

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10987

研究課題名(和文) 炎症性疾患におけるエピジェネティクス制御機構の解明と臨床応用

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of cytokine gene expression and clinical applications in inflammatory diseases

研究代表者

関亦 正幸 (SEKIMATA, MASAYUKI)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80250190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、サイトカイン遺伝子の発現調節に関わるエピゲノム状態を人為編集することで、サイトカイン産生を適切に制御する炎症制御法の創成を目指している。IL-22遺伝子発現調節に関わる新規エンハンサーを同定したところ、転写因子Runx1とROR $\gamma$ tと協調して転写増強に関与していることが判明した。このエンハンサー機能を適切に制御する方法を確立できれば、炎症発症の原因究明と治療法の確立の一助になることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：IL-22 is a cytokine that plays a pivotal role in regulating tissue homeostasis at barrier surfaces. Currently, the molecular mechanisms regulating IL22 gene expression are still unclear. Here, we have identified a crucial cis-regulatory element (CNS-32). We demonstrated that CNS-32 acts as an enhancer in reporter assays and contains binding motifs for Runx1 and ROR  $\gamma$  t. Mutation of these motifs significantly abrogated the reporter activity, suggesting a role for both factors in the control of enhancer-mediated IL22 expression. Overexpression of Runx1 promoted IL-22 production by inducing ROR  $\gamma$  t and IL-23 receptor, all critical to Th22 cell induction. Although Runx1 alone enhanced IL-22 production in Th22 cells, it was further enhanced in the presence of ROR  $\gamma$  t. Collectively, our results suggest that IL-22 production is controlled by a regulatory circuit in which Runx1 induces ROR  $\gamma$  t and then partners with ROR  $\gamma$  t to direct IL22 expression through their targeting of the IL22 enhancer.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：炎症制御 遺伝子発現 サイトカイン クロマチン構造 エピジェネティクス エピゲノム編集 シス  
調節領域 転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

敗血症などの炎症性疾患は、ヘルパーT細胞による過剰なサイトカイン産生が原因で発症するが、有効な治療法は確立していない。本研究は、サイトカイン遺伝子の発現調節に関わるエピゲノム状態（特に、改変可能な可逆的な高次クロマチン構造）を人為編集することで、サイトカイン産生を適切に制御する安全で効率的な炎症制御法の創成を目指している。

サイトカイン遺伝子の発現は、プロモーターとエンハンサーなどのシス調節領域との相互作用により形成される高次クロマチン構造により調節されている。そこで、本研究では、IFN- $\gamma$ -IL-22 遺伝子座に着目した。この遺伝子座には、IFN- $\gamma$  の他に炎症性サイトカインとしてインターロイキン (IL-22) が並列して存在している。これらのサイトカインを産生するT細胞は本来異なっており、2遺伝子同時に発現することがないよう厳密な制御を受けている。しかし、多くの自己免疫疾患ではIFN- $\gamma$  とIL-22の同時発現という異常がみられ、これら炎症促進の相乗効果が炎症発症の一因と考えられている。

これまでの申請者らの研究で、IFN- $\gamma$  遺伝子近傍のエンハンサーやインスレーターを同定し、その機能を明らかにした。本研究ではさらに、IL-22 遺伝子発現調節に関わる新規エンハンサーの同定を進めた。さらに、これらのIL-22 エンハンサー領域に特異的に結合する転写因子の同定も進めた。次いで、これら2つのサイトカイン遺伝子の発現ユニットを分離し厳密に個別制御しているインスレーター機能の生理的な役割を解明するために、これらインスレーター領域を欠損したゲノム編集マウスを作製し、マウス個体での解析を進めた。

本研究の推進により、IFN- $\gamma$ -IL-22遺伝子座のエンハンサーおよび結合転写因子の機能、さらにはインスレーター機能が解明されれば、炎症発症の原因究明と治療法の確立の一助になることが期待できる。

## 2. 研究の目的

我々を含めた多くの研究者の解析から、サイトカイン遺伝子の発現は、プロモーターとエンハンサーなどのシス調節領域との相互作用により形成される細胞分化特異的高次クロマチン構造により調節されると考えられている。本研究では、サイトカイン遺伝子発現調節に関与するシス調節領域と、シス調節領域のゲノム機能を制御している転写因子をとともに同定することで、過剰な炎症反応の原因となっているサイトカイン異常発現の原因を究明し、これらの調節機能を適切に制御できる方法を確立することで安全な炎症制御法を確立することを研究目的としている。

