

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390066

研究課題名(和文) 自然免疫応答を制御するヘム-Bach遺伝子ネットワークの解明

研究課題名(英文) Regulation of immune cells by heme and its receptors Bach1 and Bach2

## 研究代表者

五十嵐 和彦 (IGARAH, KAZUHIKO)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00250738

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヘムによる免疫応答の制御機構を解明することを目指した。死細胞などから放出されるヘムはヘモペキシンに結合して肝臓へ運搬され、分解される。組み換えヘモペキシンの発現精製系を確立し、ヘモペキシンにより運搬されるヘムが、細胞内Bach1の量を制御することを証明した。Bach2 がBリンパ球において、細胞周期関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子、サイトカインやケモカインとその受容体の遺伝子、代謝酵素遺伝子、鉄代謝・輸送系遺伝子など、実に多彩な遺伝子群を直接制御することを見いだした。また鉄代謝マクロファージの分化をヘムとBach1が形成する制御系が調節することを証明した。

研究成果の概要(英文)：Based on our recent findings that Bach1 and Bach2 are critical regulators of immune cells and that they are receptors of heme, we have tried to investigate the possible regulation of immune cells by heme. First, we established a system to express and to purify hemopexin from HeLa cells. Using a complex of the recombinant hemopexin and heme, we showed that hemopexin-bound heme regulates the protein level of Bach1. Therefore, heme within the blood can affect gene expression by altering the function of Bach1 and possibly Bach2. Using extensive gene expression profiling and chromatin immunoprecipitation-sequencing analysis, we identified candidate target genes of Bach2 in pro-B cells. The list included genes involved in cell cycle regulation, apoptosis, cytokine and chemokines and their receptors, and iron-related genes. We also found a critical function of Bach1 in the regulation of iron-metabolizing macrophages.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ヘム 免疫 Bリンパ球 マクロファージ 転写因子

### 1. 研究開始当初の背景

電子伝達や酸素代謝といった古典的機能に加え、ヘムがリガンドとしていくつかのタンパク質の機能制御やガス分子応答にも関わることが報告され、今までに想定されていなかった新しいヘム機能への関心が高まりつつある。中でも申請者は、1994年に発見した転写因子 Bach1 および Bach2 がヘム受容体でもあることを示し、ヘムがこれら転写因子の DNA 結合阻害、核外排出、ユビキチン化・分解を誘導することを示してきた。ヘム-Bach 経路は、酸化ストレス応答、赤血球前駆細胞におけるグロビン遺伝子発現、そして B リンパ球-形質細胞分化を制御する。ヘム結合能を欠く Bach2 をデザインし、そのトランスジェニックマウスを作成したところ、このマウスでは形質細胞分化が変調しており、ヘムのシグナル分子としての作用が個体レベルでも証明されつつある。原核生物や酵母ではヘムによる転写制御の例は知られていたが、多細胞生物では申請者の研究がヘムによる転写制御を証明した最初の例となり、この領域の開拓に貢献してきた。しかし、ヘムと免疫系との関係については不明な点も多く、さらなる研究の展開が求められている。

Bach2 は血球系では主に B リンパ球で発現し、抗体遺伝子クラススイッチや体細胞突然変異、すなわち液性免疫応答の制御に関わる。さらに Bach2 ノックアウト (KO) マウスは、成獣に達した後、数ヶ月のうちに 100% の頻度で肺胞蛋白症を発症し、野生型 (WT) に比べ早期に、半年程度で死亡することを見いだした (未発表)。しかも、Bach1/Bach2 ダブルノックアウト (DKO) マウスでは発症時期が早期化した (未発表)。

Bach2 KO や Bach2/Bach1 DKO マウスにおける肺胞蛋白症は、肺胞マクロファージの機能異常に関わる可能性がある。実際、発症した Bach2 KO マウスに野生型の骨髄移植を行うことにより、呼吸困難が消失し、肺胞貯留物も著しく減少する (未発表)。また、Bach2 は肺胞マクロファージで高い発現を示す (未発表)。このことから、Bach2 は肺胞マクロファージなど、組織マクロファージの成熟にも必須であることが予想される。また、この過程では Bach2 が主要な機能を担うものの、Bach1 も一部を代償し

ていることも予想される。さらに、Bach2 KO マウス肺胞マクロファージでは様々なエフェクター分子 (特に抗炎症作用を有する M2 マクロファージ機能に関わるもの) の発現が上昇しており、Bach2 がサイトカイン応答にも関わると予想される。これらの知見から、液性免疫系に加え、Bach2 および Bach1 は自然免疫系の制御にも関わること考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、古典的ヘム機能に加え、ヘムが自然免疫を制御することを証明する。Bach2 はヘム受容体であり、そのノックアウトマウスでは重篤なマクロファージ機能異常が生じるという独自の知見に着目し、自然免疫系における Bach2 (および関連因子 Bach1) の下流標的遺伝子ネットワークと、マクロファージにおけるヘムによる遺伝子発現制御を解明する。

