

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2013

課題番号：21390077

研究課題名(和文) 微小環境構築と転写ネットワーク解析による免疫反応制御の分子機構解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms for the regulation of immune response by reconstruction of microenvironment and analyses of transcription factors and their networks

研究代表者

清水 章 (SHIMIZU, Akira)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00162694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円、(間接経費) 4,230,000円

研究成果の概要(和文)：免疫反応の的確な進行には、多種類の細胞が特異的な微小環境を構築し、調和した細胞機能が発揮されることが不可欠である。微小環境を細胞培養系で再現し、これが制御する転写因子とそのネットワークを解析することによって、免疫反応を制御する分子機構を解明することを目指した。

IgAへのクラススイッチ組換えを高効率に誘導することができる in vitro 培養実験系を確立し、IgAへのクラススイッチ組換えにはRunx転写遺伝子が必須であり、同転写因子が retinoic acid ならびに TGF- β 1 信号の下流で機能していること、Runx3が制御性T細胞の分化・成熟に必要であることなどを見出した。

研究成果の概要(英文)：It is essential for proper progression of immune reaction that construction of specific microenvironment and harmonized function of a variety of immuno-competent cells. It is tried to elucidate molecular mechanisms of such immune reaction by reconstruction of such microenvironment in vitro and analyses of transcription factors and their networks regulated by such microenvironment.

An in vitro culture system that very efficiently induces class switching to IgA was established. It was found that Runx transcription factors are essential for IgA class switching and they act downstream of signals from retinoic acid TGF- β 1, and that Runx3 is essential for differentiation and maturation of regulatory T cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：分子免疫学 免疫制御 転写因子 遺伝子組換え 抗体遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 獲得免疫系の最大の特徴は、その主体として働く細胞であるリンパ球において、抗原認識のための分子、すなわち抗原受容体が機能を獲得あるいは拡張するために、その遺伝子が組換えを起こすことである。リンパ球の抗原受容体、Tリンパ球におけるT細胞受容体(以下TCR)ならびにBリンパ球における抗体の遺伝子は、可変部遺伝子の組換え(V(D)J組換え)によって部分断片から完成され、これによって個々の細胞がそれぞれ異なる抗原を特異的に認識・結合することが可能となり、免疫系全体として多様な抗原に対しそれぞれ特異的に反応する基礎を築いている。抗体はエフェクター分子として抗原の中和・除去などの機能も担うが、この機能を抗原の種類や侵入経路に応じて拡張するため、可変部遺伝子の組換えに加え、H鎖の定常部遺伝子が組換えられる(クラススイッチ組換え)。さらに、抗体はその抗原結合の親和性を高め、より低濃度の抗原を効率よく中和・除去できるように、可変部遺伝子に高頻度に突然変異が導入される(体細胞突然変異)。このような変換の結果は免疫反応の記憶として残され、同一抗原の再侵入にさし、生体はより迅速かつ高い効率でこれを排除できるようになる。

(2) これら3種の遺伝子変換には、それぞれ特異的な組換え因子であるRag(V(D)J組換え)およびAID(クラススイッチ組換え、体細胞突然変異)が必須であるが、その発現が、リンパ球のそれも特定の分化段階に特異的に精密に制御されている。さらにこれらの変換は、各細胞の分化段階や抗原の種類や侵入経路に応じて必要とされる機能に対応して特定の標的遺伝子断片にのみ特異的に行われる。クラススイッチ組換えにおいては、抗原の種類や侵入経路に応じて産生されるサイトカイン・リンホカインによる調節を受け、最もふさわしいクラス・アイソタイプのH鎖定常部遺伝子が標的となって組換えが進行する。体細胞突然変異は、抗原と反応して活性化されたBリンパ球において発現している可変部遺伝子に特異的に導入され、高親和性を獲得した抗体を発現する細胞のみが選択され、更なる活性化や記憶の獲得に導かれる。

(3) 1次リンパ組織(骨髄、胸腺)はリンパ球分化のための組織構造、微小環境を提供し、直接的接触やサイトカイン・リンホカインなどの液性因子を介する、細胞間シグナルの巧みな伝達によりこれを制御している。2次、3次リンパ組織では、免疫性炎症に伴って組織構造の再構成や新生が起こり、免疫反応の効率的継続、維持のための微小環境を提供していると考えられており、その制御に重要な意義を持つものと示唆されていた。

