

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790465

研究課題名(和文) T細胞におけるBcl11bの役割

研究課題名(英文) Functional analysis of Bcl11b in T cell development

研究代表者

広瀬 哲史(Hirose, Satoshi)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：10415276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：がん抑制遺伝子Bcl11bはジンクフィンガー転写因子をコードしており、T細胞分化のさまざまな段階において機能する。本研究で、成熟段階でのBcl11bの役割を調べるために、胸腺CD8+細胞でBcl11bの活性を低下させた。その結果、活性化マーカーを発現し、マイトジェン刺激でIFN-gammaを迅速に産生する自然免疫CD8+胸腺T細胞が分化した。Bcl11bを欠損した初期T細胞が運命転換し、自然免疫に属するリンパ球、NK細胞になることと併せて考えると、Bcl11bがT細胞の“自然免疫化”を阻止している可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：The transcription factor Bcl11b plays key roles in T cell development and T cell-mediated immune responses. We examined thymocytes at and after the DP stage in a series of Bcl11b-attenuated mutant mice that carry conditional-knockout and ENU-induced hypomorphic alleles. We show that Bcl11b impairment leads to an increased production of TCRbeta highCD44highCD122high innate CD8+SP thymocytes, which express Eomes and secrete IFN-gamma rapidly after the stimulation with PMA and ionomycin. Since NKT cells in these Bcl11b-mutant mice exhibit developmental arrest at multiple steps, increase of innate CD8SP is not likely to be caused by bystander NKT cells. These results indicate that Bcl11b regulates development of different thymocyte subsets at multiple stages and prevents excessive innate CD8+SP thymocyte differentiation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：Bcl11b CD8T細胞 T細胞 リンパ球 自然免疫 NKT細胞 胸腺 分化

1. 研究開始当初の背景

(1) 代表者の所属する研究室では、放射線で誘発したマウス胸腺リンパ腫の解析から新規がん抑制遺伝子 *Rit1/Bcl11b* を単離、同定した。

(2) *Rit1/Bcl11b* が T 細胞の分化、免疫応答において様々な役割を果たしていることが明らかになっている。当研究室ではノックアウト(KO)マウスを作製し、*Bcl11b* が $\alpha\beta$ T 細胞の分化に必須であり(Wakabayashi et al., 2003; Inoue et al. 2006)、その運命決定に関与していることを明らかにした(理研 RCAI 河本宏博士らとの共同研究, Ikawa et al., 2010)。また、Avram らは、DP(CD4+CD8+)段階で *Bcl11b* を欠失させると、正の選択が完全に停止すること、NKT 細胞や制御性 T 細胞(Treg)の分化が停止することを示した。さらに、CD8+ T 細胞特異的に *Bcl11b* を欠失させ、その応答に必須であることを見出している。Avram らの結果は、T 細胞の生存に *Bcl11b* が必須で、その欠失によりさまざまな T 細胞集団が消失することを示している。

(3) 代表者らの研究室では、()KO マウスの他、()loxP 配列を組込んだ条件欠損マウス(Flox マウス(F); 新潟大学脳研 崎村博士らとの共同研究)、()化学変異剤 ENU により変異を誘起したマウスを作製し(理研 BRC 榎藤博士らとの共同研究)、解析してきた。誘起された変異体の一つ、*Bcl11b* タンパク質の 826 番目のセリンをグリシンに置換する変異(S826G)は、機能喪失型ではなく活性低下型変異であり、KO/KO では DP が分化しなかったのに対し、KO/S826G では β -selection が低下していたが DP が分化した。()-()のマウスから、*Bcl11b* の活性を段階的に変化させた一連のマウスを作製した。その結果、T 細胞の正の選択、成熟、NKT 細胞発生において必要な *Bcl11b* の活性が異なっていることが判明した(表参照)。さらに、S826G 変異を有した個体では胸腺 CD8+(CD4 - CD8+)細胞が顕著に減少しており(表参照)、S826G 変異は、CD8 系列に属する T 細胞の発生を特異的に阻害する優性の変異であることが示唆された。また、*Bcl11b* 活性低下の表現型はマウスの遺伝的背景の影響も受けることが判明した(表参照)。BALB/c と B6 の間に修飾遺伝子の多型が存在する可能性を示すものである。

mouse strain <i>Bcl11b</i> genotype	activity of <i>Bcl11b</i>					BALB/c	
	C57BL/6 (B6)					+/+	
	S826G/F ;CD4cre	+F ;CD4cre	+KO	S826G/+ ;CD4cre	+/ ;CD4cre	+KO	+/ +
正の選択	↓	+	+	+	+	↓	+
T細胞成熟	↓	↓	↓	+	+	↓	+
NKT細胞 発生	↓	↓	↓	↓	+	ND	ND
CD8+T細胞 発生	↓	+	+	↓	+	↓	+

