

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23616003

研究課題名(和文) 1次リンパ組織の微小環境特異的エピジェネティック制御の解明

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of primary lymphoid organ microenvironment

研究代表者

菅野 雅元 (Kanno, Masamoto)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・教授

研究者番号：40161393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：胸腺T細胞分化段階ごとのポリコームタンパク質複合体を精製し、サブユニット構成、PRC1相ソフォームの比率を検討したETPではPRC1.2が多く存在し、DN3ではPRC1.4が多く存在する事が分かった。その事が、それぞれ、me1-18(PCGF1.2) KOマウスとbmi1(PCGF1.4) KOマウスの表現型の出現場所が異なる事につながる事が分かった。また、組織特異的KOマウスの作成に成功した。さらに、ANRIL というlincRNAとPRC2が結合する事が報告された。それと同じマウスlincRNA-AK148321を同定した。

研究成果の概要(英文)：We succeeded to purify thymic development stage specific PRC1 protein complexes. At ETP stage, PRC1.2 is major form of PRC1, however, at DN3 PRC1.4 form of PRC1 is major form. This corresponds well for the phenotype of different PCGF gene KO mice. We also succeeded to establish several floxed PCG gene KO mice. Also we identified new lincRNA with might bind with PRC2

研究分野：免疫学

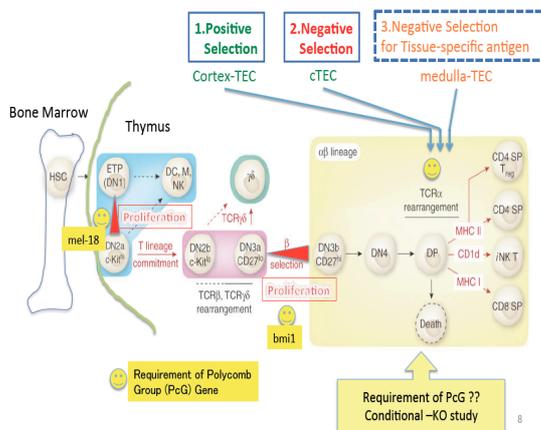
科研費の分科・細目：エピジェネティクス

キーワード：ポリコーム タンパク質複合体 KOマウス lincRNA 胸腺 T細胞分化

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、1990年代に哺乳類で最初のポリコーム遺伝子 *me118* を世界で始めて単離して以来、ポリコーム遺伝子群の生物活性を報告してきた。細胞増殖・細胞周期制御、およびがん抑制遺伝子としての活性 (Kanno et al 1995 EMBO J) 等である。その後、多くのポリコーム遺伝子 KO マウスに共通の表現型として、*Drosophila* では見られなかった血球系・免疫系の異常が観察された事から、リンパ球系の発生・分化におけるエピジェネティック制御に研究の的を絞ってきた。その結果、(1) 未熟リンパ球 (ETP) が1次リンパ組織である胸腺に移動直後に Notch シグナルを受ける最も初期の増殖期において、Notch シグナルの代表的標的遺伝子の *Hes-1* の発現維持に *me1-18* が深く関与している事 (Miyazaki, Kanno et al. J. Immunol 2005), (2) その後の preT 細胞の増殖において *bmi1* (別のポリコーム遺伝子) が細胞の増殖・生存に深く関わっており、CDK Inhibitor である p19ARF 依存的に作用する制御ネットワークである事が判明した (Miyazaki, Kanno et al. Immunity 2008、下図参照)。

Thymic T cell development and Polycomb group genes.



