

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390121

研究課題名(和文) SATB1による自己免疫疾患発症抑制機構の解明

研究課題名(英文) Suppression mechanisms of autoimmune diseases by SATB1

研究代表者

近藤 元就 (KONDO, Motonari)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：20594344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：免疫は外来抗原を排除するが、自分自身を攻撃しない、いわゆる免疫寛容が健康時には保たれている。しかし、免疫寛容が破綻する場合があります、その際には自己免疫疾患が発症する。本研究では、染色体構造調節機能を有する核タンパク、Special AT-rich binding protein-1 (SATB1) 遺伝子欠損マウスに自己免疫疾患の発症することを見出した。これは、SATB1 遺伝子欠損により胸腺内における自己反応性 T 細胞を排除するメカニズム、ネガティブセレクションが障害されることが一因であると示唆された。以上より、SATB1は免疫寛容成立に必須であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Immune tolerance is maintained in the healthy condition; however, autoimmune diseases occur once immune tolerance is broken. We found that loss of a genome organizer, Special AT-rich binding protein-1 (SATB1), leads to autoimmune diseases in mice. In SATB1 deficient mice, negative selection, in which auto-reactive T cells are eliminated, is impaired. Therefore, SATB1 plays a critical role in establishment of immune tolerance.

研究分野：免疫学

キーワード：自己免疫疾患 免疫寛容 T細胞 ネガティブセレクション

1. 研究開始当初の背景

T 細胞は胸腺で分化し、獲得免疫の調整、あるいは細胞性免疫を担うリンパ球である。その分化過程は、サイトカインなどの細胞外因子、あるいは細胞内の遺伝子発現ネットワークにより、厳密に規定されている。サイトカインはその特異的サイトカイン受容体に結合し、その生物学的活性を発揮する。インターロイキン7 (interleukin 7, IL-7)、及びその受容体を構成する IL-7 受容体 (IL-7R) α 鎖、common γ (γc) 鎖の遺伝子欠損マウスではそのいずれにも T, B 細胞の重篤な分化障害が見られる。このことより IL-7/IL-7R 系は T, B リンパ球分化に必須であることが明らかである¹。これまでに我々は、IL-7 が B 細胞分化に必須な転写因子である early B cell factor (EBF) の発現誘導に必須であること²。また、T 細胞分化過程では、CD4⁺CD8⁺ double positive (DP) 細胞期において、ポジティブセレクション後に IL-7 受容体の発現が亢進され、IL-7 による細胞死抑制作用により SP 細胞への成熟が可能となることを示してきた³⁻⁵。IL-7 の他、Notch ligand などの多様な細胞外因子の作用により、T 細胞分化は制御されている。そして、転写因子ネットワークによる遺伝子発現制御により、T 細胞が形作られている。しかしながら、この T 細胞特異的遺伝子発現ネットワークの理解は必ずしも十分とは言えなかった。

2. 研究の目的

我々はリンパ球分化に関与する遺伝子を洗い出す目的で、造血幹細胞 (hematopoietic stem cell, HSC)、共通リンパ球前駆細胞 (common lymphoid progenitor, CLP)、共通骨髄球前駆細胞 (common myeloid progenitor, CMP) との間で、gene chip を用いた遺伝子解析を行った⁶。この解析を通じて Vascular cell adhesion protein 1 (VCAM-1) が HSC から CLP への移行段階である multipotent progenitor (MPP) 細胞分画の細分化に有用であることを示した^{6,7}。さらに骨髄から胸腺へ移行する T 前駆細胞の同定にも成功した⁸。また、CLP のみに特異的に発現する遺伝子群の同定も行った。その中の 1 つが本研究課題で注目する Special AT-rich binding protein-1 (SATB1) である。SATB1 は T 細胞に発現し、chromatin remodeling factor としてグローバルな遺伝子発現調節を行う核タンパクである⁹。従って、SATB1 は T 細胞特異的遺伝子発現ネットワーク形成に関与する因子の 1 つであると考えられる。これに加え、SATB1 は IL-7R α 鎖の発現制御因子であることから、我々は CLP 特異的遺伝子群より SATB1 を選び、SATB1 の T 細胞分化における機能の詳細を解析することにした。これまでに SATB1 欠損により、T 細胞分化が DP 細胞期で著しく障害されていることが明らかになっている。しかしながら、SATB1 は T リンパ球のみならず、神経系細胞などにも発現してい