*Bcl11b*の活性の変化とその影響 + 正常 ↓ 低下 ND 未解析

2. 研究の目的

(1) *Bcl11b* の正の選択、T 細胞成熟、NKT 細胞発生における機能の詳細とそのメカニズムを明らかにする。

(2) CD8+T 細胞の発生における機能の詳細とそのメカニズムを解明する。

(3) その他、*Bcl11b* の免疫系における新規機能を探索する。

3. 研究の方法

(1) *Bcl11b* 変異マウスの樹立と解析

Bcl11b の機能を DP 段階特異的 Cre トランスジーン *CD4cre* で完全に欠失させると、それ以降の分化が進行しない。そこで、これ以降の過程での *Bcl11b* の役割を調べるために、Flox、S826G、*CD4cre* の各マウスを交配し、*Bcl11b* の活性が DP 以降も部分的に残存しているマウス *Bcl11b*^{F/S826G} *CD4cre*、*Bcl11b*^{F/+} *CD4cre*、*Bcl11b*^{+/S826G} *CD4cre*、*Bcl11b*^{+/+} *CD4cre* の変異マウス(以下、F/S826G *CD4cre*、F/+ *CD4cre*、+/S826G、+/+とそれぞれ略記)を作製した。これらのマウスの胸腺 T 細胞分化、末梢 T 細胞集団の異常をフローサイトメトリ法により検討した。

(2) *Bcl11b* の変異によって発現の変化する遺伝子を同定するために、胸腺 CD8+細胞と、正の選択の行われる DP 細胞の転写産物をマイクロアレイ法により網羅的に調べた。

(3) *Bcl11b* 転写因子の標的を同定するために、胸腺 T 細胞においてクロマチン免疫沈降 - シークエンス(ChIP-seq)法を行った。本実験は Prof. Rothenberg(カリフォルニア工科大学)研究室の協力のもとで行った。

4. 研究成果

(1) *Bcl11b* 変異の NKT 細胞分化への影響

NKT 細胞特異的なリンガンド、a-GarCerCD1d tetramer 複合体を用いて NKT 細胞を特異的に検出し、NKT 細胞分化を詳細に解析した。F/S826G *CD4cre* マウスでは、NKT 細胞が正の選択を受ける段階で顕著に阻害されており、これまでの知見と一致していた。

ところが、+/S826G では CD44<high>NK1.1<low>から CD44<high>NK1.1<high>に移行する成熟段階において分化が阻害されていることが判明した。このことから、*Bcl11b* は NKT 細胞の成熟段階においても機能を有していることが判明した。

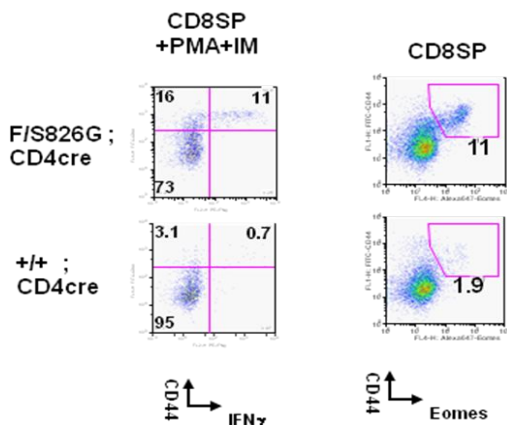
(2) 胸腺 CD8+ T の “自然免疫化”

CD8+T 細胞の発生における機能を調べるなかで、F/S826G *CD4cre* の胸腺成熟 CD8+細胞の表現型が変化していたので、この変化を解析した。

S826G/F *CD4cre* マウスの胸腺 CD8+細胞では、CD44、CD122 の発現が上昇しており、活性型の表現型を呈することが判明した。一方、エフェクター細胞を特徴づける CD25 は発現していなかった。

抗原刺激にตอบสนองしているか調べるために、擬似塩基 BrdU の取り込みを測定したが、F/S826G *CD4cre* の胸腺 CD8+細胞には取り込まれず、増殖をしていないことが示された。

