

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 6 月 15 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590348

研究課題名（和文） 制御性 T 細胞における Runx 転写因子の標的遺伝子探索

研究課題名（英文） Identification of Runx transcriptional factors target genes in regulatory T cell.

研究代表者

直江 吉則 (NAOE YOSHINORI)

国立長寿医療研究センター研究所老化機構研究部免疫研究室・室長

研究者番号：50392048

研究成果の概要（和文）：

Runx 転写因子の制御性 T 細胞における役割の解明と Runx 転写因子の標的遺伝子探索を目的に研究を行った。制御性 T 細胞特異的な Runx 転写因子の機能不全により胃炎を始めとする自己免疫の発症と Foxp3 転写因子の発現低下が見られた。これらの結果は Runx 転写因子が Treg 細胞の機能に重要な役割を果たしていることを示す。そこで、Runx 転写因子が発現を制御する標的遺伝子探索を行い、Runx 転写因子が *Foxp3*、*IL-4* ならびに *IL-10* 遺伝子座に結合することを見出した。制御性 T 細胞における Runx 転写因子の機能解明は、新たな治療方法ならびに治療薬の開発に繋がる研究成果と言える。

研究成果の概要（英文）：

The aims of this research are to understand that the function of Runx transcriptional factors and the identification of target genes of Runx transcriptional factors during regulatory T cell (Treg) development. Treg cell-specific deficiency of Cbf β , a cofactor for all Runx proteins, or that of Runx1, but not Runx3, induced lymphoproliferation, autoimmune disease, and hyperproduction of IgE. As Cbf β -deleted Treg cells exhibited impaired suppressive function in vitro and in vivo, Runx transcriptional factors have crucial roles in Treg. We have exhibited that Runx complex regulated Foxp3, IL-4 and IL-10 expression and have identified the expression of several genes were directly regulated Runx transcriptional factors in Treg.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：免疫学、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景
喘息、花粉症、アレルギー鼻炎、アトピー

性皮膚炎等のアレルギー疾患ならびに潰瘍性大腸炎、クローン病等の炎症性腸疾患の羅

患者数は上昇しており、これら免疫系の制御の破綻を原因とする疾患が国民の健康を脅かしている。これら疾患に対する治療は未だにステロイド等の非特異的な免疫抑制療法が主流であり、疾患の病態解明に基づく根治療法の開発は医学・免疫学の重要な課題である。その為には、これら疾患の分子病理を解明し、創薬の分子標的を同定することが再重要課題である。

免疫応答とは多様な細胞集団の反応の結果であり、恒常性を保つ制御バランスが重要である。免疫系の制御に重要な役割を果たす細胞として、近年注目されている細胞が制御性T細胞(以下Treg細胞)である。Treg細胞は炎症や腫瘍免疫、感染免疫などにおいて広く免疫反応を抑制する機能を持ち、Treg細胞の機能・分化異常がヒト及びマウスで自己免疫疾患、炎症性疾患およびアレルギーを発症することが知られている。したがって、Treg細胞の分化過程を知り、またその免疫抑制メカニズムを解明することは免疫系の制御機構の解明及び新たな治療法の開発に直結する重要な課題である。ヒトのIPEX(X染色体連鎖免疫調節異常)の原因遺伝子として同定されたFoxp3遺伝子は、その後の研究によりTreg細胞の分化・機能に必須であることが判明し、Foxp3転写因子がTreg細胞のマスター転写因子であると提唱されている。したがって、Foxp3遺伝子の発現制御機構を解明し、Foxp3の標的遺伝子を同定することは、Treg細胞の分化と免疫抑制機能の解明に直結する重要な研究課題である。これまでFoxp3遺伝子の発現誘導にはTGFβシグナルが重要であることが知られているが、詳細な遺伝子発現機構は明らかではない。またFoxp3が多数のTreg細胞選択的遺伝子の転写調節領域に結合し直接その発現を誘導あるいは抑制することが報告されているが、Treg細胞の免疫抑制機能を解明するには至っていない。

