

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06947

研究課題名(和文) 制御性T細胞の発生、分化および抑制機能における長鎖非翻訳RNAの役割解明

研究課題名(英文) The role of long non-coding RNA in the development and suppressive function of regulatory T cells

研究代表者

市山 健司 (Ichiyama, Kenji)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教(常勤)

研究者番号：60777960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：制御性T細胞(Treg)の免疫抑制機能を制御する新規長鎖非翻訳RNA(LncRNA)の同定およびその機能解明を目的として、Tregで高発現し、かつFoxp3と結合するLncRNAを次世代シーケンサーにより網羅的に解析した。その結果、37個の新規LncRNAsをTreg特異的な機能性LncRNAの候補因子として同定した。さらに、アンチセンスオリゴを用いたノックダウン実験によりTreg関連遺伝子の発現を制御するLncRNAを見出した。また、胸腺におけるTreg発生の必須因子であるSatb1の結合因子として転写因子Xを新たに同定し、Satb1と転写因子Xの結合にはRNAが必要であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：In order to identify the novel long non-coding RNAs (LncRNAs) which are important in the immunosuppressive function of regulatory T cell (Treg), LncRNAs, which are highly expressed in Treg and bound to Foxp3, were comprehensively analyzed by next generation sequencer. As a result, 37 novel LncRNAs were identified as candidates for Treg-specific functional LncRNA. Furthermore, we found a LncRNA which control the expression of Treg signature gene by the knock-down experiment using antisense oligonucleotides. In addition, we also identified the transcription factor X as a co-factor of Satb1, which is an essential factor for the development of Treg in the thymus, and found that RNA is necessary for the interaction between Satb1 and transcription factor X.

研究分野：免疫学

キーワード：制御性T細胞 Foxp3 長鎖非翻訳RNA

1. 研究開始当初の背景

制御性T細胞(Treg)は免疫自己寛容の確立・維持において重要な役割を担うことが知られており、その発生機構および免疫抑制機構の解明が現在免疫学の重要研究課題のひとつとされている。

申請者らはこれまで転写因子 Foxp3 が転写因子 AML1/Runx1 と転写複合体を形成し、Treg による免疫抑制機構に重要な役割を担っていることや、クロマチンリモデリングタンパク質 SATB1 が胸腺における Treg の正常発生に必須の因子であることなどを見出し報告しているが、その詳細な分子機構に関してはまだ未知の部分が多く存在する。

近年、ヒトにおいてタンパク質をコードするDNA領域の割合が全ゲノムのたった2%であることが明らかとなって以降、non-coding RNA(ncRNA)と呼ばれるタンパク質をコードしないRNAが高い注目を集めるようになり、その機能解析が世界中で精力的に行われている。なかでも、LncRNAは200塩基以上のncRNAであり、転写因子やクロマチンリモデリング因子のリクルート、タンパク複合体のscaffold(足場)など様々な作用機序を介して標的遺伝子の発現を制御することで極めて広範囲の高次生命現象に関わることが明らかになりつつある。さらに最近では、癌やアルツハイマー病など様々な疾患でLncRNAsの異常発現が観察されており、その関連性が指摘されていることから、新たなバイオマーカーや分子標的治療薬のターゲットとしても期待されている。

免疫系、特にTh細胞分化においてもここ数年でLncRNAsの役割に関する報告が増えている。しかしながら、Tregの発生および免疫抑制機能におけるLncRNAsの役割に関してはまだ報告が無く、未知のままである。

2. 研究の目的

本研究では、抑制的免疫応答制御に中心的役割を果たす制御性 T 細胞(Treg)の発生および免疫抑制機構における長鎖非翻訳 RNA(LncRNA)の役割を明らかにする。特に、従来の分子生物学的および発生工学的手法に加えて次世代シーケンサーを用いた解析を行うことで Treg に特異的な LncRNA を網羅的に解析し、Treg の発生および免疫抑制機能に関与する機能的な新規 LncRNA を探索・同定する。これらの研究結果に基づき、LncRNA をターゲットにした Treg の人為的な機能制御によるこれまでにない全く新しい自己免疫疾患治療戦略を提唱するための基盤を確立する。

3. 研究の方法

本研究では、Treg の発生および免疫抑制機能における LncRNA の役割を明らかにし、人為的に Treg を制御する新しい免疫応答制御法を提唱するための基盤の確立を目指す。そ

