

平成21年 4月 8日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17390101
 研究課題名(和文) 自己免疫疾患関連遺伝子 ZFAT 及び ZFAT に制御される免疫疾患関連遺伝子群の解明
 研究課題名(英文) Elucidation of the immune-related genes regulated by ZFAT

研究代表者

白澤 専二 (SHIRASAWA SENJI)
 福岡大学・医学部・教授
 研究者番号 10253535

研究成果の概要：ZFAT 遺伝子は魚類からヒトに至るまで高度に保存された遺伝子であり、発生初期に不可欠な遺伝子であることが明らかとなった。ZFAT は正常 T, B 細胞および白血病細胞株で発現しており、ZFAT 機能解析からアポトーシス制御機構に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。ZFAT-DNA 相互作用解析では、網羅的な基礎データの創出を行い、ZFAT の転写制御に関するネットワーク解明への基盤を構築した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	3,800,000	0	3,800,000
2006年度	3,500,000	0	3,500,000
2007年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
総計	14,300,000	2,100,000	16,400,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：自己免疫性甲状腺疾患(AITD)、ZFAT、転写因子、ネットワーク、ChIP、発現アレイ解析

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らが自己免疫性甲状腺疾患(AITD)感受性遺伝子として同定した新規の免疫系転写制御因子ZFAT(zinc-finger gene in AITD susceptibility region)の生理機能の解明、標的遺伝子群の同定および転写制御機構の解明はAITDの病因解明のために重要な課題である。研究開始当初、ZFAT遺伝子が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ていること、免疫担当細胞およびBa/F3などのいくつかの細胞株で発現していることを明らかにしており、さらに、ZFAT遺伝子改変マウスを樹立しつつあった。我々は、この新規自己免疫疾患関連遺伝子ZFATがどのような標的遺伝子群を転写制御し、生体内でどのような機能を果たしているのかを解明し、自己

免疫疾患の病因解明とその理解に立脚した新規治療法開発のための基盤を構築することを旨とし、本研究に着手するに至った。

2. 研究の目的

自己免疫疾患関連遺伝子 ZFAT の機能を細胞レベル・個体レベルで解明することを目的とする。この目的の達成のために、培養細胞レベルおよび正常マウス・遺伝子改変マウス由来の免疫担当細胞レベルにおいて、ZFAT により直接的あるいは間接的に発現制御される遺伝子群を発現アレイ解析により同定し、さらに、ZFAT が結合する DNA 領域をゲノム上より同定することを行い、転写因子 ZFAT のネットワークを解明する。これらの解析を通じて得られた所見に基づき、自己免疫疾患の病因解明と新規治療法開発のための基盤構築に資することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 発現様式解析

6 週齢 C57BL6/J の各組織を摘出し、RIPA にて抽出したタンパク質を、独自に樹立したポリクローナル抗体 (ZFAT-C 末端部位 (164 アミノ酸残基) を抗原) を用いて、Western Blot 解析を行った。またマウス C57BL6/J 脾細胞およびヒト末梢血においても、磁気ビーズにて分画後、同様に Western Blot 解析を行った。

(2) 発現アレイ解析

ZFAT を強制発現させた Ba/F3 細胞、および siRNA により ZFAT を抑制させた Ba/F3 細胞から RNA を抽出後、ラベル化した cRNA を Affymetrix 社製 GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array にハイブリダイズした。変動遺伝子群の取得および Ontology 解析等のデータ解析は GeneSpring にて行った。

(3) アポトーシス解析

ヒト白血病細胞株 MOLT4 に ZFAT siRNA をエレクトロポレーションにより導入し、ZFAT 発現抑制時のアポトーシス解析

を行った。Annexin V 染色後、Annexin V 陽性細胞を FACS Calibur (BD) にて測定した。Caspase 8,9 および 3 活性は Caspase-Glo Assay (Promega) にて測定した。