(3) 最近、胸腺のもう一つの構成要素である胸腺上皮細胞 (TEC) の増殖・生存を検討していたところ、やはり *bmi1* が深く関与して

いる事が明らかとなった (Guo, Kanno et al. Eur J. Immunol 2011)。(4) また、ポリコーム蛋白質複合体を精製する過程において、同じ複合体 PRC1 (Polycomb Repressive Complex-1) のサブユニットであると報告されている *Me118* と *Bmi1* が実は別々の複合体サブユニットであり、PRC1.2 と PRC1.4 という2種類のアイソフォームとして Hela 細胞内では共存している事が分かった

現在までに報告されているポリコーム遺伝子群の作用機序は、ほとんどが Hela 細胞等の培養細胞株 (繊維芽細胞) を用いた系がほとんどであり、実際の「胸腺」という免疫系にとって非常に重要な臓器内の細胞種類・微小環境ごとに、どのようなエピジェネティック制御ネットワークが存在するのか、使い分けられているのか、という設問が存在しなかった。

胸腺のリンパ球と上皮細胞の相互作用は、多くの免疫疾患 (特に自己免疫疾患など) の理解、創薬、等にとって非常に重要である。詳細なエピジェネティック制御ネットワークの細胞種 (微小環境) ごとの使い分けの解明を通して、自己免疫疾患、アレルギー等の理解につながる足がかりを得たい。

2. 研究の目的

(研究の全体構想) 本研究は、微小環境ごとのエピジェネティック制御ネットワークの違いを明確にする事にある。1次リンパ組織・胸腺のリンパ球と上皮細胞という2種類の細胞群において、それぞれのエピジェネティック制御ネットワークの違いを明確にし、その機構解析を行う事にある。我々は、既にポリコーム遺伝子群 (蛋白質複合体) による制御が、胸腺内リンパ球と胸腺上皮細胞 (TEC) では全く異なる事を発見している。

3. 研究の方法

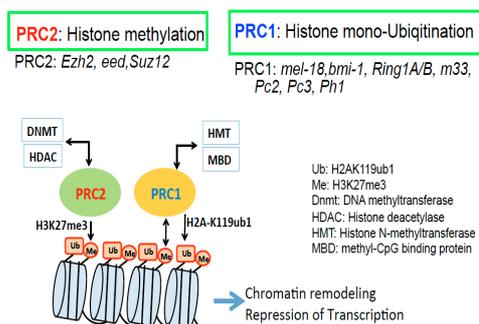
(研究の全体構想) 本研究は、微小環境ごとのエピジェネティック制御ネットワークの違いを明確にする事にある。1次リンパ組織・胸腺のリンパ球と上皮細胞という2種類の細胞群において、それぞれのエピジェネティック制御ネットワークの違いを明確にし、その機構解析を行う事にある。我々は、既にポリコーム遺伝子群(蛋白質複合体)による制御が、胸腺内リンパ球と胸腺上皮細胞(TEC)では全く異なる事を発見している。本計画では3つのサブテーマを行う:

- 1、ポリコーム蛋白質複合体の精製(リンパ球、胸腺上皮細胞、より)
- 2、組織特異的 KO マウスの作成・解析(リンパ球、胸腺上皮細胞、にそれぞれ特異的な KO マウス)
- 3、網羅的な ncRNA, 標的遺伝子の検索

H 2 3 年度

(1) ポリコーム蛋白質複合体の精製
リンパ球と上皮細胞のエピジェネティック制御ネットワークの違いが、そもそも蛋白質複合体の違いによるのか? を検討するために複合体精製を行う。従来情報は全て Hela 細胞由来であり、参考にならない。

Old Concepts of Polycomb Repressive Complexes (PRC)



- Flag-HA-TAG 付きの Mel18, または Bmi1 (PRC1 サブユニット) を導入したリンパ球細胞株、上皮細胞株を樹立する。
- 2ステップカラム法により精製し質量分析機によりサブユニットを同定する

- 単離サブユニットの酵素活性 (HDAC, HAT, E3-UBQ など)、基質特異性を調べる (ヒストン種類など)

既にリンパ球に関しては Pre-T 細胞株 CREM を用いて FlagTag-Bmi1, Flag-Tag-Mel18 を導入し、それぞれ蛋白質複合体の精製に最近成功した。別のリンパ球細胞株 Jurkit 細胞ではなぜか成功出来ていない。胸腺上皮細胞株は何を使うのがベストかまだ不明であり、試行錯誤になると思う。

