

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590465

研究課題名(和文)免疫疾患関連転写因子ZFATのコンディショナルノックアウトマウスを用いた機能解析

研究課題名(英文)Elucidation of the transcription factor Zfat function in the immune system using a conditional knockout mouse model

研究代表者

土井 佳子(DOI, Keiko)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：10341538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：免疫疾患関連転写因子ZFAT(zinc-finger gene in AITD susceptibility region / zinc-finger with AT-hook)の胸腺内T細胞分化においてZFATの機能解析を進めた。コンディショナルZFAT欠損マウスの解析から、ZFATがTCRからの適切な初期シグナリングにおける制御とERKおよびEgrの活性化を介したポジティブセレクションに必須であることを明らかにした。さらにZFATがp38/JNKシグナル経路の適切な活性化に関与することでアポトーシス感受性に重要な役割を担うこと明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This research aims to investigate and elucidate the immune system transcription network, mainly the newly discovered immune-related transcription regulatory factor, ZFAT (zinc-finger gene in AITD susceptibility region), and to understand the molecular mechanism of ZFAT in the development of immunological diseases. We have reported that Zfat is required for proper regulation of the TCR-proximal signalings, and is a crucial molecule for positive selection through ERK and Egr activities. Furthermore, we have demonstrated that Zfat critically participates in the development of DP thymocytes through regulating the activities of p38 and JNK.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ZFAT T細胞

1. 研究開始当初の背景

当研究室にて自己免疫性甲状腺疾患 (AITD) 感受性遺伝子として同定した転写制御因子 ZFAT (zinc-finger gene in AITD susceptibility region) 遺伝子は 18 個の C2H2 型 zinc-finger motif と 1 個の AT-hook motif を含む転写関連因子様タンパク質をコードし、魚類からヒトに至るまで高度に保存された遺伝子である。これまでに、ZFAT は、マウスおよびヒトにおいて T、B 細胞で高発現しており、白血病細胞株 MOLT-4 およびマウス線維芽細胞 (MEF) における機能的解析から ZFAT がアポトーシス制御分子であることを報告してきた。また、国内外での報告により ZFAT 遺伝子多型が、自己免疫性難病である多発性硬化症治療におけるインターフェロン β の応答性および高血圧症に関連すること、また、日本人・韓国人の背丈に関連することが示され、ZFAT の重要性が示唆されていた。さらに、ZFAT 欠損マウスの表現型解析と分子レベルでの解析から、ZFAT 欠損マウスは発生初期に胎生致死となることが判明し、ZFAT が正常なマウス発生過程に必須の遺伝子であることが示唆されていた。研究開始当初、ZFAT に関する基礎的知見および ZFAT の機能が明らかになりつつあったが、未だマウス個体での免疫担当細胞における ZFAT の生理学的機能の解明には至っていなかった。そこで、これまでに得られた研究背景を手がかりにし、T 細胞特異的コンディショナル ZFAT 欠損マウスを対象に、胸腺・脾臓を中心とした詳細な表現型解析、ZFAT 転写制御ターゲット遺伝子の同定等により、マウス個体における ZFAT の機能的役割の解明とその機能発現のための分子機序の解明を試みた。

2. 研究の目的

主に免疫担当細胞に発現する ZFAT の転写制御メカニズムを解明することは、免疫関連疾患の病因・病態の解明へと繋がり、さらに転写制御をコントロールすることが可能となれば先駆的な治療法の開発へと発展させることができると考えられる。このような将来的な応用を目指して、本研究ではコンディショナルノックアウトマウスを用いた ZFAT の生物学的機能の解明を行った。

3. 研究の方法

(1) コンディショナル ZFAT 欠損マウスの樹立および表現型解析

ZFAT の exon 8 の両端に loxP 配列を挿入した *Zfat*^{lox/lox} (*Zfat*^{fl}) マウスを樹立し、*Lck-Cre* マウスおよび *Cd4-Cre* マウスと交配することで、Cre/loxP システムを用いた T 細胞特異的な ZFAT コンディショナル欠損マウス (*Zfat*^{fl}-*LckCre* マウスおよび *Zfat*^{fl}-*Cd4Cre* マウス) を樹立した。FACS (flow cytometry) 解析により、胸腺内 T 細胞の細胞数等について検討した。また、胸腺内 T 細胞の *in vitro* TCR 刺激によるシグナル経路における分子の発現量およびリン酸化変動について、抗 CD3 抗体により刺激後、ウエスタンブロッティング解析にて検討した。

