

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 7日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2012

課題番号：21390102

研究課題名（和文）自己免疫疾患関連転写制御因子の生命機能における基盤的研究

研究課題名（英文）Elucidation of functions and molecular mechanisms of immune-related transcription regulatory factors in life sciences

研究代表者

白澤 専二 (SHIRASAWA SENJI)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：10253535

研究成果の概要（和文）：自己免疫疾患関連遺伝子として同定した転写制御分子 ZFAT が Tal1 の発現を制御し、血島における造血前駆細胞の分化に必須であること、また、胎児の初期発生に必須の分子であることを明らかにした。さらに、免疫系においては ZFAT が末梢 T 細胞における恒常性の維持と TCR 刺激の応答性に重要な役割を担うことを解明した。また、T 細胞分化に必須の分子 Tespa1 の細胞内シグナルの分子機序の解明、および、MHC 領域における複数の独立したバセドウ病疾患感受性領域の解明を行った。

研究成果の概要（英文）：We have elucidated that ZFAT is indispensable for mouse embryonic development and a critical transcription factor for primitive hematopoiesis in the regulation of Tal1 in blood islands through the analysis of *Zfat*-deficient mice. In addition, using T-cell specific conditional *Zfat*-deficient mice we have reported that ZFAT is crucial for peripheral T cell homeostasis and its T cell receptor-mediated responses. Furthermore, we have demonstrated that Tespa1 is a MAM-associated molecule and critically involved in Ca<sup>2+</sup> signaling in T cells, and also identified several independent risk loci for Graves' disease within the MHC region in the Japanese population.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2012年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：自己免疫疾患、転写制御因子、ZFAT、Tespa1、バセドウ病

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らが自己免疫性甲状腺疾患 (AITD) 感受性遺伝子として同定した免疫系転写制御因子 ZFAT (zinc-finger gene in AITD susceptibility region) が、T 細胞・B 細胞に強発現すること、培養系細胞における

ZFAT の強制発現系の解析において ZFAT が免疫関連遺伝子の発現制御に関与することを明らかにしていた。それらのことより、ZFAT の機能の解明、標的遺伝子群の同定および転写制御機構の解明は自己免疫疾患の病因・病態解明、免疫システム制御機構

の新たな分子機序の理解に繋がる重要な研究課題であると考えられた。一方、ZFAT 遺伝子は魚類からヒトに至るまで非常に高度に保存された遺伝子であることから、免疫系のみならず、種々の細胞生命プログラムにおいて重要な機能を有することや、T 細胞白血病細胞株を用いた解析により、ZFAT がアポトーシス制御機構に重要な役割を担う可能性が示唆されていた。

そこで、ZFAT の免疫系における機能と細胞分化・生命プログラムにおける ZFAT の機能解明と、その機能発現における ZFAT の分子機序の解明を行う研究を考案した。解析手法としては、ZFAT 遺伝子欠損マウス、コンディショナル ZFAT 欠損マウスを用いて、発生初期および生体における免疫担当細胞等における ZFAT の機能解析、および、クロマチン免疫沈降法(ChIP)、遺伝子発現解析を中心とする手法を用いた ZFAT 分子ネットワーク解明を試みることにした。また、詳細な分子機序が不明であった胸腺内 T 細胞分化に重要な *Tespa1* の細胞内シグナル伝達機構における役割の解明、さらには、MHC 領域内における自己免疫性甲状腺疾患(バセドウ病)感受性遺伝子座位の詳細な同定を行うことにした。

## 2. 研究の目的

申請者が自己免疫疾患関連遺伝子として同定した転写制御因子である ZFAT(zinc-finger gene in AITD susceptibility region)を解析対象分子として、細胞および遺伝子改変マウスを利用した細胞・個体レベルでの分子細胞生物学的・組織学的解析から ZFAT 分子の機能の解明と標的遺伝子の同定・ZFAT 分子ネットワークの解明、さらに、T 細胞分化に必須の免疫関連分子 *Tespa1* の細胞内シグナルにおける分子機序の解明等による細胞・生命プログラムの基盤的研究を行い、免疫関連疾患の病因・病態の解明と高次生命科学研究の発展に資することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) マウス発生初期における ZFAT の機能解析とその転写制御ネットワーク解析