- (2) 組織特異的 KO マウスの作成・解析、など

胸腺内では未熟(分化段階途中の)リンパ球と胸腺上皮細胞が相互作用しながら環境が出来ていく。そのためエピジェネティック制御因子(ポリコーム蛋白質)の生物学的機能・ネットワークを研究するにあたり、それぞれの組織特異的(リンパ球、上皮細胞-特異的)な遺伝子欠損マウスを用いた解析が必須になる。そのため;

- Flox-mel18, flox-bmi1 の KO マウス作成のため、まず BAC クローンを単離し、KO-construct を作製し、相同組み替え ES 細胞をスクリーニングする。

- (3) 網羅的な ncRNA, 標的遺伝子の検索
リンパ球と、上皮細胞で同一の PRC が異なる制御を受けているとすれば、そのネットワークの違いが標的遺伝子の差異として表れる。
• まずリンパ球と胸腺上皮細胞でそれぞれ wt と bmi1-KO での遺伝子発現プロファイルを網羅的に検索する。

さらに PRC1 の酵素活性は H2A (K119)-monoUbq なのでゲノムワイドな H2A-monoUbq の ChIP-on-chip を行う。

H 2 4 ・ 2 5 年度

- (4) ポリコーム蛋白質複合体の精製、活性検索

 - 胸腺上皮細胞株からの PRC1mel, PRC1bmi

の単離精製を行う。成功しなかった場合は、大量培養ではなく、免疫沈降法により酵素活性の検討を行う。1細胞質量分析技術の導入も検討している。

- ・従来の PRC1 酵素活性以外の検出を試みる
- ・PRC1 に含まれる（または結合する）ncRNA の検出・単離・同定を行う（HOTAIRE と PRC2 の例に習って）。

(5) 組織特異的 KO マウスの作成・解析、など

・floxed マウスの樹立を継続する。Lck-Cre, FoxN1-Cre などは既に手配済みである。さらに胸腺上皮細胞(TEC)の中の mTEC, cTEC 特異的な Cre-Tg を検討する。

・単なる Lck-Cre 等以外にも Cre-ER フージョン遺伝子 Tg を用い、時間・空間特異的 KO マウスとしてより詳細な解析(in vitro 培養系において)を行い、リンパ球分化、TEC 分化・増殖への関与をアッセイする。

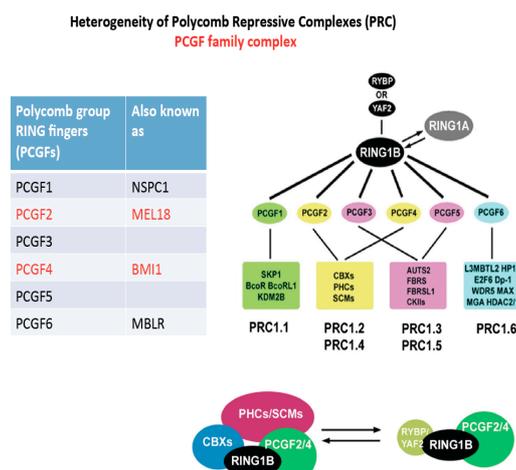
(6) 網羅的な ncRNA, 標的遺伝子の検索もし、リンパ球と、上皮細胞で、同じ PRC1 がそんざいしているとしても、何故制御ネットワークは異なるのであろうか？ 一つの可能性は、PRC1 を標的部位へリクルートする分子・因子が異なる可能性がある。その候補の可能性敵のは ncRNA である。最近 Hox 遺伝子群 ncRNA である HOTAIRE が、PRC2 と結合している事が報告された。つまり、結合する ncRNA が変われば標的遺伝子も変わることになる。そこで；

・リンパ球と胸腺上皮細胞で（それぞれ wt と bmi1-KO で）PRC1 と結合する ncRNA を検索する。ChIP の後（または単純な免疫沈降の後）、複合体に含まれる RNA 分子を増幅し塩基配列を決定する。その結果として当該 ncRNA が同定できると考えている

