

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02778

研究課題名(和文) IKZFファミリー分子によるリンパ球分化制御とその破綻による病態に関する研究

研究課題名(英文) Study on regulation of lymphocyte development by IKZF family proteins and on molecular pathogenesis of disorders caused by a mutation in IKZF family molecules.

研究代表者

森尾 友宏 (Morio, Tomohiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30239628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：IKZF3 G158R変異を有する新しい獲得免疫異常と、本疾患における病態を明らかにした。1例ではリンパ腫を発症し、BCL6の切断とNOTCH2の変異を認めた。対応する変異を有するノックイン(KI)マウスは、症例と同じ免疫細胞の異常を呈した。本変異はEMSAやレポーター遺伝子解析では機能喪失変異である。KIマウスの胸腺細胞を用いた解析でIKZF1/変異IKZF3が、通常IKZF1が会合する部位に結合しないこと、さらには新規部位への会合も検出されることが判明した。IKZF3変異によりIKZF1の機能阻害を呈したが、この病態はヘテロマー干渉阻害という、新規の疾患発症機構であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転写因子の変異では、その変異部位によって様々な表現型を呈することが知られている。研究ではIKZF3の変異が、IKZF1の機能を阻害するという新しい知見をえた。ヘテロマー干渉阻害と名付けた分子機構自体が、新しい概念である。生体内の数多くの分子は複合体を形成して機能していることを鑑みると、変異部位や種類によって、変異分子だけでなく複合体全体の機能に影響が及ぼされることが容易に想像される。この分子機構、ヘテロマー干渉阻害が当てはまる疾患はこれから数多く発見される可能性がある。治療の観点からは、ヘテロマー形成を阻害する方策が考えられ、今後の治療開発戦略にも有用な視点を与えている。

研究成果の概要(英文)：We have identified a human impaired immune disorder with a heterozygous IKZF3 G159R missense variant. The patient developed malignant lymphoma with split BCL6 and loss of NOTCH2. Knock-in (KI) model mice harboring Ikzf3 G158R variant recapitulated the B and T cell phenotypes of the patient. B cell defect was proven to be caused by Ikzf3 variant itself using bone marrow competition assay. IKZF3 G159R was shown to be loss-of-function mutant by EMSA and Luciferase reporter gene assay. Using thymocytes of the KI mice, we showed Ikzf3 G158R lost a capacity to bind to a canonical Ikzf3 DNA sequence; and Ikzf1/Ikzf3 G158R heterodimers did not bind to the canonical Ikzf1/Ikzf3 DNA sequence. The heterodimer also gained affinity to novel DNA sequences. These data indicated that the adaptive immunity defect was caused by the IKZF3 variant hijacking IKZF1 function. This heteromeric interference can be a novel mechanism of autosomal dominance.

研究分野：小児科学、免疫学

キーワード：Ikarosファミリー分子 原発性免疫不全症 リンパ球分化 転写調節 腫瘍発生 ヘテロマー干渉阻害 Neomorph

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

原発性免疫不全症(primary immunodeficiency disease: PID)では300以上の責任遺伝子が同定されている。PIDはB細胞、T細胞、好中球、樹状細胞などの免疫細胞の分化障害を呈する疾患を内包し、その原因解明と機能解析は、分子機能、血球分化機構や分化停止に伴う腫瘍発生機構などの基盤的理解に寄与してきた。

ヒトでの様々な分子異常、変異が明らかになる中、ゲノム編集、モデル系構築、大量データ解析が可能になり、ヒトの知見から分子の機能を推察し、臨床に還元する時代となった。今回対象とするIKZF1, IKZF3は、共に私たちが新しくその変異を見いだしたものであり、疾患の成立と密接に関連している。

IKAROSファミリータンパク(IKZF1-5)は既に白血病、リンパ腫、胸腺腫、自己免疫疾患などでの関与が示唆されている。本研究では、特にIKZF1とIKZF3の個別機能、相互作用、変異分子の機能に焦点を当てる。現在知られている5種類のIKAROSタンパクのうち特にIKZF3, IKZF1を中心に、分子がホモダイマーあるいはヘテロダイマーとしてどのように免疫細胞分化や機能成熟に寄与し、その異常がどのように免疫不全症や腫瘍発生に繋がるのかを問う。IKZF1とIKZF3は同様にB, T細胞分化に関わるが、それぞれ発症しやすいリンパ系悪性腫瘍のlineageに差異がある。その成立機序についても検討を進める。

2. 研究の目的

本研究には基礎から臨床に至る幅広い目的がある。

1) まず、ヒトで明らかになった疾患、責任遺伝子から、免疫不全症、悪性腫瘍などの疾患の成り立ちを理解することである。

2) 2つ目はIKZFファミリー分子の生理的機能の理解である。臨床データ(表現型)を、分子の機能的理解につなげ、正常分化における転写調節の理解を深める。特にこれらの分子異常はヘテロ異常であり、分子間相互作用による転写調節機構の理解へとつなげる。