(2) 発現アレイ解析および ChIP-seq 解析

Zfat^{fl}-*LckCre* マウス胸腺 CD4⁺CD8⁺ double positive (DP) 細胞および *Zfat*^{fl}-*Cd4Cre* マウス CD4⁺ T 細胞の細胞から RNA を抽出後、ラベル化し、Affymetrix 社製 GeneChip Array にハイブリダイズした。変動遺伝子群の取得等のデータ解析は GeneSpring にて行った。

Zfat^{fl}-*LckCre* マウス胸腺 CD4⁺CD8⁺ double positive (DP) 細胞 (*Zfat*^{fl} マウスをコントロール) を対象に、新規に樹立した ZFAT モノクローナル抗体を用いて、ChIP DNA を沈降精製後、シーケンシングを行い、Avadis NGS にて解析した。

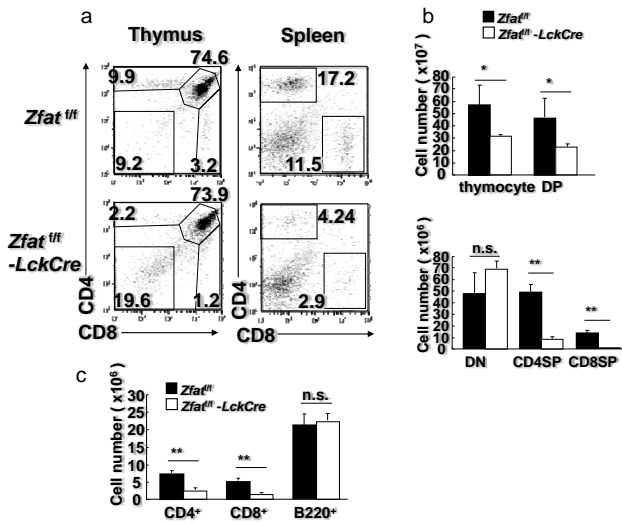
4. 研究成果

(1) 胸腺内 T 細胞分化における ZFAT の機能解析

① T 細胞特異的 ZFAT コンディショナル欠損マウス (*Zfat*^{fl}-*LckCre* マウス) を対象とした表現型解析およびポジティブセレクションにおける検討

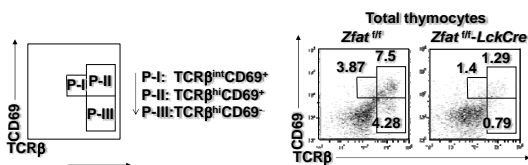
免疫担当細胞 T 細胞の ZFAT の機能解析を目的として、Cre/loxP システムを用いた T 細胞特異的な ZFAT コンディショナル欠損マウスの樹立を試みた。*Zfat*^{lox/lox} (*Zfat*^{fl}) マウスと *Lck-Cre* マウスを交配し、*Zfat*^{fl}-*LckCre* マウスを樹立した。表現型解析の結果、*Zfat*^{fl}-*LckCre* マウスでは胸腺内 CD4⁺CD8⁺ double positive (DP) 細胞数、CD4⁺ single positive (CD4SP) 細胞数および CD8⁺ single positive (CD8SP) 細胞数が著しく減少しており、末梢 CD4⁺ 細胞お

および CD8⁺細胞においても細胞数の著しい減少が示された(図1)。



【図1】 *Zfat^{fl/fl}-LckCre* マウスの胸腺 T 細胞分化障害および末梢 T 細胞数減少 (a,b) *Zfat^{fl/fl}* マウスと *Zfat^{fl/fl}-LckCre* マウスの胸腺 CD4⁺ CD8⁺ double negative (DN)細胞、CD4⁺ CD8⁺ double positive (DP)細胞、CD4⁺ single positive (CD4SP)および CD8⁺ single positive (CD8SP)の割合および細胞数 (c) *Zfat^{fl/fl}* マウスおよび *Zfat^{fl/fl}-LckCre* マウス脾臓における CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞および B 細胞の細胞数

