

リンパ球の分化を制御する転写調節機構の解明と治療への応用

研究課題名：リンパ球の分化を制御する転写調節機構の解明と治療への応用

理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター 免疫転写制御研究チーム チームリーダー
谷内 一郎

● 研究のねらい：

生物の発生・分化プログラムの根幹をなすのは、ゲノム情報から適切な情報を適切な時期に発現させることであり、遺伝子発現（転写調節）制御機構の解明は広く生物学の重要な課題と言える。Runxファミリーは核内転写因子ファミリーであり、DNA結合領域であるRuntドメインを保有する α ユニットがDNA結合能をもたない β ユニットとヘテロ2量体を形成し、機能を発揮すると考えられており、生物種を超えて多くの発生・分化過程に重要な役割を果たすことが知られている。哺乳類では α ユニットをコードする遺伝子としてRunx1、Runx2、Runx3の3つの遺伝子、 β ユニットをコードする遺伝子としてCb β 遺伝子が単離されている。いずれのRunxファミリー遺伝子も広く血球系細胞に発現しており、白血病や自己免疫疾患などのヒト疾患との関連性が指摘されている。一方で、免疫系細胞の分化や免疫系の機能制御におけるRunxファミリーの役割は良く解っていない。本研究課題では、リンパ球分化を制御する転写調節機構の解明を目標に、特にRunxファミリーに焦点を当て、主に遺伝学的なアプローチを用いて、免疫系の分化・機能制御におけるRunxファミリーの機能解明とRunxファミリー機能不全に起因する免疫疾患の発症機序の解明し、免疫疾患の新たな制御法の開発につながる成果を得ることを目標に研究を行った。

● 研究結果と考察

Runxファミリーの全ての α ユニットは、その機能発現にはCb β との2量体形成が必須であり、Cb β の欠損により全てのRunx複合体の機能が欠損すると考えられる。また、いずれのRunx遺伝子のヌル変異マウスも胎生期あるいは生後直後に死亡する。そこで、免疫系でのRunxファミリーの機能を解析する為に、まず研究材料として、Runxファミリー遺伝子に関してCre-loxPの系を用いたコンディショナルノックアウトマウス、特異的なアイソフォームを欠損するマウス、ある機能ドメインのみを欠損するマウス等を作製することから研究を開始した。研究終了報告会では、これらRunxファミリー変異マウスの解析により得られた、Runxファミリーの免疫系での新たな機能とその破綻による疾患発症に関して発表する。

1. CD4⁺CD8⁺ DP 胸腺細胞の運命決定におけるRunx転写因子の機能解析

$\alpha\beta$ TCRを発現する末梢成熟Tリンパ球は主にCD4⁺CD8⁺ヘルパーT細胞とCD4⁺CD8⁺細胞傷害性T細胞という異なる機能を持つ2つの亜集団から構成されるが、ヘルパーT細胞と細胞傷害性T細胞は胸腺内で共通の前駆細胞であるCD4⁺CD8⁺ DP胸腺細胞から分化する。CD4⁺CD8⁺ DP胸腺細胞がどちらの系列の細胞に分化するかを決定する分子機序（細胞の運命決定機構）の理解は免疫学において長年の課題と言える。CD4⁺CD8⁺ DP胸腺細胞の運命決定にはCD4/CD8分子の発現がよく相関し、RunxファミリーがCD4遺伝子の細胞傷害性T細胞特異的な発現抑制に関与していることから、RunxファミリーがCD4⁺CD8⁺ DP胸腺細胞の運命決定に関与するか検討した。

CD4⁺CD8⁺ DP胸腺細胞でRunx1とRunx3遺伝子が不活性化されたRunx1^{f/f}:Runx3^{f/f}:Cd4マウス(R1R3DKO)やコリプレッサータンパクとの結合に必須であるC末のVWRPY配列を欠損したRunx1のみを発現するRunx1 ^{Δ 446}変異マウスをRunx3^{fllox}:Cd4と交配して作製したRunx1 ^{Δ 446/ Δ 446}:Runx3^{f/f}:Cd4マウス(R1D446R3DKO)では、胸腺内でCD8陽性の細胞傷害性系列の細胞の分化が障害されていた。

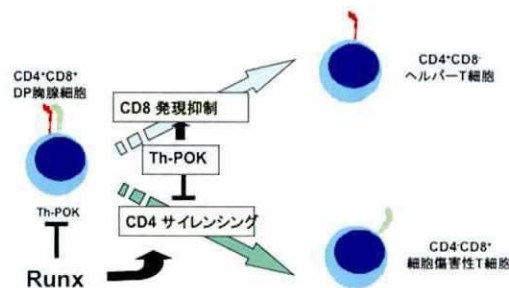
CD8⁺細胞傷害性系列細胞の分化障害の原因としては、クラスI拘束性細胞の特異的な分化障害とクラスI拘束性胸腺細胞の細胞運命の転換が考えられる。そこで、R1D446R3DKOマウスをクラスII欠損マウスと交配しクラスI拘束性細胞の分化を解析した所、ほとんどのクラスI拘束性細胞が機能的にも遺伝子発現プロファイル的にもヘルパー系列の細胞に近いCD4⁺CD8⁺細胞に分化していた。このことから、CD4⁺CD8⁺ DP胸腺細胞で

