

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07177

研究課題名(和文) Satb1の複合体形成に関する新規長鎖非翻訳RNAの同定およびその機能解明

研究課題名(英文) Identification and elucidation of novel long non-coding RNA involved in complex formation of Satb1.

研究代表者

市山 健司 (Ichiyama, Kenji)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授(常勤)

研究者番号：60777960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子Satb1を介したTregの分化機構の分子基盤の確立を目指し、特にSatb1と複合体を形成する転写因子Ikzf1のTregにおける役割を中心に解析を進めた。その結果、TregでIkzf1の機能が欠失すると免疫応答の異常な活性化が生じ、自己免疫疾患様の致死的な炎症が発症することが明らかとなり、Ikzf1はTregにおいて重要な役割を担っていることが示唆された。

また同時に、Treg分化に関する新規LncRNAの同定を目的として、独自に樹立したCRISPRiシステムを用いた大規模なスクリーニングを行った結果、Treg分化制御因子の候補として多くの新規LncRNAを同定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正常個体中に存在する制御性T細胞(Treg)は、異常・過剰な免疫反応の抑制に特化したT細胞群であり、免疫自己寛容、免疫恒常性の維持に中心的な役割を果たしている。そしてその異常は、自己免疫病、アレルギー疾患、炎症性腸炎などの直接的原因となることが知られている。本研究成果は、Tregの分化機構および免疫抑制機構の基礎的理解を進めた。このことから、Tregを標的とし、その量的・機能的増減による、癌、病原微生物や自己免疫疾患、移植臓器拒絶反応に対する新しい免疫応答制御法の開発、医療応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In order to establish the molecular basis of Treg differentiation via the transcription factor Satb1, we focused on the role of Ikzf1, which a transcription factor that forms a complex with Satb1, in Treg. Then, the loss of Ikzf1 function in Treg causes abnormal activation of immune responses and the development of autoimmune disease-like lethal inflammation, suggesting that Ikzf1 plays an important role in Treg. At the same time, we also conducted a large-scale screening using own CRISPRi system to identify novel LncRNAs involved in Treg differentiation, and succeeded in identifying many novel LncRNAs as candidates for regulators of Treg differentiation.

研究分野：分子免疫学

キーワード：制御性T細胞 長鎖非翻訳RNA Foxp3 自己免疫疾患

1. 研究開始当初の背景

免疫系は、個体にとって有害となる病原体を認識し、それに対して効果的な応答を惹起して病原体から生体を防御する(正の応答)。一方で、自己を構成する生体分子や共生細菌、食物などの異物に対しては過剰に反応しないよう寛容を誘導する(負の応答)。このように、免疫応答は常に正と負のバランスが適度に制御される必要があり、この恒常性維持機構が破綻するとアレルギーや自己免疫疾患などの免疫疾患や免疫不全症となる。

免疫系の恒常性維持には免疫の中核と呼ばれるヘルパーT (Th)細胞が主要な役割を果たしている。特に、積極的に負の応答を促す制御性T細胞(Treg)はその存在および免疫自己寛容の確立・維持における重要性が明らかとなって以降、現在に至るまで世界的に活発な研究が展開されている。なかでも、Tregの分化機構および免疫抑制機構の解明とそれを基にしたTregの人為的な制御方法の確立が現在免疫学の重要研究課題の一つとされている。

これまで、機能的に成熟したTregの分化にはクロマチン再構成因子Satb1を介したTreg特異的なエピゲノム形成、特にスーパーエンハンサーの形成が必須であることが明らかとなっている。しかしながら、Satb1は様々な細胞でユビキタスに発現することが知られており、Treg特異的なエピゲノム形成が生じていない細胞でも高発現していることから、Treg特異的なエピゲノム形成にはSatb1に加えてTreg特異性を規定する別因子の関与が示唆されている。

近年、非翻訳RNA(ncRNA)と呼ばれるタンパク質をコードしないRNAが高い注目を集めている。なかでも、200塩基以上の長さを持つncRNAである長鎖非翻訳RNA(Long non-coding RNA: LncRNA)は次世代シーケンシング技術の発展によりマウスおよびヒトにおいて数多く同定され始めており、多様な作用機序を介して標的遺伝子の発現を制御することで極めて広範囲の高次生命現象に関与していることが明らかになってきた。しかしながら、免疫系におけるLncRNAの役割は未だ不透明であり、現在その機能解析が世界中で精力的に行われている。

2. 研究の目的

本研究では、Treg特異的にSatb1と結合する転写因子や長鎖非翻訳RNA(Long non-coding RNA: LncRNA)を網羅的に探索、解析することでSatb1を介したTreg分化制御に寄与する新規因子の同定を試みる。さらに、同定した因子の生理的意義を明らかにし、Treg分化および機能の人為的操作による新たな免疫応答制御法の基礎を確立する。

3. 研究の方法

本研究は、Tregの分化機構および免疫抑制機構の分子基盤の解明を目指し、次世代シーケンサーによる網羅的解析、さらには遺伝子改変マウスの作製を通して主に以下の2項目について研究を遂行した。(1)Tregの分化および免疫抑制機能におけるSatb1結合因子Ikzf1の機能解析、(2)Treg分化に寄与する新規LncRNAの同定およびその機能解明。

4. 研究成果

(1) Tregの分化および免疫抑制機能におけるSatb1結合因子Ikzf1の機能解析

Satb1を介したTregの分化・維持機構の分子基盤の確立を目指し、特にSatb1と複合体を形成する転写因子Ikzf1のTregにおける役割を中心に解析を行った。

Ikzf1はそのN末端およびC末端にzinc fingerドメインを有する転写因子であり、N末端のzinc fingerはDNA結合に、C末端のzinc fingerはタンパク質との相互作用に重要な働きを担うことが知られている。そこで、まずIkzf1とSatb1の複合体形成において重要なIkzf1の領域を同定するため、Ikzf1の各ドメインを欠損した変異体を作製し、それらを用いてSatb1との免疫沈降実験を行った。その結果、興味深いことに、タンパク質相互作用に重要なC末端のzinc fingerを欠失させた変異Ikzf1ではSatb1との複合体形成に影響がなく、一方で、N末端のzinc fingerを含むExon 5領域を欠損させた変異Ikzf1を用いるとSatb1との複合体形成が消失することを見出した。以上の結果から、Ikzf1は自身のExon 5領域を介してSatb1と複合体を形成することが明らかとなった(図1)。