ZFAT ゲノムの exon 8 を欠損した ZFAT 欠損マウス(B57BL/6 系統)を樹立し、発生初期の胎児および卵黄嚢の組織学的・病理学的解析を行った。造血前駆細胞の分化に必須の転写因子群(TAL1, LMO2, GATA1)の mRNA 発現量は、胎生 7.5 の卵黄嚢から total RNA を抽出し、逆転写反応後、定量 PCR にて解析し、その蛋白質発現は免疫組織学的染色により行った。ZFAT のゲノム結合領域と候補遺伝子の転写制御については、ZFAT 相互作用候補領域を 1 kbp DNA プローブおよび、さらに分割した 200 bp DNA プローブを用いて、HEK293 細胞におけるレポーターアッセイを実施するとともに、胎生 7.5 の卵黄嚢における抗 ZFAT 抗体を用いて ChIP により得られた沈降ゲノム DNA を定量 PCR にて解析した。

(2) ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)およびマウス胎児線維芽細胞(MEF)における ZFAT の機能解析

ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)の ZFAT 抑制時における機能を検討するため、レンチウイルスによる ZFAT-siRNA およびコントロール siRNA を導入後、マトリゲルを用いた 3 次元培養により血管内皮細胞の管腔形成での異常を検討した。マウス胎児線維芽細胞(MEF)では、ZFAT siRNA およびコントロール siRNA をリポフェクション法により導入後、細胞増殖活性と Caspase 3 活性を測定した。

(3) 免疫担当細胞 T 細胞における ZFAT の機能解析

ZFAT の exon 8 の両端に loxP 配列を挿入した *Zfat*<sup>lox/lox</sup> (*Zfat*<sup>ff</sup>)マウスを樹立し、*Cd4-Cre* マウスと交配することで、Cre/loxP システムを用いた T 細胞特異的な ZFAT コンディショナル欠損マウス(*Zfat*<sup>ff</sup>-*Cd4Cre* マウス)を樹立した。FACS 解析により、末梢 T 細胞の数等について検討した。また、IL-7/IL-7R $\alpha$ シグナルにおける IL-7 の応答性について、IL-7 を添加し、*in vitro* 培養後の生細胞数および Bcl-2

の発現量を FACS 解析により検討した。さらに、Naive CD4 陽性 T 細胞の *in vitro* TCR 刺激については、抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体により刺激後、FACS 解析にて IL-2R $\alpha$  発現を検討し、IL-2 分泌量は ELISA にて測定した。

(4) 免疫担当細胞 T 細胞および B 細胞における *Tespa1* の IP<sub>3</sub>R との相互作用とその機能解析

*Tespa1* に対するポリクロナール抗体の樹立を行った。胸腺、脾臓 CD4 陽性 T 細胞および脾臓 B 細胞において、抗 *Tespa1* 抗体による免疫沈降後、ウェスタンブロット解析にて IP<sub>3</sub>R1 および IP<sub>3</sub>R3 とタンパク質相互作用が示されるか検討した。さらに、*Tespa1* と IP<sub>3</sub>R の相互作用領域について、それぞれの相互作用候補領域の各種変異体タンパク質を作製し、細胞株での強制発現系においてタンパク質相互作用を検討し、相互作用領域の同定を試みた。また、抗 CD3 抗体等による刺激時においてカルシウムチャネル拮抗剤等を用いることで、*Tespa1* のリン酸化修飾等を検討した。Jurkat 細胞等における *Tespa1* の局在は免疫染色にて解析し、エレクトロポレーションによる *Tespa1* siRNA の導入により、Rhod-2 および Flou4 を用いた FACS 解析にて Ca<sup>2+</sup> の流量を検討した。

(5) MHC 領域内における自己免疫性甲状腺疾患(AITD)感受性遺伝子座位の検討

日本人 GD(Graves' disease;バセドウ病)症候群 1119 例・コントロール 2718 例を対象とし、二段階ゲノムワイド関連解析(GWAS)を実施した(Perlegen array 法、Invader multiplex assay 法)。replication study では、独立に収集した GD 432 例・コントロール 1157 例を対象とした(TaqMan assay 法)。各 SNP (single nucleotide polymorphism)の独立性についてはロジスティック回帰分析により検討した。