4. 研究成果

(1) ポリコーム蛋白質複合体の精製・活性ポリコームタンパク質複合体 PRC1 は、最近、

下図の様に、多様な存在様式を示す事が分かった。

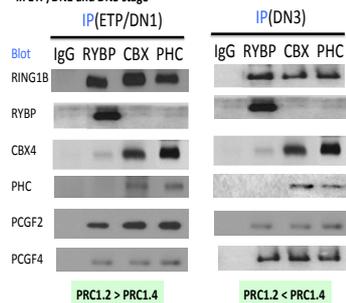


そこで、実際に、胸腺 T 細胞の分化段階の DN1(ETP)と DN3 においてその存在様式を確認するための実験を行った。

胸腺の ETP は細胞数が少なく、タンパク質複合体の免疫沈降実験を 1 回行うために、new born または 4 週令マウスを 200 匹程度使用し、1 回の免疫沈降実験が出来た。その結果（下図参照）

Question: What is a role of PRC1 heterogeneity for Thymic T cell development?

Heterogeneity and balance of PRC complexes (between PRC1.2 and PRC1.4) in ETP/DN1 and DN3 stage

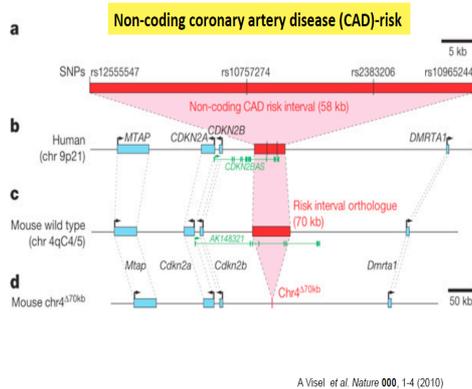


やはり ETP では PRC1.2 が多く存在し、DN3 では PRC1.4 が多く存在する事が分かった。その事が、それぞれ、me1-18(PCGF1.2) KO マウスと bmi1(PCGF1.4) KO マウスの表現型の出現場所が異なる事につながる事が分かった。

(2) 組織特異的 KO マウスの作成・解析
 組織特異的 Polycomb 遺伝子群 KO マウスの鎖悪性を試み、mel-18 floxed マウス、eed-floxed マウス、Ezh2-floxed マウスを準備できた。しかし、bmi1-floxed マウスの作成は、BAC クローンからの組替えプラスミド作成が非常に困難で、断念した。現在これら floxed マウスと Lck-cre Tg, CD4-cre Tg, Fox N1-cre Tg, ERT-Cre Tg, などとの交配が進行中である。

(3) long-ncRNA, 標的遺伝子の検索
 ヒトでは ANRIL という lncRNA と PRC2 が結合する事が報告された。それと位置的に同じマウス lincRNA-AK148321 を同定した。

Possibility: Differential expression of ANRIL-like lincRNA in the thymus (mouse) ?



実際に、胸腺 T 細胞と胸腺上皮細胞での lincRNA-AK148321 の発現レベルを検討した。

Results-4 Quantitative RT-PCR measurement of lincRNA-AK148321 in Thymus

sample	Calc.conc (ng/reaction)
E15 thymocyte (exp-1)	0.511
(exp-2)	0.068
(exp-3)	0.155
cTEC	0.005
mTEC	Not detected

It seems that lincRNA-AK148321 is expressed very low level in thymus, however, thymocytes express it more than TEC do.

We will see the in vivo analysis with chr4Δ70Kb mice for the requirement of p19Arf.

発現量は低いながら、胸腺 T 細胞での発現が確認された。上皮細胞ではほとんど発現していなかった。この事が、胸腺 T 細胞と胸腺上皮細胞での Polycomb 遺伝子群の関与の違い、標的遺伝子制御の差異になっていると考えられた。

現在、対応する染色体領域を欠損したマウス Chr4 delta70Kb の導入を検討している。

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 5 件)

1. Atsumi Y., Inase A., Osawa T., Sugihara E., Sakasai R., Fujimori H., Teraoka H., Saya H., Kanno M., Tashiro F., Nakagama H., Matsuntani M. and Yoshioka K., Arf/p53 module, which induces apoptosis, downregulates histone H2AX to allow normal cells to survive in the presence of anti-cancer drugs **J. Biol. Chem** 査読有 288(19): (2013) 13269-77. (doi: 10.1074/jbc.M112.402560)

2. **Sugihara E.**, Shimizu T, Kojima K, Onishi N, Kai K, Ishizawa J, Nagata K, Hashimoto N, Honda H, Kanno M., Miwa M, Okada S, Andreeff M, Saya H.