胸腺内の T 細胞分化過程におけるポジティブセレクションについて、抗 CD69 抗体および抗 TCRβ抗体染色による分離で FACS 解析した結果、*Zfat^{fl/fl}-LckCre* マウスではポジティブセレクションの阻害が示された(図2)。また、*Zfat^{fl/fl}-LckCre* マウスと T cell antigen receptor (TCR)トランスジェニックマウスとの交配によって、ポジティブセレクションの阻害が回復されるかどうかを検討したが、ポジティブセレクションの阻害が回復されることはなかった。



【図2】 *Zfat^{fl/fl}-LckCre* マウスの胸腺 T 細胞分化におけるポジティブセレクションの阻害

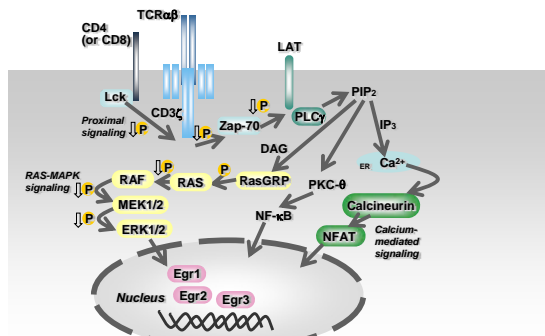
Zfat^{fl/fl} マウスと *Zfat^{fl/fl}-LckCre* マウスの胸腺細胞の CD69 と TCRβによる分離。 *Zfat^{fl/fl}-LckCre* マウスでは、P-I, P-II, P-III のいずれの過程においても割合の低下が示された。

さらに、*Zfat^{fl/fl}* マウス および *Zfat^{fl/fl}-LckCre* マウスの胸腺内 CD4⁺CD8⁺ double positive (DP)細胞における抗 CD3 抗体刺激後のウエスタンブロット解析から、*Zfat^{fl/fl}-LckCre* マウスでは、TCR からの刺激応答における ERK1/2、MEK1/2 および c-Raf のリン酸化の

抑制が示された。また CD3ζのリン酸化も抑制されたことからの CD3ζのリン酸化阻害を伴う、MEK-ERK 経路の活性化の減弱が明らかとなった(図3)。

また、*Zfat^{fl/fl}-LckCre* マウスでは *Egr1*, *Egr2* および *Egr3* の TCR 刺激による発現上昇の阻害が認められた。MEK1/2 阻害剤である U0126 存在下では TCR 刺激による *Egr1* と *Egr2* の発現上昇が抑制されたことから、*Zfat* が MEK-ERK 経路を介した TCR 刺激による *Egr1* と *Egr2* の発現上昇に必須であることが示唆された。*Zfat^{fl/fl}* マウスと *Zfat^{fl/fl}-LckCre* マウスの胸腺内 DP 細胞における *Egr1*, *Egr2* および *Egr3* の mRNA は、TCR 刺激前では差異が認められなかったが、TCR 刺激後では発現上昇の抑制が示された。*Zfat^{fl/fl}-LckCre* マウスの胸腺内 DP 細胞における TCR 刺激前の *Egr* タンパク質量の減少は、*Egr* タンパク質に対して、*Zfat* がターンオーバーもしくは分解に関与している可能性が示唆された。

ZFAT が TCR からの適切な初期シグナリングにおける制御と ERK および *Egr* の活性化を介したポジティブセレクションに必須であることを明らかにした。(Ogawa M et al, *PLoS One*, 2013)



【図3】 胸腺 T 細胞における TCR からのシグナル経路 *Zfat^{fl/fl}-LckCre* マウスの胸腺細胞では TCR からのシグナル経路の白抜き矢印で示しているリン酸化の抑制が示された。

② 胸腺内 CD4⁺CD8⁺ double positive (DP) 細胞における ZFAT 発現抑制によるアポトーシス感受性への影響

胸腺内 CD4⁺CD8⁺ double positive (DP)細胞数の著しい減少を示す T 細胞特異的コンディショナル ZFAT 欠損マウス(*Zfat^{fl/fl}-LckCre* マウス)を用いて、胸腺内 DP 細胞における ZFAT のアポトーシス感受性への関与を検討した。その結果、*Zfat^{fl/fl}-LckCre* マウスの胸腺内 DP 細胞では、*in vitro* 培養系においてカスパーゼ

