

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659128

研究課題名(和文) 転写因子NF- κ Bによるエピゲノム制御

研究課題名(英文) Epigenetic regulation by transcription factor NF- κ B

研究代表者

秋山 泰身 (AKIYAMA, Taishin)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：50327665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：NF- κ Bファミリーの一つRelBは細胞の分化を制御するシグナル誘導型の転写因子である。本研究課題により、胸腺の髄質上皮細胞の分化においてRelBが機能する段階について知見が得られた。また細胞刺激に依存したRelBの核移行の挙動を可視化することができた。これらの成果は、不明な点が残るRelBの活性化機構の一端を明らかにするとともに、自己免疫の抑制に必須な髄質上皮細胞の分化機構に関する新たな知見を与える。

研究成果の概要(英文)：RelB is a member of NF- κ B family, which is activated by various extra-cellular signaling, and regulates differentiation of immune stroma cells in several lymphoid tissues including thymus. This project provides information regarding to roles of RelB in differentiation of medullary thymic epithelial cells that are essential for preventing the onset of autoimmune diseases. Moreover, dynamics of nuclear localization of RelB induced by stimulation has been newly identified in this study. These findings would contribute to uncovering molecular mechanisms underlying stimulus-dependent activations of RelB and also would provide new insights in the molecular mechanism regulating differentiation of medullary thymic epithelial cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：NF- κ B 細胞分化 胸腺 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

NF-kappaB ファミリーは細胞増殖、細胞死、炎症など様々な生命現象に関わる誘導型の転写因子である。NF-kappaB ファミリーは、通常は不活性化状態として細胞質に存在するが、細胞外からのシグナルに反応して核移行し、特定配列のゲノム DNA に結合して転写を誘導する。NF-kappaB ファミリーの中で転写活性化ドメインを持つものは RelA, RelB, c-Rel の3つであり、他は2量体を形成することで DNA 結合に寄与する。細胞外からのシグナルを細胞内で伝達する経路は、RelA と c-Rel の核移行を誘導する古典的経路、RelB の核移行を誘導する非古典的経路に分かれる。古典的経路は細胞外シグナルにより迅速に活性化し、非古典的経路は遅れて活性化するが、どちらもほぼ同じ配列の DNA に結合するとの考えが一般的である。他のグループによる欠損マウスの解析から、RelB はリンパ組織の形成に必須であることが明らかとなった。すなわち RelB は細胞分化を制御するために、他の NF-kappaB で相補できない特殊な機能を持つと推論できる。

T 細胞が胸腺で分化途中で自己抗原を認識するとアポトーシスで除去され、その結果、自己抗原に対する免疫応答は抑制される。胸腺の髄質領域に局在する上皮細胞（髄質上皮細胞）は、（インシュリンのように）通常は末梢組織にだけ発現するタンパク質を多量にわたり異所的に発現する特殊な性質を持ち、これら組織特異的抗原を認識する T 細胞は分化途中で除去される（Kyewski et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 24 571, 2006）。髄質上皮細胞による組織特異的抗原の異所的な発現にはエピゲノム制御が重要と報告されたが（Tycocinsky et al., *PNAS*, 107 19426, 2010）、髄質上皮細胞が分化する際に、どのような機構でエピゲノム状態が変化するのか不明である。一方、申請者は髄質上皮細胞の分化シグナルの研究を行い、TNF レセプターファミリー RANK と CD40 のシグナルが RelB を活性化し、髄質上皮細胞の分化を誘導することを報告した（Akiyama et al. *Science* 308 248, 2005; Akiyama et al., *Immunity* 29 423, 2008; Hikosaka et al., *Immunity* 29 438, 2008）。すなわち RelB の活性化は、何らかの機構を介して、最終的には髄質上皮細胞のエピゲノム状態を変化させることになる。

培養細胞を使った網羅的な NF-kappaB シグナル関連因子のプロテオーム解析によると、RelB はクロマチン構造変換因子 SWI/SNF 複合体と結合することが報告されている

（Bouwmeester et al., *Nat. Cell. Biol.*, 6 97 2004）。実際、申請者らを含めた共同研究で、SWI/SNF 複合体に結合するタンパク質 Requiem が RelB に結合することを報告した（Tando et al., *JBC*, 285, 21951, 2010）。

2. 研究の目的

RelB がクロマチン構造変換因子と結合するとの結果にどのような生理的意義があるのか現在まで不明である。しかしながら、項目1で述べた申請者らの髄質上皮細胞に関する研究と考え合わせると、RelB は配列特異的な転写活性化能に加え、エピゲノムを変化させる活性を持つため細胞の分化を誘導する可能性がある。そこで、本研究課題は、RelB が分化に必須な髄質上皮細胞を材料として、RelB によるエピゲノムの制御を立証することを最終目的とした。

3. 研究の方法

RelB を特異的に認識するとともに免疫沈降を可能にするために、RelB の C 末端に Venus および Flag タグを結合させたノックインマウス（以下 RelB-KI と略）を準備した。これらのマウスを利用して、RelB が機能する髄質上皮細胞の分化段階について知見を得るとともに、Flag タグを利用した免疫沈降実験を行うことで、結合するタンパク質や DNA の同定を目指した。

1) RelB-Venus-Flag の機能性についての検証

RelB 欠損マウスは、胸腺髄質上皮細胞の分化異常に加えて、全身の様々な臓器に炎症性細胞浸潤を伴う自己免疫疾患様の症状を呈する。RelB-Venus-Flag が RelB と同じ機能を持っているのか検証するために、RelB-KI と RelB 欠損マウスの表現型を比較した。生後3週令の RelB 欠損マウスを解析したところ、胸腺髄質上皮細胞の形成不全、リンパ節形成不全、肝臓などにおける炎症性細胞浸潤を呈したが、RelB-KI は、野生型との違いが認められなかった。これらの結果より、RelB-Venus-Flag は野生型 RelB と同じ機能を持つと結論した。

2) 胸腺髄質上皮細胞における RelB-Venus-Flag の発現と活性化

成体 RelB-KI マウスの胸腺を共焦点顕微鏡により確認したところ、Venus による蛍光が胸腺髄質上皮細胞で確認できた。さらに胎仔胸腺ストローマ器官培養を RANK リガンドで刺激した場合においても、Venus の蛍光が核内で観察できた。これらの結果は、RelB-Venus-Flag が RANK リガンド刺激依存的に胸腺髄質上皮細胞で活性化し、核移行し

ていることを強く示唆している。

3) 胎仔期の胸腺髄質上皮細胞の分化において、RelB が機能する分化段階の検討

胎仔期において RelB が機能する分化段階を検証するために、様々な RelB 欠損胎仔マウスより、胸腺を採取し、フローサイトメーターにより解析を行った。その結果、胸腺髄質上皮細胞の分化段階の比較的初期において RelB が機能することが分かった。これらの結果から、RelB が機能する段階の髄質上皮細胞は、1 個体あたり非常に少数であることが分かった。従って、これらの細胞における RelB 結合因子の同定は困難が予想された。そこで、調製が容易な他の細胞における RelB 結合因子の同定を検討項目に加えて、その結果を参考にして、胸腺髄質上皮細胞における RelB 結合因子の同定を目指すとの方向性の修正を行った。

4) 胸腺髄質上皮細胞の DNA メチル化状態の検討

胸腺髄質上皮細胞の分化段階におけるエピジェネティクス状態の変化を検討するため、髄質上皮細胞で発現している因子のゲノム DNA におけるメチル化状態を検討した。その結果、髄質上皮細胞で特徴的に発現する因子のいくつかでは、胎齢が進むに従い、メチル化が減少している CpG 配列が存在していた。

5) マウス繊維芽細胞における RelB の核移行の検討

胸腺髄質上皮細胞を用いた実験の前段階としてマウス繊維芽細胞を用いて、サイトカイン刺激依存的な RelB の核移行を検討した。RelB-KI の胎仔より繊維芽細胞を樹立した。マウス繊維芽細胞では RANK が発現していないため、髄質上皮細胞の分化を制御する他の TNF レセプターであるリンホトキシン b レセプターによる刺激実験を行い、RelB-Venus が核移行することを、タイムラプス顕微鏡を用いて確認した。現在、核移行における RelB の挙動を含めて、RelB の標的因子とエピジェネティクス制御の可能性について検討を行っている。

4 . 研究成果

本研究課題により RelB を可視化することで、RelB が機能する胎仔期の胸腺髄質上皮細胞の分化段階について知見が得られた。RelB は胸腺髄質上皮細胞の分化を制御し、自己免疫を抑制する重要な転写因子の一つであり、その機能に関する知見は、自己免疫疾患など免疫関連疾患の発症機構解明や治療戦略に

創出に寄与する可能性がある。

また本研究課題により RelB が核移行する際の動的な振る舞いを明らかにできた。RelB の核移行過程の可視化は、これまでに報告がなく、今後の解析により RelB の機能の特徴づける動的性質が明らかになる可能性がある。

本研究課題では、胸腺髄質上皮細胞において RelB に結合する因子群の網羅的な同定を目指したが、RelB が機能する分化段階の髄質上皮細胞が希少なため、現在のところ、まだ成功には至っていない。今後は、現在樹立した RelB-KI マウス由来繊維芽細胞を精査することで、標的因子についての知見を得た上で、当該分子の胸腺髄質上皮細胞における結合について検討を進める予定である。

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 4 件)

1) Akiyama T, Shinzawa M, Qin J and Akiyama N
Regulation of gene expressions in medullary thymic epithelial cells essential for preventing the onset of autoimmune disease
Front. Immunol. 4:249 (2013)
doi: 10.3389/fimmu.2013.00249.

2) Wu G, Hirabayashi K, Sato S., Akiyama N., Akiyama T., Shiota K., and Yagi S.
DNA methylation profile of Aire-deficient mouse medullary thymic epithelial cells
BMC Immunol. 13, 58 (2012).
doi: 10.1186/1471-2172-13-58.

3) Akiyama T, Shinzawa M and Akiyama N
RANKL-RANK interaction in immune regulatory systems
World J. Orthop. 3:142-150 (2012)
doi: 10.5312/wjo.v3.i9.142.

4) Akiyama T, Shinzawa M and Akiyama N
TNF receptor family signaling in the development and functions of medullary thymic epithelial cells.
Front. Immunol. 3:278 (2012)
doi: 10.3389/fimmu.2012.00278

[学会発表] (計 6 件)

1) 秋山泰身
「胸腺髄質上皮細胞の分化における非古典的 NF-kappaB 活性化シグナルの役割」
京都 T 細胞会議、2012 年 7 月 6 日、芝欄会館・京都

2) Taishin Akiyama
「The negative feedback regulation of thymic microenvironment required for self-tolerance」

ThymUS 2012、2012年11月7日、米国・マイアミ市

3) 秋山泰身

「Sequential regulation of the development of medullary thymic epithelial cells by NF-κB family」

第41回日本免疫学会学術総会、2012年12月5日、神戸国際会議場・神戸市

4) Taishin Akiyama ら

「Requirement of RANKL signaling for maintenance of mature mTECs in adult thymus」

京都T細胞国際会議、2013年6月4日、芝罘会館・京都

5) 滝沢信和、秋山泰身

「Roles of lymphotoxin signaling in the development of medullary thymic epithelial cells essential for preventing autoimmunity」

Gradients and Signaling: from chemotaxis to development、2013年11月12日、沖縄化学技術大学院大学・沖縄

6) 秋山泰身

「胸腺髄質上皮細胞の分化と機能を制御する分子機構」

第33回日本胸腺研究会、2014年2月8日、伊藤国際学術研究センター・東京

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 泰身 (AKIYAMA, Taishin)

東京大学 医科学研究所 准教授

研究者番号：50327665