3) 3つめは、新しい疾患成立機序の提唱である。IKZFタンパクはZinc finger領域(ZF1~ZF6)に強い相同性があり、ZF領域の変異は、発現段階や細胞により、お互いに影響を及ぼすと想定される。1つの分子による他の分子の抑制を"heterologous interference"と仮称しているが、このような疾患成立機序は他領域でも極めて稀であり、独自の視点からの研究となる。

申請する研究の特色は、IKZFはマウスとヒトの相同性が極めて高いことを生かし、マウス、ヒトの細胞を用い、各々の利点を生かして、多角的に解析することにより、責任遺伝子解明後の最大の課題である「真の病態解析」にアプローチすることである。分子内ドメイン解析、生理活性や会合に重要なアミノ酸部位の同定等、病態解明に欠くべからざる必須データも提供する。

申請する研究はそれぞれの解析系に実績のある研究者が協調し解析を行い、体系的な情報が集積する。本研究は、機能未知遺伝子同定時における病態解析手法のモデルとなり、また稀少疾患の病態解析、治療開発モデルとなることが期待される。

3. 研究の方法

1) Knock-in マウスの作成と病態の再現

Ikzf1 N159S マウス(ヒトIKZF1 N159Sモデル)及びIkzf3 G158R マウス(ヒトIKZF3 G159Rモデル)を作成し、骨髄細胞、胸腺細胞、脾臓などにおいて詳細な免疫学的解析を行う。また経時的に経過を追い、悪性リンパ腫の発症や、そのほかの免疫疾患の発症について観察を行う。

2) 正常IKZF3及びIKZF3 G159Rによる転写調節の解析

EMSAやreporter gene assayでvariantの転写調節機能について評価する。またモデル細胞(NALM6 preB細胞株)あるいはKnock in mouseを用いて、胸腺細胞やB細胞でのvariantの転写調節能をChIP-seqやRNA-seqで明らかにする。

3) IKZF1, IKZF3によるリンパ球分化制御のfine mapping

IKZF1, IKZF3 2分子間の相互作用や、IKZF1(あるいはIKZF3)とIKZF2, KZF4などとの相互作用について検証を行う。

4) IKZF3 G159R変異によるリンパ腫発症の分子機構の解明

患者由来組織及び(発症すれば)モデルマウスにおけるリンパ腫を用いて、リンパ腫発症の分子機構について分子生物学的に解析を行う。

5) 患者由来iPS細胞を用いたT細胞(B細胞)分化障害の解析

IKZF1 N159S, IKZF3 G159R iPS細胞を樹立して、分化障害の詳細について補完を行う。

4. 研究成果

1) Knock-in マウスの作成と病態の再現

予定通りIKZF1及びIKZF3のヒトvariantをknock-in(KI)マウスを作成して再現した。解析にあたっては、私たちがはじめて明らかにしたIKZF3異常症を中心に検討した。Ikzf3 G158R(ヘテロ)マウスでは、成長発達に問題を認めなかった。免疫細胞解析では、末梢においてはB細胞

の著減を認め、骨髄では Pre-ProB 細胞から ProB 細胞への分化に障害を認めた。T 細胞では胸腺細胞での分化異常及び、成熟 T 細胞での CD3 発現低下を確認した。これらより、モデルマウスはヒトの免疫状態を模倣（再現）すると結論した。分化の異常は Ikzf3 variant によるものであり、実際に bone marrow competition assay において、B 細胞分化障害を再現した。

2) 正常 IKZF3 及び IKZF3 G159R による転写調節の解析

IKZF3 variant は IKZF1 との核内共有解析において、heterochromatin 構造を作らず、diffuse な分布を示すという点で異常を認めた。また、EMSA assay では consensus モチーフに会合せず（機能喪失）reporter gene assay では同様に機能喪失を呈することを明らかにした。一方 Ikzf3 knock out (KO) mice では B 細胞減少を認めず、Th17 細胞分化異常程度の軽度の免疫変調を呈するのみであることから、IKZF3 G159R 変異は単なる機能喪失ではないことが示唆された。このことから NALM-6 細胞において IKZF3 を KO し、正常及び変異 IKZF3 を導入して RNA-seq を行ったところ、両者に大きな差異が認められ、特に IKZF1 によって制御される分子の発現低下が認められた。さらに ChIP-seq を行ったところ、IKZF3 変異により、ヘテロダイマーパートナーである IKZF1 が阻害されることを明らかにした。そこで Ikzf3 G158R KI マウスの胸腺細胞および preB 細胞を用いて ChIP-seq を行った。その結果、wt Ikzf3 がコンセンサス結合配列である GGGAA, TGGAA に会合すること、G158R variant は GGAGC, GGAGG, CCCAGA など新規配列に会合すること、また Ikzf1, Ikf3 が共に結合する領域において、G158R variant が結合しない領域があること、などを明らかにした。

