

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19390118

研究課題名（和文） Runx 転写因子機能不全による免疫疾患の発症機序の解明

研究課題名（英文） Analysis of pathogenesis of immunological disorders by dysfunction of Runx transcriptional factor complexes

研究代表者

谷内 一郎 (TANIUCHI ICHIRO)

独立行政法人 理化学研究所・免疫転写制御研究チーム・チームリーダー

研究者番号 20284573

研究成果の概要：

Runx 転写因子機能不全に起因する免疫疾患の病態解明を主目的に研究を実施した。その結果、T 細胞での Runx 機能不全により血清 IgE の高値と肺への細胞浸潤といった喘息様疾患と炎症性腸炎が自然発症し、その発症機序には IL-4 サイレンサー機能制御不全による IL-4 過剰産生や Smad4 を介した TGF β シグナル経路の異常が関与することを明らかにした。このような免疫疾患モデルマウスの樹立と免疫疾患の発症機序の解明は、新たな治療薬の開発に繋がるという研究成果と言える。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008 年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：疾患モデル動物、アレルギー、炎症性腸疾患、Runx 転写因子

1. 研究開始当初の背景

哺乳類 Runx 転写因子ファミリーは 3 種類の ユニット遺伝子 (*Runx1*, *Runx2*, *Runx3*) と 1 種類の ユニット遺伝子 (*Cbf*) が単離されており、これらの遺伝子産物より形成される Runx/Cbf 転写因子複合体 (以下 Runx 複合体) は多くの発生・分化過程を制御し、またその機能不全は発がんを始めとするヒト疾患の発症に関与することが示されている。興味深いことに、SLE、関節リウマチ、乾癬といった自己免疫疾患の発症を促進す

る SNP として相次いで Runx 結合配列の変異が報告され、Runx 転写因子機能不全とヒト免疫疾患の発症との関係が注目されるようになった。

Cbf 遺伝子からは RNA スプライシングにより 2 種類のアイソフォーム *Cbf* タンパク (*Cbf 1* と *Cbf 2*) が産生される。研究代表者は独自に *Cbf 1* と *Cbf 2* を特異的に欠損するマウスを作製し、*Cbf 2* 欠損マウスでは血清 IgE の上昇と肺への好酸球の浸潤を伴う喘息様疾患と IgA 陽性の形質細胞様の浸潤を

特徴とした炎症性腸疾患 (IBD) といった免疫疾患を発症することを発見した。Runx3 欠損マウスでも類似の免疫疾患の発症が報告されており [EMBO J. 23:969 (2004)、PNAS 101:16016(2004)], これらの結果はマウスでも Runx 転写因子機能不全により免疫疾患が発症することを強く示すものであり、これらのマウスは有用なヒト疾患モデルとなりうると考えられた。重要なことは、Runx3 欠損マウスは BALB/C や C57BL/6 の遺伝的背景では生後直後に致死となり免疫系の解析を行うためのモデルとなり難いのに対し、研究代表者の確立した Cbf 2 欠損マウスはこれらの遺伝的背景でも成体まで生存し免疫疾患を発症するので、Runx 転写因子の機能不全による免疫疾患の有用なモデルマウスとなることである。これらの背景より Cbf 2 欠損マウスを用いて Runx 転写因子機能不全に起因する免疫疾患の発症機序を解明することは、ヒトでの類似免疫疾患の発症機序の解明及びそれら疾患の新たな制御法の開発につながる医学・免疫学の重要な課題と考えられた。

2. 研究の目的

本研究課題では、Cbf 2 欠損マウスを Runx 転写因子機能不全による免疫疾患のモデルマウスと捉え、個体レベルでの疾患の発症を基準とした解析と細胞レベルでの分子生物学的解析を組み合わせることで以下の項目を明らかにすることを目的に研究を行った。

(1) Runx 転写因子機能不全による免疫疾患の発症機序の解析 (病理学的解析)