の Runx 複合体機能不全はクラス I 拘束性細胞の運命転換を誘導することが明らかとなった。

3 年前に CD4⁺ ヘルパー系列細胞の分化を制御するマスター分子として *Th-POK/cKrox* 遺伝子が同定され、*Th-POK* 遺伝子の CD4⁺CD8⁺DP 胸腺細胞への強制発現により、TCR の MHC 拘束性に関わらず正の選択を受けた全ての胸腺細胞は CD4⁺CD8⁺ のヘルパー T 細胞系列に分化する事が示された。そこで、*Th-POK* 遺伝子の発現を解析した所、Runx 複合体の機能を欠損する CD69CD4⁺CD8⁺DP 胸腺細胞では本来ならば発現の見られない *Th-POK* 遺伝子が有意に発現していた。また、胸腺細胞の成熟過程で徐々に Cb β タンパクを喪失する *Cb β ^{fl/fl}:Cd4* マウスでは、末梢の CD8⁺T 細胞で *Th-POK* 遺伝子の発現が見られ、更に Cb β タンパクの再発現により *Th-POK* 遺伝子の発現が抑制された。これらの結果より、Runx 複合体を介した *Th-POK* 遺伝子の発現抑制は細胞傷害性 T 細胞の分化に必須であることが明らかとなった。

次に、Runx 複合体が *Th-POK* 遺伝子の発現を抑制する機構の解析を行なった。まず抗 Cb β 2 抗体を用いていわゆる ChIP on chip 法を行ない、Runx 複合体が *Th-POK* 遺伝子座に直接結合するか検索した所、転写開始点上流（プロモーター領域）とイントロン領域の 2 カ所に結合が見られた。これらの領域内には種を超えて保存された Runx 認識配列が存在していた。そこで、レポータートランスジェニックマウスを作製し、これら領域の機能を検討した所、プロモーター領域のみではヘルパー T 細胞特異的な発現は得られず、イントロン領域の挿入により、系列・分化段階特異的なトランスジーン発現が誘導できた。この結果から、Runx 複合体が *Th-POK* 遺伝子座のプロモーター/イントロンエンハンサーに結合することで、プロモーター/エンハンサー相互作用が負に制御され、*Th-POK* 遺伝子の発現が抑制されていると考えられた。

以上の結果から、CD4⁺CD8⁺ DP 胸腺細胞の運命決定は Runx と *Th-POK* を中心とした転写因子ネットワークのバランスにより制御されていることを明らかにとなった（下図参照）。また CD69CD4⁺CD8⁺DP 胸腺細胞での *Th-POK* 遺伝子の脱抑制は、MHC-TCR 相互作用による細胞運命の選別が行なわれる前からヘルパー T 細胞への分化誘導プログラムが抑制されていることを示し、新たな概念を提出するものといえる。



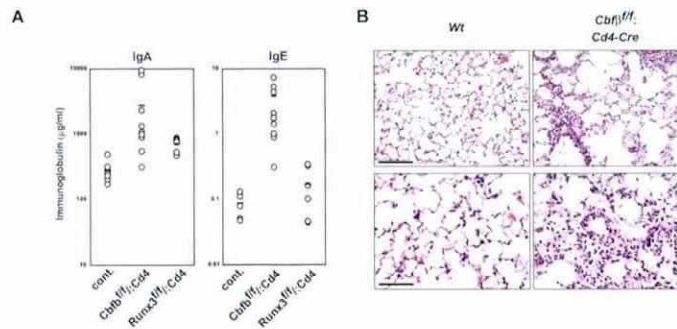
Runx/Th-PLK を中心とした転写因子ネットワークによる DP 胸腺細胞の運命決定機構

2. CD4⁺ヘルパー T 細胞の分化における Runx 転写因子の機能

CD4⁺ ヘルパー細胞は抗原刺激により幾つかのサブセットに分化し、特徴的なサイトカインを分泌する。良く知られているのは、IFN γ 産生を特徴とする Th1 細胞と IL4 産生を特徴とする Th2 細胞であり、Th1/Th2 バランスの異常、特に Th2 優位な免疫応答はアレルギー疾患の発症に深く関与することが知られている。IFN γ /IL4 は排他的な発現パターンを示し、Th1 細胞では IL4 は産生されないことは良く知られているが、この IL4 産生抑制機構は良く解っていない。2 年前に IL4 遺伝子座の 3' 側に位置する HSIV サイトにはサイレンサー活性があり、Th1 細胞での IL4 産生抑制に重要であることが示され、IL4 サイレンサーと名付けられた。

