

令和 5 年 5 月 11 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07459

研究課題名（和文）BCL11B変異によるヒト原発性免疫不全症発症機序の解明

研究課題名（英文）Investigation of the impact of BCL11B p.N441K mutation on inborn errors of immunity

研究代表者

奥山 一生（Okuyama, Kazuki）

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：60712750

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：Tリンパ球減少症の患児に同定されたBCL11B遺伝子の点突然変異p.N441Kに関して、その発症機序を解明するために、モデルマウスの解析を行った。変異マウスに、新生児期のTリンパ球の分化不全を認め、病態が再現されることが分かった。さらに変異マウス胸腺にはNK様細胞が出現し、Tリンパ球への運命決定が破綻していると考えられた。分子生物学的解析から、NK様細胞の分化抑制にはBcl11aが必要であり、Bcl11b変異タンパク質はBcl11aの機能を阻害することが分かった。さらにNK様細胞の分化はTcf1依存적であり、Tcf1に対するBcl11bの阻害機能が変異によって減弱することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の運命決定において、他の細胞系譜への分化を抑制することは極めて重要である。Bcl11bはTリンパ球系譜の運命決定を制御する最も重要な転写因子である。本研究では、胸腺内におけるNK細胞系譜への分化抑制には、Bcl11bだけではなくBcl11aも重要であることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：A de novo mutation of BCL11B gene, p.N441K was isolated from a patient with T-lymphocytopenia. To understand the pathogenesis of p.N441K mutation, we generated a mouse model. T cell development was impaired in the mutant mice at neonatal period indicating the phenotype of the patient was recapitulated in the model mice. We found an accumulation of NK-like cells in the thymus of mutant mice suggesting that the cell fate determination toward T cell lineage was disrupted by the Bcl11b mutation. Our analyses revealed that Bcl11a is required for the repression of NK-like cells in the thymus, and mutant Bcl11b interfered Bcl11a function. The development of NK-like cells depended on Tcf1, and the mutation impaired the capacity of Bcl11b to repress Tcf1 transcriptional activity.

研究分野：免疫発生学

キーワード：先天性免疫異常症 T細胞分化 Bcl11b 転写制御

## 1. 研究開始当初の背景

先天性免疫異常症 (IEI) は、遺伝子変異により免疫担当細胞の分化不全や機能異常を呈する疾患である。感染症への罹患リスクが上昇するだけではなく、自己免疫疾患や腫瘍免疫の低下なども観察される。免疫不全症 IMD49 は重篤な T リンパ球減少症を伴う IEI であり、しばしば脳神経系疾患を伴う。その原因遺伝子は T リンパ球分化や脳神経系の発生に必須の転写因子、*BCL11B* である。IMD49 は新生児期の免疫系スクリーニングにより診断される。T リンパ球分化が正常な場合、T 細胞受容体形成過程の副産物である TREC が血中に検出されるが、分化初期の異常による T リンパ球減少症では TREC が産生されない。2016 年、D. Punwani らによって報告された IMD49 患児の症例では TREC は検出されず、末梢血中の CD3 陽性 T リンパ球数は正常値の 1/10 以下であった。この患児の *BCL11B* 遺伝子の片アレルには新規突然点変異 p.N441K が認められた。培養細胞およびゼブラフィッシュを用いた機能解析から *BCL11B*<sup>N441K</sup> は優勢阻害効果を発揮し、T リンパ球分化を抑制することが判明している。しかしながら *BCL11B*<sup>N441K</sup> がどのような作用機序で T リンパ球分化不全を引き起こすのか、その詳細な分子機構は不明である。

*BCL11B* は 1 つの非典型 CCHC 型と 6 つの C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型亜鉛フィンガー領域を有する亜鉛フィンガー転写因子で、ホモ二量体として機能する。亜鉛フィンガー領域はしばしばタンパク質の機能に重要である。*BCL11B* の非典型 CCHC 型亜鉛フィンガー領域は二量体形成に必要であることが知られている。一方、C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型亜鉛フィンガー領域の生理的機能は完全には解明されていない。N441 残基は 4 番目の C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型亜鉛フィンガー領域に位置し、*BCL11B*<sup>N441K</sup> の詳細な解析は *BCL11B* の亜鉛フィンガーの機能を理解する上でも重要である。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、IEI 患児に同定された *BCL11B* の p.N441K 変異がどのような機序により T リンパ球分化不全を引き起こすのかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

