

令和 6 年 9 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02879

研究課題名(和文) IKZF転写因子の生理的構造差異による機能分担と変異による転写調節変調機構の解明

研究課題名(英文) Research on the functional assignment of the IKZF transcription factor by structural difference and on the modulation of transcriptional regulation by mutations in the IKZF1 molecule

研究代表者

森尾 友宏 (Morio, Tomohiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30239628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：IKZF転写因子のホモ/ヘテロダイマーの機能的差異検証のため、split GFP/AirID系の導入検討を行った。またIkzf3 G159R, N160S, Ikzf1 N159Sなど様々なマウスを作成し、骨髄や二次リンパ組織で免疫細胞解析や発現調節機構解析を行った。G159R, N160Sは異なる機能異常を有することやIkzf3 N160SはIkzf1の機能阻害、homing阻害が病態の一部を担うことを示した。マウスから経時的に細胞、核酸の取得を行い、変異蓄積、転写因子アクセシビリティなどの解析が行える準備が整った。国際共同研究から、新規IKZF3変異を同定し、変異分子の機能解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

まず今まで明らかでなかった先天性免疫異常症の責任遺伝子、遺伝子変異が明らかになり、疾患の理解に繋がった。国際共同研究からIKZF3以外の分子の異常も判明した。また、IKZFファミリータンパクの異常による易感染性、自己免疫疾患、悪性腫瘍発症の分子機能を知ることが、これらの疾患の一般的な分子病態の解明や、治療法の開発に繋がると期待される。さらに、ホモダイマー、ヘテロダイマーを形成する転写因子の機能的差異が明らかになれば、発生や分化、腫瘍発生等の分子機能がより明確になり、生体内における分子間相互作用や、複雑な転写制御の理解の一助になると予想される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we introduced the split GFP and split AirID systems to clarify the functional differences between homo- and hetero-dimers and found that these systems work in adherent cells. We also generated Ikzf3 G159R, N160S, Ikzf1 N159S mice, and etc., and performed detailed phenotyping in bone marrow, and secondary lymphoid tissues. We also examined in detail the differential dysregulation of expression caused by each mutation. We found that Ikzf3 G159R and N160S have independent dysfunctions, and that at least Ikzf3 N160S plays a part in the pathogenesis by inhibiting Ikzf1 function and hematopoietic cell homing. Long-term follow-up of these mice and sampling of cells and nucleic acids over time was done, which will enable us to analyze mutation accumulation and the change in the accessibility of transcription factors. In addition, several novel IKZF3 mutations were identified from international collaborations; and functional analysis of the mutant molecules was performed.

研究分野：小児科学、免疫学

キーワード：原発性免疫不全症 リンパ球分化 転写調節 ダイマー イカロス アイオロス

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

IKZF ファミリー分子は主に造血細胞系に発現し、分化を制御する重要な転写因子である。主たるものとして IKZF1(IKAROS), IKZF2, IKZF3(AIOLOS), IKZF4 が知られているが、中でも IKZF1, IKZF3 の研究が進んでおり、幹細胞への commitment や、リンパ球系分化での役割が検討されてきた。IKZF1 は DNA 依存性 ATPase Mi2 と、ヒストンデアセチラーゼと共に IKZF1-NURD 複合体を形成し、また DNA 依存性 ATPase Brg-1 とともに IKZF1-SWI/SNF 複合体を形成する。クロマチンの再構成に関与し、細胞の系列維持や分化に関わる分子の代表例である。IKZF1, IKZF3 は分化段階で段階的に発現し、ホモダイマー、あるいはヘテロダイマーとして働くことが知られてきたが、それぞれの機能の差異や、近年存在が明らかになった「モノマー」の機能については未知の状態である。

IKZF ファミリー分子の変異による疾患も知られている。IKZF1 胚細胞変異は、その変異部位により抗体産生不全、複合免疫不全症や自己免疫疾患を呈し、私たちが同定した IKZF3 異常症(G159R)は B 細胞欠損、T 細胞異常、悪性リンパ腫を発症する。共同研究者が近年同定した IKZF3 異常症(N160S)は T 細胞異常が主体である。IKZF1, 3 は造血系腫瘍とも深く関わっている。ハイリスク急性リンパ性白血病では IKZF1 のヘテロ欠失がしばしば認められ、慢性リンパ性白血病(CLL)ではその 3% で IKZF3 L162R 変異がホットスポットとして同定されている。一方、IKZF3 点変異と白血病発症/細胞の性質変化の関係については、未だに十分に解明されていない。

