

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07186

研究課題名(和文)Regulatory mechanisms controlling CCL5 chemokine to maintain tissue homeostasis

研究課題名(英文)Regulatory mechanisms controlling CCL5 chemokine to maintain tissue homeostasis

研究代表者

SEO WOOSOOK (SEO, Wooseok)

名古屋大学・医学系研究科・特任准教授

研究者番号：40574116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：CCL5は重要な炎症性ケモカインであり、感染部位に免疫細胞を遊走させる役割を持つ。最近の研究では、CCL5は局所組織に定在する免疫細胞を維持するためにも機能することが示唆されている。しかし、CCL5が炎症性・非炎症性の両方の状況下で機能するメカニズムは解明されてなかった。CCL5の特異的発現に關与する分子調節回路を理解するため本研究を行い、これまで知られていなかった2つの転写エンハンサーを発見した。エンハンサーのノックアウトした遺伝子改変マウス系統を作製することで、これら2つのエンハンサーは、クロマチンループを媒介することによってCCL5発現の時間的特異性を与えることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

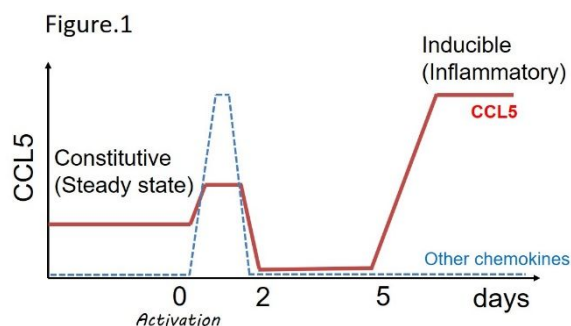
多くの癌組織には大量のCCL5が含まれていますが、その生理学的意味は明確に定義されておらず、CCL5を利用した効果的な治療アプローチの開発に障害になっています。私の研究は、CCL5発現調節の分子機構を解明するだけでなく、癌組織におけるCCL5存在の免疫学的意味にも新たな光を当てました。この研究成果として発表した私の論文は、がんの増殖を後押しする、CCL5の新しい役割を提供しました。この発見は、CCL5の役割に関するパラダイムシフトをもたらし、癌の治療アプローチをさらに発展させると考えています。

研究成果の概要(英文)：CCL5 is an important inflammatory chemokine and used to recruit immune cells to the infected sites to clear pathogens. Recent studies have suggested that CCL5 also functions to maintain tissue-resident immune cells within local tissues, thus implying that CCL5 can function under both inflammatory and non-inflammatory situations. During the thorough examination to decipher the detailed molecular regulatory circuit responsible for the specific expression of CCL5 in both inflammatory and non-inflammatory situations, I discovered that previously unknown two transcriptional enhancers, each of which is responsible for the expression of CCL5 in inflammatory and non-inflammatory situations. By the generation two gene-modified mouse lines in which either of enhancer is knocked out, I concluded that these two enhancers gives the temporal specificity of CCL5 expression by mediating chromatin loop between them.

研究分野：がん免疫

キーワード：CCL5 Enhancer Cancer

## 1. 研究開始当初の背景



CCL5, migrate to the source of CCL5 secretion and fight against the infection. Interestingly, recent studies suggest that CCL5 is expressed at low levels in normal homeostatic situation and involved in the maintenance of tissue-resident immune cells in local tissues (Figure 1). This indicates that **CCL5 works in two different settings, one in inflammatory and another in non-inflammatory situations.**

## 2. 研究の目的

CCL5 is a unique chemokine in that it has two modes of action, one with a high expression of CCL5 during the acute inflammation and another with a low expression during the normal homeostasis. However, how these seemingly two different modes of CCL5 expression are generated has been a mystery, thus hindering the development of effective therapeutic approaches involving CCL5. The preliminary research by the applicant indicated that CCL5 is regulated by a transcription factor called RUNX. Therefore, the applicant of this grant aimed to understand the detailed regulatory mechanisms of CCL5 expression by RUNX transcription factor.