(2) Runx 転写因子を介した免疫細胞の分化制御の解析 (生理学的解析)

(1) で免疫疾患の原因となる細胞群を同定出来た場合、その細胞群の分化制御や機能制御における Runx 転写因子の役割を明らかにする。特に、これまでの解析から Cbf 2 欠損マウスではヘルパー T 細胞サブセットの分化異常が認められているのでその分子機構を明らかにし、異常な T 細胞分化が免疫疾患の発症に關与するか検討する。

3. 研究の方法

Cbf 2 欠損マウスに加えて、T 細胞特異的に Cbf 或は Cbf 2 アイソフォームを欠損するマウスを作製し T 細胞での Runx 転写因子機能不全が免疫疾患の発症に及ぼす影響を解析した。

血清 IgE の上昇と肺への好酸球の浸潤等のアレルギー症状は Th2 型の免疫応答の増強と相関する事が知られている。Th2 免疫応答には IL-4 シグナルが重要な役割を果たすことから、Cbf 2 欠損マウスでの免疫疾患発症における IL-4 シグナルの關与を遺伝学的に解析すると共に、Runx 転写因子による IL-4 遺伝子発現制御機構に関して分子生物学的手

法を用いて解析した。

4. 研究成果

Cbf 2 欠損マウスで觀察される血清 IgA、IgE の高値、肺への細胞浸潤、腸炎の発症は、T 細胞特異的に Cbf 或は Cbf 2 アイソフォームを欠損するマウスでも觀察されたことから、T 細胞での Runx 転写因子機能不全が免疫疾患の発症に關与することが確認出来た (図 1)。

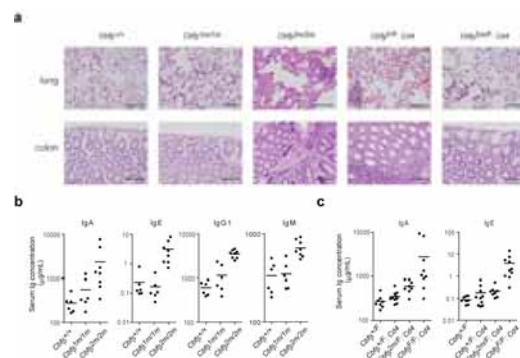


図 1. T 細胞特異的 Cbf 欠損による免疫疾患の発症。

この結果から、T 細胞の機能異常を疑いサイトカイン産生を測定した所、Cbf 2 を欠損する CD4⁺T 細胞から、IL-4 などの Th2 サイトカインの高産生が認められた (図 2)。また試験管内での T ヘルパーサブセットの分化誘導系においても、Cbf 2 欠損により IL-4 産生細胞の分化促進、更に Th1 細胞分化誘導条件下では INF を産生する Th1 細胞からも IL-4 産生が認められた。これらの結果から Cbf 2 アイソフォームは Th1 細胞での IL4 遺伝子の発現抑制に必須であることが判明した。

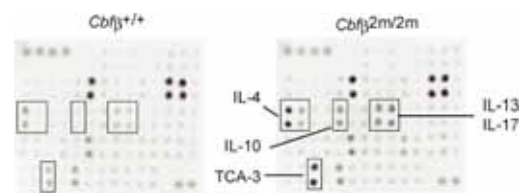


図 2. Cbf 2 欠損による Th2 サイトカイン過剰産生。

このような Cbf 2 欠損マウスの表現型は T 細胞で TGF シグナルの異常をきたすマウスと類似であったことから、Cbf 2 欠損と TGF シグナルとの関連性を検索した。その結果 Cbf 2 欠損マウスでは TGF 依存性のランゲルハンス細胞の分化や B 細胞での IgA へのクラススイッチ反応が障害されていた