2. 研究の目的

私たちが掲げた学術的な問いかけは

- 1) IKZFファミリー分子のモノマー、ホモダイマー、ヘテロダイマー、そしてそれぞれのアイソフォームがどのような機能的差異を有し、どのような分子機構で機能しているか (構造的差異と機能的差異)。
- 2) IKZF3 変異により、どのような機序で、免疫不全症、自己免疫疾患、リンパ系悪性腫瘍が発症するか (LOF, GOF の視点に加えた heteromeric interference, neomorphic 機能の証明)。
- 3) IKZF1, IKZF3 のヘテロ異常から表現型出現に至るまでにどのような分子病態を経ているのか (遅発性発症となる分子機構の解明)。

これらを下にした当初の研究の目的は以下の通りであった。

- (1) IKZF1, IKZF3の正常における機能の解明：構造的差異と機能的差異
IKZF1ホモダイマー、IKZF1/IKZF3ヘテロダイマー、IKZF3ホモダイマーによって転写制御をうける分子とそれそれによる機能的差異 (機能分担) を明らかにする。
IKZF1モノマー、IKZF3モノマーによる転写制御を検証し、その生理学的意義を明らかにする。
IKZF1, IKZF3アイソフォームのリンパ球分化段階における発現を明らかにする。
- (2) IKZF3変異による免疫異常症の分子病態の解明：転写調節の変調
IKZF3変異(G159R, N160S, L162S)がIKZF1, IKZF3の機能に与える影響を明らかにする。
IKZF3変異による新規転写制御能獲得の検証
- (3) IKZF3変異による腫瘍形質転換の解析
IKZF3 L162S 変異による白血病細胞の global transcriptional landscape の変化の解析
- (4) IKZF1, IKZF3ヘテロ変異による時空間的転写変化機構の解明

3. 研究の方法

1) IKZF ファミリー分子 (IKZF1, IKZF3) の正常における機能の解明：

- (1) IKZF1 ホモダイマー、IKZF1/IKZF3 ヘテロダイマー、IKZF3 ホモダイマーによる転写制御
NALM6 preB 細胞を用い、IKZF1 ホモダイマー、IKZF1/IKZF3 ヘテロダイマー、IKZF3 ホモダイマーを区別で

きるタグをつけて、sequential ChIP などを用いてホモダイマー及びヘテロダイマーにより転写調節を受ける領域を比較し、特異的な転写調節領域とその影響度を明らかにする。

(2) IKZF モノマーによる転写制御

wt IKZF1-HA, wt-IKZF3-Ty1 単独発現 DKO NALM を用いて、モノマーによる転写制御を評価する。

(3) IKZF1, IKZF3 アイソフォームの発現解析及び機能解析

Long read RNA-Seq を用いて、ヒトリンパ球亜群(B, CD4, CD8, NK, Th 亜群など)及び骨髄 B 細胞分化段階でのアイソフォーム発現について解析を行う。

2) IKZF3 変異による免疫異常症の分子病態の解明：転写調節の変調

(1) IKZF3 点変異による IKZF3, IKZF1 機能への影響(heteromeric interference: ヘテロ二量体干渉阻害)、及び新規転写制御(neomorph)の可能性の検討

ヒト細胞を用いて G159R について更に精緻な解析を行い、N160S, L162S の機能についても検討する。

(2) G158R KI マウス preB 細胞、胸腺細胞での Ikzf1, Ikzf3 による転写制御の精緻な解析

(3) N159S KI マウス (ヒト：N160S に対応) の作成と解析

ヒト N160S 変異における T 細胞機能異常の分子機構を明らかにするために、N159S KI マウスを作成して、表現型を解析し、ヒトとの異同を明らかにする。

3) IKZF3 変異による腫瘍形質転換の解析

KI マウスの長期観察から腫瘍形質転換のメカニズムについて解析を行う。また L162S 変異を有する CLL 患者検体が手に入れば、変異に特有の signature を明らかにする。

4) IKZF1, IKZF3 ヘテロ変異による時空間的転写変化の解明

Ikzf1 はまだ KI マウスが作成されていないが、海外共同研究者による作成が成功すれば、共同研究として検討を進める。また、IKZF1, IKZF3 のヘテロ異常症での緩徐な発症機構にアプローチする。

5) 新規 IKZF3 変異同定と、変異分子の解析による IKZF3 機能の解析、及び新規 IKZF ファミリー分子異常症の同定と解析 (当初の研究計画に追加)

海外医療機関、研究機関と連携し、新規 IKZF3 異常症、IKZF1, 3 以外の IKZF 異常症の同定、免疫学的特性解析、表現型の解析、分子病態の解明にあたる。