2. 研究の目的

Runxファミリーはαサブユニットおよびβサブユニットで2量体を形成する転写因子であり細胞の発生・分化過程において極めて重要かつ多様な役割を持つと考えられている。哺乳類ではRunx1、Runx2およびRunx3のαユニットとCBFβのβユニットが知られている。興味深いことに、京都大学の坂口らはFoxp3転写因子の機能発現にはRunx1との会合が重要であることを報告した(Nature, 2007; 446: 685-9)。この結果は、Runx転写因子はTreg細胞の機能に重要な役割を果たしていることを示すが、その機序について更なる解析が必要である。例えば、Runx転写因子がTGFβシグナルの下流で直接Foxp3の発現制御に関与するのか? Runx転写因子欠損による制御Treg細胞の機能異常はFoxp3発現低下

によるものか、Foxp3以外にもTreg細胞の機能に重要なRunx標的遺伝子があるのか明らかにする必要がある。この為には、Treg細胞におけるRunx転写因子の標的遺伝子を同定することが非常に最重要課題である。

我々はクロマチン免疫沈降法(Chromatin immunoprecipitation; ChIP)によりRunx転写因子がIL-4サイレンサーに結合することでTh1細胞でのIL-4発現抑制に重要であることを発見した(J Exp Med, 2007; 204: 1749-1755)。さらにChIP法をタイリングアレイと組み合わせたChIP on chip法によりRunx結合部位の網羅的な検索を可能にする実験系の立ち上げに成功し、ヘルパーT細胞分化におけるマスター遺伝子であるTh-POK遺伝子座内に新規サイレンサー領域を同定した(Science, 2008; 319: 822-5)。さらにChIP on chip法をTh-POK標的遺伝子の探索に応用し、Th-POKがCD4サイレンサーならびにTh-POKサイレンサーに結合することを同定する(Nat Immunol, 2008; 9: 1113-21)などを明らかにしてきた。そこで同様の手法を用いTreg細胞におけるRunx転写因子の標的遺伝子を同定することはTreg細胞の機能を理解する上で非常に重要で意義のある課題であると考え研究を行った。

3. 研究の方法

(1) マイクロアレイを用いたTreg細胞の遺伝子発現プロファイル測定

Runx転写因子を発現しているTreg細胞とRunx転写因子を発現していないTreg細胞間の遺伝子発現をマイクロアレイ法により網羅的に調べた。Treg細胞特異的Runx転写因子欠損マウスはCbfβ^{f/f}マウスにTreg細胞特異的にCre遺伝子を発現するFoxp3-IRES-Cre(FIC)マウスを交配して作成した。

それらマウスからTreg細胞(CD4⁺CD25⁺)をMACSにより調整し、RNeasy Micro Kit(QIAGEN)を用いてRNAを抽出した。RNAをラベルしAffymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0 arraysを用いて遺伝子発現を調べた。データはGenespring (Agilent)を用いて解析した。

(2) ChIP on Chip法によるRunx転写因子結合領域の探索

10% Formaldehyde液で固定したTreg細胞を超音波により細断化し、lysis bufferを用いて可溶化した。Anti-Cbfβ抗体を用いて免疫沈降を行い、得られたDNAを精製し、LM-PCR法で増幅した。Tiling arrayは転写開始ならびに終了点からそれぞれ6.0kbp上流および下流をカバーし、200bpごとにプローブを配置するようにeArray (Agilent)を用いて設計した。ハイブリ、洗浄ならびにスキャンは

manufactures' protocol (Agilent)に従い行った。データはAgilent's feature extractionならびにChIP Analytics software (Agilent)を用いて解析した。

4. 研究成果

Treg 細胞特異的に Runx 転写因子を欠損するマウスは胃炎を発症することから、Treg 細胞において Runx 転写因子は重要な役割を果たしていると考えられるが、Foxp3 転写因子と Runx 転写因子が会合することのみが報告されている。そこで、Treg 細胞と Runx 転写因子欠損 Treg 細胞における遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイにより調べた。その結果、Runx 転写因子欠損により、75 個の遺伝子発現上昇、ならびに 29 個の遺伝子発現抑制が見られた。

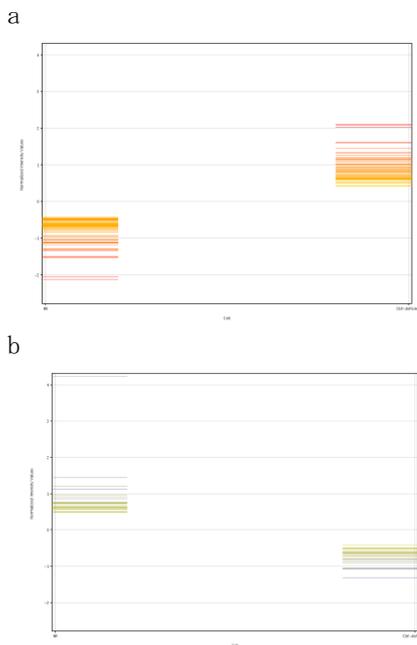


図 1. Treg 細胞における Runx 転写因子欠損により遺伝子発現が上昇する遺伝子 (a) および減少する遺伝子 (b)

Runx 転写因子欠損により発現が上昇する遺伝子の GO 解析を行ったところ、regulation of inflammatory response、negative regulation of chronic inflammatory response、regulation of response to external stimulus ならびに cytokine receptor activity、発現が減少する遺伝子では guanylate cyclase activity、cyclase activity、negative regulation of humoral immune response および coreceptor activity に関与した機能の遺伝子が候補遺伝子として挙げられた。

Foxp3 は Treg 細胞分化のマスター遺伝子として知られている。Foxp3 の発現に Runx 転写因子が関与しているか調べるため、Treg 細胞

ならびに Runx 転写因子欠損 Treg 細胞から RNA を抽出し、cDNA を合成しリアルタイム PCR 法で Foxp3 の発現量を調べたところ、Runx 転写因子欠損 Treg 細胞の Foxp3 の発現量は Treg 細胞のそれと比べて明らかに低下していた (図 2)。

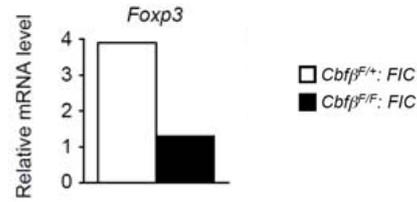
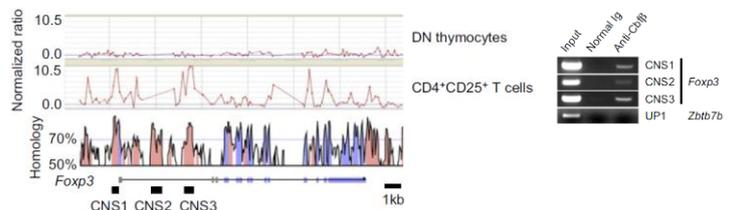


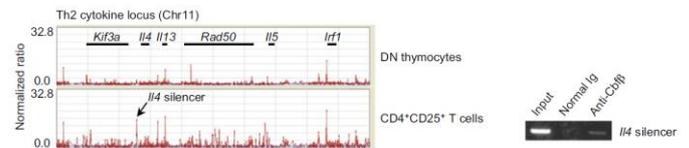
図 2. Runx 転写因子欠損 Treg 細胞では Foxp3 の発現が低下する

Treg 細胞において Runx 転写因子が欠損すると、Foxp3 をはじめ多くの遺伝子の発現が変化することが明らかになった。そこで Foxp3、IL-4 ならびに IL-10 の遺伝子座に Runx 転写因子が直接結合するか Runx 転写因子のβユニットの CBFβ に対する抗体を用いて ChIP on Chip 法および ChIP-PCR 法にて調べた (図 3)。その結果、Runx 転写因子は Foxp3 遺伝子座において CNS1、2 および 3 領域、IL-4 遺伝子座において IL-4 silencer ならびに IL-10 遺伝子座のプロモーター領域に結合することが明らかになった。