(4) このように組換えそのもの、すなわちこ

れに必須な因子(最終分化・活性化ではAID遺伝子など)の発現と、組換え標的の特異性が正しく制御されてはじめてリンパ球が正しく分化成熟して機能を獲得し、あるいは効率的・効果的な免疫反応を起こすことができる。さらにこれに引き続くリンパ球の選択や記憶細胞への分化も、微小環境によって、きめ細かくしかも実に巧みに制御されており、その調節機構を明らかにすることは、免疫系の機能発現を理解する上で重要かつ不可欠な課題である。さらに、クラススイッチ組換えの標的制御や免疫記憶獲得機構の解明はIgEやIgAの特異的産生抑制あるいは増強を可能にし、アレルギー疾患克服や特定免疫の増強による疾患予防への新たな展開が期待できるものであり、国内外の研究者が競ってこれを明らかにしようとして試みている重要な課題であるが具体的成果をあげているもの、ことに微小環境の構築を視野に入れているものは未だ稀であった。

2. 研究の目的

(1) 免疫反応が効率よく的確に進行するためには、多種類の細胞がリンパ節の胚中心などの特異的な構造を構築し、この構造に由来する微小環境からの信号によって個々の細胞における転写ネットワークが制御され、調和した細胞機能が発揮されることが不可欠である。本研究では、微小環境を細胞培養系で再現しつつ、これが制御する転写因子とそのネットワークを解析することによって、免疫反応を制御する分子機構を解明することを目指した。

(2) 本研究では、本研究代表者らがこれまで明らかにしてきた成果、すなわちTリンパ球の分化段階においてTCR可変部遺伝子断片領域のクロマチン構造がヒストンのアセチル化によって開かれた構造となり、その結果組換え前転写(GT)が誘導・維持されて組換えにつながることで、IgEへのクラススイッチ組換えが転写因子E2Aに強く依存しており抑制性転写因子であるId2がこのクラス特異的にGTならびに組換えを抑制すること、Pax5がAID遺伝子発現のキーとなる分子でありId2がこれを機能的に抑制すること、組換えとクロマチン構造の開放は強く関連するものの、これだけでは組換えの誘導には至らず、転写そのものが組換えに必要であり、この転写が組換え系因子の誘引に必要であることなどを基礎とし、細胞培養系とこれら転写因子などの遺伝子導入マウスや破壊マウスのリンパ球などを用いて構築された、特異的な遺伝子の組換えなどを指標とする実験系を材料とし、主に抗原刺激後の免疫反応を制御する分子機構を解析する。標的遺伝子特異的な実験系の構築はこれまでの成果によってはじめて可能になったもので、国外においても注目された成果でもあり、基本的結果の再現性も報告されている。

(3) 本研究代表者らは上記エフェクター細胞側の解析に加え、リンパ節T細胞領域のストローマ細胞株樹立や自己免疫炎症時の微小環境の分子細胞生物学的解明などの場の解析においても成果も得ている。本研究はこれらをもとにして、微小環境を細胞培養系で再現し、これが制御する転写因子ネットワークを解析することによって、免疫反応を制御する分子機構を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) Bリンパ球の最終分化・活性化における転写ネットワークの解析を行いつつ、リンパ節ストローマ細胞株の樹立によるリンパ球活性化のための微小環境の再現を目指した。再現された微小環境における遺伝子発現を解析するとともに、共培養系によってリンパ球活性反応を再現することで、ストローマ側とリンパ球側の双方における、相互作用とその間における転写ネットワーク制御機構を解明する。これらの結果を総合して免疫反応の制御の分子基盤を明らかにしようと試みた。

(2) 細胞培養系において、転写因子などの遺伝子導入マウスや破壊マウスのリンパ球などを用いて構築された、特異的な遺伝子の組換えなどを指標とする実験系を材料とし、Bリンパ球の最終分化・活性化における遺伝子変換（体細胞突然変異とクラススイッチ組換え）の必須因子であるAIDの発現制御の転写ネットワークを解析した。これまでの研究成果により、Bリンパ球分化・活性化のマスター因子であるPax5がAID遺伝子の発現に必須であるがこれだけでは特異的制御を説明できないことと、この遺伝子の制御領域と考えられる部位を明らかにしていたので、Pax5と協調して制御に関与する因子の同定を試みた。