(4) ChIP-chip 解析

C57BL6/J 脾細胞より磁気ビーズにて分離した CD4⁺ T 細胞を、抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体にて刺激した。刺激後、ZFAT 発現亢進時において、新規に樹立した ZFAT モノクローナル抗体 (M16 : ZFAT 中心領域を抗原) を用いて、ZFAT ChIP DNA を調製した。ChIP DNA を in vitro transcription (IVT) 法により増幅し、コントロールとして Rat IgG で同様の操作を行ったものを用いて、Affymetrix 社製 GeneChip[®] Mouse Promoter 1.0R Array にハイブリダイズし、TAS/IGB にて解析した。

(5) レポーターアッセイ

(4) ChIP-chip 解析にて得られた ZFAT 相互作用候補領域を 600bp DNA プローブおよび、さらに分割した 200bp DNA プローブを用いて、HEK293 におけるレポーターアッセイを実施した。

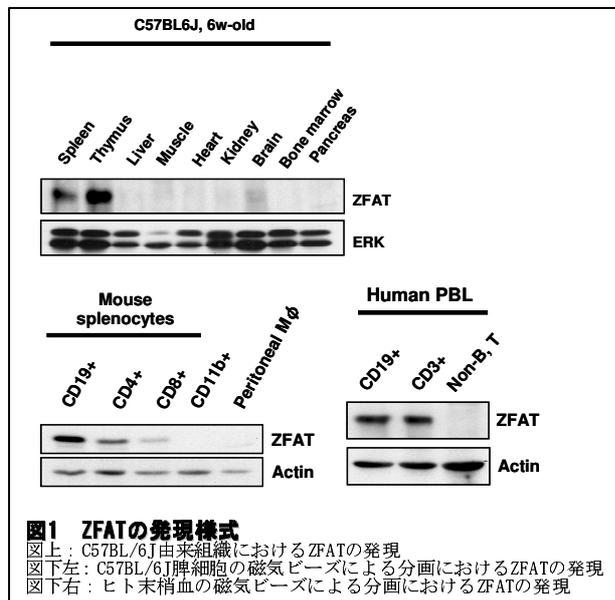
4. 研究成果

(1) ZFAT の組織別発現解析

ZFAT-C 末端部位 (164 アミノ酸残基) を抗原とするポリクローナル抗体を樹立し、マウス免疫組織における内在性 ZFAT タンパクの発現量を western 法で解析した。ZFAT タンパクは調べた 9 種類の組織の中では脾臓および胸腺で顕著に多く、骨髄、腎臓を含む他の 7 組織では殆ど検出されなかった。また表面抗原で分離した細胞集団 (CD19⁺ B 細胞、CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞、CD11b⁺ 細胞など) を対象に western 解析を行った結果、マウス脾臓およびリンパ節では ZFAT は B 細胞および T 細胞にほぼ特異的に発現していること、マウス胸腺では CD4⁺ CD8⁺ T 細胞以後の分化段階で発現が強くなることが明らかとなった。

(Koyanagi M, et al. *Genomics* (2008), 91(5):451-7)。

またヒト末梢血においても T, B 細胞に特異的に発現していることを確認した。(図 1)



(2) 発現アレイ解析 (Ba/F3 cell)

① Ba/F3 cell における ZFAT 強制発現系での発現アレイ解析

発現変動遺伝子群の Ontology 解析では、ZFAT の強制発現により、発現が抑制される遺伝子群に免疫に関与する遺伝子カテゴリーが、多数含まれていることが明らかとなり、ZFAT が免疫応答において重要な役割を担うことが示唆された。

