

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15095

研究課題名(和文) IkBL分子機能に着目した新たな免疫・感染制御機序の解明とその応用

研究課題名(英文) To reveal regulatory mechanisms and strategy for regulation of susceptibility to immune-related diseases and infectious diseases by IkBL molecule

研究代表者

木村 彰方 (kimura, Akinori)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：60161551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：HLA領域に存在するIkBLによる免疫・炎症性疾患や難治性免疫疾患への制御戦略を得ることを目的として、IkBLのターゲット遺伝子群の探索とIkBLによるHIV感染制御機序を検討した。HIV感染者にはIkBL低発現遺伝子型が多いため、IkBLはHIV感染を抑制すると考えられた。そこで、T細胞株、B細胞株、上皮細胞株にそれぞれIkBL遺伝子を導入したIkBL高発現形質転換細胞を樹立し検討したところ、T細胞株および上皮細胞株ではIkBLによってHIV複製を抑制した。また、T細胞株でPMA刺激前後のRNA発現パターンを検討し、多くの遺伝子がIkBLによるスプライシング制御下にあることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Aim of this study was to investigate the functional involvement of HLA-linked IkBL gene (NFKBIL1) in the regulation of susceptibility to infectious disease and immune-related diseases, especially focusing on HIV infection. By analyzing polymorphisms in IkBL promoter region, it was found that susceptibility to HIV infection as associated with low expression allele of IkBL. By using T cell line and epithelial cell line overexpressing IkBL, it was suggested that IkBL inhibited replication of HIV. In addition, it was observed that splicing of many genes was regulated by IkBL. Furthermore, a novel HIV infection-related gene, of which splicing was regulated by IkBL, was identified to be involved in the regulation of HIV infection.

研究分野：人類遺伝学

キーワード：遺伝子 ウイルス 感染症 免疫学 生体分子

1. 研究開始当初の背景

主要組織適合抗原複合体領域 (MHC、ヒトでは HLA) にコードされる HLA 分子は、抗原提示を介して T 細胞および B 細胞による獲得免疫を制御するとともに、NK 細胞のリガンドとして機能することで自然免疫にも密接に関わる。以前より HLA 領域は免疫応答性や、自己免疫・慢性炎症疾患、ウイルス感染症への感受性を遺伝的に制御することが知られており、それらは HLA 遺伝子群のゲノム多様性によるものと考えられていた。しかし、HLA 領域には 200 を超える遺伝子が存在し、機能が不明な遺伝子も多い。我々は、関節リウマチや高安病を始めとする種々の疾患についての詳細な関連解析を行い、IkBL 遺伝子のプロモーター多型が発現量制御を介して疾患感受性に関わることを報告して来た。さらに、従来未知であった IkBL 遺伝子の機能解明に取組み、IkBL 分子が ASF/SF2 との結合において CLK1 と競合すること、CD45, CTLA4, CD72 の選択的スプライシングを制御すること、IkBL によるスプライシング制御には CLK1 によるキナーゼ活性は関わらないことを明らかにし、また、IkBL はインフルエンザウイルスの複製に必須な M 遺伝子のスプライシングを制御することを報告した。さらに、予備的な検討で、IkBL がアデノウイルス E1a のスプライシングを調節すること、インフルエンザの重症化と関連すること、T 細胞の活性化課程において一群の遺伝子の発現量やスプライシングパターンを変えること等を見出した。このような背景から、IkBL はウイルス感染制御や免疫機能調節において重要な役割を果たすと推定される。

2. 研究の目的

HLA 領域には、T・B 細胞が担う獲得免疫と NK 細胞が担う自然免疫に関わる多数の遺伝子が存在し、免疫応答性や免疫疾患・感染症感受性の個体差を遺伝的に支配している。申請者らは HLA 領域にある機能未知の IkBL が免疫関連遺伝子やウイルス遺伝子の選択的スプライシングを調節することを最近明らかにした。そこで本研究では、免疫関連細胞の活性化状況において IkBL によるスプライシング制御を受けるターゲット遺伝子群を同定し、その制御機序を解明するとともに、得られた知見に基づいて免疫・炎症性疾患や難治性感染症への制御戦略を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

IkBL 遺伝子を導入した形質転換株とその親株について、外部刺激による活性化の前後での網羅的 RNA 解析を行い、IkBL によるスプライシング制御のターゲット候補遺伝子群を同定する。また、CLK1 のキナーゼ活性に影響されないターゲット遺伝子を抽出し、その特徴や共通点の検討から、IkBL 特異的なスプライシング制御機構を解明する。さらに、