4 . 研究成果

IKZF ファミリー分子 (IKZF1, IKZF3) の正常における機能の解明

IKZF1 ホモダイマー、IKZF1/3 ヘテロダイマー、IKZF3 ホモダイマーによる転写制御の解析については、用いる tag の検討を行った結果、当初予定していた HiBiT システムを利用して IKZF1, IKZF3 にそれぞれ HA, Ty1 のタグ付けを行うシステムから、split GFP 及び split AirID タグをつけた IKZF1, IKZF3 を IKZF1/2 double KO NALM6 細胞に導入してホモダイマー、ヘテロダイマーを可視化する手法 (近位依存性ピオチン化酵素によるタンパク質相互作用解析の応用) に転換した。

まず、IKZF1, IKZF3 を KO した NALM6 細胞は確立されている。また、接着細胞においては、Split GFP により IKZF1/IKZF3 ヘテロダイマーが可視化できる体制を整えた。また、近接タンパク質ピオチン標識法(BioID)を改変し、特異性が向上した AirID 法を用いた Split AirID 法を計画し、コンストラクトを作成するに至った。

これらの結果、Split GFP 系は接着細胞で稼働することが明らかになったが、リンパ球系細胞株での GFP reconstitution は、現在も条件検討を重ねているところである。Split BioID 系については、浮遊系細胞での、高導入効率、低バックグラウンドの達成が困難であった。

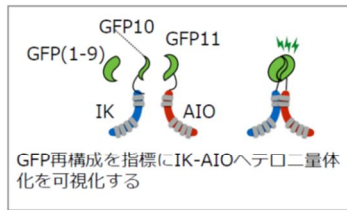
これらのことから、今回の検討ではホモダイマー、ヘテロダイマーの解析手法の基礎検討段階に留まった。バックグラウンド問題や、浮遊細胞系での適切な条件検討等が、課題となっており、研究終了時点では、Fluoppi (理研宮脇博士開発) による phase separation 系の導入を考慮しているところである。


モノマー機能については、ZF5, ZF6 が欠ける変異を患者で同定しており、同サンプルを用いた解析により、デ

ータを蓄積する方向性となっている。

IKAROS-AIOLOSヘテロ二量体の形成制御機構と機能の解明

Split GFP系を用いた ハイスループットスクリーニング



GFP1-9+
IK-GFP10 +
AIO-GFP11
 PlatE細胞における
GFP再構成

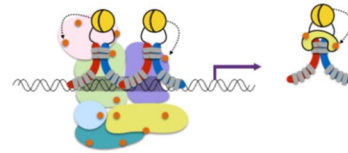
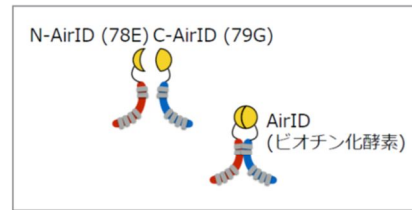
小分子スクリーニング

→ AIOLOS異常症治療薬候補分子の検索

CRISPRスクリーニング (KO)

→ 二量体化制御分子の同定

Split AirID系を用いたヘテロ二量体特異的な 近位依存性標識 (タンパク質相互作用解析)



Unbiasedなタンパク質相互作用解析による
ヘテロ二量体特異的な転写因子複合体や二
量体化制御分子の同定

IKZF3 変異による免疫異常症の分子病態の解明：転写調節の変調

Ikzf3 G158R KI マウスに加えて、N159S KI マウスが作成され、その表現型解析、病態解析が行われた (理化学研究所 谷内一郎博士との共同研究)。N159S KI マウスでは CD62L や CD40L の発現が減弱する。同マウスにおいては RNAseq 等を実施した。Chang Z, Yamashita M, Padhi AK, Zhang KYJ, Taniuchi I. Front Immunol. 17 August 2023 Volume 14 2023. ここでは Ikzf3 N159S が Ikaros の機能を阻害し、homing に影響を与えていることを明らかにしている。

Ikzf3G158R/ N159S KI(double KI)マウスも作成した。このマウスでは、G158R の免疫学的表現型と、N159S の免疫学的表現型の両者が観察されることから、隣接するアミノ酸の変異でありながら、それぞれの変異が異なる機能を有することが明らかになった。またこれにより G158R KI マウス、N159S マウスとの side by side 検証も可能となり、研究の幅が広がった。さらにいくつかの異なる Ikzf3 変異マウスや、double mutant マウスなどの作成に向けた取組が開始された。

G158R マウス、N159S マウス及びヒトにおける IKZF3 異常症については、国際共同研究が進み、一部は J. Exp. Med (2021)や Nat Immunol (2021)に共著として報告し、また今後さらに N159S マウスを用いて CD23 や CD40L 発現異常等、病態についての検討を進める段階となった。