るために、SATB1^{-/-}マウスは生後 3 週までに死に至る¹⁰。そのため、SATB1 の T 細胞分化における詳細な解析は行われていない。そこで我々は、Cre-loxP 技術を用いた conditional SATB1 knockout mice を作製することにした。SATB1 遺伝子 exons 3-5 を loxP ではさんだマウスを血球特異的 Vav-Cre マウスとかけ合わせ、全ての血球細胞中 (Vav-Cre-SATB1^{fl/fl}) の SATB1 を特異的に除いたマウスを作製したところ、T 細胞数は野生型に比べ 20-40% 減少していた。さらに、生後 16 週を経過すると、自己免疫疾患モデルマウスに特徴的な自己抗体価の上昇が認められた。このことより、SATB1 は免疫寛容成立に必須であることが示唆された。そこで本研究課題は、SATB1 欠損による T 細胞分化異常、及び、免疫寛容破綻が生じるメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

我々が用いた SATB1 floxed (SATB1^{fl/fl}) マウスには、SATB1 遺伝子に loxP 配列が挿入されている。従って、Cre 存在下で SATB1 遺伝子を欠失させることができる。SATB1^{fl/fl} マウスを Vav-Cre マウスと掛け合わせることにより、血球細胞特異的 SATB1 遺伝子欠損マウスを作製した。この報告書では、本マウスを SATB1 conditional knockout (SATB1cKO) マウスと称する。SATB1^{fl/fl} マウスを Lck-Cre マウスと掛け合わせることにより T 細胞特異的 SATB1 遺伝子欠損マウス (LckCre-SATB1^{fl/fl}) を作製し、SATB1cKO マウスの表現型は T 細胞に由来することを確認した。その他に HY-TCR トランスジェニックマウス、OT-I、OT-II TCR トランスジェニックマウスを SATB1cKO マウスと掛け合わせて用いた。すべてのマウスは C57BL/6 マウスとバッククロスし、SPF 環境下で維持、繁殖をした。

4. 研究成果

(1) SATB1 遺伝子欠損による T 細胞数減少はポジティブセレクション不全による。

OT-I、OT-II TCR はそれぞれ MHC class I、MHC class II と Ova ペプチドの複合体を認識する。従って、OT-I⁺ T 細胞は CD8⁺ T 細胞に、OT-II⁺ T 細胞は CD4⁺ T 細胞に分化する。これら TCR トランスジェニックマウスを SATB1cKO と掛け合わせた結果、OT-I⁺ CD8⁺ T 細胞、OT-II⁺ CD4⁺ T 細胞数の著減が見られた。このことは SATB1 欠損によりポジティブセレクションが障害されていることを示している。また、SATB1cKO マウス CD4⁺CD8¹⁰ 胸腺細胞による CD5 の発現は低下していた。このことは SATB1 欠損によるポジティブセレクション不全は TCR シグナル伝達に何らかの障害があることにより引き起こされていると考えられた。従って、SATB1 により遺伝子発現制御を受けている遺伝子群の中にポジティブセレクションに必須なものが存在することが明らかとなり、今後この遺伝子の同定を行うこ

とが重要である。

(2) SATB1cKO マウスの免疫寛容破綻はネガティブセレクション不全が原因となっている。

Foxp3⁺ CD4⁺ regulatory T (Treg) は末梢性免疫寛容成立に主要な役割を担う。SATB1cKO 脾臓内 Treg 数には顕著な変化は見られず、かつ免疫反応抑制作用も正常に見られた。このことは、SATB1cKO マウスにおける免疫寛容破綻は Treg 細胞に起因するものではないことを示唆した。そこで、末梢性免疫寛容と共に免疫寛容成立に必要な、中心性免疫寛容について、SATB1cKO マウスで調べた。

まず、HY-TCR トランスジェニックマウスを用いて検討した。この HY-TCR は HY 抗原を認識するため、メスではポジティブセレクションが正常に行われ、HY-TCR⁺ CD8⁺ T 細胞が分化できるが、オスではネガティブセレクションにより、HY-TCR⁺ CD8⁺ T 細胞の分化は著しく障害される。これに対し、SATB1cKO と掛け合わせた場合、ポジティブセレクションの障害により、メスで HY-TCR⁺ CD8⁺ T 細胞の減少が認められた。これに対し、オスでは HY-TCR⁺ CD8⁺ T 細胞数の増加が認められたことから、SATB1cKO マウスではネガティブセレクションが障害されていることが示唆された。