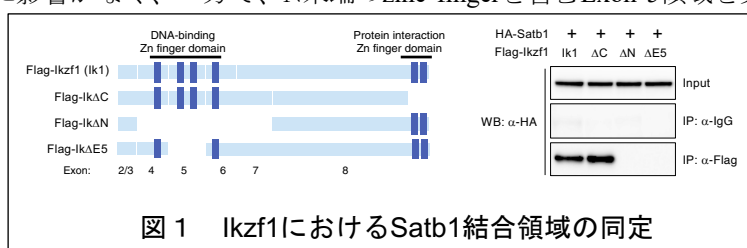


図1 Ikzf1におけるSatb1結合領域の同定

次に、*Ikzf1*のTregにおける生理的役割を検討するため、Treg特異的に*Ikzf1*のExon 5領域を欠失した条件的遺伝子変異マウス(*Foxp3^{Cre}IkE5^{fl}*)の作製を試みた。方法としては、まずLoxP配列で*Ikzf1*のExon 5領域を挟んだ遺伝子改変マウス(*IkE5^{fl}*マウス)が他のグループにより既に作製、報告されていたことから、共同研究により*IkE5^{fl}*マウスを分与して頂いた。そして、申請者が所持している*Foxp3*発現と並行してCreリコンビナーゼを発現するマウス(*Foxp3^{Cre}*マウス)と交配させることで目的の*Foxp3^{Cre}IkE5^{fl}*を作製した。変異マウス作製後は、その表現型解析を行うことTregにおける*Ikzf1*の生理的意義の解明を試みた。まず、変異マウスが自己免疫疾患を自然発症するかどうか、マウスの生存曲線および体重を測定した結果、変異マウスは生後まもなくしてから顕著な体重減少が生じ、生後50日以内で全て死亡してしまうことが明らかとなった(図2A, B)。さらに、マウスの炎症状態を確認するため、組織へのリンパ球の浸潤や血清中の抗体量、リンパ組織における免疫細胞の活性化状況をヘマトキシリン・エオジン染色法(HE染色法)、ELISA法およびFACS法によりそれぞれ解析したところ、変異マウスでは各組織への顕著なリンパ球の浸潤、血清中の抗体量の増加、CD4⁺およびCD8⁺ T細胞の活性化が認められた(図2C-E)。以上の結果から、Treg特異的に*Ikzf1*が変異したマウスは、免疫応答の異常な活性化が生じることで、自己免疫疾患様の重篤な炎症が発症し、早期に死亡することが明らかとなった。このことから、*Ikzf1*はTregにおいて重要な役割を担っていることが示唆された。

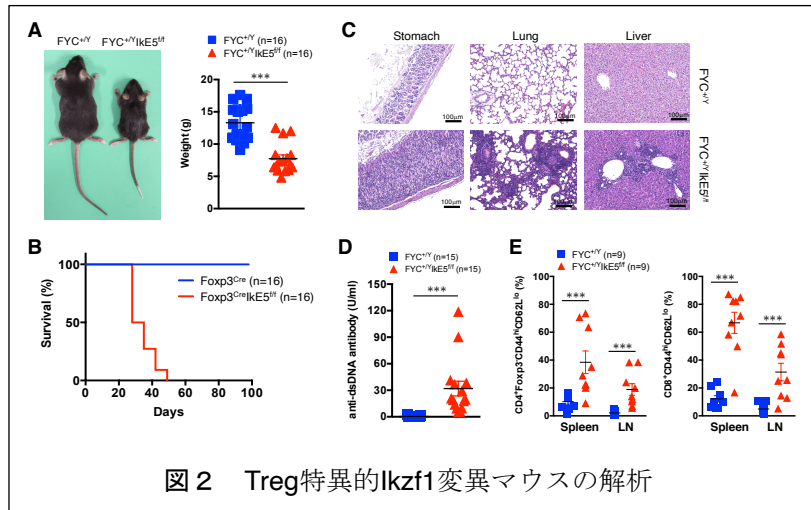


図2 Treg特異的*Ikzf1*変異マウスの解析

(2) Treg分化に寄与する新規LncRNAの同定およびその機能解明

Treg分化を制御する新規LncRNAの探索・同定を目的として、網羅的なスクリーニング系の確立を試みた。最近、標的遺伝子の発現を人為的に抑制する新たな方法として、従来のshort interfering RNA (siRNA)やsmall hairpin RNA (shRNA)、アンチセンスオリゴ(ASO)と比較して安価で特異性も高いことからCRISPR/dCas9システムを利用したCRISPR interference (CRISPRi)が注目を集めている。CRISPRiはDNA切断活性を失活したCas9 (dCas9) と転写抑制因子であるKRAB/MeCP2の融合タンパクを用いることで遺伝子座へのヘテロクロマチン形成を介して標的遺伝子の転写を抑制する方法であり、従来のCRISPRシステムによるフレームシフトを介した遺伝子欠損と異なりRNAの転写自体を抑制することからncRNAの機能阻害に適している(図3A)。そこで、まずCRISPRiシステムをRosa26領域に導入したKnock-inマウス(CRISPRiマウス)を独自で作製し、その評価を行った。具体的には、CRISPRiマウスの脾臓からCD4陽性T細胞を単離し、レトロウイルスを用いて標的遺伝子に対するgRNAsを導入後、数日培養して標的遺伝子の発現をRT-qPCRにより確認した。その結果、shRNAやASOと比較して、CRISPRiは既知のLncRNAである*Neat1*および*Malat1*の発現をより顕著に(95%以上)抑制することができ、非常に有用な遺伝子抑制システムを樹立することに成功した(図3B)。