これらの結果より、新規に同定した IKZF3 G159R 変異は IKZF1 の生理的機能を阻害するという点で、ヘテロマー干渉阻害という新しい機序で、免疫不全症を呈していることが明らかになった。加えて、この IKZF3 variant は新規部位への会合も認めており、neomorphic な機能も有している。この新規機能が病態にどう関わっているかは今後の検討課題である。

3) IKZF1, IKZF3 によるリンパ球分化制御の fine mapping

上記の検討から IKZF1/IKZF3 ヘテロダイマーの重要性が示唆された。一方、正常な IKZF1/IKZF1 ホモダイマー、IKZF1/IKZF3 ヘテロダイマー、IKZF3/IKZF3 ホモダイマーの機能分担については、まだ詳細な解析が必要であり、今後の検討課題となる。また詳細な解析は細胞数の制限から、主として胸腺細胞を用いて実施したが、PreB 細胞を用いての反復解析も必要である。

4) IKZF3 G159R 変異によるリンパ腫発症の分子機構の解明

今回の観察期間において、Ikzf3 G158R heterozygous or homozygous mice において、リンパ腫は発症しなかった。また後者は加齢と共に著しく体重が減少し、早期死亡に至った。そのことより患者由来リンパ腫検体を用いて RNAseq 解析を行ったところ、BCL6 の split signal と NOTCH2 変異が確認され、腫瘍発生への関連性が示唆された。

一方症例においては EBV 関連腫瘍を発症しており、IKZF3 変異と EBV 関連リンパ腫との関係性は今後の検討課題である。Ikzf3 KO マウスではリンパ腫の発症があり、IKZF3 機能喪失がリンパ腫発症に関与した可能性は残るものと考えている。

5) 患者由来 iPS 細胞を用いた T 細胞（B 細胞）分化障害の解析

今回はモデルマウスを用いた解析において、B 細胞、T 細胞分化障害の分子機構が検討可能であったため、iPS 細胞については正常 iPS 細胞からのゲノム編集コンストラクト作成のみにとどめている。KI iPS 細胞の作成については、大阪大学中田慎一郎博士の開発した SNGD 法で確率高く KI を pick up できるようになっており、今後 iPS 細胞からの B, T 細胞分化手法が確立すれば、本格的な樹立と、変異導入細胞を用いた解析を試みたい。

（研究結果の総括）

上記の研究により、論文は 2021 年 6 月の時点で accept となっている。今回の研究においては、IKZF3 の 1 つの変異を例にとつての解析となったが、ヘテロマー干渉阻害など新しい現象を見いだすに至っており、また当初の計画になかった治療へ応用展開可能なデータも得ることができた。一方 IKZF1, IKZF3 は変異部位によって様々なリンパ球分化異常が認められ、今後はさらに変異の variety を増やしての解析や、より根本的なホモダイマー、ヘテロダイマーの遺伝子発現制御の棲み分け等についての解析が必要になると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 星野顕宏、山下基、森尾友宏、金兼弘和	4. 巻 70
2. 論文標題 Ikaros zinc finger protein family(IKZF)と自己免疫	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 642-648
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 森尾友宏	4. 巻 28
2. 論文標題 疾患特異的iPS細胞を用いた免疫不全症に対するアプローチ	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 血液フロンティア	6. 最初と最後の頁 353-360
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Yamashita M, Kuehn HS, Okuyama K, Okada S, Inoue Y, Mitsuiki N, Imai K, Takagi M, Kanegane H, Takeuchi M, Shimojo N, Tsumura M, Padhi AK, Zhang Y, Boisson B, Casanova JL, Ohara O, Rosenzweig S, Taniuchi I, Morio T.	4. 巻 Online ahead of print.
2. 論文標題 A Variant in Human AIOLOS Impairs Adaptive Immunity by Interfering with IKAROS.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Immunology.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41590-021-00951-z.	査読の有無 有
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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Morio T.
2. 発表標題 Disorders caused by a defect in IKAROS family protein. Disorders caused by a defect in IKAROS family protein.
3. 学会等名 2019 Samsung Medikal Center Primary Immunodeficiency Symposium
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Primary immunodeficiency disorders caused by a mutation in IKAROS family gene.
2. 発表標題 Morio T.
3. 学会等名 RIKEN IMS-JSI International Symposium on Immunology 2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	大津 真 (Otsu Makoto) (30361330)	東京大学・医科学研究所・准教授 (12601)	

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