ヒト *BCL11B* p.N441K 変異に相当する *Bcl11b* 変異 p.N440K を有する遺伝子改変マウスを作製し、その表現型解析を行う。

## 4. 研究成果

相同組換えにより *Bcl11b*<sup>N440K</sup> 変異を有するマウス ES 細胞を作製し、細胞凝集法によってキメラマウスを作製した。キメラマウスと C57BL/6 マウスとの交配により F1 マウスを得たところ、*Bcl11b*<sup>+ / N440K</sup> マウスは顕著な発育不全を呈し、生後 4 週程度で致死であった。生後 0 日から 1 週の *Bcl11b*<sup>+ / N440K</sup> マウスの胸腺をフローサイトメトリにて解析したところ、CD4/8 陰性の T リンパ球前駆細胞の蓄積が認められ、T リンパ球系譜に運命決定した CD4/8 陽性細胞は減少していた。二次リンパ器官である脾臓では成熟 T リンパ球が顕著に減少しており、*BCL11B*<sup>N441K</sup> 患児の T リンパ球減少症がモデルマウスでも再現された。また *Bcl11b*<sup>+ / N440K</sup> マウス胸腺に、CD24 陰性 TCRβ 陰性の非 T リンパ球集団の出現を認めた。この集団の細胞系譜を明らかにするために RNA-seq 解析を行ったところ、NK 細胞関連遺伝子である *NKp46* や *Eomes* を発現する NK 様細胞であることが分かった。興味深いことにこれらの NK 様細胞は、*Bcl11b* 欠損マウス胸腺には観察されない。より詳細に *Bcl11b*<sup>N440K</sup> 変異タンパク質の機能を検討するために、*Bcl11b*<sup>N440K</sup> キメラマウスの精子と 4 週齢の *Bcl11b*<sup>+ / N440K</sup> F1 マウス卵子を用いて試験管内受精を行い、*Bcl11b*<sup>N440K / N440K</sup> マウスを作製した。このマウスは生後 1 日で致死であった。*Bcl11b*<sup>N440K / N440K</sup> マウス胸腺ではより高頻度で NK 様細胞が出現したことから、*Bcl11b*<sup>N440K</sup> は野生型の *Bcl11b* に対してのみならず他のタンパク質の機能も阻害すると考えられた。*Bcl11a* は *Bcl11b* と同源性の高い非典型 CCHC 型亜鉛フィンガー領域を共有しており、T リンパ球分化の初期特異的に *Bcl11a* は *Bcl11b* と共発現している。これらの事実から *Bcl11b*<sup>N440K</sup> は *Bcl11a* とヘテロ二量体を形成することで、*Bcl11a* の機能を阻害するのではないかと仮説を立てた。共免疫沈降法により *Bcl11b* は *Bcl11a* と相互作用することが確認され、*Bcl11a* 欠損マウスの胸腺を解析したところ、*Bcl11b*<sup>+ / N440K</sup> マウスと同様に NK 様細胞が出現することが分かった。この結果から、胸腺内での NK 様細胞の分化は *Bcl11a* によって抑制され、*Bcl11b*<sup>N440K</sup> は *Bcl11b* に加えて *Bcl11a* の機能も阻害すると示唆される。次に、同様の現象が脳神経系の発生段階においても観察されるか、大脳皮質の解析を行った。*Bcl11b*<sup>N440K / N440K</sup> マウスの大脳皮質では層構造が破綻し、退縮が認められた。*Bcl11b* 欠損マウスでは皮質の退縮は観察されなかった一方で、*Bcl11a* 欠損マウスでは *Bcl11b*<sup>N440K / N440K</sup> マウスと同様に、層構造の破綻と退縮が観察された。このことから、*Bcl11a* に対する *Bcl11b*<sup>N440K</sup> の阻害効果は大脳皮質においても発揮されていることが分かった。

任意の細胞系譜の分化過程において他系譜への分化を抑制することは、その細胞系譜への運命決定に重要である。これまで報告では T リンパ球系譜への運命決定は、他系譜への分化抑制も含めて *Bcl11b* が制御すると考えられていた。しかしながら我々の観察では、胸腺内における NK 様細胞への分化抑制には *Bcl11a* が必須であると予測される。では *Bcl11a* 欠損下あるいは