### 3. 研究の方法

全ての細胞は、ネクロシス等の際にヘムタンパク質を放出する。血中に遊離したヘムは酸素と反応して活性酸素種を産生する危険な分子となるが、アルブミンやヘモペキシンと結合し、酸素反応性の低い安定な形で運ばれる。ヘモペキシンは、アルブミンに比べてヘムに対する親和性ははるかに高く、またアルブミンに結合したヘムもヘモペキシンに再結合出来るため、血中のヘムはほぼ全て、ヘモペキシンと結合して存在すると考えられる。このヘム結合型ヘモペキシンは、肝細胞に取り込まれ、代謝されて、鉄として利用される、鉄代謝の一役を担うシステムとして捉えられてきた。近年同定されたヘモペキシン受容体は、肝細胞以外に、マクロファージ、神経、脳といった様々な組織に発現していた。従って、ヘム-ヘモペキシン系は鉄を代謝・再利用するための役割以外にも、細胞が積極的にヘムを取り込むことで、ヘム自身を利用した細胞応答などの役割が予想されている。さらに、ヘム結合型ヘモペキシンを実験系に用いることにより、生理的な状況でヘムを細胞内に取り込ませることが可能であり、ヘムの新たな機能を検証できる。申請者は、ヘム-ヘモペキシン系が、Bach2 や Bach1 を標的として遺伝子発現も変動させる可能性を追求する。

Bach1 や Bach2 の標的遺伝子を同定する

ために、野生型およびこれら遺伝子欠損マウス由来の B リンパ球やマクロファージ（特に肺胞マクロファージ）を用いた詳細な発現プロファイリングを行う。そして、下流遺伝子候補を同定する。あわせて野生型細胞での ChIP-Seq を実施する。抗体は、Bach2 と Bach1 に加え、これら因子と二量体を形成する MafK に対するものも用いる。ChIP サンプルおよびライブラリーのクオリティーは、既知の Bach2 結合領域（HO-1 エンハンサー領域など）および非結合領域を比較し、結合領域への優位な Bach2 の結合により判断する。結合 DNA モチーフの基本的情報を取得し、得られた結合部位の中で、Bach2-MafK、あるいは Bach1-MafK のピークがそれぞれ共存するものを特定する。ピーク上流・下流を含めた近傍遺伝子と距離などの詳細な情報を取得し、ピークがどの遺伝子を制御し得る領域なのかを推定し結合標的遺伝子候補リストを作成する。

#### 4. 研究成果

ヘモペキシン-ヘム複合体の役割をさらに細胞培養系で調べるために、哺乳動物細胞組み換えヘモペキシン発現・高効率分泌・精製系をまず確立した。この系で得たヘモペキシンとヘムを混合し、ヘム結合型ヘモペキシンを得ることに成功した。本来のヘム結合型ヘモペキシンと同様の性状を有することを分光学的測定によりしたが、ヘムの配位および量比は天然のものと矛盾しなかった。組み換えヘム結合型ヘモペキシンを株化マクロファージ細胞およびヘパトマ細胞に添加し、ヘムの細胞内への取り込み、Bach1 の量と細胞内分化、Bach1 標的遺伝子発現変化をしらべ、組み換えヘム-ヘモペキシンが予想通りの作用を有することを確認できた。この組み換えヘモペキシン発現精製系のチューニングを進め、効率良く高純度組み換えヘモペキシンを生成するプロトコルを確定した。さらに、これを用いたヘム-ヘモペキシン複合体の調整法を確立した。このヘム-ヘモペキシン複合体を用いて、細胞外ヘムがヘモペキシン複合体としてエンドソーム依存的に取り込まれ、遊離したヘムが転写因子 Bach1 を不活性化することで下流遺伝子の発現を誘導するという一連の情報伝達経路を証明することができた。ここまでの実験内容は英文論文として報告した（BBA, 2014）。

標的遺伝子の探索については、当初予定した肺胞マクロファージについては必要細

胞数を減らす技術開発を様々検討したがうまく実施できていない。Bach2 発現マクロファージ株を用いることも検討したが、予想外なことにほとんどのマクロファージ株では Bach2 の発現は認められなかった。このことと肺胞マクロファージにおける機能との矛盾を掘り下げるために、大阪大・黒崎知博教授らが作成した Bach2 リポーターマウスを用いて Bach2 の生体内における発現パターンを解析した結果、Bach2 はマクロファージ前駆細胞と組織マクロファージのごく一部にのみ発現することを見いだした。これらも数的に微量であるために、ChIP-seq 実験を実施することは困難であった。

一方、B リンパ球を用いた標的遺伝子探索は順調に進み、Bach2 が細胞周期関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子、サイトカインやケモカインとその受容体の遺伝子、代謝酵素遺伝子、鉄代謝・輸送系遺伝子など、実に多彩な遺伝子群を直接制御することを証明することができた。これら遺伝子全てが Bach1 でも制御されている、というわけではなく、予想以上に Bach2 特異的標的遺伝子が多く存在することも見いだしている。標的遺伝子に関する研究はさらに掘り下げるべき点が多く残っているが、一部については現在論文を準備中である。