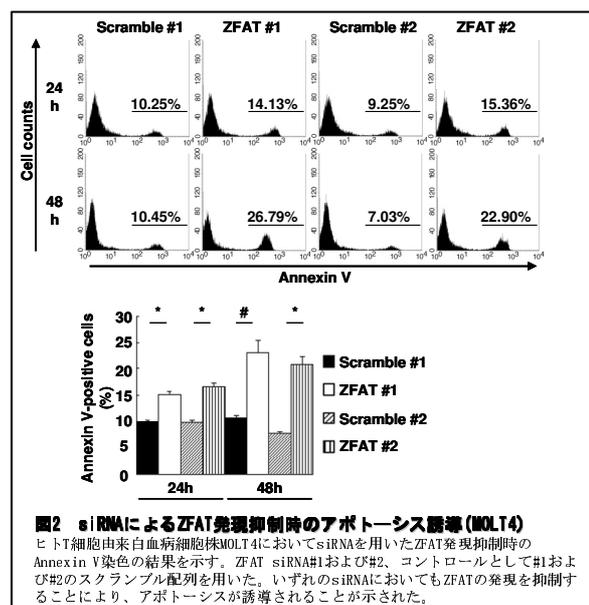
(Koyanagi M, et. al. *Genomics*, 91(5):451-7, 2008)

② Ba/F3 cell における siRNA による ZFAT 抑制時の発現アレイ解析

ZFAT 標的配列に対して異なる 2 種の siRNA (コントロール siRNA はそれぞれの siRNA のスクランブル配列) を Ba/F3 に導入し、ZFAT 発現抑制時の発現アレイ解析を行った。その結果、ZFAT 発現抑制時では細胞の分化・増殖に関連する遺伝子群が変動することが示され、細胞分化・増殖に関する機能が示唆された。(Koyanagi M, et.al. *Med.Bull.Fukuoka univ.*, 35(4)187-191, 2008)

(3) ヒト T 細胞における ZFAT 機能解析

ZFAT はヒト末梢血においてもマウスと同様に T 細胞に発現が確認されていることから、ZFAT が発現しているヒト T 細胞由来白血病細胞株 MOLT4 の系において ZFAT の機能解析を行った。ZFAT 標的配列に対して異なる 2 種の siRNA (コントロール siRNA はそれぞれの siRNA のスクランブル配列) を MOLT4 に導入し、ZFAT の発現を抑制した。ZFAT 発現抑制時では細胞増殖率の低下、Sub-G1 期の増加およびアポトーシス陽性細胞数の増加 (アネキシン V 染色) が認められた。(図 2) さらに詳細にアポトーシス経路について検討した結果、ZFAT 発現抑制細胞群では caspase8 および caspase9 の活性が亢進しており、活性型 caspase3 においても亢進が認められ、caspase 阻害剤 Z-VAD により細胞増加率の低下は完全に解消された。(Fujimoto T, et. al. *FEBS Lett.*, 583(3):568-72., 2009)



(4) ZFAT ChIP-chip 解析 (TCR 刺激時のマウス CD4⁺T 細胞)

野生型C57BL/6由来CD4⁺T細胞の in vitro TCR刺激 (抗CD3抗体および抗CD28抗体) により、T細胞の芽球化に一致してZFAT発現量が一過性に亢進することを見出した (図3)。

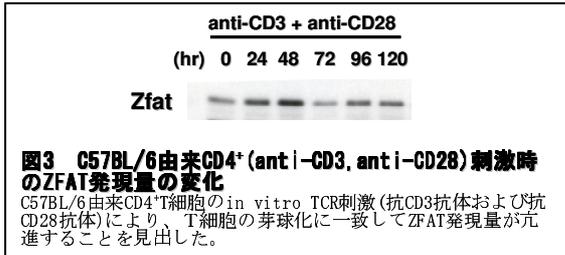


図3 C57BL/6由来CD4⁺(anti-CD3, anti-CD28)刺激時のZFAT発現量の変化
C57BL/6由来CD4⁺T細胞のin vitro TCR刺激(抗CD3抗体および抗CD28抗体)により、T細胞の芽球化に一致してZFAT発現量が亢進することを見出した。