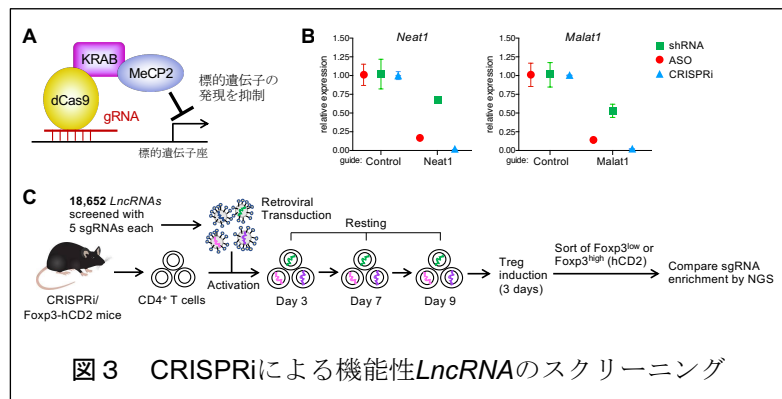


図3 CRISPRiによる機能性LncRNAのスクリーニング

そこで次に、CRISPRiシステムを用いてTreg分化を制御する新規LncRNAの大規模なスクリーニングを行った。まず、T細胞で発現する全18,652 LncRNAsに対してそれぞれ5つのsgRNAsを設計した。次に、CRISPRiシステムおよび*Foxp3*-hCD2レポーターを発現するCRISPRi/*Foxp3*-hCD2レポーターマウスを作製し、その脾臓およびリンパ節から単離したCD4陽性T細胞にレトロウイルスを用いて設計した各sgRNAsを導入後、約一週間のresting期間を経てTreg分化条件下でそれぞ

れ3日間培養した。培養後、hCD2の発現を指標にしてTregの分化誘導効率が低い細胞集団(hCD2^{low})および分化誘導効率が低い細胞集団(hCD2^{high})をFACSソーティングで回収してそのゲノムDNAを抽出後、ライブラリー化し、次世代シーケンサーに供した。その結果、Treg分化制御因子の候補として幾つかの新規LncRNAsを同定した(図3C)。今後は、同定した全新規LncRNAsの詳細な機能解析を進め、その生理的意義や作用機序について明らかにしたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakaguchi Shimon, Mikami Norihisa, Wing James B., Tanaka Atsushi, Ichiyama Kenji, Ohkura Naganari	4. 巻 38
2. 論文標題 Regulatory T Cells and Human Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annual Review of Immunology	6. 最初と最後の頁 541-66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1146/annurev-immunol-042718-041717	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 -

1. 著者名 Ichiyama Kenji, Dong Chen	4. 巻 443
2. 論文標題 The role of miR-183 cluster in immunity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 108 ~ 114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2018.11.035	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 Tanaka Kentaro, Martinez Gustavo J., Yan Xiaowei, Long Weiwen, Ichiyama Kenji, Chi Xinxin, Kim Byung-Seok, Reynolds Joseph M., Chung Yeonseok, Tanaka Shinya, Liao Lan, Nakanishi Yoichi, Yoshimura Akihiko, Zheng Pan, Wang Xiaohu, Tian Qiang, Xu Jianming, O' Malley Bert W., Dong Chen	4. 巻 23
2. 論文標題 Regulation of Pathogenic T Helper 17 Cell Differentiation by Steroid Receptor Coactivator-3	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2318 ~ 2329
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2018.04.088	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

〔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 Kenji Ichiyama
2. 発表標題 Epigenetic regulation of pathogenic T helper 17 cell differentiation by steroid receptor coactivators.
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ichiyama Kenji
2. 発表標題 ステロイド受容体活性化補助因子SRC2およびSRC3はエピジェネティックな活性化制御を介してTh17分化を促進する
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
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
---------------------------	-----------------------	----

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