(3) 次に、クラススイッチ組換えの標的制御に関与する転写ネットワークの解析、免疫反応を制御する微小環境を試験管内培養系で再構築する準備などを行い、Bリンパ球が抗原刺激を受けた後の免疫反応について、動員される転写ネットワークを解析しつつ、微小環境の再構築とこれによる免疫制御の再現を試みた。

(4) 免疫反応、特に抗原刺激を受けた後のBリンパ球の最終分化に関連する現象すなわち、クラス変換、体細胞突然変異導入と高親和性抗体産生細胞の選択、液性免疫記憶の獲得などを誘導できる微小環境の再現に努めつつ、リンパ球の側における転写ネットワーク制御について、クラススイッチ組換えの標的制御、体細胞突然変異導入、高親和性抗体産生細胞の選択、液性免疫記憶の獲得、のそれぞれに関与するものに切り分けつつ解析を進めた。

(5) リンパ球の側における転写ネットワーク制御について解析を進め、Id2, 3, Runx2, 3, SIP, CEBPなど免疫反応の制御への関与が予想されている転写因子をはじめとする各種遺伝子の破壊マウスのBリンパ球を上記微小環境再現系における共培養やRAG2遺伝子破壊マウスへの移植によって反応を評価し、それぞれの反応に関与する因子の同定を試みた。さらに、同定された因子に対して、これに結合し、これを制御する可能性のある因子を検索した。

4. 研究成果

(1) 正常マウスマウスの脾臓Bリンパ球をLPSと各種リンホカインの添加で刺激して、IgAへのクラススイッチ組換えを高効率に誘導することができる*in vitro*培養実験系を確立した。必要な刺激としては、April, IL-5, retinoic acidならびにTGF- β 1であり、これらが協調して働くことが重要であることを見出した。

(2) この結果から、個体内で最も多く産生されているにもかかわらず効率よい試験管内誘導が見出されていなかったIgAへのクラススイッチ組換えが、腸管という特異的微小環境に依存していること、本研究で見出された方法がその微小環境を再現できていることが強く示唆される。

(3) この試験管内誘導系とRunx転写遺伝子破壊マウスのBリンパ球を用いた実験からIgAへのクラススイッチ組換えにはRunx転写遺伝子が必須であり、同転写因子がretinoic acidならびにTGF- β 1信号の下流で機能していることが示された。

(4) April, IL-5, retinoic acidならびにTGF- β 1の添加によりIgAへのクラススイッチ組換えを高効率に誘導することができる*in vitro*培養実験系を確立した。この結果は、個体内で最も多く産生されているにもかかわらず効率よい試験管内誘導が見出されていなかったIgAへのクラススイッチ組換えが、腸管という特異的微小環境に依存していること、本研究で見出された方法がその微小環境を再現できていることを示している。

(5) 転写因子Runx3を欠損したリンパ球を持つマウスは、前腫瘍性病変である自己免疫性の炎症性腸炎を高頻度に発症することを見出した。Runx3が制御性T細胞の分化・成熟に必要であり、Runx3の欠損によって制御性T細胞の機能不全に陥るため、正常な動物では抑制されている腸炎が生ずることが判明した。

(6) 再現された免疫反応の微小環境を、そこから抽出された分子信号 (ligand 結合、液性

因子)による刺激によって代替し、上記で確定された転写ネットワークをそれぞれの免疫反応に対し特異的に誘導できるか否かについて検討することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