#### 4. 研究成果

(1) マウス発生初期における ZFAT の機能解析とその転写制御ネットワーク解析

ZFAT の機能解明と ZFAT を中心とした転写ネットワークの解明を目的として、ZFAT

欠損マウスを樹立し、その表現型解析と分子レベルでの解析を行った。その結果、ZFAT 欠損マウスは発生初期(E8.5)に胎生致死となること、卵黄囊血管の発達異常が確認され、ZFAT が正常なマウス発生過程に必須の遺伝子であることが示唆された(図1)。

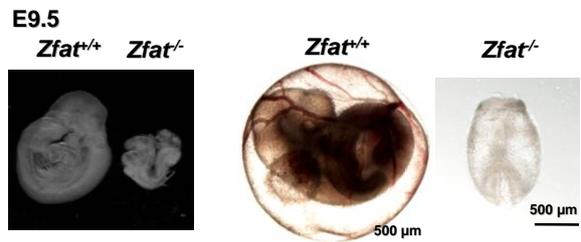


図1: Zfat欠損マウスと野生型マウス(胎生9.5)

さらに、卵黄囊血島における詳細な病理組織学的解析を進めた結果、ZFAT 欠損マウスでは、卵黄囊の血島および造血前駆細胞の数の減少、造血系細胞の分化異常が明らかとなった(図2)。

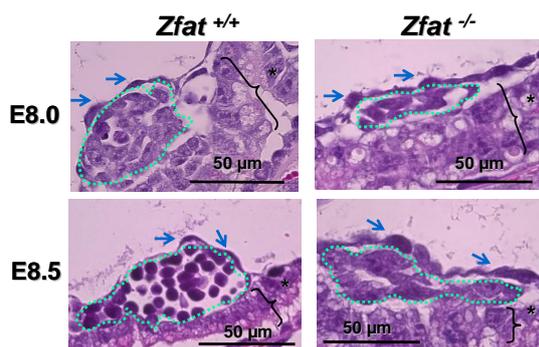


図2: Zfat欠損マウスと野生型マウスの卵黄囊におけるHE染色(胎生8.0および8.5)

ZFAT 欠損マウスでは造血前駆細胞の分化に必須の転写因子群(TAL1, LMO2, GATA1)の mRNA 発現量の抑制、および、免疫組織学的解析により、それらの蛋白質レベルでの発現も抑制されていることを明らかにした。さらに ChIP-PCR およびレポーター解析の結果、ZFAT がそれらの転写因子群(TAL1, LMO2, GATA1)を転写制御していることが示され、ZFAT 欠損がもたらす発生学的異常およびその分子機序に関する ZFAT 転写制御機構の一端を明らかとした(Tsunoda T et al, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010)。

(2) ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)およびマウス胎児線維芽細胞(MEF)における ZFAT の機能解析

ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)における血管内皮細胞の管腔形成実験系での ZFAT の機能解析を行った結果、ZFAT 発現抑制時では血管内皮細胞の管腔形成が阻害されることが明らかとなった(Yoshida Y et al, *Cell Mol Biol Lett*, 2010)。さらに、ZFAT が発現しているマウス胎児線維芽細胞 (MEF) において siRNA による ZFAT 発現抑制時の ZFAT 機能解析を進めた結果、アポトーシス制御分子としての機能が示唆された(Doi K et al, *Cell Mol Biol Lett*, 2011)。

(3) 免疫担当細胞 T 細胞における ZFAT の機能解析

免疫担当細胞 T 細胞の ZFAT の機能解析を目的として、Cre/loxP システムを用いた T 細胞特異的な ZFAT コンディショナル欠損マウスの樹立を試みた。ZFAT の exon 8 の両端に loxP 配列を挿入した *Zfat<sup>lox/lox</sup>* (*Zfat<sup>fl/fl</sup>*)マウスを樹立し、*Cd4-Cre* マウスと交配することで、*Zfat<sup>fl/fl</sup>-Cd4Cre* マウスを樹立した。*Zfat<sup>fl/fl</sup>-Cd4Cre* マウスでは、末梢 CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞の細胞数が著しく減少した (図 3)。