S826G/F *CD4cre* マウスの胸腺 CD8+細胞を PMA と Ionomycin で刺激すると IFN γ を迅速に産生することが判明した。さらに CD122 や IFN-gamma の発現を制御する転写因子、Eomes の発現が検出された。(下図参照)



F/S826G *CD4cre* マウスの胸腺 CD8+細胞が示す特徴は、*Itk*, *Id3*, *NF- κ B1* 欠損マウスなどで見られた自然免疫様 CD8+T 細胞のものと同じである。

さらにマイクロアレイの解析から、CD8+T 細胞の活性化を示す遺伝子の上昇が認められたものの、細胞増殖と関連する遺伝子群の発現は低下していたことから、抗原刺激にตอบสนองして増殖するエフェクターT細胞とは区別されることが明らかになった。加えて、自然免疫と関連する遺伝子群や、NK細胞などで発現する遺伝子群が発現することが分かった。

(3) クロマチン免疫沈降法による Bcl11b 転写因子の標的候補の同定。

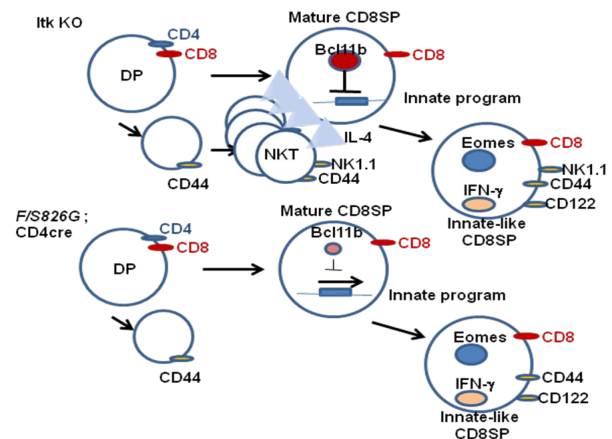
Prof. Rothenberg のグループでは、これまでも Bcl11b 転写因子の ChIP を試みたが、成功していなかったために、代表者は ChIP の条件検討を行った。その結果、X社の抗 Bcl11b

抗体を用いるとコントロール IgG と比較したときに標的配列#1 が 15 倍程度、標的配列#2 が 8 倍程度濃縮されたことが定量 PCR 法で確認された。このサンプルを次世代シーケンサーで解析し、Bcl11b 転写因子の標的の候補を同定した。今後、Bcl11b の機能を阻害した時に実際に転写活性に影響があるか検討する。

(4) 自然免疫様胸腺 CD8+細胞分化の機構

自然免疫様胸腺 CD8+細胞の分化には IL-4 が重要であることが示されている。*Itk* や *Id2* などの欠損マウスで自然免疫様胸腺 CD8+細胞が増加する原因は、NKT 細胞または $\gamma\delta$ NKT cell といった IL-4 産生細胞が増えるためだと考えられている(下図参照)。ところが、S826G/F *CD4cre* マウスでは、NKT 細胞はむしろ減少しており、 $\gamma\delta$ NKT cell (CD4+ $\gamma\delta$ T cell) も増加していないことから、CD8 陽性胸腺 T 細胞の内因性の要因によって自然免疫様胸腺 CD8+細胞に分化していると考えられた。すなわち、CD8 陽性胸腺 T 細胞中で *Bcl11b* が活性低下することによって自然免疫に属する性質の発現を抑制できなくなったものと考えられる(下図参照)。NF- κ B1 欠損マウスでも、同様に内因性のメカニズムによって、自然免疫様胸腺 CD8+細胞が生成していることが報告されている。

T 細胞分化の初期において、*Bcl11b* は自然免疫に属するリンパ球、NK 細胞への分化を抑制し T 細胞への運命を決定することが示されている。今回の結果は、 $\alpha\beta$ T cell がさまざまな T 細胞小集団に分化する際にも自然免疫的な性質の発現を抑制することを示唆している。



(5) 意義

免疫反応においては、侵入した異物に即座に反応する自然免疫(Innate Immunity)と、反応は遅れるが異物の特異的認識を伴う獲得免疫(Adaptive Immunity)が存在する。典型的な T リンパ球や B リンパ球が獲得免疫を担うのに対し、NK 細胞等のように自然免疫を担うリンパ球も存在する。後者に属するリンパ