のために、次世代シーケンサーを用いて、胸腺内 Treg の各発生過程における LncRNA の発現を RNA-Sequencing で網羅的に解析することで、Treg 特異的に高発現する新規 LncRNA の探索・同定を行う。また、Satb1 および Foxp3 を標的とした RIP-Sequencing を行うことで標的因子と複合体を形成する LncRNA を網羅的に解析し、Treg の発生および免疫抑制機構に関与する新規 LncRNA の探索・同定も試みる。特定の LncRNA を同定した後は、ウイルスベクターを用いて LncRNA の過剰発現およびノックダウン実験を行い、実際に Treg に及ぼす効果およびその作用機序を検討する。

4. 研究成果

制御性T細胞(Treg)の免疫抑制機能を制御する新規長鎖非翻訳RNA(LncRNA)の同定およびその機能解明を目的として、TregにおけるLncRNAの発現を次世代シーケンサーにより網羅的に解析した。具体的には、我々が独自に作製したFoxp3-GFPレポーターマウスを用いてその脾臓およびリンパ節からTreg細胞、Tconv細胞をそれぞれFACSソーティングで精製・回収した。その後、それぞれのサンプルからtotal RNAをカラムで抽出し、cDNAライブラリーを作製後、次世代シーケンサーに供した。シーケンス後は、①FDRが0.05以下、②FPKMが1以上、③ゲノム領域がintergenic、④コントロールであるTconvと比較して発現が2倍以上、の4条件でデータ解析を行った結果、Treg特異的な新規LincRNAとして約150個の候補LincRNAを選出した(図1)。

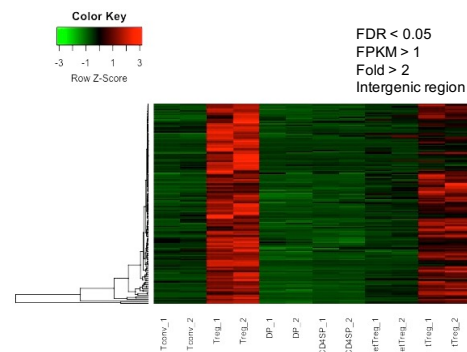


図1 Treg細胞で特異的に発現するLincRNAsのヒートマップ

LncRNAは転写因子と複合体を形成し、そのリクルートを介して標的遺伝子の発現を制御することが知られている。そこで、さらに機能的なLncRNAを絞り込むため、Tregのマスター遺伝子である転写因子Foxp3に結合するLncRNAの網羅的解析をRIP-Sequencingにより試みた。具体的には、Foxp3-GFPレポーターマウスの脾臓およびリンパ節からTregをFACSソーティングで精製・回収し、その後、抗IgG抗体もしくは抗Foxp3抗体で免疫沈降することでFoxp3に結合するRNAを回収した。そして、cDNAライブラリーを作製して次世代シ

ークエンサーに供した。シークエンス後は、①FPKMが1以上、②ゲノム領域がintergenic、③inputと比較してIPで濃縮されている、④コントロールであるTconvと比較してIP後の発現が2倍以上、の4条件でデータ解析を行った結果、興味深いことに37個の新規LncRNAsをTreg特異的な機能性LncRNAの候補因子として選出した。

次に、これまでに選出した37個のLncRNAsが実際にTregの免疫抑制機能に影響を及ぼすかどうか検討するため、レトロウイルスの系を用いたshRNAによるLncRNAのノックダウン実験を試みた。まず絞り込んだ37個全てのLncRNAに対して特異的な標的配列を持つshRNAをそれぞれ3-6個設計し、Tregにウイルス感染させることでその標的LncRNAのノックダウン効率を確認した。その結果、非常に残念ながら作成した全てのshRNAコンストラクトにおいて標的LncRNAの発現レベルで5-10%程度のノックダウン効率しか確認できなかった。一般的に、目的遺伝子をノックダウンする方法としてはshRNAを用いる手段以外に、標的の遺伝子配列に対するアンチセンス配列を持った合成オリゴを用いる方法もよく知られている。そこで次に、アンチセンスオリゴ(ASOs)を用いたノックダウン実験を試みた。LncRNAは自身が位置するゲノム領域の近傍に存在する遺伝子の発現をcis作用で制御することが知られている。そこで、37個の候補LncRNAsの中からTreg signature genesの近辺に存在する数個のLncRNAsを選出し、それぞれに3個のASOsを設計し、Tregに導入することでその標的LncRNAのノックダウン効率を確認した。その結果、1つの新規LncRNAに対して90%以上のノックダウン効率を示すASOsを合成することに成功した(図2)。さらに、ノックダウン処理したTregにおいてTreg signature genesの発現をRT-PCRにより測定したところ、興味深いことに標的LncRNAの近傍に存在するTreg signature geneの発現が有意に抑制された(図2)。