Bcl11b<sup>N440K</sup> 存在下において、NK 様細胞への分化はどの分子によって誘導されるのか？これを明らかにするために、Bcl11b と相互作用するタンパク質の探索を行った。その結果、p.N440K 変異によって Bcl11b と Tcf1 の相互作用が減弱することが分かった。また Bcl11b の DNA 結合解析の結果、p.N440K 変異によって結合が変化した DNA 領域には Tcf1 の認識配列が濃縮されていた。*Tcf1* 欠損マウス胸腺から CD24 陰性 TCRβ 陰性細胞を単離し、遺伝子発現を解析したところ、NKp46、Eomes などの発現が低下していることが分かった。試験管内で *Bcl11b*<sup>N440K/N440K</sup> 胎児由来の肝細胞を培養したところ、生体内と同様に NK 様細胞が分化誘導されたが、これは shRNA による *Tcf1* 発現抑制により阻害された。以上の結果から Bcl11b<sup>N440K</sup> 変異タンパク質は、NK 様細胞の分化を抑制する Bcl11a を阻害すると同時に、Tcf1 から離脱することで Tcf1 による NK 関連遺伝子発現誘導を亢進させると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okuyama Kazuki, Nomura Aneela, Nishino Kohei, Tanaka Hirokazu, Harly Christelle, Chihara Risa, Harada Yasuyo, Muroi Sawako, Kubo Masato, Kosako Hidetaka, Taniuchi Ichiro	4. 巻 -
2. 論文標題 The Majority of the Serine/Threonine Phosphorylation Sites in Bcl11b Protein Are Dispensable for the Differentiation of T Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.2200101	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okuyama Kazuki, Taniuchi Ichiro	4. 巻 7
2. 論文標題 Three residues in the BTB domain promote a good partnership between NuRD and Thpok	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciimmunol.abq1408	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 T. Strid, K. Okuyama, J. Tingvall-Gustafsson, J. Kuruvilla, C. Jensen, S. Lang, M. Prasad, R. Somasundaram, J. Ahsberg, S. Cristobal, S. Soneji, J Ungerback, and M. Sigvardsson	4. 巻 206
2. 論文標題 B Lymphocyte Specification Is Preceded by Extensive Epigenetic Priming in Multipotent Progenitors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 2700 ~ 2713
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.2100048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 M. Yamashita, H.S. Kuehn, K. Okuyama, S. Okada, Y. Inoue, N. Mitsuiki, K. Imai, M. Takahi, H. Kanegane, M. Takeuchi, N. Shimojo, M. Tsumura, A.K. Padhi, K.Y.J. Zhang, B. Boisson, J.L. Casanova, O. Ohara, S.D. Rosenzweig, I. Taniuchi, and T. Morio	4. 巻 22
2. 論文標題 A variant in human AIOLOS impairs adaptive immunity by interfering with IKAROS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 893 ~ 903
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41590-021-00951-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 H.S. Kuehn, J. Chang, M. Yamashita, J. Niemela, C. Zou, K. Okuyama, J. Harada, J. Stoddard, R. Baxter, E. Hsieh, M. Garofalo, T. Fleisher, T. Morio, I. Taniuchi, C. Dutmer, and S. Rosenzweig	4. 巻 218
2. 論文標題 T and B cell abnormalities, pneumocystis pneumonia, and chronic lymphocytic leukemia associated with an A10LOS defect in patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20211118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Somasundaram Rajesh, Jensen Christina T, Tingvall-Gustafsson Johanna, Ahsberg Josefine, Okuyama Kazuki, Prasad Mahadesh, Hagman James, Wang Xun, Soneji Shamit, Strid Tobias, Ungerback Jonas, Sigvardsson Mikael	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 EBF1 and PAX5 control pro-B cell expansion via opposing regulation of the Myc gene.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2020009564	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kotaki Ryutaro, Kawashima Masaharu, Yamaguchi Asuka, Suzuki Naoto, Koyama-Nasu Ryo, Ogiya Daisuke, Okuyama Kazuki, Yamamoto Yuichiro, Takamatsu Masako, Kurosaki Natsumi, Ando Kiyoshi, Murata Akihiko, Ohtsuka Masato, Nakagawa So, Katagiri Koko, Kotani Ai	4. 巻 10
2. 論文標題 Overexpression of miR-669m inhibits erythroblast differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70442-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawashima M, Carreras J, Higuchi H, Kotaki R, Hoshina T, Okuyama K, Suzuki N, Kakizaki M, Miyatake Y, Ando K, Nakayama M, Umezu S, Horie R, Higuchi Y, Katagiri K, Goyama S, Kitamura T, Chamoto K, Yano S, Nakamura N, Kotani A	4. 巻 34
2. 論文標題 PD-L1/L2 protein levels rapidly increase on monocytes via trogocytosis from tumor cells in classical Hodgkin lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 2405 ~ 2417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-020-0737-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kazuki Okuyama, Motoi Yamashita, Kazuaki Matsumoto, Michiko Ohno-Oishi, Satoshi Kojo, Tomohiro Morio, Hideyuki Yoshida, Ichiro Taniuchi
2. 発表標題 A de novo missense mutation of Bcl11b gene causes an abnormal thymopoiesis
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥山一生
2. 発表標題 亜鉛フィンガー転写因子Bcl11bによる遺伝子発現制御とクロマチン再構成
3. 学会等名 霊長類医科学フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------