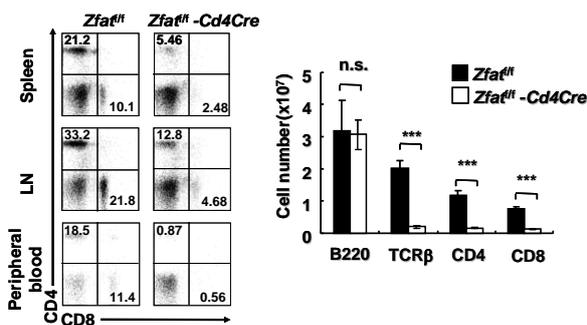


図3: Zfatコンディショナル欠損マウスとコントロールマウスの末梢T細胞数と割合

また、*Zfat<sup>fl/fl</sup>-Cd4Cre* マウスの Naive CD4 陽性 T 細胞では、T 細胞の生存維持に重要である IL-7R $\alpha$ の細胞表面の発現および mRNA の発現の低下が認められた。さらに、T 細胞の生存維持シグナルとして IL-7/IL-7R $\alpha$ シグナルにおける IL-7 の応答性を検討した。IL-7 を添加した *in vitro* 培養系において *Zfat<sup>fl/fl</sup>-Cd4Cre*

マウスの Naive CD4 陽性 T 細胞の生細胞の割合はコントロールマウスに比べ、有意に減少しており、IL-7 の応答性の低下も示唆された。また、IL-7 添加 24 時間後の *in vitro* 培養系における *Zfat<sup>fl/fl</sup>-Cd4Cre* マウスの Naive CD4 陽性 T 細胞の Bcl-2 の発現は、コントロールマウスに比べ低下していることが示され、Bcl-2 の発現低下を伴う IL-7/IL-7R $\alpha$ シグナルの減弱が示唆された。

一方、*Zfat<sup>fl/fl</sup>-Cd4Cre* マウスの Naive CD4 陽性 T 細胞の *in vitro* TCR 刺激時では細胞増殖阻害およびアポトーシス細胞の増加が示され、IL-2R $\alpha$ の発現上昇が阻害されることが明らかとなった。*Zfat<sup>fl/fl</sup>-Cd4Cre* マウスの Naive CD4 陽性 T 細胞の *in vitro* TCR 刺激による IL-2 分泌量は著しく低下していることが明らかとなり、*in vitro* TCR 刺激により、IL-2 および IL-2R $\alpha$ の発現低下が示された。これらの T 細胞特異的な ZFAT コンディショナル欠損マウスの表現型解析から、ZFAT は IL-7R $\alpha$ および IL-2R $\alpha$ の発現制御を介した末梢 T 細胞の恒常性および TCR 刺激の応答性において必須な役割を担うことが明らかとなった(Doi K et al, *Biochem Biophys Res Commun*, 2012)。

(4) 免疫担当細胞 T 細胞および B 細胞における *Tespa1* の IP<sub>3</sub>R との相互作用とその機能解析

胸腺におけるポジティブセレクションに関連した T 細胞分化に重要とされる *Tespa1* の会合分子として IP<sub>3</sub>R1 および IP<sub>3</sub>R3 を同定した。*Tespa1* は胸腺、脾臓 CD4 陽性 T 細胞および脾臓 B 細胞において、IP<sub>3</sub>R1 および IP<sub>3</sub>R3 とタンパク質相互作用が示された (図 4)。

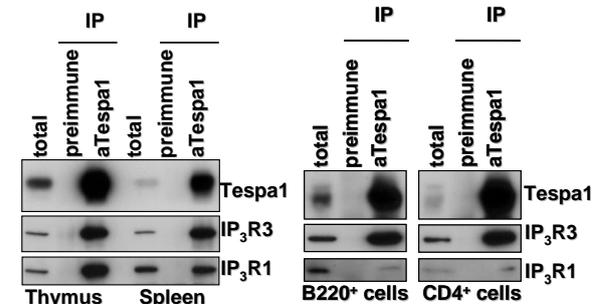


図4: 胸腺および脾臓(CD4陽性T細胞、B細胞)Tespa1とIP<sub>3</sub>R1およびIP<sub>3</sub>R3とのタンパク質相互作用

さらに、Tespa1 と IP<sub>3</sub>R の相互作用領域について、それぞれの相互作用候補領域の各種変異体タンパク質を作製し、相互作用領域を同定した(Matsuzaki H et al, *FEBS Open Bio*, 2013)。

また、Tespa1 は、マウス胸腺細胞および白血病株化細胞 Jurkat 細胞において TCR 刺激により小胞体ストアの Ca<sup>2+</sup>レベルの減弱が引き金となって誘導されるストア作動性カルシウム流入(store-operated calcium entry : SOCE)機構を介してリン酸化修飾を受けることが明らかとなった。(Fujimoto T et al, *Biochem Biophys Res Commun*, 2013)。