一方、Runx3 や Cb β を T 細胞で欠損したマウスでは血清 IgE の高値と肺への細胞浸潤といった喘息様の症状を自然発症する。これらマウス由来の CD4⁺ ナイブ T 細胞を刺激すると IL4 の産生が亢進しており、更に試験管内で CD4⁺ ナイブ T 細胞を抗 IL4 抗体と IL12 存在下で培養しより Th1 分化を誘導した所、IFN γ を産生する細胞からも IL4 が産生されており、IFN γ /IL4 共産生細胞が分化していた。そこで、ChIP により Runx 複合体が IL4 サイレンサーに結合するか検討した所、CD4⁺ ナイブ T 細胞と Th1 細胞では結合が見られたが、Th2 細胞では結合は検出出来なかった。このことから、Runx 複合体が IL4 サイレンサーに結合することが、IL4 サイレンサーの機能発現に必須であり、IL4 の脱抑制による Th2 優位な免疫応答が喘息様症状の発症に関

与していると考えられた。しかしながら、IL4の脱抑制だけで疾患の発症が説明出来るとは思えず、Runx 複合体機能不全はCD4⁺ヘルパーT細胞の他の機能にも影響すると考えられた。興味深いことに、T細胞でのRunx機能不全は血清IgAの上昇も引き起こし、またCbfβ2欠損マウスでは幼少期より大腸へのIgA陽性の形質細胞様細胞の浸潤が見られ炎症性腸疾患を発症する。これらの結果は、エフェクターT細胞でのRunx機能不全はIL4の脱抑制に加え他の機能異常を示唆するものであり、今後CD4⁺ヘルパーを始めとするエフェクターT細胞分化におけるRunx複合体の機能を更に詳細に解明していくことは、マウスでの病態解明、ひいてはヒト疾患の病理機序の解明につながる重要な課題と考えられた。



T細胞特異的Cbfβ欠損マウスで見られる高IgE血漿と肺へのリンパ球浸潤

今後の展望

今回は時間の関係で発表出来ないが、本研究課題により、Runx複合体はリンパ組織の形成に重要であるLTi細胞の分化、 $\gamma\delta$ T細胞や樹状細胞の分化にも関与することが明らかとなって来ており、当初の予想以上にRunx複合体が免疫系細胞の分化制御・機能制御に関与していると感じている。今後は各々の制御機構の分子生物学的な解明に務め、生理学的な側面を明らかにすると共に、Runx複合体機能不全に起因する病理的な側面を明らかにし、ヒト疾患発症への関与をより一層明らかにすることが、将来的な治療法・制御法の開発には重要であろう。Runxファミリーの機能は多種多様である為、その機能を制御することはリスクを伴うと予想され、まず生理的な機能を解明する基礎的な研究を確実にこなすことが肝要と感じている。

主要論文リスト

1. Taniuchi I, Ellmeier W and Littman D.R. (2004) The CD4/CD8 Lineage Choice: New Insights into Epigenetic Regulation during T Cell Development. **Adv. Immunol.** 83: 55-89.
2. Taniuchi I, and Littman D.R. (2004) Epigenetic gene silencing by Runx proteins. **Oncogene** 23: 4341-45.
3. Fukushima-Nakase Y, Naoe Y, Taniuchi I, Hosoi H, Sugimoto T, and Okuda T. (2005) Shared and distinct roles mediated through C-terminal subdomains of Acute Myeloid Leukemia/Runt-related Transcription Factor molecules in murine development. **Blood** 105: 4298-4307.
4. Egawa T, Eberl G, Taniuchi I, Benlagha K, Geissmann F, Hennighausen L, Bendelac A and Littman D.R. (2005) Genetic Evidence supporting selection of the Va14i NKT cell lineage from double positive thymocyte precursors. **Immunity** 22: 705-716.
5. Wang X, Blagden C, Fan J, Nowak S, Taniuchi I, Littman D.R and Burden S.J. (2005) Runx1 prevents wasting, myofibrillar disorganization, and autophagy of skeletal muscle. **Genes & Dev.** 19: 1715-1722.
6. Grueter B, Petter M, Egawa T, Laule-Kilian K, Aldrian C.J, Wuerch A, Ludwig Y, Fukuyama H, Wardemann H, Waldschuetz R, Moroy T, Taniuchi I, Steimle V, Littman D.R and Ehlers M. (2005) Runx3 Regulates Integrin E/CD103 and CD4 Expression during Development of CD4-/CD8+ T Cells. **J. Immunol.** 175:1694-1705.
7. Kramer I, Sigrist M, de Nooij J.C, Taniuchi I, Jessell T.M and Arber S. (2006) A role for Runx transcriptional factor signaling in dorsal root ganglion sensory neuron diversification. **Neuron**, 49:379-393.

特許

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 (出願番号2006-008654)