

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月25日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590086

研究課題名（和文） NFAT ファミリーの多様性にもとづく特異的制御法の開発

研究課題名（英文） Specific regulation for NFAT based on diversity of the NFAT family

研究代表者

神沼 修 (KAMINUMA OSAMU)

財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主任研究員

研究者番号：80342921

研究成果の概要（和文）：活性化分子 NFATc2 と抑制性分子 NFATc4 のキメラ分子を作製して検討したところ、NFATc4 による抑制作用の責任領域は CRD 領域にマップされた。CN と NFAT の部分領域の結合活性を定量的に比較検討したところ、CRD 内に新たな CN 結合領域を見いだした（CNBR3）。マイクロアレイ比較解析によって、NFATc4 を大動脈血管平滑筋に特異的に発現調節する因子として WWTR1 を発見した。

研究成果の概要（英文）：By employing NFATc2/NFATc4 chimera molecules, it was clarified that NFATc4 down-regulate cytokine expression in T cells via its CRD domain. The quantitative CN/NFAT binding assay revealed that there is a novel CN binding region in the CRD domain. It was found that WWTR1 regulates specific expression of NFATc4 in aortic smooth muscle cells by means of a comparative microarray analysis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：免疫学

## 1. 研究開始当初の背景

肝臓、腎臓、造血臓器などにおける機能不全性疾患は、重篤な臨床症状および不可逆性を伴う場合が多く、その最終的治療戦略として臓器移植が選択されることも少なくない。その移植臓器に対する拒否反応および移植片対宿主病を回避するため、免疫抑制薬は不可欠な薬剤である。しかしながら、代表的な免疫抑制薬であるシクロスポリンおよびタクロリムスに懸念される副作用は、広範かつ

重篤なものも多く、それらを用いた治療が患者に与える満足度は高くない。

Nuclear factor of activated T cells (NFAT) は、多くのT細胞サイトカインの遺伝子発現に必須の転写因子である。シクロスポリン、タクロリムスの主薬効に関わる重要性が判明した1980年代後半以降、NFATに関する研究は劇的に進み、その結果NFATが、Ca<sup>2+</sup>シグナルによって活性化されたカルシニューリン（CN）により脱リン酸化され

た後、細胞質から核内に移行してサイトカイン遺伝子転写調節領域の特異的認識配列に結合し、それらの転写活性化を誘導するという作用機序は判明している。

NFATファミリーは5種類の分子に大別されるが、1990年代後半に相次いで各NFATのノックアウト(KO)マウスが作製されたことにより、サイトカイン産生だけでなく、心血管系や筋肉、骨などの発生・分化に対し、各NFATがそれぞれ特異的に機能分担していることが明らかにされてきた。その中で、NFATc2(NFAT1)-KOマウスでT細胞のIL-4産生能亢進がみられたことは(Xanthoudakis ほか、*Science* 272:892, 1996 ほか)、ある種のNFATが、サイトカイン遺伝子転写に対して抑制的に作用する可能性を示唆するものであった。しかしながら、NFATc2をT細胞に強制発現させるとIL-4遺伝子転写は増強される(Luo ほか、*Mol Cell Biol*, 16:3955, 1996 ほか)。このように、遺伝子改変動物ではさまざまな代償性反応も起こりうることから、NFAT-KOマウスの表現型だけから、種々の疾病におけるNFATの病態生理学的役割や治療標的としての重要性を断定するのは難しかった。加えて、NFATファミリー分子間の相違について比較解析した成績はあまり報告されておらず、各NFATの特異性を規定する要因についての情報も乏しかった。

NFATは、単独もしくは他の転写因子と複合体を形成して標的遺伝子のプロモーターに結合し、その転写誘導に関与するが、NFATのパートナーとなりうる転写因子はサイトカインにより異なる。例えば、上述のIL-2の場合と異なり、TNF- $\alpha$ プロモーター上ではJun/ATF2と複合体を成すことが報告されている(Tsai ほか、*Mol Cell Biol*, 16:5232, 1996 ほか数報)。

そこで応募者らは、IL-2およびTNF- $\alpha$ 遺伝子転写に与える影響について、各NFATファミリー分子間で比較検討した。その結果、NFATc1(NFAT2)およびNFATc2はIL-2転写を同様に増強する一方、TNF- $\alpha$ に対してNFATc2は増強作用を示すが、NFATc1は、T細胞に強制発現させてもRNA干渉法でノックダウンしても影響がないという機能的相違を見いだした。またその際、NFATc1はNFATc2と同様にTNF- $\alpha$ プロモーター上に結合するが、C末の転写活性化ドメインを欠落することによって、TNF- $\alpha$ 転写誘導能を発揮できないという分子メカニズムを明らかにした(Kaminuma ほか、*J Immunol*, 180:319, 2008)。

このような各ドメインの機能の中で、新たなNFAT制御法に結びつきうるものとして、NFATとCNとの結合様式も一部明らかにされている。すなわち、NFATは二カ所の分子

内ドメインを介してCNと結合しており、その結合領域を含んだオリゴペプチドは、NFAT/CN結合を拮抗阻害するのみならず、NFATが介在する種々の遺伝子転写を細胞および動物レベルで抑制しうる(Noguchi ほか、*Nat Med*, 10:305, 2004 ほか)。そこで応募者らは、CNとの結合様式についても各NFAT間の比較を行った。ELISA、表面プラズモン共鳴法(Biacore)を含めた数種類の定量的蛋白相互作用計測法を比較した結果、増幅ルミネッセンス近接ホモジニアスアッセイ(ALPHA)法が、感度、信頼性および将来的に薬剤スクリーニングに利用できる点でも優れていることを見いだした。それにより初めて、NFATc2の二カ所のCN結合ドメインのCN結合親和性がほぼ同程度であるという定量的な比較データを導き出すことができた。

これら構造に起因する機能的相違の他に、NFATは、生体内の発現パターンも異にすることでファミリー内の機能分担を達成している。例えば、免疫抑制薬の標的となるT細胞には、NFATc1、c2およびc3(NFAT4)が高発現する一方、NFATc4(NFAT3)の発現レベルは低い(Lyakh ほか、*Mol Cell Biol*, 17:2475, 1997)。このような、NFATの臓器特異的発現制御のメカニズムはこれまで殆ど明らかにされていなかった。

そこで応募者らが最近、各NFATの発現レベルについて比較解析を進めたところ、通常末梢T細胞での発現レベルが低いNFATc4が、ヒトT細胞株であるJurkatには比較的高発現しており、それをRNA干渉法でノックダウンすると、他のNFATの場合と異なり、サイトカイン遺伝子発現が亢進することをみいだした(Kaminuma ほか、未発表データ)。

以上の学術的背景をもとに、これまでの研究成果を一段と発展させ、NFATファミリー分子の病態生理学的意義とその特異性のメカニズムを解明し、その選択的制御法を開発することを目的として、今回、本研究を立案するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、NFATファミリーにおける分子構造、既知および未知の会合分子との結合様式ならびに特異的な発現調節機構について詳細な比較解析を実施することによって、各NFATの特異性を規定する分子内外の要因を特定する。さらに、その特異性を利用したNFATの制御を行うことの病態生理学的意義を追求することによって、疾患治療を目指した新たな免疫作用薬の開発に結びつけることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) NFATファミリー分子の特異性に関わる

機能ドメインの特定：NFAT は、N 末に  $\text{Ca}^{2+}$  調節領域 (CRD)、中心部に DNA 結合領域 (DBD)、CRD よりさらに N 末側と C 末に転写活性化領域 (TAD) をそれぞれ配した構造を持つ。NFATc2 と NFATc4 の間で、各機能ドメインを交換した種々キメラ分子の発現ベクターを作製し、ヒト末梢 T 細胞および T 細胞株である Jurkat 細胞に遺伝子導入することにより、各キメラ分子を強制発現させた。刺激によって誘導される、IL-2 などのサイトカイン遺伝子発現に与えるそれらキメラ分子の影響を比較検討することにより、NFATc4 のサイトカイン産生抑制作用に関わる分子内領域の同定を試みた。またさらに細分化したサブドメインを交換したキメラを作製して、責任領域を絞り込んだ。

(2) NFAT とその会合分子の結合親和性の定量的比較検討：NFAT は、CRD 内の一カ所または二カ所の領域を介して CN と結合する。また IL-2 などのサイトカイン遺伝子プロモーター、および AP-1 など一部の協調因子とは DBD を介して結合することが知られる (Chen ほか、Nature, 392:42, 1998 ほか)。一方、TNF- $\alpha$  プロモーター上での Jun/ATF2 との協調作用には、C 末の TAD を利用していることを、申請者が最近明らかにした (Kaminuma ほか、J. Immunol, 180:319, 2008)。そこで、各 NFAT ファミリー分子における種々会合分子との結合領域全体もしくはその一部を、N 末に GST、C 末に FLAG タグを結合させた融合蛋白として大腸菌に発現させ、FLAG タグを利用したアフィニティークロマトグラフィーにより高純度に精製した。それらとビオチン化した CN との結合親和性につき、ALPHA 法により定量的に測定し、各 NFAT ならびにその機能ドメイン間で比較検討した。ところがこの方法では、夾雑物の影響で正確なアフィニティを測定することができないことが判明した。そこで、種々の分子間相互作用測定系について再度比較検討した結果、定量的免疫沈降法を用いることによって、最も信憑性の高いデータが得られることを見いだした。NFAT に特異的な結合親和性がみられた領域については、さらに細分化して検討した。

同定した機能ドメインの発現ベクターを T 細胞に導入し、サイトカイン遺伝子発現など、内在性の NFAT が制御する T 細胞機能に与える影響を検討した。

(3) NFAT ファミリーの特異的発現調節機構：各 NFAT の発現調節機構につき、転写および染色体の修飾レベルで解析した。すなわち、各 NFAT のプロモーター/エンハンサー領域のレポーターベクターを作製し、それら特徴的な NFAT 発現パターンを示す各種細胞、例えば、NFATc1、c2 および c3 が強く発

現する末梢 T 細胞や、逆に NFATc4 が特異的に高発現する血管平滑筋細胞等に遺伝子導入した。さらにそのレポーターベクターに変異/欠失を導入して影響を検討することにより、臓器特異的なエンハンサー活性発現の決定要因となるプロモーター領域の決定を試みた。

一方、各 NFAT における遺伝子領域の染色体構造を、制限酵素感受性アッセイ法により発現・非発現細胞間および各 NFAT 分子間で比較解析し、NFAT の特異的発現調節が染色体レベルで制御されているか明らかにした。

(4) NFAT の特異的発現制御因子の同定：前年度 (3) により NFAT の特異的発現がプロモーター制御によることが判明した場合、その臓器特異的発現制御を司るプロモーター領域の配列オリゴを用いたアフィニティークロマトグラフィーを行うことによって、結合分子を精製した。その際、プロモーター活性が消失することが判明した部分変異オリゴを共存させることにより、特異的制御に関わる分子のみを高純度に精製した。それを電気泳動および質量分析することによって、精製蛋白の同定を試みた。

また並行して、NFATc4 が高発現する血管平滑筋細胞より樹立した cDNA ライブラリーを、ゲノムに挿入できるレンチウイルスベクターを用いて構築した。また、GFP 等の蛍光蛋白をレポーター遺伝子にした NFAT プロモーターベクターを、Jurkat 細胞に恒常的に遺伝子導入した細胞株を樹立した。そこに cDNA ライブラリーレンチウイルスを感染させることによって GFP の発現レベルが亢進した細胞を、フローサイトメトリーを利用してソーティングし、限界希釈培養およびクローニングを行うことにより、NFAT プロモーター活性化因子の同定を試みた。

さらに、それら同定した分子が実際に NFAT の特異的制御に関与するか検証した。すなわち、当該分子を遺伝子導入による強制発現することによって、標的 NFAT のプロモーター活性、遺伝子および蛋白発現に与える影響を検討した。

#### 4. 研究成果

まず活性化分子である NFATc2 と抑制性分子である NFATc4 の種々キメラ分子を作製した。それらの発現プラスミドを Jurkat 細胞に遺伝子導入し、各種サイトカイン発現に与える影響を検討した。その結果、NFATc4 によるサイトカイン産生抑制作用の責任領域は、N 末の CRD にマップされることが明らかとなった。その CRD をさらに細分化したサブドメインを NFATc2 と交換したキメラ分子を作製して検討したところ、NFATc4 によるサイトカイン産生抑制作用は、その CRD 領域全体で制

御されていることが明らかとなった (図 1)。

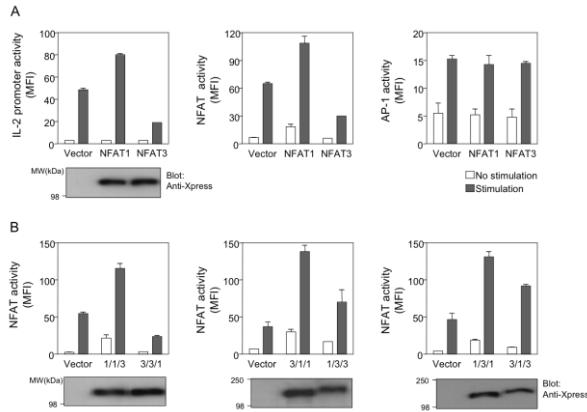


図 1. NFAT 転写活性化に対する NFATc2 (NFAT1) /NFATc4 (NFAT3) キメラ分子の作用。さまざまな NFAT1/NFAT3 キメラの発現ベクターを NFAT プロモーターレポーターベクターと共に Jurkat 細胞に遺伝子導入し、刺激によって誘導される転写活性化に与える影響を検討した。

次に、各 NFAT の部分領域とその調節分子であるカルシニューリンとの結合活性について定量的な比較検討を行った。当初計画していた ALPHA 法では、夾雑物の影響で正確なアフィニティーを測定することができないことが判明した。そこで、種々の分子間相互作用測定系について再度比較検討した結果、定量的免疫沈降法を用いることによって、最も信頼性の高いデータが得られることを見いだした。それにより NFAT の CRD 領域と CN との結合活性を詳細に比較検討したところ、これまで知られている二カ所の CN 結合部位だけでなく、その中間部位も明らかに CN との結合活性を示すことを見いだした。その新たな CN 結合部位 (CNBR3) の CN 結合活性を比較検討したところ、NFATc2 および NFATc4 の CNBR3 は CN 結合に関与するが、NFATc1 および NFATc3 ではほとんど寄与しないことが明らかとなった (図 2)。

そこで、CNBR3 の発現ベクターを NFAT 結合配列レポーターベクターと共に Jurkat 細胞に導入したところ、刺激誘導される転写活性化に対し、CNBR3 は抑制作用を示した。ヒト T 細胞に遺伝子導入すると、CNBR3 は IL-2 遺伝子発現を抑制した。

並行して T 細胞の IL-17A 発現に対する NFAT の役割を比較検討したところ、NFATc2 は NFATc1 に比し IL-17 遺伝子発現を強く誘導し、IL-17A の転写活性化に CNBR3 が関与する可能性が示唆された。CNBR3 は、NFAT の特異的制御を行う上で有望な標的となる可能性が示された。

次に、抑制性分子 NFATc4 における種々のプロモーターレポーターベクターを作製し、種々の細胞でその発現調節機構を検討した。その結果、NFATc4 が高発現する血管平滑筋細

胞において高い転写活性が認められた。そこで、変異/欠失させたレポーターベクターを作製して作用検討することにより、活性中心となる調節領域の絞り込みを行った結果、その転写開始点より -390~-330bp の領域を欠失させることにより、転写活性が劇的に減弱することを見いだした。さらにいくつかの点変異を導入して検討し、その活性中心となる約 20bp のオリゴ配列を同定できた。そこで、その配列オリゴと変異オリゴを用いて血管平滑筋細胞抽出液を免疫沈降し、共沈した蛋白をプロテオーム解析した。

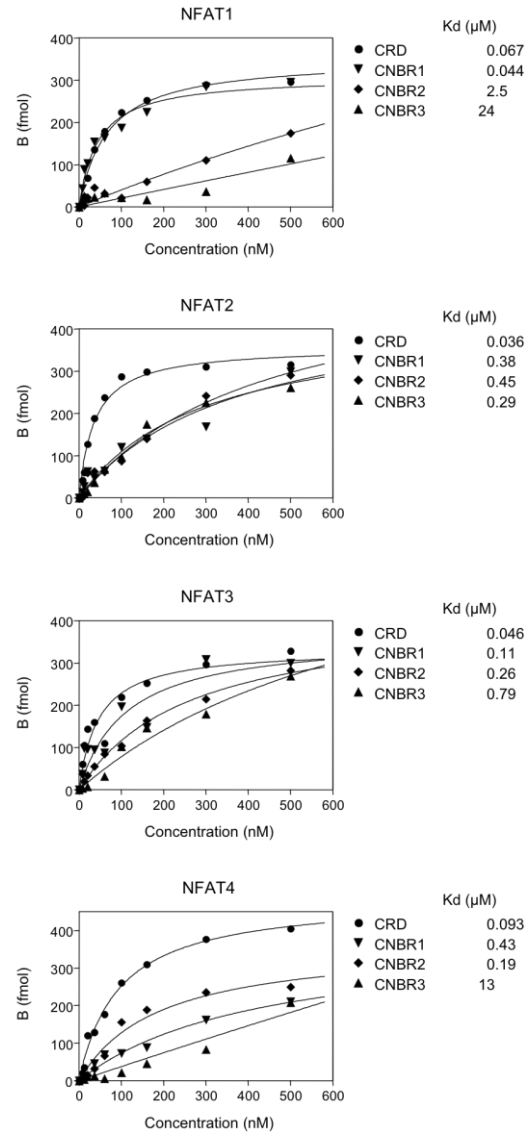


図 2. CN/NFAT 結合活性。リコンビナント CN および NFAT の各部分蛋白を調整し、その結合活性を定量的免疫沈降法により比較検討した。

並行して、血管平滑筋細胞より樹立した cDNA ライブラリーを、NFATc4 プロモーターベクターを恒常的に導入した Jurkat 細胞に導入して転写活性を増強する分子をクロニングした。

それらの結果、合計7種類の分子を同定できたが、各々をサブクローニングした発現ベクターを Jurkat 細胞に導入して強制発現させても NFATc4 の発現を増強せず、見いだされた分子は全て擬陽性であると結論した。

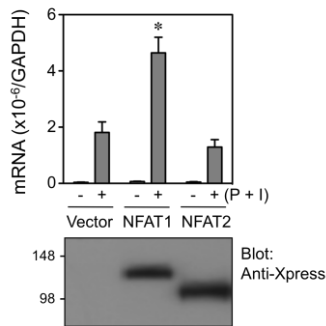


図3. IL-17A 遺伝子発現に対する NFAT の作用. NFATc2 (NFAT1) および NFATc1 (NFAT2) を Jurkat 細胞に遺伝子導入し、刺激によって誘導される IL-17A の mRNA 発現誘導レベルを検討した。

そこで、異なる手法で NFAT 発現調節候補分子の同定を試みた。すなわち、T 細胞と血管平滑筋細胞に発現する遺伝子をマイクロアレイ比較解析し、血管平滑筋で転写調節に関わる 12 分子を抽出した。それらの発現ベクターと NFATc4 プロモーターレポーターベクターを Jurkat 細胞に導入して検討した結果、NFATc4 の転写活性化を誘導し、NFAT の特異的発現制御を可能にする標的分子として有望な WWTR1 を見いだした (図4)。

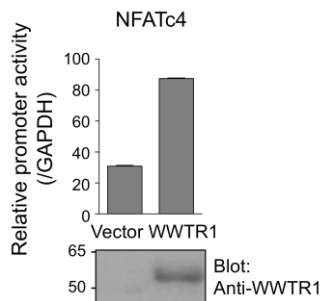


図4. NFATc4 遺伝子発現に与える WWTR1 の影響. WWTR1 の発現ベクターを NFATc4 プロモーターレポーターベクターと共に Jurkat 細胞に遺伝子導入し、転写活性化に与える影響を検討した。

また NFAT との相対比較のため、他の転写制御因子である ZFPM1 および CtBP の Th2 サイトカイン発現に与える影響を明らかにすると共に、in vivo における作用検討を行うための T 細胞移入マウスにおける気道炎症反応モデルについて、CD44 およびステロイド感受性に着目してプロファイリングを行った。

以上、引き続き詳細な検討を進めることによって、臨床応用も可能な選択的 NFAT 制御法を開発できると期待される。

## 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)

1. Kitamura N, Mori A, Tatsumi H, Nemoto S, Miyoshi H, Miyatake S, Kitamura F, Hiroi T, Kaminuma O. Zinc finger protein, multitype 1 suppresses human Th2 development via down-regulation of IL-4. *Int Arch Allergy Immunol*, 155: S53-56, 2011. (査読有り)

2. Abe A, Ohtomo T, Koyama S, Kitamura N, Kaminuma O, Mori A. Comparative analysis of steroid sensitivity of Th cells in vitro and in vivo. *Int Arch Allergy Immunol*, 155: S110-116, 2011. (査読有り)

3. Kato S, Kaminuma O, Hiroi T, Mori A, Ohtomo T, Maeda S, Shimizu H, Obase Y, Oka M. CD44 is critical for airway accumulation of antigen-specific Th2 cells, but not Th1 cells, induced by antigen challenge in mice. *Eur J Immunol*, 41: 3198-3207, 2011. (査読有り)

4. Kitamura F, Kitamura N, Mori A, Tatsumi H, Nemoto S, Miyoshi H, Miyatake S, Hiroi T, Kaminuma O. Selective suppression of Th2 cytokines by C-terminal binding protein 2 in human T cells. *Int Arch Allergy Immunol*, 152: S18-21, 2010. (査読有り)

5. Ohtomo T, Kaminuma O, Kitamura N, Suko M, Kobayashi N, Mori A. Eosinophils are required for the induction of bronchial hyperresponsiveness in a Th-transfer model of Balb/c background. *Int Arch Allergy Immunol*, 152: S79-82, 2010. (査読有り)

6. 神沼 修. NFAT サブタイプ阻害薬開発の意義と可能性. *薬学研究所の進歩* 25: 7-10, 2009. (査読無し)

[学会発表] (計5件)

1. Kaminuma O, Kato S, Mori A, Hiroi T. Antigen-specific Th2 cells specifically utilize CD44 to infiltrate into antigen-challenged lung in mice. 第40回日本免疫学会学術集会 (千葉), 2011. 11. 28.

2. 神沼 修, 北村 紀子, 北村 ふじ子, 巽 英樹, 根本 莊一, 宮武 昌一郎, 森 晶夫, 廣井 隆親. T 細胞の IL-17 産生に対する NFAT ファミリーの機能的相違. *アレルギー・好酸球研究会 2011* (東京), 2011. 6. 18.

3. Mori A, Abe A, Koyama S, Kitamura N, Yamaguchi M, Tanimoto H, Sekiya K, Oshikata C, Mitsui C, Taniguchi M, Ohtomo

M, Maeda Y, Hasegawa M, Akiyama K, Ohtomo T, Kaminuma O. Comparative analysis of steroid sensitivity of Th cells in vitro and in vivo. 30th Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (Istanbul, Turkey), 2011. 6. 13.

4. 神沼 修, 北村 紀子, 森 晶夫, 巽 英樹, 根本 荘一, 廣井 隆親. ZFPM1/CtBP1 コンプレックスは GATA-3 による Th2 分化を抑制する. 第 60 回日本アレルギー学会総会 (東京), 2010. 11. 26.

5. 安部 暁美, 大友 隆之, 神山 智, 北村 紀子, 神沼 修, 森 晶夫. T 細胞クローン移入喘息モデルによるステロイド感受性解析. アレルギー・好酸球研究会 2010 (東京), 2010. 6. 19.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

神沼 修 (KAMINUMA OSAMU)

財団法人東京都医学総合研究所

ゲノム医科学研究分野・主任研究員

研究者番号：80342921