakahata T, Saito MK, Human AK2 links intracellular bioenergetic redistribution to the fate of hematopoietic progenitors, Biochem Biophys Res Commun, 2018 Mar 4;497(2):719-725, 査読有
DOI:10.1016/j.bbrc.2018.02.139. Epub 2018 Feb 17.

[学会発表](計4件)

第17回日本ミトコンドリア学会年会、2017.11, 京都「ミトコンドリアがUPR活性をコントロールして免疫細胞分化の方向を決定づける」谷村 綾子, 三好圭子, 堀口 大吾, 萩田 浩子, 藤澤 浩一, 野間 隆文

日本ゲノム編集学会 第2回大会、2017.6 大阪「CRISPR/Cas9を用いたAK2の段階的欠損による細胞代謝への影響」谷村 綾子, 三好 圭子, 堀口 大吾, 藤澤 浩一, 野間 隆文

Gordon Research Conference Bioenergetics, 2017.6 Andover, New Hampsher, USA 「Impact of mitochondrial ATP production on neutrophil differentiation.」

Tanimura A, Miyoshi K, Horiguchi T, Hiroko H, Fujisawa K and Noma T
第57回日本生化学会 中国・四国支部例会、高知 2016.5 「HL-60細胞を用いた血球分化時におけるUnfolded protein responseの解析」谷村 綾子, 堀口 大吾, 三好 圭子, Yosi Dian Arinawati, 野間 隆文

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野間 隆文(NOMA, Takafumi)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号：40189428

(2) 研究分担者

谷村 綾子(TANIMURA, Ayako)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：10610199

(3) 研究分担者

堀口 大吾(HORIGUCHI, Taigo)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：70304532