Foxp3



IL-4



IL-10



図 3. Runx 転写因子は Foxp3、IL-4 ならびに IL-10 遺伝子座に結合する。

以上より、Treg 細胞において Runx 転写因子は Foxp3、IL-4 ならびに IL-10 等の多くの遺伝子発現を直接制御して、Treg 細胞の機能発揮に関与していることを明らかにした。

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 4 件)

- ① Naito T, Tanaka H, Naoe Y and Taniuchi I. Transcriptional control of T-cell development, International Immunology, 査読無、23 巻、2011、661-668、
- ② Sakaguchi S, Hombauer M, Bilic I, Naoe Y, Schebesta A, Taniuchi I and Ellmeier W, The zinc finger protein MAZR is part of the transcription factor network controlling CD4/CD8 cell fate decision of DP thymocytes, Nat Immunol, 査読有、11 巻、2010、442-8、
- ③ Bruno L, Mazzarella L, Hoogenkamp M, Hertweck A, Cobb BS, Sauer S, Hadjur S, Leleu M, Naoe Y, Telfer J, Bonifer C, Taniuchi I, Fisher AG and Merkenschlager M, Runx proteins regulate FoxP3 expression, J Exp Med, 査読有、206 巻、2009、2329-37、
- ④ Kitoh A, Ono M, Naoe Y, Ohkura N, Yamaguchi T, Yaguchi H, Kitabayashi I, Tsukada T, Nomura T, Miyamachi Y, Taniuchi I and Sakaguchi S, Indispensable role of Runx1/Cbfb complex for in vivo suppressive function for FoxP3⁺ regulatory T cells, Immunity, 査読有、16 巻、2009、1-12、

[学会発表] (計 9 件)

- ① Naoe Y, Functional analysis of an age-related novel GEF, Zizimin2/Dock11 in immunosenescence, Ninth Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology and Geriatrics, 2011 年 10 月 25 日、Melbourne, Australia、
- ② 直江吉則、老化関連因子 Zizimin2/Dock11 の獲得免疫系における機能解析、第 34 回日本基礎老化学会年会、2011 年 6 月 17 日、東京、
- ③ 直江吉則、ヘルパー T 細胞分化過程における特異的な選択的スプライシングの検出、第 21 回 Kyoto T Cell Conference、2011 年 6 月 11 日、京都、
- ④ 直江吉則、加齢に伴う免疫低下メカニズムの解析、第 11 回日本抗加齢医学会総会、2011 年 5 月 28 日、京都、
- ⑤ Naoe Y, The zinc finger protein MAZR is

part of the transcription factor network that regulates CD4/CD8 cell fate decision of DP thymocytes, 14th International Congress of Immunology, 2010 年 8 月 25 日、Kobe, Japan、

- ⑥ Naoe Y, Operationing with a fake ID at the border: Lineage switch of mucosal CD4T cells, 14th International Congress of Immunology, 2010 年 8 月 24 日、Kobe, Japan、
- ⑦ Naoe Y, Molecular mechanisms of functional decline in the immunosenescence, Asian Aging Core for Longevity Research and Education 2010 Jeju Conference, 2010 年 8 月 23 日、Jeju, Korea、
- ⑧ 直江吉則、免疫老化関連因子 Zizimin2/Dock11 の in vivo における機能解析、第 33 回日本基礎老化学会、2010 年 6 月 17 日、名古屋、
- ⑨ Naoe Y, Analysis of zizimin2 function in mouse dendritic cells, 第 32 回分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日、横浜、

[図書] (計 1 件)

- ① 直江吉則、朝倉書店、免疫の辞典、2012、229、230、430、

[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

http://www.ncgg.go.jp/department/dma/immunology_naoea.html

6. 研究組織
(1) 研究代表者

直江 吉則 (NAOE YOSHINORI)
国立長寿医療研究センター研究所老化機
構研究部免疫研究室・室長
研究者番号：50392048