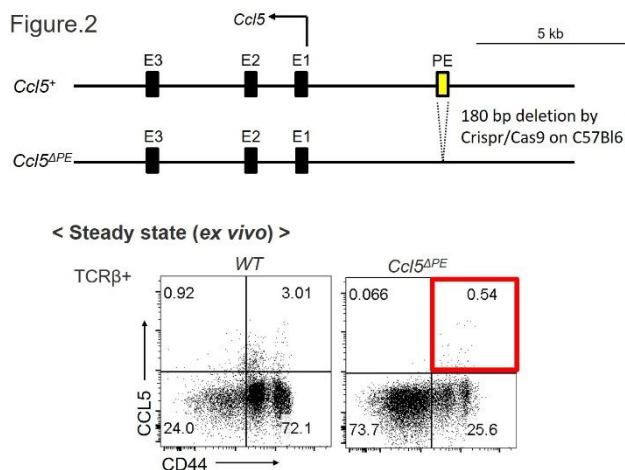
## 3. 研究の方法

(1) Elucidation of regulatory mechanisms of CCL5 expression

NK cells and T cells are the main producer of CCL5 *in vivo*. The expression pattern of CCL5 is examined by ELISA (The enzyme-linked immunosorbent assay) and flow cytometry in NK cells and T cells during the homeostatic and inflammatory settings. Since we postulated that the transcription factor RUNX is involved in the regulation of CCL5, ChIP (Chromatin ImmunoPrecipitation) is employed to find the locations in which RUNX binds around the CCL5 locus.

(2) Understanding the physiological relevance of two expression modes of CCL5

The genomic locations (loci) identified by RUNX ChIP will be genetically eliminated from the mouse genome by using Crispr/Cas9-mediated genome editing. The generated knockout mice will be used to assess the changes in CCL5 expression in the absence of the genomic regions. To decipher the physiological roles of the CCL5 expression, we will employ tumor models in the knockout mice.



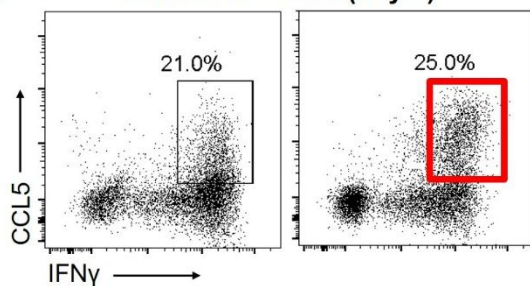
## 4. 研究成果

(1) **The steady-state expression of CCL5 is mediated by the proximal enhancer**

The thorough examination of CCL5 expression indicated that RUNX transcription factor is closely involved in the regulation of CCL5 expression. Therefore, we performed RUNX ChIP-seq to find out the locations in which RUNX binds to CCL5 locus. Bioinformatics analysis indicated that there is a strong peak at 5kb upstream of the transcriptional promoter of the CCL5 gene. To evaluate the physiological relevance of this region, we

generated the knockout mouse. The deletion of this upstream region of CCL5 resulted in the abolition of CCL5, indicating that this region serves as the transcriptional enhancer (Figure 2). Therefore, we named this region as PE (proximal enhancer) of CCL5.

**Figure.3 Activated T cells (day 5)**

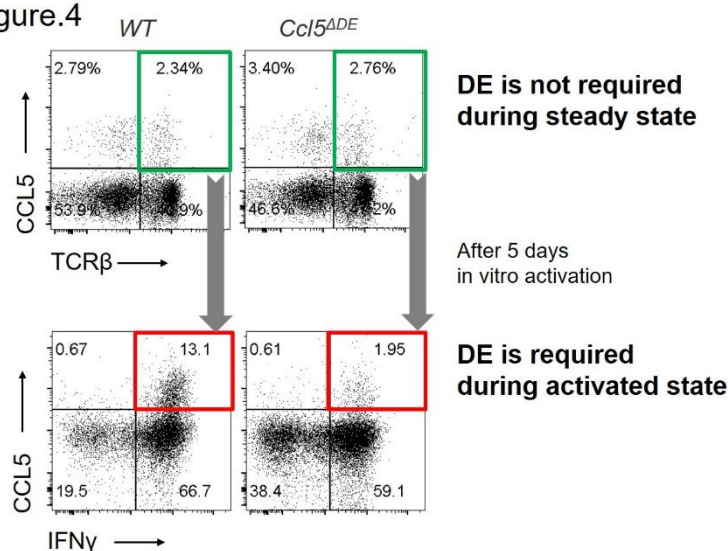


**(2) The induced expression of CCL5 requires a separate and distant enhancer**

Surprisingly, we found that PE-knockout mice did not have a defect in the expression of CCL5 if the cells are activated, indicating that CCL5 in activated T cells require another separate enhancer (Figure 3). However, the examination of RUNX binding sites around CCL5 locus did not find any more significant binding sites, suggesting that this another enhancer of

CCL5 on activated cells must be located at a distant site. To discover this potential enhancer, we employed a novel approach called enChIP (engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation) and the results of enChIP-seq identified an extremely distant enhancer (DE). The genetic deletion of DE from the mouse genome clearly indicated that this DE is responsible for the regulation of CCL5 during the activated states (Figure 4). The discovery of these two enhancers explain how CCL5 can achieve two-modes of specific expressions.