(図3)。更に、生化学的解析により TGF 細胞内シグナル伝達に重要な Smad4 分子は Cbf 2 アイソフォームと特異的に会合することを見いだした。また、Smad4 分子は Cbf 2 非存在下では TGF 刺激後でも Ig プロモーターに結合出来ないことが明らかとなった(図3)。この結果から、Cbf 2 アイソフォームは Th1 細胞での IL-4 遺伝子の発現抑制に必須であることが判明した。

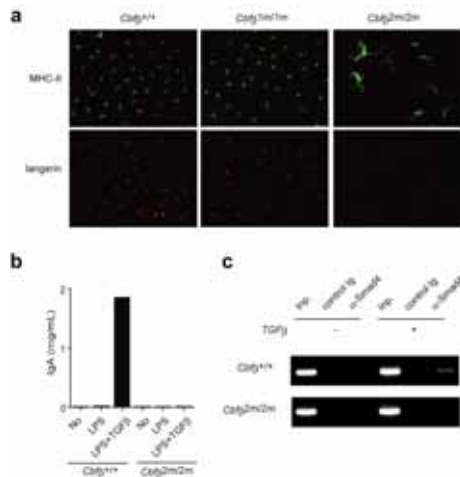


図3. Cbf 2欠損による TGF シグナルの異常。

次に IL-4 シグナルの免疫疾患発症への関与を調べる目的で、IL-4 受容体からのシグナル伝達に必須の Stat6 遺伝子の変異を Cbf 2 欠損マウスに導入した。その結果、IL-4 シグナルの阻害により、喘息様症状のみならず腸炎症状も緩和されることが判明した。この結果から、Runx 転写因子機能不全による腸炎の発症には、IL-4 を介した免疫応答が関与することが明らかとなった。

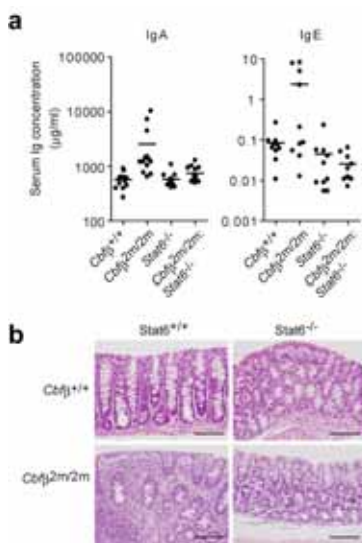


図4. Cbf 2欠損による腸炎発症への IL-4 シグナルの関与。

以上の結果から、Runx 複合体及び TGF が IL-4 遺伝子発現を抑制するメカニズムの解明を目的に、ChIP on chip 法を用いて I14 遺伝子座内での Cbf 及び Smad4 結合部位を検索した。その結果、従来の IL-4 サイレンサー以外に複数の Runx 結合領域を同定し、また 4 カ所の Smad4 結合領域を同定した(図5)。

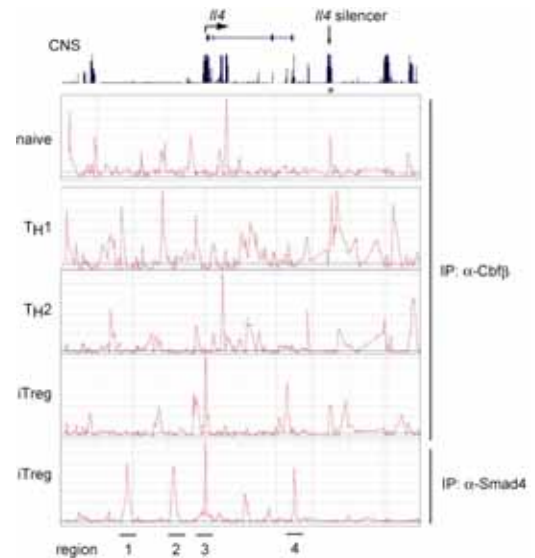


図5. I14 遺伝子座内での Cbf 及び Smad4 結合部位の同定

以上の結果より、Runx 転写因子機能不全に起因する免疫疾患の発症には、少なくとも T 細胞の機能不全を一つの原因とする IL-4 の過剰産生が関与することを明らかにした。

その他、胸腺細胞分化に置ける Runx 転写因子の機能に関して研究を行い、Runx 転写因子による ThPOK 遺伝子発現抑制機構を明らかにし、ThPOK 遺伝子座内に Runx 依存性の新規サイレンサー領域を同定した。

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)

- Collins A, Littman D.R and Taniuchi I. RUNX proteins in transcription factor networks that regulate T-cell lineage choice. *Nat. Rev. Immunol.* 9:106-15, 2009. 査読有り
- Muroi S, Naoe Y, Miyamoto C, Akiyama K, Ikawa T, Masuda K, Kawamoto H and Taniuchi I. Cascading suppression of transcriptional silencers by ThPOK seals helper T cell fate. *Nat. Immunol.*

- 9:1113-21, 2008. 査読有り
- Maekawa Y, Minato Y, Ishifune C, Kurihara T, Kitamura A, Kojima H, Yagita H, Satake-Yanagimoto M, Saito T, Taniuchi I, Chiba S, Sone S, and Yasutomo K. Notch 2 integrates signaling by the transcription factors RBP-J and CREB1 to promote T cell cytotoxicity. *Nat. Immunol.* 9:1140-47, 2008. 査読有り
 - Setoguchi R, Tachibana M, Naoe Y, Muroi S, Akiyama K, Tezuka C, Okuda T and Taniuchi I. Repression of the Transcription Factor Th-POK by Runx Complexes in Cytotoxic T Cell Development. *Science* 319:816-819, 2008. 査読有り
 - Naoe Y, Setoguchi R, Akiyama K, Muroi S, Kuroda M, Hatam F, Littman D.R and Taniuchi I. Repression of interleukin-4 in T helper type 1 cells by Runx/Cbfb binding to the *Il4* silencer. *J.Exp.Med.* 204:1749-1755, 2007. 査読有り
 - Egawa T, Tillman R.E, Naoe Y, Taniuchi I and Littman D.R. The role of the Runx transcription factors in thymocyte differentiation and in homeostasis of naïve T cells. *J.Exp.Med.* 204:1945-1957 2007. 査読有り

[学会発表](計5件)

- 谷内 一郎: Essential requirement of Cbfb isoform protein in regulating TGFb-signaling by interacting with Smad protein. 第38回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 12-1月, 2008.
- 谷内 一郎: Role of Runx complexes during T cell development. 15th International RUNX Workshop, Provincetown, USA, 9月, 2008.
- 谷内 一郎: Role of Runx proteins in early development of lymphoid tissue inducer cells. 第37回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, 11月, 2007.
- 谷内 一郎: Transcriptional Factors Network in CD4/CD8 Lineage Choice. RCAI-JSI International Symposium on Immunology 2007: Development and Maintenance of Immune System, 横浜, 7月, 2007.

- 谷内 一郎: Runx 複合体の IL4 silencer への結合を介した Th1 細胞における IL4 産生の抑制. 第17回 Kyoto T Cell Conference (KTCC), 京都, 6月, 2007.

[産業財産権]

出願状況(計2件)
 名称: 免疫疾患モデルマウスとしての Cbf2 アイソフォーム欠損マウスの作製
 発明者: 谷内一郎
 権利者: 独立行政法人理化学研究所
 種類: 特許
 番号: 2006-008654
 出願年月日: 2006年1月17日
 国内外の別: 国内

名称: T 細胞特異的なサイレンサー活性を有するヌクレオチド及びその利用
 発明者: 谷内一郎
 権利者: 独立行政法人理化学研究所
 種類: 特許
 番号: 2007-341378
 出願年月日: 2007年12月28日
 国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等
<http://web.rcai.riken.jp/en/labo/regu/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
 谷内 一郎
 独立行政法人 理化学研究所・免疫転写制御研究チーム・チームリーダー
 研究者番号 20284573