3 の活性化を伴うアポトーシス細胞が増加しており、ZFAT 欠損によるアポトーシス感受性の増大が示された。さらに、*Zfat^{fl/fl}-LckCre* マウスの DP 細胞では、p38 および JNK のリン酸化が亢進しており、MEKK4 および MKK3/6 のリン酸化および *Gadd45α* の亢進も認められた。*Zfat^{fl/fl}-LckCre* マウスを用いた *in vivo* における TCR 刺激での解析から、TCR 刺激による DP 細胞のアポトーシス感受性の増大も示された。また、*Zfat^{fl/fl}-LckCre* マウスの DP 細胞を用いた *in vitro* 培養系での TCR 刺激でもアポトーシス細胞の増加が認められ、JNK のリン酸化亢進の延長が示された。胸腺内 DP 細胞において、ZFAT が *Gadd45α*-MEKK4 - MKK3/4/6 - p38/JNK シグナル経路の適切な活性化に参与することにより、アポトーシス感受性に重要な役割を担うことが明らかとなった。(Ishikura S et al, *J Cell Biochem*, 2014)

③ 胸腺内 CD4⁺CD8⁺ double positive (DP)細胞における発現アレイ解析および ChIP-seq 解析

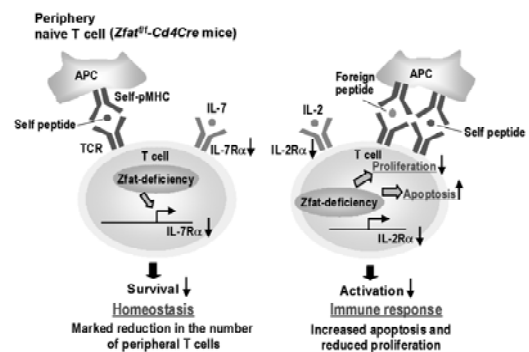
T 細胞特異的 ZFAT コンディショナル欠損マウス(*Zfat^{fl/fl}-LckCre* マウス)の DP 細胞の網羅的発現プロファイル取得のため、発現アレイ解析を行った。さらに、ZFAT の機能発現における分子メカニズムを明らかにするために、ChIP-seq 解析を試みた。新規に樹立した 10 種の抗 ZFAT 抗体を用いて、ChIP (chromatin immunoprecipitation: クロマチン免疫沈降)法の実験条件を最適化し、*Zfat^{fl/fl}-LckCre* マウスの胸腺細胞において ChIP-seq 解析を行い、ZFAT 転写制御活性領域の同定を試み、ZFAT のゲノム結合候補領域を同定した。今後、これまでに得られている発現変動遺伝子群の情報もあわせて、ZFAT が直接的に転写制御する遺伝子を同定することにより、ZFAT が担う分子制御機構の詳細な解明へと繋げていくことが必要である。

(2) 末梢 T 細胞における ZFAT の機能解析

末梢 T 細胞の ZFAT の機能解析では、コンディショナル ZFAT 欠損マウス(*Zfat^{fl/fl}-Cd4Cre* マウス)の解析から、IL-2R と IL-7R の発現抑制を伴う末梢の CD4⁺T 細胞および CD8⁺T 細胞が著しく減少することが示された。さらに、末梢ナイーブ T 細胞の FACS 解析等による表

現型解析によって、コンディショナル ZFAT 欠損マウスの末梢 T 細胞数の減少における、ナイーブ CD4⁺T 細胞とメモリーCD4⁺T 細胞の比率について検討した結果、コンディショナル ZFAT 欠損マウスのナイーブ CD4⁺T 細胞とメモリーCD4⁺T 細胞はコントロールマウスと同様の割合を示した。ZFAT が欠失した末梢 CD4⁺T 細胞数の減少はナイーブ CD4⁺T 細胞とメモリーCD4⁺T 細胞に特異性はなく、いずれの CD4⁺T 細胞も減少していることが明らかとなった(図 4)。

また、ZFAT 欠失による末梢 CD4⁺T 細胞の網羅的発現プロファイル取得のため、発現アレイ解析を行った結果、免疫関連分子を含む発現変動遺伝子群が得られ、末梢 T 細胞における ZFAT の分子機序解明のための基礎的情報を取得した。ZFAT を欠失したナイーブ CD4⁺T 細胞の *in vitro* TCR 刺激時では細胞増殖阻害およびアポトーシス細胞の増加が示され、TCR 刺激による正常な T 細胞の増殖が抑制されることが明らかとなった。(Doi K et al, *Biochem Biophys Res Commun*, 2012)



【図 4】 *Zfat^{fl/fl}-Cd4Cre* マウスの末梢 T 細胞における恒常性維持と TCR 刺激応答性の阻害

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 Ishikura S, Ogawa M, Doi K, Matsuzaki H, Iwaihara Y, Tanaka Y, Tsunoda T, Hideshima H, Okamura T, Shirasawa S.: Zfat-deficient CD4⁺ CD8⁺ double-positive thymocytes are susceptible to apoptosis with deregulated activation of p38 and JNK. *J Cell Biochem*. Jan;116(1):149-57. 2015(査読有)
DOI: 10.1002/jcb.24954.
- ② Doi K, Ishikura S and Shirasawa S. The roles

of ZFAT in thymocyte differentiation and homeostasis of peripheral naive T-cells. *Anticancer Res* 34(8): 4489-4495. 2014 (査読有) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25075091>

- ③ Doi K, Okamura T, Ishikura S, Doi K, Matsuzaki H, Tanaka Y, Ota T, Hayakawa K, Suzuki H, Tsunoda T, Sasazuki T, Shirasawa S.: Zfat-deficiency results in a loss of CD3zeta phosphorylation with dysregulation of ERK and Egr activities leading to impaired positive selection. *PLoS One* 8(10): e76254. 2013(査読有) DOI: 10.1371/journal.pone.0076254
- ④ Doi K, Fujimoto T, Okamura T, Ogawa M, Tanaka Y, Mototani Y, Goto M, Ota T, Matsuzaki H, Kuroki M, Tsunoda T, Sasazuki T, Shirasawa S. ZFAT plays critical roles in peripheral T cell homeostasis and its T cell receptor-mediated response. *Biochem Biophys Res Commun* 425(1): 107-112. 2012(査読有) DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.07.065.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 土井佳子、石倉周平、岡村匡史、角田俊之、田中陽子、白澤専二「ZFAT 欠損 CD4⁺CD8⁺ double positive 胸腺細胞におけるアポトーシス感受性の亢進」日本人類遺伝学会第 59 回大会, タワーホール船堀 (東京都江戸川区), 11 月 21 日, 2014
- ② 土井佳子、小川雅弘、石倉周平、角田俊之、田中陽子、白澤専二「胸腺内 T 細胞分化における転写制御分子 ZFAT の分子機序の解明」第 17 回バイオ治療学術研究会学術集会, 福岡大学 (福岡県福岡市), 12 月 7 日, 2013
- ③ 土井佳子、小川雅弘、岡村匡史、石倉周平、角田俊之、田中陽子、白澤専二「転写制御分子 ZFAT 欠損による胸腺内 T 細胞分化異常に関する ZFAT 分子機序の解明」日本人類遺伝学会第 58 回大会, 江陽グランドホテル(宮城県仙台市), 11 月 21 日, 2013
- ④ 土井佳子、岡村匡史、角田俊之、藤本崇宏、小川雅弘、田中陽子、白澤専二「遺伝子改変マウスを利用した転写制御分子 ZFAT の機能解明」日本人類遺伝学会第 57 回大会, 京王プラザホテル (東京都新宿区), 10 月 25 日, 2012

[図書]

該当なし

[産業財産権]

○出願状況

該当なし

○取得状況

該当なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.fukuoka-u.ac.jp/cellbio/index-j.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

土井 佳子(DOI, Keiko)
福岡大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：10341538

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

白澤 専二(SHIRASAWA, Senji)
福岡大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：10253535

角田 俊之(TSUNODA, Toshiyuki)
福岡大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：70444817

小柳 緑(KOYANAGI, Midori)
福岡大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：20153687