そこで、IFN- $\gamma$ -IL-22 遺伝子座に含まれる2つのサイトカイン (IL-22 と IFN- $\gamma$ ) の発現開始時、発現調節に必要な高次クロマチン構造の形成に関与する新規エンハンサーやインスレーターなどのシス調節領域の同定を進めた。さらに研究を進展させるために、我々が新規に同定したエンハンサーに特異的に結合する転写因子の検索を行った。

## 3. 研究の方法

シス調節領域の網羅的スクリーニングが可能な次世代シーケンサーを用いた新規スクリーニング法である Self-transcribing active regulatory region-sequencing (STARR-seq 法) を駆使して、IL-22 遺伝子近傍の新規エンハンサーの同定を進めた。

さらに研究を進展させるために、我々が新規に同定したエンハンサーに特異的に結合する転写因子の結合配列を、データベース検索に基づいたアルゴリズム解析法 (Genomatix) により同定した。

マウスT細胞の初代培養細胞を行い、これらの細胞を分化させることで、T細胞レベルで同定したエンハンサーと転写因子の機能解析を行った。さらに、マウス個体レベルでのシス調節領域の機能を明らかにする目的で、これらの機能領域を CRISPR/Cas9 ゲノム編集法で欠損させたマウスを作製し、欠損による効果を解析した。

## 4. 研究成果

シス調節領域の網羅的スクリーニング法である Self-transcribing active regulatory region-sequencing (STARR-seq 法) を駆使して、IL-22 遺伝子座に新規エンハンサーの同定を進めた。その結果、IL-22 遺伝子上流 32kb に新規エンハンサーを同定できた (図1)。レシフェラーゼ転写活性測定法で解析したところ、このエンハンサーはIL-22 遺伝子のプロモーターに作用することで転写活性を強く促進していることが確認できた (図2)。

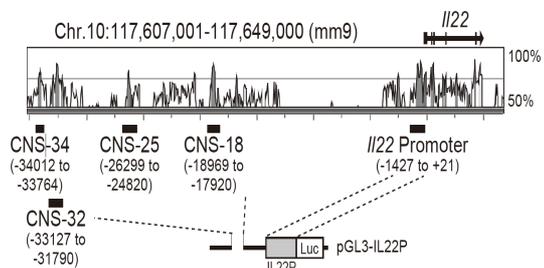


図1. IL-22 エンハンサーの検索

さらに研究を進展させるために、我々が新規に同定したこのIL-22 遺伝子エンハンサーに特異的に結合する転写因子を、Genomatix プログラムを駆使して検索した。その結果、その他多くのヘルパーT細胞サブセットの機能調節に関わる転写因子として知られて

いる Runx1 と ROR $\gamma$ t が、このエンハンサーに特異的に結合し、転写活性の増強に関与していることが明らかになった。これにより、IL-22 遺伝子は、上流 32kb に新規エンハンサーと Runx1 と ROR $\gamma$ t との結合により転写調節されていることが判明した (図 3)。

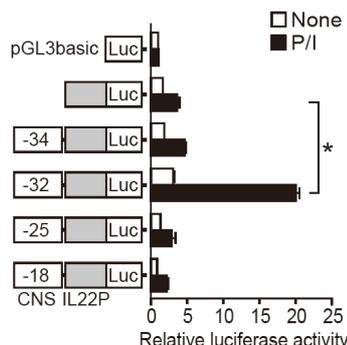


図 2 . IL-22 エンハンサー活性の同定

一方で、IFN- $\gamma$  遺伝子は、転写因子 T-bet が IFN- $\gamma$  エンハンサーに結合することで転写調節されている。そこで、これら 2 遺伝子の中間に位置するインスレーター配列をゲノム編集により欠損したマウスを作製し、両遺伝子の発現調節に与える影響を解析した。その結果、インスレーター欠損により、厳密な発現制御に異常をきたし、本来発現しない T 細胞において IL-22 遺伝子発現が見られ、一方で IFN- $\gamma$  遺伝子発現が下がるという制御異常が観察された。これまでの研究で、新規エンハンサーとその結合転写因子 Runx1 と ROR $\gamma$ t を同定でき、さらに、これらのユニットを分離しているインスレーターの機能をあきらかに出来たことから、IFN- $\gamma$ -IL-22 遺伝子座の関与する炎症制御機構の解明という目標に向けて、さらなる研究の進展が期待できると考える。