Ink4a and Arf are crucial factors in the determination of the cell of origin and the therapeutic sensitivity of Myc-induced mouse lymphoid tumor. **Oncogene.** 査読有 7;31(23): (2012) 2849-61. (doi: 10.1038/onc.2011.462)

3. Kurogi T, Inoue H, Guo Y, Nobukiyo A, Nohara K, and Kanno M
 A methyl-deficient diet modifies early B

cell development

Pathobiology 査読有 79: (2012) 209-218
(doi: 10.1159/000337290.)

4. Janakiraman H, Nobukiyo A, Inoue H, **Kanno M**

Mel-18 controls the enrichment of tumor-initiating cells in SP fraction in mouse breast cancer.

Hiroshima J Med Sci. 査読有 60(2): (2011) 25-35

http://ir.lib.hiroshima-u.ac.jp/metadb/up/kiyo/AA00664312/HiroshimaJMedSci_60_25.pdf

5. Guo Y, Miyazaki M, Itoi M, Satoh R, Iwama A, Amagai T, Kawamoto H, **Kanno M** Polycomb group gene *Bmi1* play a role in the growth of thymic epithelial cells

Eur J.Immunol 査読有 41: (2011) 1098-1107

(doi: 10.1002/eji.201040794.)

[学会発表] (計 10 件)

1. **M. Kanno**, Y. Guo, W. S. Kong, A. Nobukiyo, and H. Inoue

Heterogeneity of Polycomb repressive complexes and long-noncoding RNA dictate the regulation network of thymic T cell development

15th International congress of Immunology 2013 August 22-27 Milan/Italy

2. **M. Kanno**, A. Nobukiyo, Y. Ohno, Y. Takihara and Y. Guo Polycomb

Connection between Coronary Artery Disease Risk and Irradiation-Regeneration process of Thymus via Long-noncoding RNA 3rd International Symposium of RIRBM,

Hiroshima University

12-13, Feb. 2013 Hiroshima Japan

3. 大澤 智之, 熱海 悠子, 杉原 英志, 佐谷 秀行, **菅野 雅元**, 田代 文夫, 益谷 美都子, 吉岡 研一

Arf と p53 に依存的なヒストン H2AX の低下と静止状態

第 3 5 回日本分子生物学会 2012 年 12 月 1 1-1 4 日, 福岡国際会議場

4. 熱海 悠子, 稲瀬 安希, 杉原 英志, 佐谷 秀行, **菅野 雅元**, 益谷 美都子, 吉岡 研一

抗癌剤存在下での優先的な癌細胞死と正常細胞の生存に資する Arf/p53 依存的 H2AX 制御機構

第 3 5 回日本分子生物学会 2012 年 12 月 1 1-1 4 日, 福岡国際会議場

5. 熱海 悠子, 稲瀬 安希, 杉原 英志, 佐谷 秀行, **菅野 雅元**, 益谷 美都子, 吉岡 研一

抗癌剤存在下での優先的な癌細胞死と正常細胞の生存に資する Arf/p53 依存的 H2AX 制御機構

第 3 5 回日本分子生物学会 2012 年 12 月 1 1-1 4 日, 福岡国際会議場

6. 土谷 佳弘, 金本 麻裕, 浅野 知一郎, **菅野 雅元**, 鎌田 英明

UV に応答した核内の IKKbeta を介した NF-kappaB 活性化と細胞死

第 3 5 回日本分子生物学会 2012 年 12 月 1 1-1 4 日, 福岡国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 雅元 (KANNO MASAMOTO)

広島大学・医歯薬保健学研究院 (医)・教授
研究者番号 : 40161393