- ① Suto, H., Katakai, T., Sugai, M., Kinashi, T. and Shimizu, A. CXCL13 production by an established lymph node stromal cell line via lymphotoxin-beta receptor engagement involves the cooperation of multiple signaling pathways. *Int Immunol.*, 査読有, 21巻, 2009, 467-476.
- ② Onoue, M., Terada, T., Kobayashi, M., Katsura, T., Matsumoto, S., Yanagihara, K., Nishimura, T., Kanai, M., Teramukai, S., Shimizu, A., Fukushima, M. and Inui, K. UGT1A1*6 polymorphism is most predictive of severe neutropenia induced by irinotecan in Japanese cancer patients. *Intnat. J. Clin. Oncol.*, 査読有, 14巻, 2009, 136-142.
- ③ Watanabe, K., Sugai, M., Nambu, Y., Osato, M., Hayashi, T., Kawaguchi, M., Komori, T., Ito, Y. and Shimizu, A. Requirement for Runx proteins in IgA class switching acting downstream of TGF- β 1 and retinoic acid signaling. *J. Immunol.*, 査読有, 184巻, 2010, 2785-2792.
- ④ Sugai, M., Watanabe, K., Nambu, Y., Hayashi, T. and Shimizu, A. Functions of Runx in IgA class switch recombination. *J. Cell. Biochem.*, 査読有, 112巻, 2010, 409-414.
- ⑤ Tanaka, S., Maeda, S., Hashimoto, M., Fujimori, C., Ito, Y., Teradaira, S., Hirota, K., Yoshitomi, H., Katakai, T., Shimizu, A., Nomura, T., Sakaguchi, N. and Sakaguchi, S. Graded attenuation of TCR signaling elicits distinct autoimmune diseases by altering thymic T cell selection and regulatory T cell function. *J. Immunol.*, 査読有, 185巻, 2010, 2295-2305.
- ⑥ Sugai, M., Aoki, K., Osato, T., Nambu, Y., Ito, K., Taketo, M. M., Ito, Y. and Shimizu, A. Runx3 is required for full activation of regulatory T cells to prevent colitis-associated tumor formation. *J. Immunol.*, 査読有, 186巻, 2011, 6515-6520.
- ⑦ Kitawaki, T., Kadowaki, N., Fukunaga, K., Kasai, Y., Maekawa, T., Ohmori, T., Itoh, T., Shimizu, A., Kuzushima, K., Kondo, T., Ishikawa,

T. and Uchiyama, T. Cross-priming of CD8(+) T cells in vivo by dendritic cells pulsed with autologous apoptotic leukemic cells in immunotherapy for elderly patients with acute myeloid leukemia. *Exp. Hematol.*, 査読有, 39巻, 2011, 424-433.

- ⑧ Ido A, Moriuchi A, Numata M, Murayama T, Teramukai S, Marusawa H, Yamaji N, Setoyama H, Kim ID, Chiba T, Higuchi S, Yokode M, Fukushima M, Shimizu A, and Tsubouchi H. Safety and pharmacokinetics of recombinant human hepatocyte growth factor (rh-HGF) in patients with fulminant hepatitis: a phase I/II clinical trial, following preclinical studies to ensure safety. *J. Transl. Med.*, 査読有, 9巻, 2011, 55.
- ⑨ Sakata-Goto, T., Takahashi, K., Kiso, H., Huang, B., Tsukamoto, H., Takemoto, M., Hayashi, T., Sugai, M., Nakamura, T., Yokota, Y., Shimizu, A., Slavkin, H. and Bessho, K. Id2 controls chondrogenesis acting downstream of BMP signaling during maxillary morphogenesis. *Bone*, 査読有, 50巻, 2012, 69-78.
- ⑩ Nambu, Y., Hayashi, T., Jang, K.J., Aoki, K., Mano, H., Nakano, K., Osato, M., Takahashi, K., Itoh, K., Teramukai, S., Komori, T., Fujita, J., Ito, Y., Shimizu, A. and Sugai, M. *In situ* differentiation of CD8 $\alpha\alpha$ T cells from CD4 T cells in peripheral lymphoid tissues. *Scientific Reports*, 査読有, 2巻, 2012, 642.
- ⑪ Huang, B., Takahashi, K., Sakata-Goto, T., Kiso, H., Togo, Y., Saito, K., Tsukamoto, H., Sugai, M., Akira, S., Shimizu, A. and Bessho, K. Phenotypes of CCAAT/enhancer-binding protein beta deficiency: Hyperdontia and elongated coronoid process. *Oral Diseases*, 査読有, 19巻, 2013, 144-150.
- ⑫ Hara, E., Makino, A., Kurihara, K., Sugai, M., Shimizu, A., Hara, I., Ozeki, E. and Kimura, S. Evasion from accelerated blood clearance of nanocarrier named as "Lactosome" induced by excessive administration of Lactosome. *Biochem. Biophys. Acta-General Sub.*, 査読有, 1830巻, 2013, 4046-4052.
- ⑬ Morimoto, N., Yoshimura, K., Niimi, M., Ito, T., Aya, R., Fujitaka, J., Tada, H., Teramukai, S., Murayama, T., Toyooka, C., Miura, K., Takemoto, S., Kanda, N., Kawai, K., Yokode, M.,

Shimizu, A. and Suzuki, S. Novel collagen/gelatin scaffold with sustained release of basic fibroblast growth factor: clinical trial for chronic skin ulcers. *Tissue Enginer. Part A*, 査読有, 19巻, 2013, 1931-1940.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 章 (SHIMIZU, Akira)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号： 00162694