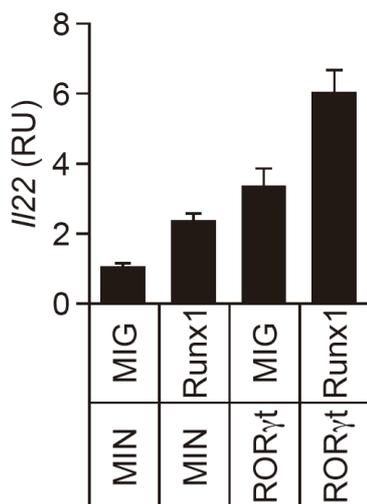


図 3 .Th22 細胞における Runx1 と ROR $\gamma$ t による IL22 遺伝子の転写活性化

本研究の最終目的は、サイトカイン遺伝子の発現調節に関わるエピゲノム状態 (特に、高次クロマチン構造) を人為編集することで、サイトカイン産生を適切に制御する安全で効率的な炎症制御法の創成することにある。本目標遂行のため、今後は同定した新規エンハンサーと転写因子 Runx1 と ROR $\gamma$ t が、どのようなメカニズムで発現に必要な T 細胞分化特異的な高次クロマチン構造を形成できるのか、その分子機構の解明を進める。そのために、高次クロマチン構造の解析に必要な chromosome conformation capture 法を駆使し分化特異的な高次クロマチン構造の決定を行う。解明後は、この高次クロマチン構造を分子標的としたエピゲノム編集法の確立を目指す。このエピゲノム編集法を用いてマウスモデルで検証実験を行い、炎症制御に向けた治療法の確立を目指す。

## 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)

Nakano, T., Matsui, H., Tanaka, T., Hozumi, Y., Iseki, K., Kawamae, K., Goto, K. Arachidonoyl-specific diacylglycerol kinase  $\epsilon$  and the endoplasmic reticulum. *Front. Cell Dev. Biol.* 4:132 (2016) 査読あり, doi: 10.3389/fcell.2016.00132

Hayasaka, Y., Nogawa, H., Sekimata, M., Murakami-Sekimata, A. The effects of neuregulin1 and/or fibroblast growth factor 1 on the differentiation of mouse embryonic submandibular gland ex vivo culture cells. *Bulletin of Yamagata University (Medical Science)*. 34, 42-49 (2016) 査読あり, doi: なし

Iwazaki K., Tanaka T., Hozumi Y., Okada M., Tsuchiya R., Iseki K., Topham MK., Kawamae K., Takagi M., Goto K. DGK $\zeta$  downregulation enhances osteoclast differentiation and bone resorption activity under inflammatory conditions. *J Cell Physiol.* 232, 617-624 (2017) 査読あり, doi: 10.1002/jcp.25461

Nakao, A., Inaba, T., Murakami-Sekimata, A., Nogawa, H. Morphogenesis and mucus production of epithelial tissues of three major salivary glands of embryonic mouse in 3D culture. *Zoolog. Sci.* 34, 475-483 (2018) 査読あり doi: 10.2108/zs160177

Tanaka, T., Iseki, K., Tanaka, K., Nakano, T., Iino, M., Goto, K. DGK $\zeta$  ablation engenders upregulation of p53 level in the spleen upon whole-body ionizing radiation. *Adv. Biol. Regul.* 67, 93-100 (2018) 査読あり doi: 10.1016/j.jbior.2017.09.010

〔学会発表〕(計5件)

**関亦正幸**、**伊関憲**、**関亦明子**、STARR-seq法で同定したエンハンサーと転写因子Runx1によるエピジェネティックなIL-22遺伝子発現制御機構。第39回日本分子生物学会2016.10.30-12.2. パシフィコ横浜

**関亦明子**、早坂勇人、野川宏幸、**関亦正幸**、マウス胎児顎下腺上皮組織の体外培養におけるneuregulin 1とfibroblast growth factor 1の細胞分化への作用。第89回日本組織培養学会。2016.5.25-26. 大阪千里ライフサイエンスセンター

吉田大貴、**伊関憲**、**関亦明子**、**関亦正幸**、インターロイキン9(IL9)遺伝子サイレンサーと転写因子Runx1によるエピジェネティックなIL9転写調節機構の解明。第40回日本分子生物学会。2017.12.6-9. 神戸ポートアイランド

**関亦明子**、阿蘇裕子、椎名裕美、本間千明、柳橋志帆、**関亦正幸**、唾液腺保護ケア開発を目指したマウス唾液腺培養モデル構築の試みにおけるSerum Replacementの効果について。第5回看護理工学会学術集会。2017.10.14-15. 金沢大学

**関亦明子**、野川宏幸、**関亦正幸**、マウス胎児顎下腺原基上皮細胞の無血清培地による炭層化培養の試み。第90回日本組織培養学会。2017.6.30-7.1. 岡山理科大学

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関亦 正幸 (SEKIMATA MASAYUKI)  
福島県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：80250190

(2) 研究分担者

伊関 憲 (ISEKI KEN)  
福島県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70332921

関亦 明子 (SEKIMATA AKIKO)  
山形大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：50321823

(3) 連携研究者

( )

(4) 研究協力者

( )