**Figure.4**

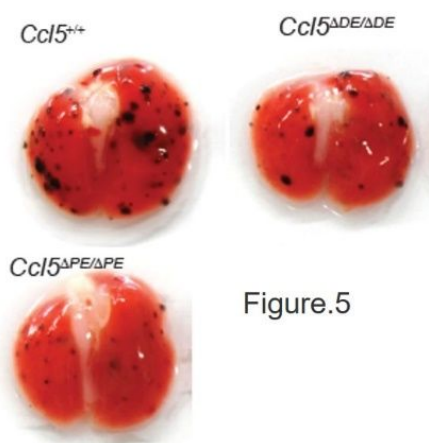


**(3) CCL5 expressed by the proximal enhancer functions as a pro-cancer molecule**

To better understand the physiological meaning of these two enhancers, we

infected cancer cells in the knockout mice of each enhancer, and we discovered that CCL5 expression mediated by the proximal enhancer resulted in the clearance of cancers in the metastasized lungs (Figure 5). This exciting result suggests that CCL5 from hosts might

function as a pro-cancer molecule. Indeed, more detailed biochemical analysis indicated that NK and T cells without the steady-state CCL5 expression exhibit more stimulated states which can generate much potent anti-cancer effects. In other words, CCL5 in the steady-state suppress NK and T cells and prevent them from harming our healthy tissues. In conclusion, we propose that the control of host CCL5 during the steady-state could potentially benefit our anti-cancer effects.



**Figure.5**

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Seo Wooseok, Jerin Chandsultana, Nishikawa Hiroyoshi	4. 巻 53
2. 論文標題 Transcriptional regulatory network for the establishment of CD8+ T cell exhaustion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental & Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 202 ~ 209
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s12276-021-00568-0	査読の有無 無
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 Seo Wooseok, Shimizu Kanako, Kojo Satoshi, Okeke Arinze, Kohwi-Shigematsu Terumi, Fujii Shin-ichiro, Taniuchi Ichiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Runx-mediated regulation of CCL5 via antagonizing two enhancers influences immune cell function and anti-tumor immunity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1 ~ 16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-15375-w	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 Kojo Satoshi, Ohno-Oishi Michiko, Wada Hisashi, Nieke Sebastian, Seo Wooseok, Muroi Sawako, Taniuchi Ichiro	4. 巻 3
2. 論文標題 Constitutive CD8 expression drives innate CD8+ T-cell differentiation via induction of iNKT2 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 1 ~ 13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.202000642	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 Seo Wooseok, Taniuchi Ichiro	4. 巻 43
2. 論文標題 The Roles of RUNX Family Proteins in Development of Immune Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules and cells	6. 最初と最後の頁 107 ~ 113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14348/MOLCELLS.2019.0291	査読の有無 無
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 Tenno Mari, Wong Alicia Yoke Wei, Ikegaya Mika, Miyuchi Eiji, Seo Wooseok, See Peter, Kato Tamotsu, Taida Takashi, Oishi-Ohno Michiko, Ohno Hiroshi, Yoshida Hideyuki, Ginhoux Florent, Taniuchi Ichiro	4. 巻 3
2. 論文標題 Essential functions of Runx/Cbf in gut conventional dendritic cells for priming Ror t+ T cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lsa.201900441	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 Seo Wooseok, Taniuchi Ichiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Too much can be as bad as too little	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 1262~1264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-019-0498-7	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 Xing Shaojun, Shao Peng, Li Fengyin, Zhao Xudong, Seo Wooseok, Wheat Justin C., Ramasamy Selvi, Wang Jianfeng, Li Xiang, Peng Weiqun, Yu Shuyang, Liu Chengyu, Taniuchi Ichiro, Sweetser David A., Xue Hai-Hui	4. 巻 215
2. 論文標題 Tle corepressors are differentially partitioned to instruct CD8+ T cell lineage choice and identity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 2211~2226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20171514	査読の有無 無
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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Seo, Wooseok & Taniuchi, Ichiro
2. 発表標題 Regulation of CCL5 expression by Runx/CBF transcription factor complexes and long-distance enhancers
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

がん免疫におけるケモカインCCL5発現抑制機構の解明  
[https://www.riken.jp/press/2020/20200326\\_3/index.html](https://www.riken.jp/press/2020/20200326_3/index.html)

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------