Tespa1 は、ミトコンドリアの近位での局在が認められ、siRNA による Tespa1 発現抑制時ではミトコンドリアおよび細胞質 Ca<sup>2+</sup>の流量が減少した。さらに、MAM (mitochondria-associated ER membranes)を介したミトコンドリア Ca<sup>2+</sup>取り込みの関連分子である GRP75 と Tespa1 のタンパク質相互作用が示され、Tespa1 は、IP<sub>3</sub>R との会合による小胞体 Ca<sup>2+</sup>流出および GRP75 との会合による MAM を介したミトコンドリア Ca<sup>2+</sup>取り込みにおいて重要な生理的役割を有することを明らかにした。(Matsuzaki H et al, *Biochem Biophys Res Commun*, 2013)。

(5) MHC 領域内における自己免疫性甲状腺疾患(AITD)感受性遺伝子座位の検討

日本人集団におけるバセドウ病を対象とした二段階ゲノムワイド関連解析(GWAS)を実施し、一次解析および二次解析の結果、34 個の SNP (有意水準  $P < 2 \times 10^{-7}$ ) を同定した。これらの SNP について replication study を実施したところ、22 個の SNP について GD との相関が再現された。これらの GD 関連 SNP は全て MHC 領域に位置していた。ロジスティック回帰解析により独立した7個の SNP が同定された (Nakabayashi K et al, *J Hum Genet*, 2011)。

本研究において、自己免疫疾患関連遺伝子として同定した転写制御分子 ZFAT が、末梢 T 細胞における恒常性の維持と TCR 刺激の応答性に重要な役割を担うことを明らかとし

た。また、ZFAT が欧米人における多発性硬化症におけるインターフェロンβに対する応答性を規定している報告もある。これらのことより、ZFAT の分子機序の解明は自己免疫疾患の病因・病態解明と免疫システムにおける新たな分子ネットワークの解明に繋がることが強く期待される。さらに、ZFAT が初期発生において必須の役割を担うこと、卵黄嚢血島における hemangioblast の分化に必須の転写制御分子 Tall を直接に転写制御すること、および、血管内皮細胞の分化に関与する可能性は、当初予想したように、ZFAT が免疫系のみならず、種々の細胞生命プログラムにおいて重要な役割を担うことを強く示唆しているものと考えられる。一方、免疫関連分子 Tespa1 の免疫担当細胞における細胞内カルシウムイオンシグナリングにおける分子機序の解明は、免疫担当細胞の機能制御において重要な知見を与えると予想される。今後の更なる ZFAT 機能解明は、免疫系のみならず、血球系細胞、血管内皮細胞の分化・機能や発生プログラムを含む種々の細胞生命プログラムにおいて、新たな重要な知見の産出に繋がることが強く期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Matsuzaki H, Fujimoto T, Tanaka M, Shirasawa S. Tespa1 is a novel component of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes and affects mitochondrial calcium flux. *Biochem Biophys Res Commun*, 433(3):322-326, 2013, 査読有, DOI:10.1016/j.bbrc.2013.02.099
- ② Fujimoto T, Matsuzaki H, Tanaka M, Shirasawa S. Tespa1 protein is phosphorylated in response to store-operated calcium entry. *Biochem Biophys Res Commun*, 434(1):162-165, 2013, 査読有, DOI:10.1016/j.bbrc.2013.02.128
- ③ Matsuzaki H, Shirasawa S, et al. (他 7 名 9 番目) Tespa1 is a novel IP3R-binding protein in T- and B-lymphocytes. *FEBS Open Bio*, 2:255-259, 2012, 査読有, DOI:10.1016/j.fob.2012.08.005
- ④ Doi K, Shirasawa S, et al. (他 11 名 13 番目)

ZFAT plays critical roles in peripheral T cell homeostasis and its T cell receptor-mediated response. *Biochem Biophys Res Commun*, 425(1):107-112, 2012, 査読有,  
DOI:10.1016/j.bbrc.2012.07.065