さらに、重症 IKZF1 異常症 (DN 変異) である IKZF1 N159S のマウスモデル(Ikzf1 N159S)も作成された (理化学研究所との共同研究)。同マウスにおいて、解析を加えたところ、本変異では造血幹細胞レベルでの障害が認められ、更に NK 細胞、骨髄球系細胞、リンパ球の減少や、ホーミング受容体の発現異常や B 細胞における機能分子の発現減弱が認められた。これらの結果を合わせると、Ikzf1 N159S, Ikzf3 N159S には共通する分子機構がある可能性が示唆された。

IKZF3 変異による腫瘍形質転換の解析/ IKZF1, IKZF3 ヘテロ変異による時空間的転写変化の解明

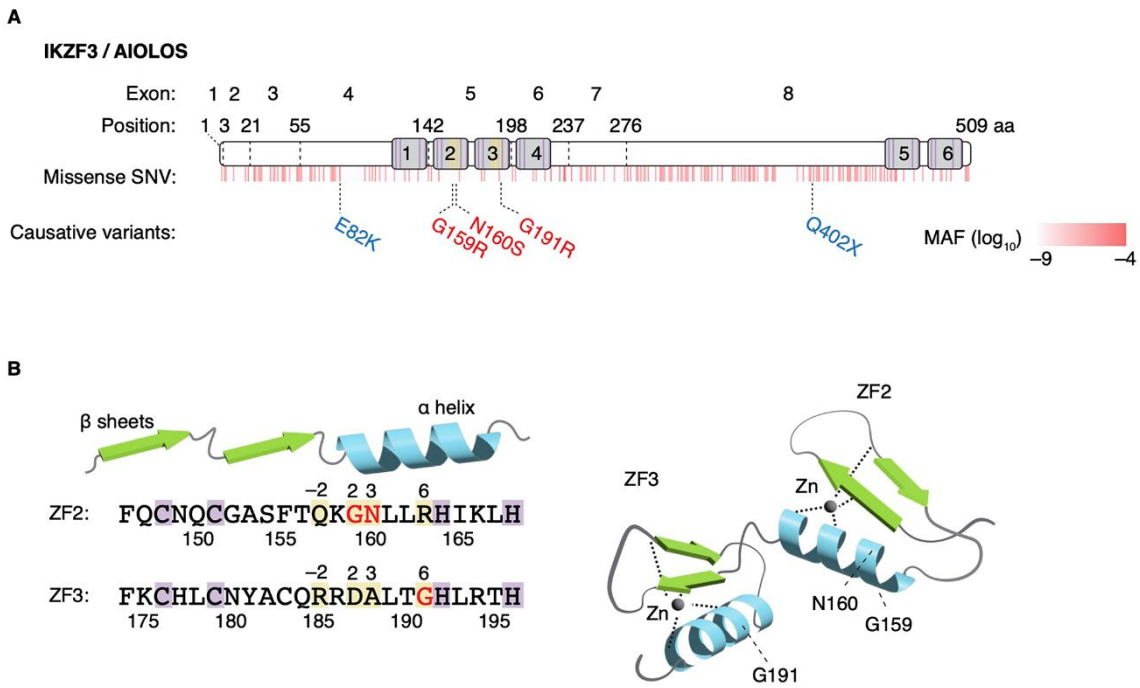
モデルマウス (Ikzf3 G158R, N159S, G158R/N159S 及び Ikzf1 N159S) を長期に亘ってフォローした。しかし、どのモデルマウスにおいても、腫瘍発生には至っておらず、何らかの trigger が必要と考えた。骨髄細胞、脾臓等の経時的なサンプリングは行っており、もしいずれかのモデルマウスにて腫瘍が発生した際には、遡り遺伝子変異の導入時期や、その種類等を解析することが可能な状況となっている。

同様に、経時的なサンプリングが行われており、Ikzf1, Ikzf3 転写調節領域を含む、global な転写領域の

不活化等については methylome や ATACseq 等で解析する段階に至った。

新規 IKZF3 変異同定と、変異分子の解析による IKZF3 機能の解析、及び新規 IKZF ファミリー分子異常症の同定と解析（当初の研究計画に追加）

研究期間の間に、IKZF3 N160S の milder phenotype がトルコとの共同研究で明らかになった。従って、IKZF3 N159S 変異は、民族、環境、modifier gene の存在等により、異なる表現型をとる可能性が示唆された。また下記のような様々な IKZF3 variant が報告された（2024年5月に代表者により review を発表）。一方、N380H, R214X という新たな IKZF3 variant が国際共同研究から明らかになり、共に特徴的な自己免疫系の表現型を呈していることが明らかになった（未発表データ）。さらに G191R 変異は重症感染症となっており（私信）、これらの variant については、それぞれ EMSA、PC-HC assay、等の機能解析を実施し、IKZF3 各変異の機能的差異についてデータが蓄積しつつある。