HIV 感染患者、対照者の血液 DNA 試料と臨床情報をすでに収集しているため、これらの試料を用いて IkBL プロモーター多型を検討し、HIV 感染および AIDS 発症の感受性・抵抗性との関連を明確にする。これに加えて、IkBL 遺伝子導入形質転換株を用いて、IkBL による HIV-1 複製制御を検討するとともに、HIV ウイルスの選択的スプライシング制御機序を解析する。さらに、IkBL による選択的スプライシングを受けるターゲット候補遺伝子の多型と HIV 感染との関連を検討する。

4. 研究成果

(1) HIV 感染と IkBL 多型およびその他の遺伝子多型との関連

IkBL 遺伝子 (NFKB1) にはプロモーター配列多型があり、IkBLp*01 ~ IkBLp*05 の 5 プロモーターハプロタイプが存在する。これらのハプロタイプのうち IkBLp*01 は低発現性、IkBLp*03 は高発現性を示すことが判明している。我々は HIV 感染と IkBL との関連を検討する目的で、日本人 HIV 感染者、HIV 感染後長期 AIDS 未発症者と対照者、インド人 HIV 感染者と対照者の IkBL 多型をダイレクトシーケンス法によって解析した。その結果、インド人集団について、HIV 感染者で IkBLp*01 頻度の有意な増加 (0.619 vs 0.484, OR=1.74, pc=0.03) が観察された。また、日本人集団についても同様の傾向 (0.500 vs 0.364, OR=1.74, pc=ns) を認めたと、HIV 感染後長期 AIDS 未発症者では関連を認めなかった (0.375 vs 0.364, OR=1.05, pc=ns)。このことから IkBL 低発現性は HIV 感染感受性と関連することが示された。

(2) IkBL によってスプライシング制御を受ける遺伝子群の探索

HIV 感染による細胞機能障害を受ける主体は T 細胞である。そこで、T 細胞株 (JSL1) を用いて、IkBL 遺伝子を導入した細胞株 (JSL1-IkBL) を樹立した。JSL1-IkBL では IkBL が高発現していることを確認した後に、PMA によって活性化した際に、JSL1 と JSL1-IkBL では遺伝子発現パターンがどのように変化するかを RNA-Seq で網羅的に検討したところ、PMA 刺激によって発現が亢進するが IkBL によってさらに発現増強される遺伝子群 (MYL6 他 12 遺伝子)、PMA 刺激によって発現が亢進するが IkBL によって発現抑制される遺伝子群 (GALT 他 5 遺伝子)、PMA 刺激によって発現が低下するが IkBL によって低下が抑制される遺伝子群 (NGLY1 他 11 遺伝子)、PMA 刺激によって発現が低下するが IkBL によって発現が強く増強される遺伝子群 (FAM33 他 15 遺伝子) のように、IkBL による特異的な発現制御を受ける遺伝子群が同定できた。

一方、スプライシング変化に着目した場合は、PMA 刺激後のスプライシングが IkBL によって強く抑制される (5 倍程度の抑制) 現

象が CPNE1 他 29 遺伝子、より軽度に抑制される減少が NPL 他 11 遺伝子見出された。これとは逆に、PMA 刺激後のスプライシングが IkBL によって 50%以上促進される遺伝子が COG6 他 61 遺伝子同定された。

さらに、IkBL によるスプライシング制御が有意に変化する遺伝子群をオントロジーで分類すると、予想どおり RNA スプライシングや mRNA プロセッシングに関わる遺伝子群が有意な変化を示したが、その他にも転写関連遺伝子群、細胞周期制御関連遺伝子群、細胞内シグナリングに関連遺伝子群などにも有意な変化が観察された。

これらのことから、T 細胞の活性化に伴う遺伝子発現変化やスプライシング変化は、IkBL によって増強、抑制の両方向であり、その影響は多岐にわたることが判明した。

(3) IkBL による HIV 複製制御の検討

T 細胞株、B 細胞株、上皮系細胞株のそれぞれに IkBL 遺伝子を導入して高発現株を樹立したため、これらの細胞株に HIV-1 を感染または HIV ゲノムをトランスフェクションで導入した後に、培養液中の p24 量を測定することで、IkBL による HIV 複製抑制の可能性を検討した。その結果、T 細胞株と上皮系細胞株では IkBL によって p24 産生量が有意に低下した。また、T 細胞株を用いて、HIV のスプライシングを検討したところ、IkBL は HIV のスプライシングを有意に抑制していた。これに対して、B 細胞株では p24 産生量は IkBL による影響を受けなかった。このことは、IkBL は HIV ゲノムの複製とスプライシングを抑制するが、その効果は細胞種によって異なることを示唆した。