また、変性 ZFAT 蛋白をよりよく免疫沈降させる抗 ZFAT 抗体の樹立を試みた結果、M16 抗体を樹立することに成功した(図 4)。

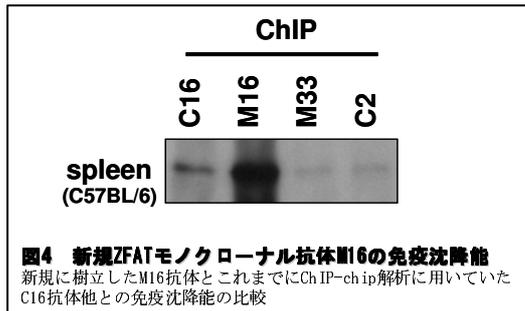


図4 新規ZFATモノクローナル抗体M16の免疫沈降能
新規に樹立したM16抗体とこれまでにChIP-chip解析に用いていたC16抗体他との免疫沈降能の比較

この免疫沈降能の優れたM16抗体を用いて、マウスCD4⁺T細胞のin vitro TCR刺激後のZFAT発現量亢進時のChIP-chip解析((クロマチン免疫沈降(ChIP : Chromatin Immunoprecipitation)とマイクロアレイを組み合わせた網羅的な解析法))によりZFAT-DNA相互作用部位の同定を試みた。ZFAT ChIP DNAはin vitro transcription (IVT)法により増幅し、コントロールとしてRat IgGで同様の操作を行ったものを用いて、Affymetrix社製GeneChip[®]Mouse Promoter 1.0R Array(25500以上のマウスプロモーター領域の5'転写開始部位の約6kb上流から約2.5kb下流までカバー)にハイブリダイズし、TAS/IGBにて解析した。複数回のChIP-chip解析を行い、重複して同定された39の領域を候補領域(図5)とし、その候補領域近傍遺伝子(41 genes)に関して、さらなる検証を進めた。

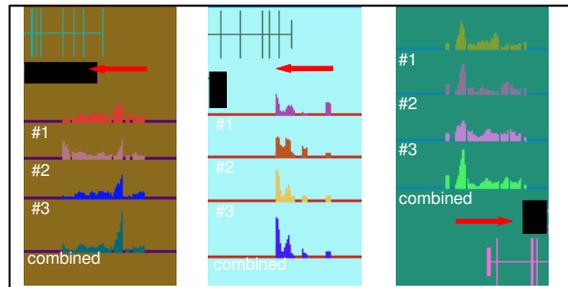


図5 M16抗体を用いたChIP-chip解析における候補領域近傍遺伝子のpositive領域(抜粋)
マウスCD4⁺T細胞のin vitro TCR刺激後のZFAT発現量亢進時において、M16によるChIP-chip解析を複数回実施した。図中の波形はプロモーターアレイ解析(TAS/IGB)による候補領域近傍遺伝子(抜粋)のpositive領域を示す。

(5) レポーターアッセイ

ChIP-chip法で得られた39個のZFAT制御候補領域について、レポーターアッセイによるDNA結合能に関する検証を行った。HEK293 cellにZFATを強制発現させ、600bp DNAプローブを用いたレポーターアッセイを行った。それらのうちポジティブであった600bp DNAプローブをさらに200bpに縮小したDNAプローブを作製し、同様にアッセイを行った。その結果、ZFAT相互作用標的遺伝子として、アポトーシス、転写関連遺伝子等を含む候補遺伝子を取得した(図6)。得られた遺伝子群のネットワーク解析からZFATがアポトーシス、癌関連遺伝子機能制御などの細胞機能維持に重要な分子の制御に関与することが示唆された。本研究ではZFATの機能解析および転写制御ネットワーク解明への基盤構築において新たな知見を得ることができたが、今後、さらなる詳細なZFATを中心とした転写制御機構を解明および機能解析が期待され、それらの理解に基づく自己免疫疾患の病因解明と新規治療法開発が期待される。