Yamashita, M., Morio, T. AIOLOS-Associated Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol* 44, 128 (2024). <https://doi.org/10.1007/s10875-024-01730-9>

更には、IKZF4 variant（未報告）も国際共同研究で明らかになり、KI mice を作成して、その機能を解析している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kuehn HS, Chang J, Yamashita M, Niemela JE, Zou C, Okuyama K, Harada J, Stoddard JL, Nunes-Santos CJ, Boast B, Baxter RM, Hsieh EWY, Garofalo M, Fleisher TA, Morio T, Taniuchi I, Dutmer CM, Rosenzweig SD.	4. 巻 218
2. 論文標題 T and B cell abnormalities, pneumocystis pneumonia, and chronic lymphocytic leukemia associated with an AIOLOS defect in patients.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Exp Med.	6. 最初と最後の頁 e20211118
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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamashita M, Kuehn HS, Okuyama K, Okada S, Inoue Y, Mitsui N, Imai K, Takagi M, Kanegane H, Takeuchi M, Shimojo N, Tsumura M, Padhi AK, Zhang KYJ, Boisson B, Casanova JL, Ohara O, Rosenzweig SD, Taniuchi I, Morio T.	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 Nat Immunol.	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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kido T, Hosaka S, Imagawa K, Fukushima H, Morio T, Nonoyama S, Takada H.	4. 巻 43
2. 論文標題 Initial manifestations in patients with inborn errors of immunity based on onset age: a study from a nationwide survey in Japan.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 747-755
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10875-023-01434-6.	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 Ozdemir O, Dikici U, Yarar MH, Yamashita M, Morio T.	4. 巻 44
2. 論文標題 A rare AIOLOS N160S variant causing IEI in human.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 J Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10875-024-01657-1.	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 Yamashita M, Morio T.	4. 巻 44
2. 論文標題 AILOS-associated Inborn Errors of Immunity.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 J Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10875-024-01730-9.	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Morio T
2. 発表標題 Elucidation of the molecular pathogenesis of human inborn errors of immunity.
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of Japanese Society of Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Morio T
2. 発表標題 Dissection of the molecular pathogenesis of transcription factor defects using model mice/cell systems.
3. 学会等名 Chang Gung Medical Week Symposium
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Morio T
2. 発表標題 Novel gene discovery
3. 学会等名 Asia Pacific Society for Immunodeficiencies (APSID)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>連携機関（国際共同研究） 名前Sergio D. Rosenzweig, MD, PhD. 共同研究相手国 アメリカ合衆国 相手方研究機関等Department of Laboratory Medicine, Clinical Center, NIH (IKZF3変異患者の病態解明についての共同研究) 名前Bertrand Boisson, PhD 共同研究相手国アメリカ合衆国 相手方研究機関等St. Giles Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases The Rockefeller University (IKZF3変異患者の病態解明についての共同研究) 名前ner & zdemir, MD. 共同研究相手国トルコ 相手方研究機関等Department of Pediatrics, Division of Allergy- Immunology, Sakarya University (IKZF3変異患者の病態解明についての共同研究) 名前Fabian Hauck, MD, PhD 共同研究相手国ドイツ 相手方研究機関等Pediatrics / Pediatric Hematology and Oncology / Immunology (DGfI) LMU Klinikum Dr. von Hauner Children's Hospital (IKZF3変異患者の病態解明についての共同研究) 名前Alexandre BELLOT, MD. PhD. 共同研究相手国フランス 相手方研究機関等Pediatric Rheumatology Unit and National Referee Centre RAISE HFME, HCL, Lyon, France (IKZF3変異患者の病態解明についての共同研究)</p>

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
研究分担者	尾崎 富美子 (Ozaki Fumiko) (60795277)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任助教 (12602)	

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			
米国	Department of Laboratory Medicine,	Clinical Center, NIH		
米国	St. Giles Laboratory of Human	Genetics of Infectious Diseases	The Rockefeller University	
トルコ	Department of Pediatrics, Division	of Allergy- Immunology,	Sakarya University	
ドイツ	Pediatrics	Pediatric Hematology and Oncology	Immunology	
フランス	Pediatric Rheumatology Unit	and National Referee Centre RAISE HFME,	HCL, Lyon, France	