球の特徴は、異物に侵入に対する予備的活性化を示す活性化マーカー発現と刺激時の迅速なサイトカイン産生である。T、Bリンパ球にも自然免疫の特徴を帯びたサブセットが存在する。

獲得免疫と自然免疫の抗原認識の違いは、異物を認識する受容体の違い、あるいは、その多様化機構の有無に焦点があてられてきた。一方、獲得免疫と自然免疫の応答の速さの違いやその分子機構についてはこれまでほとんど意識されてこなかった。今回の表現型は、*Bcl11b*が細胞の予備的活性化を抑制し、結果として自然免疫の性質を帯びることを阻止していると解釈できる。本研究は、これまで意識されてこなかった獲得免疫と自然免疫の応答の速さの違いに光をあたるものである。

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 2 件)

Go R, Hirose S, Katsuragi Y, Obata M, Abe M, Mishima Y, Sakimura K, Kominami R. Cell of origin in radiation-induced premalignant thymocytes with differentiation capability in mice conditionally losing one *Bcl11b* allele. *Cancer Science*. 2013年 104:1009-1016. (査読有)
doi: 10.1111/cas.12193.

Go R, Takizawa K, Hirose S, Katsuragi Y, Aoyagi Y, Mishima Y, Kominami R. Impairment in differentiation and cell cycle of thymocytes by loss of a *Bcl11b* tumor suppressor allele that contributes to leukemogenesis. *Leukemia Research*. 2012年 36:1035-1040. (査読有)
doi: 10.1016/j.leukres.2012.04.028

[学会発表](計 8 件)

奥村和弘, 齋藤慈, 青戸良賢, 八谷剛史, 榊原康文, 葛城美德, 廣瀬哲史, 木南凌, 後飯塚僚, 中村卓郎, 若林雄一 *Meis1*は表皮幹細胞の維持と皮膚発がんに必要な。第34回日本分子生物学会年会, 2013年12月4日, 神戸

郷梨江香, 廣瀬哲史, 葛城美德, 小幡美貴, 阿部学, 三島行雄, 崎村建司, 木南凌 放射線誘発胸腺リンパ腫における発症母体細胞の同定。日本放射線影響学会第26回大会, 2013年10月18日-20日, 青森

奥村和弘, 齋藤慈, 八谷剛史, 榊原康文, 大澤光次郎, 岩間厚志, 廣瀬哲史, 木南凌, 後飯塚僚, 中村卓郎, 若林雄一 *Meis1*は腫瘍悪性を制御する。第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月5日, 横浜

廣瀬哲史 理研 ENU マウスから明らかになった *Bcl11b* の T 細胞における役割。第27回モロシヌス研究会, 2013年6月28、29日, つくば市

Satoshi Hirose, Rieka Go, Yoshinori Katsuragi, Yoshiyuki Sakuraba, Yoichi Gondo, and Ryo Kominami The *Bcl11b* transcription factor prevents the intrathymic development of innate CD8 T cells. The 6th International Workshop of Kyoto T Cell conference, 2013年6月3日-7, 京都

廣瀬哲史, 葛城美德, 小幡美貴, 三嶋行雄, 木南凌 転写因子 *Rit1/Bcl11b* は Innate 様 CD8+T 細胞の分化を制御する。第22回 Kyoto T Cell Conference, 2012年7月6、7日, 京都

廣瀬哲史 次世代版ジーンタゲッティング プロラムで作製された置換型変異アリルから明らかになった細胞障害性 T 細胞分化における *Bcl11b* の役割。第26回モロシヌス研究会, 2012年6月15日, 東京

奥村和弘, 佐藤美穂, 廣瀬哲史, 後飯塚僚, 中村卓郎 マウス表皮幹細胞における *Meis1* の役割。第59回日本実験動物学会総会, 2012年5月24-26日, 別府

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]
ホームページ等

新潟大学大学院医歯学総合研究科 分子細胞医学専攻 遺伝子制御講座分子生物学分野
<http://www.med.niigata-u.ac.jp/bc1/welcome.html>

新潟大学医学部医学科 教育・研究活動紹介 > 研究内容一覧 > 分子遺伝学
<http://www.med.niigata-u.ac.jp/contents/research/kiso/seika01.html>

科学技術振興機構データベース
J-GLOBAL 研究者の詳細情報 廣瀬哲史
http://jglobal.jst.go.jp/detail.php?JGLOBAL_ID=200901093250119174

6. 研究組織

(1) 研究代表者

広瀬 哲史 (HIROSE SATOSHI)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：10415276

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：