我々はさらに、OT-II-SATB1cKO と RIP-mOva マウスを掛け合わせて胸腺内 T 細胞分化を調べた。通常は RIP-mOva 存在下には OT-II⁺ DP 細胞がネガティブセレクションを受け、OT-II⁺ CD4⁺ T 細胞数は減少する。しかし、SATB1cKO バックグラウンドでは、OT-II⁺ CD4⁺ T 細胞数の増加が認められた。従って、CD4⁺ T 細胞への分化時にもネガティブセレクションが障害されていることがわかった。最後に、野生型マウス、SATB1cKO マウス胸腺細胞を抗 CD3 抗体注射後に調べた。抗 CD3 抗体を生体内に投与すると非常に強い TCR シグナルが細胞内に伝達される。これにより、CD4⁺CD8⁺ double positive (DP) 細胞の多くがアポトーシスにより排除される。これに対し、SATB1cKO マウスでは DP 細胞の多くが排除されなかった。以上より、SATB1cKO マウスの胸腺細胞は clonal deletion に対して抵抗性であることがわかった。ネガティブセレクションの分子機構は必ずしも明らかとはなっていない。従って、我々の研究結果はネガティブセレクションの分子制御機構解明の端緒となることが期待される。

以上、(1)、(2)の結果を含む論文は投稿中である。

(3) SATB1cKO マウスに生じる自己免疫疾患の解析

SATB1cKO マウスは野生型 littermates よりも早く死ぬことがわかった。SATB1cKO マウスは加齢と共にネフローゼの症状を呈するものが増加していた。また、これらのマウスにはループス腎炎様の病理像が見られたことから、死因の多くは自己免疫疾患の一症状で

ある、腎不全によるものと推測された。

SATB1cKO マウスに生じる自己免疫疾患発症機構解明の目的で、EAE 誘導を試みた。SATB1cKO マウスでは野生型マウスに比し、重篤になるものと予想したが、SATB1cKO マウスには EAE の症状は全く見られなかった。これらの矛盾が生じる理由を明らかにすることを目的とし現在、挑戦的萌芽研究として追究しているところである。

<引用文献>

① Kovanen and Leonard, Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gamma(c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. *Immunol. Rev.* 202, 2004, 67-83.

② Kikuchi, Kondo et al, IL-7 receptor signaling is necessary for stage transition in adult B cell development through up-regulation of EBF. *J. Exp. Med.* 201, 2005, 1197-1203.

③ Kondo et al, Bcl-2 rescues T lymphopoiesis but not B or NK cell development in common γ chain-deficient mice. *Immunity* 7, 1997, 155-62.

④ Akashi, Kondo et al, Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 1997, 661-72.

⑤ Akashi, Kondo et al, Two distinct pathways of positive selection for thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1998, 2486-91.

⑥ Lai, Kondo et al, Heterogeneity of Flt3-expressing multipotent progenitors in mouse bone marrow. *J. Immunol.* 175, 2005, 5016-5023.

⑦ Lai and Kondo, Asymmetrical lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *J. Exp. Med.* 203, 2006, 1867-73.

⑧ Lai and Kondo, Identification of a bone marrow precursor of the earliest thymocytes in adult mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 2007, 6311-16.

⑨ Dickinson et al, A tissue-specific MAR/SAR DNA-binding protein with unusual binding site recognition. *Cell* 70, 1992, 631-645.

⑩ Alvarez et al, The MAR-binding protein SATB1 orchestrates temporal and spatial expression of multiple genes during T-cell development. *Genes Dev* 14, 2000, 521-535.

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 6件)

- ① Hao, B., Nalk, A.K., Watanabe, A., Tanaka, H., Chen, L., Richards, H.W., Kondo, M., Taniuchi, I., Kohwi, Y., Kohwi-Shigematsu, T., and Krangel, M.S. (2015). An anti-silencer- and SATB1-dependent chromatin hub regulates Rag1 and Rag2 gene expression during thymocyte development. *J. Exp. Med.* 212, 809-24. (査読有り)
- ② Guo, X., Tanaka, Y., and Kondo, M. (2015). Thymic precursors of TCR $\alpha\beta^+$ CD8 $\alpha\alpha^+$ intraepithelial lymphocytes are negative for CD103. *Immunol. Lett.* 163, 40-48. (査読有り)
- ③ Sun, S., Horino, S., Itoh-Nakadai, A., Kawabe, T., Asao, A., Takahashi, T., So, T., Funayama, R., Kondo, M., Saitsu, H., Matsumoto, N., Nakayama, K., and Ishii, N. (2013). Y chromosome-linked B and NK cell deficiency in mice. *J. Immunol.* 190, 6209-6220. (査読有り)
- ④ Satoh, Y., Yokota, T., Sudo, T., Kondo, M., Lai, A., Kincade, P.W., Kouro, T., Iida, R., Kokame, K., Miyata, T., Habuchi, Y., Matsui, K., Tanaka, H., Matsumura, I., Oritani, K., Kohwi-Shigematsu, T., and Kanakura, Y. (2013). The SATB1 protein directs hematopoietic stem cell differentiation toward lymphoid lineages. *Immunity.* 38, 1105-1115. (査読有り)
- ⑤ Kuwabara, T., Tanaka, Y., Ishikawa, F., Kondo, M., Sekiya, H., and Kakiuchi, T. (2012). CCR7 ligands up-regulate IL-23 through PI3-kinase and NF-kappaB pathway in dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 92, 319-36. (査読有り)
- ⑥ Fujita, K., Akasaka, Y., Kuwabara, T., Wang, B., Tanaka, K., Kamata, I., Yokoo, T., Kinoshita, T., Iuchi, A., Akishima-Fukasawa, Y., Ishikawa, Y., Kondo, M., and Ishii, T. (2012). Pathogenesis of lupus-like nephritis through autoimmune antibody produced by CD180-negative B lymphocytes in NZBWF1 mouse. *Immunol Lett* 144, 1-6. (査読有り)

〔学会発表〕(計 9件)

- ① The function of SATB1 in a mouse model for sjogren's syndrome. 43rd, The annual meeting of the Japanese Society for Immunology 2014, oral presentation, 10 December 2014, 国立京都国際会館 (京都府京都市), Tanaka, Y., Sotome, T., Kuwabara, T., Akiba, Y., Kondo, M.
- ② SATB1 is required for development of

experimental autoimmune encephalomyelitis. 43rd, The annual meeting of the Japanese Society for Immunology 2014, poster presentation, 10 December 2014, 国立京都国際会館 (京都府京都市), Kuwabara, T., Akiba, Y., Tanaka, Y., Naito, T., Kondo, M.

③ 免疫寛容における分子制御機構の解析
Kyoto T cell Conference 第24回学術集会、口頭発表、2014年5月16-17日 京都平安ホテル (京都府京都市)、田中ゆり子、郭向華、向津隆規、早乙女壮彦、桑原卓、近藤元就

④ SATB1 遺伝子欠損マウスにおける自己免疫疾患の病態解析 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会、口頭発表、2014年5月9日 国立京都国際会館 (京都府京都市)、早乙女壮彦、渡邊美砂、正田八州穂、小峰由美子、田中ゆり子、郭向華、近藤元就

⑤ SATB1 is necessary for IEL development. 42rd, The annual meeting of the Japanese Society for Immunology 2013, poster presentation, 11-13 December 2013, Makuhari Messe (千葉県千葉市), Guo, X., Tanaka, Y., Kondo, M.

⑥ The role of SATB1 in mouse model of autoimmune disease. 42rd, The annual meeting of the Japanese Society for Immunology 2013, poster presentation, 11-13 December 2013, Makuhari Messe (千葉県千葉市), Mukozu Takanori, Guo, X., Tanaka, Y., Ishikawa, F., Kuwabara, T., Kondo, M.

⑦ Genome organizer SATB1 is critical for T cell maturation in the thymus. 42rd, The annual meeting of the Japanese Society for Immunology 2013, oral presentation, 11 December 2013, Makuhari Messe (千葉県千葉市), Tanaka, Y., Guo, X., Mukozu, T., Kuwabara, T., Kondo, M.

⑧ Acetylation modulates interleukin-2 receptor signaling. 15th International congress of immunology, poster presentation, 22-27 August 2013, Milan, Italy, Kuwabara, T., and Kondo, M.

⑨ SATB1 is necessary for establishment of immune tolerance. 41rd, The annual meeting of the Japanese Society for Immunology 2012, oral presentation, 5 December 2012, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市), Tanaka, Y., Guo, X., Kuwabara, T., Mukozu, T., Ishikawa, F., Kondo, M.

〔その他〕

ホームページ等

http://www.med.toho-u.ac.jp/lab/lab_immunology.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 元就 (KONDO, Motonari)
東邦大学・医学部・教授
研究者番号：20594344

(2) 研究分担者

石川 文雄 (ISHIKAWA, Fumio)
東邦大学・医学部・講師
研究者番号：10130345

田中 ゆり子 (TANAKA, Yuriko)
東邦大学・医学部・助教
研究者番号：40396685