(4) IkBL によるスプライシング制御を受ける遺伝子と HIV 感染との関連

IkBL によるスプライシング制御を受ける候補遺伝子 A について、その遺伝子多型と HIV 感染感受性との関連を検討した。その結果、遺伝子 A 多型と感染感受性との関連性は著明ではなかったが、特定の SNP (A>G) の遺伝子型で患者群を分類すると、AA 型の個体では感染後のウイルス量(1viral load)が低かった。このことはインド人集団、日本人集団のいずれでも観察された。さらに、T 細胞株を用いて当該遺伝子のスプライシングパターンと HIV 感染との関連を検討したところ、IkBL によって当該遺伝子のスプライシングが抑制されることが判明した。この遺伝子がコードするタンパクはスプライシングによって複数のアイソフォームが産生されることが知られているが、IkBL によってスプライシング抑制を受けて産生が増えるアイソフォームは他のウイルスで複製を抑制することが報告されているため、HIV 複製も同様の機序で抑制することが推定された。これらの結果は、IkBL によるスプライシング制御がウイルス感染を抑制することを示すもので

ある。

(5) その他の成果

HIV 感染感受性を規定する遺伝子を探索する目的で、日本人集団およびインド人集団を対象として、患者 対照研究を行った。その結果、APOBEC3H 遺伝子は HIV 感染感受性および HIV 感染後 AIDS 発症感受性の両者と有意に関連することを見出した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Naruse TK, Sakurai D, Ohtani H, Sharma G, Sharma SK, Vajpayee M, Narinder KM, Kaur G, Kimura A. APOBEC3H polymorphisms and susceptibility to HIV-1 infection in an Indian population. *J Hum Genet.* 2016; 61(3): 263-265. (査読有)
(doi: 10.1038/jhg.2015.136)
2. Sakurai D, Iwatani Y, Ohtani H, Naruse TK, Terunuma H, Sugiura W, Kimura A. APOBEC3H polymorphisms associated with susceptibility to HIV-1 infection and AIDS progression in Japanese. *Immunogenetics.* 2015; 67(4): 253-257. (査読有)
(doi: 10.1007/s00251-015-0829-2)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Akinori Kimura, Taeko K. Naruse, Daisuke Sakurai, Jianbo An, Hiroshi Terunuma, Emi E. Nakayama, Tatsuo Shioda, Gaurav Sharma, Narinder Mehra, Gurvinder Kaur. IkBL regulates susceptibility to HIV-1 infection. The 13th International Congress of Human Genetics 2016.04.04 (Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan)
2. Taeko K. Naruse, Daisuke Sakurai, Hitoshi Ohtani, Hiroshi Terunuma, Yasumasa Iwatani, Wataru Sugiura, Gaurav Sharma, Narinder Mehra, Gurvinder Kaur, Akinori Kimura. APOBEC3H polymorphisms are associated with susceptibility to HIV-1 infection and development of AIDS in Asian

populations. The 13th international Congress of Human Genetics 2016.04.04 (Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan)

3. 成瀬妙子、中山英美、安健博、Gaurav Sharma、Narinder Mehra、塩田達雄、Gurvinder Kaur、木村彰方. IkBL による HIV-1 感染感受性の制御. 日本人類遺伝学会第 60 回大会 2015.10.15 京王プラザホテル (東京都、新宿区)
4. 木村彰方、櫻井大祐、成瀬妙子、大谷仁志、Gaurav Sharma、Narinder Mehra、Gurvinder Kaur. APOBE3H は HIV-1 感染感受性および AIDS 発症感受性を制御する. 第 24 回日本組織適合性学会大会 2015.09.10 ホテルレイクビュー水戸 (茨城県、水戸市)
5. 成瀬妙子、櫻井大祐、安健博、中山英美、塩田達雄、Gaurav Sharma、Narinder Mehra、Gurvinder Kaur、木村彰方. IkBL は HIV-1 感染感受性を制御する. 第 24 回日本組織適合性学会大会 2015.09.10 ホテルレイクビュー水戸 (茨城県、水戸市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村 彰方 (KIMURA, Akinori)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
研究者番号：60161551