- ⑤ Nakabayashi K, Shirasawa S. et al. (他 16 名 18 番目) Identification of independent risk loci for Graves' disease within the MHC in the Japanese population. *J Hum Genet*, 56(11): 772-778, 2011, 査読有,  
DOI:10.1038/jhg.2011.99
- ⑥ Doi K, Shirasawa S. et al. (他 8 名 10 番目) ZFAT is a critical molecule for cell survival in mouse embryonic fibroblasts. *Cell Mol Biol Lett*, 16(1):89-100, 2011, 査読有,  
DOI:10.1158/0008-5472.CAN-10-0714
- ⑦ Tsunoda T, Shirasawa S. et al. (他 10 名 12 番目) Immune-related zinc finger gene ZFAT is an essential transcriptional regulator for hematopoietic differentiation in blood islands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107(32):14199-14204, 2010, 査読有,  
DOI:10.1073/pnas.1002494107
- ⑧ Yoshida Y, Shirasawa S. et al. (他 7 名 9 番目) ZFAT is essential for endothelial cell assembly and the branch point formation of capillary-like structures in an angiogenesis model. *Cell Mol Biol Lett*, 15(4):541-550, 2010, 査読有,  
DOI:10.2478/s11658-010-0028-y

[学会発表] (計 9 件)

- ① 角田俊之, 土井佳子, 黒木政秀, 白澤専二 「ZFAT は末梢 T 細胞の恒常性と T 細胞レセプター刺激に対する増殖応答性に関与する」第 16 回バイオ治療法研究会学術集会, 東京, 12 月 8 日, 2012
- ② 土井佳子, 白澤専二(他 5 名 7 番目)「遺伝子改変マウスを利用した転写制御分子 ZFAT の機能解明」日本人類遺伝学会第 57 回大会, 東京, 10 月 25 日, 2012
- ③ 藤本崇宏, 白澤専二「癌・代謝関連遺伝子 KRAP の細胞内カルシウムイオン制御機構に関する研究」日本人類遺伝学会第 57 回大会, 東京, 10 月 25 日, 2012
- ④ 白澤専二「KRAP・ZFAT を対象とした生命科学における基盤研究と創薬シーズの探索」第 39 回薬物活性シンポジウム (特別講演), 福岡, 11 月 21 日, 2011

- ⑤ 白澤専二「生命科学と創薬開発のための基礎研究」第 14 回バイオ治療法研究会学術集会 (特別講演), 福岡, 12 月 11 日, 2010
- ⑥ 土井佳子, 白澤専二(他 7 名 9 番目)「遺伝子欠損マウスを利用した新規転写制御因子 ZFAT の機能解明」日本人類遺伝学会第 55 回大会, 埼玉, 10 月 30 日, 2010
- ⑦ 高島康郎, 白澤専二(他 6 名 8 番目)「ZFAT is an antiapoptotic molecule and critical for cell survival in MOLT-4 cells.」第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 11 日, 2009
- ⑧ 白澤専二, 中林一彦「自己免疫性甲状腺疾患ゲノム解析の現状と転写関連分子 ZFAT」第 37 回日本臨床免疫学会総会 (シンポジウム), 東京, 11 月 13 日, 2009
- ⑨ 土井佳子, 白澤専二(他 8 名 10 番目)「転写制御因子 ZFAT の機能および転写ネットワークに関する研究」日本人類遺伝学会第 54 回大会, 東京, 9 月 26 日, 2009

[図書] (計 4 件)

- ① 中林一彦, 白澤専二. 自己免疫性甲状腺疾患ゲノム解析の現状と転写関連分子 ZFAT. 「日本臨床免疫学会会誌」(小宮山印刷工業株式会社) 33(2):66-72, 2010
- ② 中林一彦, 白澤専二. 自己免疫性甲状腺疾患—感受性遺伝子群の探索と機能解析. 「医学のあゆみ」(医歯薬出版株式会社) 230(9):599-603, 2009
- ③ 中林一彦, 白澤専二. 自己免疫性甲状腺疾患の遺伝要因と環境要因. 「よくわかる甲状腺疾患のすべて 改訂第 2 版」(伴 良雄編, 永井書店) 363-367, 2009
- ④ 中林一彦, 田嶋敦, 白澤専二. 疾患ゲノム解析の現状と展望. 「日本臨床」(日本臨床社) 67(3):469-476, 2009

[その他]

ホームページ

<http://www.med.fukuoka-u.ac.jp/cellbio/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白澤 専二 (SHIRASAWA SENJI)  
福岡大学・医学部・教授  
研究者番号: 10253535

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし