

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31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591254

研究課題名(和文) リンパ球とマクロファージの分化を支配する転写因子NF- κ Bの免疫制御機構の解明研究課題名(英文) Elucidation of immune regulation mechanisms by NF- κ B for development of lymphocytes and macrophages.

研究代表者

土井 貴裕 (DOI TAKAHIRO)

独立行政法人理化学研究所・生体情報統合技術開発チーム・サブチームリーダー

研究者番号：60227684

研究成果の概要(和文)：

RelA および c-Rel は、造血幹細胞の発生および維持には必須ではないものの、細胞自発的な分化促進因子の制御には必須であることが明らかとなった。また、RelA および c-Rel それぞれ単独の欠損マウスでは、これらの表現型が見られないことから、RelA と c-Rel が協調的に血球分化を制御していることが明らかとなった。そして、血球分化の過程に於いて RelA と c-Rel は、分化と共に、増殖と細胞死の制御を担っていることも判明した。さらに当初の狙いを遙かに超えて、RelA と c-Rel が、リンパ球、マクロファージのみならず、赤血球系および血小板系の分化にも必須であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：

We demonstrated that RelA and c-Rel were essential for regulation of cell-autonomous differentiation factors in hematopoiesis, because stem cells of lymphocytes and macrophages lacking RelA and c-Rel do not develop even in normal hematopoietic environment. And it was demonstrated that RelA and c-Rel functioned coordinately, because mice deficient of both of them showed pancytopenia, although mice lacking each of them did not. The main role of RelA and c-Rel in development of lymphocytes and macrophages cells from apoptosis. And beyond imagination, it was also demonstrated that RelA and c-Rel played the critical roles on development, not of lymphocytes and macrophages but also of megakaryocytes and erythrocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：NF- κ B, RelA, c-Rel, Hematopoiesis, Lym,phocytes, Macrophages Maturation, Apoptosis

1. 研究開始当初の背景

マクロファージとリンパ球は、自然免疫および獲得免疫を制御する2大免疫制御細胞である。これらのいずれかが欠損しても生命体は著しい免疫不全に陥る。同一の血液幹細胞から分化することは既に絶対的自明の事実であるが、それぞれにおける分化の過程で営まれている機序についてはいまだ不明である。免疫制御機構を解明するに当たり、この2大免疫制御細胞の分化課程の機序を解明することは必須の研究である。ところが、リンパ球においては *In vitro* での分化誘導は不可能と言って差し支えない状況である。これまで、リンパ球の各発生過程にある細胞を用いた遺伝子発現解析から、それぞれの分化のステップに必要なとされる遺伝子群が示されてきた。そして、それぞれの候補遺伝子について欠損マウスを作出して行われた解析からは、部分的なリンパ球の欠損を示すのみであった。従って現在最も求められているのは、血液幹細胞がリンパ球系へと誘導されていく機序に不可欠な真の決定的因子を解明することである。一方、マクロファージは、血液幹細胞から各種の血球系を誘導する試みの中で必然的に出現してきてしまうために、マクロファージを誘導する試みが全くなされず、その分化課程で営まれている機序についても全く解明に向けた努力がなされていなかった。しかも、マクロファージはいかなる遺伝子欠損マウスにおいても欠失することのない唯一の血球系細胞であったため、解明への糸口が掴めなかったことも大きな原因の一つであった。アレルギー反応の機序解明や感染に対する防御機構の解明を含めた免疫制御機構全容の解明のためには、リンパ球とマクロファージの分化機序を解明し、両者を自在に誘導する技術を確立すること必

要であるが今最も必要である。

2. 研究の目的

免疫制御機構の研究になくてはならない細胞は、リンパ球とマクロファージである。これらについては、その分化課程の機序については分かっていないため、*In vitro* での誘導システムが確立されておらず、研究の発展を阻害している。この現状を打開するために我々は、リンパ球とマクロファージの発生を見ない遺伝子欠損マウスを駆使して、リンパ球とマクロファージの分化発生に不可欠な因子を探ることを目的とする。申請者は *RelA/c-Rel* 欠損を作出したところ、リンパ球は全く発生しないこと、マクロファージが誘導されないこと、を明らかにした。これまでに作出された遺伝子欠損マウスの中で、全くリンパ球とマクロファージの発生を見ない遺伝子欠損マウスは、この *RelA/c-Rel* 欠損マウスにおいて他にはない。このことから申請者は、*RelA/c-Rel* 欠損マウスを活用することによって、これまでに解明されなかったリンパ球ならびにマクロファージの分化発生に必須な因子群を網羅的に同定することを目指す。

3. 研究の方法

転写因子 *NF-kB* のサブユニット *RelA* と *c-Rel* を欠損したマウスは、胎生期に致死となるため、死亡直前の胎児肝臓（胎生期に造血を担っている）を放射線照射した成人マウスに移植し、骨髄再構築マウスを作成した。このマウスを用いて以下の解析を行った。

- ①骨髄および末梢リンパ系組織のプロファイリング解析
- ②造血細胞群の網羅的遺伝子発現解析
- ③ *In vitro* アッセイ系を用いた造血細胞群の

分化誘導実験

4. 研究成果

RelA、c-Rel 欠損の骨髄再構築マウスの表現型解析として、脾臓、胸腺、骨髄のプロファイリング解析を行った結果、以下のことが判明した。

- ① リンパ球 (T および B 共に) が著明に減少していること
- ② マクロファージ系の骨髄球が著明に減少していることを見出した。

移植の際の宿主マウスは正常型であるため、移植骨髄の環境は正常である。即ち、造血ニッチェは正常であるにも係わらず、成熟血球が出現しないことから、RelA/c-Rel 欠損細胞は細胞自発的な機序の欠損による分化停止が起きていると考えられた。

再構築した骨髄からの細胞を用いた *In vitro* の解析から、以下の点を明らかにした。

① *In vitro* 分化誘導 (CFC Assay) :

造血幹細胞を *In vitro* アッセイ系にて誘導した結果、全血球系のコロニーの出現が著明に減少していることを見出した。

② T lymphocytes:

支持細胞の上で誘導培養した結果、未熟Tリンパ球までの分化は見られたが、分化段階のリンパ球が圧倒的に減少していた。

③ B lymphocytes:

骨髄のFACS解析から、Pre-細胞の段階で分が止まっていることを見出した。

④ Erythroid cells :

コロニーフォーメーションアッセイにおいて、コロニー数の著明な減少が見られた。

⑤ Macrophages :

GM-CSF, M-CSFおよびIL-3による誘導では、誘導開始から4-5日目に細胞死を起こすことを見出した。

⑥ Megakaryocytes :

*In vitro*の分化誘導において、コロニー数が激減していた。

⑦ Stem cell:

細胞表面抗原の発現解析 (FACS解析) を用いた造血幹細胞の検出 (c-Kit+/Sca-1+/Lin-cells) からは、RelA/c-Rel欠損骨髄は、正常マウスとほぼ同等の造血幹細胞が出現していることを検出した。

さらに、骨髄の遺伝子解析から、Pax-5, IL-7, IL-7Rのリンパ球の分化関連遺伝子群の著明な発現低下に加えて、GATA-1/2, EpoRの造血関連遺伝子群の著明な発現低下を見出した。

以上のことから、RelAおよびc-Relは、造血幹細胞の発生および維持には必須ではないものの、細胞自発的な分化促進因子の制御には必須であることが明らかとなった。また、RelAおよびc-Relそれぞれ単独の欠損マウスでは、これらの表現型が見られないことから、RelAとc-Relが協調的に血球分化を制御していることが明らかとなった。そして、血球分化の過程に於いてRelAとc-Relは、分化と共に、増殖と細胞死の制御を担っていることも判明した。

さらに当初の狙いを遙かに超えて、RelAとc-Relが、リンパ球、マクロファージのみならず、赤血球系および血小板系の分化にも必須であることが明らかとなった。

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 7 件)

①NF- κ B inducing kinase (NIK) negatively regulates bone formation *in vivo* and *in vitro*.

E. Jimi, T. Doi, et al.

Endocrinology, 2011

(査読 有)

② Interleukin 11 links oxidative stress and compensatory proliferation.

H. Nakano, T. Doi, et al.

Science Signalin, 2011

(査読 有)

③ Processing of the NF- κ B2 precursor, p100, to p52 is critical for RANKL-induced osteoclast differentiation.

E. Jimi, T. Doi, et al.

Journal of Bone and Mineral Research, 2010

(査読 有)

④ Hepatocyte-Specific c-Flip-deficient mice uncover a causal link between ROS and STAT3 via IL-11.

H. Nakano, T. Doi, et al.

Journal of Clinical Investigation, 2010

(査読 有)

⑤ The pivotal role of the alternative NF- κ B pathway in maintenance of basal bone homeostasis and osteoclastogenesis.

E. Jimi, T. Doi, et al.

Journal of Bone and Mineral Research, 2010

(査読 有)

⑥ The NF- κ B RelA subunit confers resistance to *Leishmania major* by inducing NOS2 and Fas expression but not Th1 differentiation.

S. Mise, T. Doi, et al.

Journal of Immunology, 2009

(査読 有)

⑦ TNF α represses BMP signaling by interfering with the DNA binding of SMADS through the activation of NF- κ B.

E. Jimi, T. Doi, et al.

Journal of Biological Chemistry, 2009

(査読 有)

[学会発表] (計3件)

① 土井 貴裕、三瀬 節子 「NF- κ B/RelA subunit plays the critical roles on erythropoiesis.」第34回日本分子生物学会 平成23年12月13日(横浜市)

② 土井 貴裕、三瀬 節子

「NF- κ B/RelA positively functions on transcriptional activation of Foxp3 with TGF- β signaling.」第33回日本分子生物学

会

平成22年12月9日(神戸市)

③ 土井 貴裕、三瀬 節子 「Deficiency of NF- κ B/RelA subunit and tumor necrosis factor (TNF) both cause abnormal hematopoiesis.」第32回日本分子生物学会 平成21年12月9日(横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土井 貴裕 (DOI TAKAHIRO)

独立行政法人理化学研究所・生体情報統合技術開発チーム・サブチームリーダー

研究者番号：60227684

(2) 研究分担者

三瀬 節子 (MISE SETSUKO)

独立行政法人理化学研究所・生体情報統合技術開発チーム・開発研究員

研究者番号：00269052

(3) 連携研究者

なし