また、組織マクロファージ分化と Bach1 や Bach2 の関係についても大きな進展があった。国際共同研究を実施することで、ヘム-Bach1 経路が組織マクロファージの分化を制御することを証明することができた（Cell, 2014）。脾臓や骨髄に多く存在する鉄代謝に特化したマクロファージの分化は、転写因子 SpiC によって促進される。Bach1 は SpiC 遺伝子を直接抑制すること、細胞外ヘムが上昇した際には Bach1 にヘムが結合し、Bach1 の分解が誘導され、SpiC の発現が上昇し、単球から鉄代謝マクロファージへの分化が促進する。一方、Bach2 は肺胞マクロファージの機能調節に必須であることも、追加実験等を経て論文としてまとめることができた（J. Exp. Med., 2013）。Bach2 ノックアウトマウスでは肺胞マクロファージの機能が低下することから、Bach2 はマクロファージが肺胞特異的機能を発現する際に必須と考えられた。しかし、先に述べたように Bach2 リポーターマウスを用いた解析結果によると、Bach2 の発現自体はマクロファージ前駆細胞などごく一部のマクロファージ系細胞に限られている。前駆細

胞段階での作用がエピジェネティック機構を介して最終分化した肺胞マクロファージの機能発現に関わることが予想される。この点は現在さらに追求しており、来年までには論文として発表したいと考えている。

#### 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 16 件)

Hada, H., Shiraki, T., Watanabe-Matsui, M., and Igarashi, K., Hemopexin-dependent heme uptake via endocytosis regulates the Bach1 transcription repressor and heme oxygenase gene activation., *Biochim Biophys Acta.*, 査読有、2014、840 巻、2351-60.

DOI: 10.1016/j.bbagen.2014.02.029.

Haldar, M., Kohyama, M., So, A.Y., Kc, W., Wu, X., Briseño, C.G., Satpathy, A.T., Kretzer, N.M., Arase, H., Rajasekaran, N.S., Wang, L., Egawa, T., Igarashi, K., Baltimore, D., Murphy, T.L., and Murphy, K.M., Heme-Mediated SPI-C Induction Promotes Monocyte Differentiation into Iron-Recycling Macrophages., *Cell*, 査読有、156 巻、1223-1234, 2014

DOI: 10.1016/j.cell.2014.01.069

Nakamura, A., Shibuya, R. E., Itoh-Nakadai, A., Muto, A., Shima, H., Saigusa, D., Aoki, J., Ebina, M., Nukiwa, T. and Igarashi, K., The transcription repressor Bach2 is required for pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage function., *The Journal of Experimental Medicine*, 査読有、210 巻、2013、2191-2204

DOI: 10.1084/jem.20130028.

Roychoudhuri, R., Hirahara, K., Mousavi, K., Clever, D., Klebanoff, C. A., Bonelli, M., Sciume, G., Zare, H., Vahedi, G., Dema, B., Yu, Z., Liu, H., Takahashi, H., Rao, M., Muranski, P., Crompton, J. G., Punksody, G., Bedognetti, D., Wand, E., Hoffmann, V., Rivera, J., Marinocola, F. M. Nakamura, A., Sartorelli, V., Kanno, Y., Gattinoni, L., Muto, A., Igarashi, K., O'Shea, J. J., and Restifo, N. P., Bach2 represses effector programmes to stabilize Treg-mediated immune homeostasis., *Nature*, 査読有、498 巻、2013、506-510

DOI: 10.1038/nature12199.

〔学会発表〕(計 12 件)

Risa Shibuya, Roles of Bach2 in the development of alveolar macrophage, Keystone Symposia meeting on Dendritic Cells and Macrophages Reunitd、2015 年 3 月 10 日、モントリオール(カナダ)

Risa Shibuya, Roles of Bach2 in the function and development of alveolar macrophages and pulmonary homeostasis, 第 43 回 日本免疫学会学術集会、2014 年 12 月 11 日、国立京都国際会館(京都府京都市)

五十嵐和彦, ヘム-Bach1 経路による遺伝子発現調節と鉄欠乏への適応、鉄バイオサイエンス学会、2014 年 9 月 7 日、仙台国際センター(宮城県仙台市)

Hiroshi Hada, Hemopexin-dependent heme uptake through endocytosis regulates Bach1 transcriptional activity of cellular stress responses., Cold Spring Harbor Laboratory Meeting Metabolic Signaling & Disease: From Cell to Organism, 2013 年 8 月 14 日、Cold Spring Harbor(アメリカ)

Kazuhiko Igarashi, Heme as a signaling molecule for globin gene regulation and iron homeostasis., Cold Spring Harbor Laboratory Meeting Metabolic Signaling & Disease: From Cell to Organism, 2013 年 8 月 15 日、Cold Spring Harbor(アメリカ)

〔図書〕(計 0 件)

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www.biochem.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐 和彦 (IGARASHI, Kazuhiko)  
東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：00250738

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：