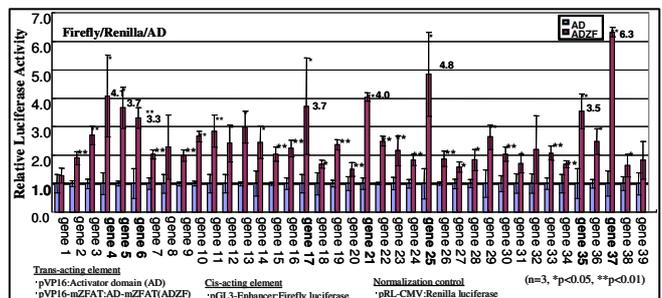


図6 レポーターアッセイ(抜粋)
ChIP-chip解析におけるポジティブ領域を分割したDNAプローブとZFATタンパク質のHEK293細胞におけるレポーターアッセイ(未発表)

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 6 件)

- ①Fujimoto T, Doi K, Koyanagi M, Tsunoda T, Takashima Y, Yoshida Y, Sasazuki T, Shirasawa S. ZFAT is an antiapoptotic molecule and critical for cell survival in MOLT-4 cells., *FEBS Lett.*, 査読有, 583(3):568-72., 2009
- ②Koyanagi M, Doi K, Fujimoto T, Tsunoda T, Takashima Y, Shirasawa S. Functional Analysis of ZFAT through Specific siRNA against ZFAT in Ba/F3 cell Line., *Med.Bull.Fukuoka univ.*, 査読有, 35(4):187-191, 2008
- ③Koyanagi M, Nakabayashi K, Fujimoto T, Gu N, Baba I, Takashima Y, Doi K, Harada H, Kato N, Sasazuki T, Shirasawa S. ZFAT expression in B and T lymphocytes and identification of ZFAT-regulated genes., *Genomics*, 査読有, 91(5):451-7, 2008
- ④ Sugiyama S, Nakabayashi K, Baba I, Sasazuki T, Shirasawa S. Role of epiregulin in peptidoglycan-induced proinflammatory cytokine production by antigen presenting cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 337(1):271-274., 2005
- ⑤ Hiratani H, Bowden DW, Ikegami S, Shirasawa S. Shimizu A, Iwatani Y, Akamizu T. Multiple SNPs in intron 7 of thyrotropin receptor are associated with Graves' disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90(5), 2898-2903, 2005
- ⑥Kochi Y, Yamada R, Suzuki A, Harley JB, Shirasawa S. Sawada T, Bae S-C, Tokuhira S, Chang X, Sekine A, Takahashi A, Tsunoda T, Ohnishi Y, Kaufman KM, Kang CP, Kang C, Otsubo S, Yumura W, Mimori A, Koike T, Nakamura Y, Sasazuki T, Yamamoto K. A functional variant in *FcRL3*, encoding Fc

Receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities. *Nature Genet.* 37 (5):478-485, 2005

[学会発表] (計 9 件)