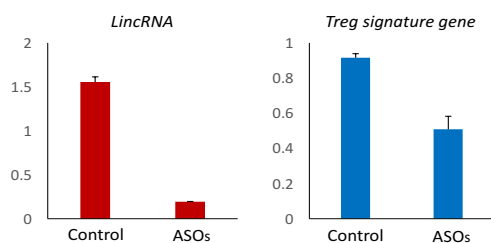


図2 アンチセンスオリゴ(ASOs)による標的LincRNAのノックダウン

このLncRNAはTregで特異的に発現が高く、かつFoxp3と結合することから、TregにおけるFoxp3複合体の形成に寄与することでTreg signature geneの発現を正に制御する新規制御因子である可能性が考えられる。また、同定したLncRNAによって制御されるTreg

signature geneはTregの免疫抑制機構に関与することが知られているため、LncRNAがTreg signature geneの発現制御を介してTregの免疫抑制機能を調節する可能性が示唆される。今後は、実際に同定したLncRNAがTregの免疫抑制機能を制御するかどうか検討するため、ASOs処理をしたTregを用いてin vitroおよびin vivoでsuppression assaysを行いたいと考えている。さらに、詳細な分子機構を明らかにするため、LncRNAをノックダウンしたTregにおいてRNA-Seqを行うことで遺伝子発現を網羅的に解析し、またFoxp3に対する抗体で免疫沈降およびクロマチン免疫沈降を行うことでFoxp3転写複合体の形成およびその機能に及ぼす影響を検討する予定である。また同時に、CRISPR/Casシステムを用いて迅速に遺伝子欠損マウスを作製することで、LncRNAの生理的意義を個体レベルでも明らかにしたいと考えている。

一方で、これまでに我々はTregの正常発生に必須の因子としてゲノムオーガナイザーであるSatb1を同定し、Satb1がTreg特異的なエピゲノム形成を介してTreg分化を制御することを明らかにし、報告している。しかしながら、Satb1は様々な細胞でユビキタスに発現しているためどのようにしてTreg特異性を獲得するのかその詳細な分子機構はまだ良くわかっていない。申請者はこれまでにSatb1によるTreg分化制御の分子機構を明らかにする過程で、CD4陽性胸腺細胞においてSatb1がクロマチン再構成複合体の構成要素の一つである転写因子Xと結合することを新たに見出した(図3)。さらに興味深いことに、RNase処理をすることでその結合が消失することからSatb1と転写因子Xの結合にはRNAが関与することが示唆された(図3)。LncRNAはタンパク質複合体のスキヤホールド因子として作用することが知られており、このことからTreg特異的なLncRNAがSatb1と転写因子Xの結合に寄与する可能性が考えられる。今後は、Satb1や転写因子Xに結合するLncRNAの網羅的解析を介してSatb1と転写因子Xの結合に寄与するLncRNAを同定し、Treg発生に及ぼすその役割についても検討を進めたいと考えている。

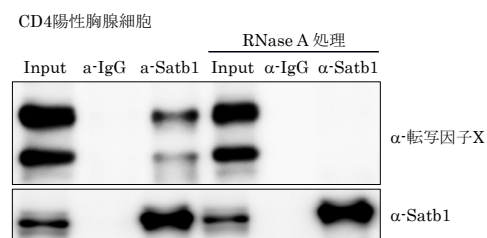


図3 CD4陽性胸腺細胞におけるSatb1の免疫沈降

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 1 件)

Kim BS, Lu H, Ichiyama K, Chen X, Zhang YB, Mistry NA, Tanaka K, Lee YH, Nurieva R, Zhang L, Yang X, Chung Y, Jin W, Chang SH, Dong C. (2017) Generation of ROR γ t+ Antigen-Specific T Regulatory 17 Cells from Foxp3+ Precursors in Autoimmunity. *Cell Rep.*, 21:195-207 (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

平成 29 年 12 月

第 46 回日本免疫学会学術集会

Kenji Ichiyama, Chen Dong

「Identification and functional elucidation of novel regulators in the development of IL-17-producing helper T cells」

[図書] (計 1 件)

市山健司、坂口志文「制御性 T 細胞」

周産期医学, Vol.47, No.12, 2017

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市山 健司 (ICHIYAMA, Kenji)

大阪大学、免疫学フロンティア研究センター、特任助教(常勤)

研究者番号 : 60777960

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()