- ①Yasuo Takashima, Midori Koyanagi, Keiko Doi, Iwai Baba, Yoko Tanaka, Toshiyuki Tsunoda, Takahiro Fujimoto, Kazuhiko Nakabayashi, Takehiko Sasazuki, Senji Shirasawa 「Genome-wide survey of ZFAT-regulated genes in antigen-primed CD4+ T cell」第 31 回日本分子生物学会 神戸 2008 年 12 月 11 日
- ②白澤専二. 生命科学と創薬シーズの探索. 第 40 回日本臨床分子形態学会, 福岡, 10 月 3-4 日, 2008(招待口演—国内学会・研究会)
- ③角田俊之, 小柳 緑, 藤本崇宏, 馬場 賀, 中林一彦, 土井佳子, 高島康郎, 吉田康浩, 笹月健彦, 白澤専二 「B および T 細胞における ZFAT の発現とその制御因子の解析」日本人類遺伝学会第 52 回大会, 東京, 9 月, 2008
- ④中林一彦, 藤本崇弘, 馬場賀, 小柳緑, 顧寧, 土井佳子, 加藤規弘, 笹月健彦, 白澤専二 「免疫系転写関連因子 ZFAT の転写ネットワークの解明」日本人類遺伝学会第 52 回大会 2007 年 9 月
- ⑤中林一彦, 馬場賀, 藤本崇弘, 加藤規弘, 笹月健彦, 白澤専二 「新規免疫系転写因子 ZFAT・TR-ZFAT を軸とする転写ネットワークとその生理機能の解明」、日本人類遺伝学会第 51 回大会 2006 年 10 月
- ⑥ Shirasawa S., Genome Analysis on Autoimmune Thyroid Disease. *The 6th HUGO-Pacific Meeting & the 7th Asia-Pacific Conference on Human Genetics.* Taipei, March 7-10, 2006(招待口演—国際学会・研究会)
- ⑦中林一彦, 杉山滋, 馬場賀, 加藤規弘, 赤水尚志, 山本健, 笹月健彦, 白澤専二

「自己免疫性甲状腺疾患(AITD)感受性候補遺伝子 ZFAT の同定と機能解析」第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡, 12 月 7-10 日, 2005

⑧白澤専二. Epiregulin 欠損マウスにおけるアトピー様皮膚炎発症の分子機構. 第 55 回日本アレルギー学会総会, 盛岡, 10 月 20-22 日, 2005(招待口演一国内学会・研究会)

⑨白澤専二, 石川繭子, 杉山滋, 中林一彦, 野本順子, 赤水尚史, 伴良行, 青木正幸, 山本健, 笹月健彦「自己免疫性甲状腺疾患のゲノム解析」日本人類遺伝学会第 50 回大会, 岡山, 9 月 19-22 日, 2005

〔図書〕(計 8 件)

①中林一彦, 田嶋敦, 白澤専二. 疾患ゲノム解析の現状と展望. 「日本臨床」Vol. 67, No. 3 : 469-476, 2009

②白澤専二. 自己免疫性甲状腺疾患感受性遺伝子の探索. 「日本臨床」Vol. 64, No. 12 : 2208-2214, 2006

③白澤専二, 笹月健彦. 自己免疫性甲状腺疾患の疾患感受性遺伝子探索. 「ゲノム医科学 NOW」135-152, 2006

④白澤専二, 笹月健彦. 自己免疫性甲状腺疾患感受性遺伝子の探索. 「蛋白質・核酸・酵素/増刊号 ゲノムから生命システムへ」Vol. 50 No. 16, 2097-2102, 2005

⑤山田亮, 白澤専二. ゲノムワイド研究と膠原病・自己免疫疾患. 「リウマチ・膠原病最新トピックス -変わりゆく研究と診療」(竹原和彦, 佐藤伸一, 桑名正隆 編, 診断と治療社) 6-9, 2005

⑥白澤専二. 自己免疫性甲状腺疾患. 「最新医学」第 60 卷 9 月増刊号(「臨床遺伝子学 '05 -多因子遺伝病研究の最前線-」) 2087-2094, 2005

⑦白澤専二. 自己免疫性甲状腺疾患感受性遺伝子とその探索. 「ホルモンと臨床」Vol. 53, No. 9, 11-16, 2005

⑧白澤専二. 自己免疫性甲状腺疾患の疾患感受性遺伝子. 「Medical Practice」(M.P. 内科総合誌) : Vol. 22 no. 4, 633-635, 2005

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

発明の名称:ZFAT 遺伝子発現抑制 RNA

発明者:白澤専二、藤本崇宏、角田俊之、土井佳子、小柳緑

権利者:学校法人福岡大学

番号:PCT/JP2008/66155

出願年月日:2008年9月8日

国外

6. 研究組織

(1)研究代表者

白澤 専二(SHIRASAWA SENJI)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号:10253535

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし