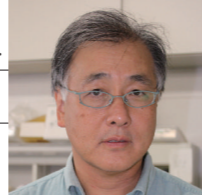


サブチームリーダー Subteam Leader

土井 貴裕 (医博)

Takahiro DOI, M.D., Ph.D.



生体応答情報技術開発サブチーム

Subteam for BioSignal Integration

ミッションと事業概要 Mission

我々のチームのミッションは、(1)バイオリソースセンターに寄託されているリソースの特性解析、(2)リソースの有効な利用法を示すことである。最終目的は、リソースの付加価値を高め、より広範囲のユーザーにリソースを活用して頂くことである。リソースの特性解析として、我々は細胞および個体レベルでの生体応答反応を取り扱っている。その中でも、多様な生体反応を制御している最も重要な因子である転写因子NF-κBが関与する生体応答機構に焦点を当てている。

The main missions of our team are (1) characterization of bioresources deposited in BioResource Center, (2) demonstration of the best use of the bioresources. And the final goal is the increase of value of bioresources. For characterization, we deal with bioresponse that is response of cells or lives to stimulation from outside. And we focus on bioresponse which transcription factor NF-κB is involved in, because NF-κB is one of the most important factors that regulate various types of bioresponses.

平成21年度の成果

Research and Development in 2009-2010

(1) 転写因子NF-κBの生理的機能の解明

転写因子NF-κBは、5つのメンバー (RelA, RelB, c-Rel, p50, p52) からなるファミリーを形成し、外界からの様々な刺激に対する生体応答を司る重要な因子である。細胞質内でヘテロダイマーを形成しているNF-κBは、細胞外からの刺激によって核内へ移行し、生体応答調節機構に関連する多くの遺伝子の転写活性を行う。RelAの機能解析を目的として作製したRelA遺伝子欠損マウスは胎生期致死であり、解析が困難であった。そこで我々は、①RelAを欠損する胎児肝細胞を移植して骨髄を再構築したマウス、②RelA欠損マウスの死因である腫瘍壊死因子 (TNF) を同時に欠損するTNF^{-/-} RelA^{-/-} マウス、を作出してそのそれぞれの表現型について解析を行った。

(1) Characterization of biofunction of NF-κB

NF-κB consists of five members; RelA, RelB, c-Rel, p50 and p52 and functions as the major mediator for response against a various types of stimuli from outside. In the cytoplasm, NF-κB is present as a heterodimer complex. After activation, NF-κB translocates to the nucleus and transcriptionally regulates many genes. RelA deficient mice are embryonic lethal due to TNF. Therefore it was too difficult to analyze how RelA would function in bioresponse mechanisms. To solve this problem, we generated (1) mice which have reconstituted bone marrows with fetal livers deficient of RelA, (2) mice deficient of RelA and

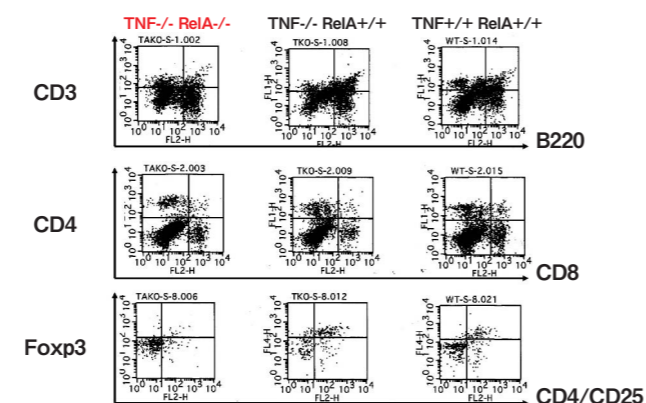
Tumor Necrosis Factor (TNF).

(2) RelAの欠損によって引き起こされるリンパ球の分化異常と骨代謝異常の機序の解析

RelA欠損胎児肝細胞を移植したマウスの解析から、脾臓においてTおよびBリンパ球の細胞数が著しく減少していることが判明した。骨髄においては、B220およびCD3eを発現する細胞が減少していたが、骨髄球 (CD11b⁺/Gr-1⁺) および赤芽球 (Ter-119⁺) は正常であった。胎児肝から再構築した骨髄を用いて2次移植を行ったマウスを解析したところ、TおよびBリンパ球の細胞数が激減していた。これらのマウスの骨髄を解析した結果、TおよびB共通のリンパ球前駆細胞 (Lin⁻/IL-7Ra⁺) が軽度であるが減少していた。さらに、移植マウスの骨を解析したところ、

脾臓細胞のリンパ球プロファイリング (図1)

Lymphocyte profiling of spleen cells (Fig.1)



RelA欠損胎児肝細胞、および再構築したRelA欠損骨髄を移植したマウスでは、コントロールマウスと比較して、明らかに骨粗鬆症様の病態を呈した。骨芽細胞の動態を解析したところ、in vivo, in vitro両方において、機能亢進および機能障害のいずれも観察されなかった。これらのことは、RelAが骨芽細胞を介した骨代謝機構と骨芽細胞と同等の由来である造血ニッチを介した造血機構に重要な制御を行っている可能性を示唆している。

(2) Deficiency of NF-κB/RelA molecule in hematopoietic cells impairs lymphocyte development and bone metabolism: a possibility on a damage of hematopoietic niche.

In order to examine the role of RelA in hematopoiesis, we transplanted fetal liver cells into lethally irradiated host mice. Compared with mice transplanted with RelA-sufficient fetal liver cells, reduced number of T and B lymphocyte in spleen developed in some of mice transplanted with RelA-deficient fetal liver cells. In bone marrow, the number of cells expressing B220 or CD3e was significantly reduced in RelA-deficient fetal liver chimeric mice. In contrast, the development of CD11b⁺ Gr1⁺ myeloid cells and Ter119⁺ erythroid cells was intact. The mice which received second transplantation with RelA-deficient bone marrow cells had significant reduced number of T and B lymphocytes. The number of Lin⁻/IL-7Ra⁺ cells, which contained common lymphoid progenitors, was rather reduced in the bone marrow. RelA-deficient fetal liver- or bone marrow-chimeric mice were much thinner than wild type chimeric mice and looked osteoporotic. However, the differentiation of RelA-deficient osteoclast was not accelerated nor impaired in vitro and in vivo. Taken together, our data indicate the possibility that RelA would critically regulate the function of osteoblast cells in bone metabolism and hematopoietic niche cells in hematopoiesis.

(3) RelAの欠損によって自己免疫疾患が発症する機序の解析

制御性T細胞は、免疫機構の恒常性維持に重要な役割を果たしている。Foxp3は制御性T細胞の機能発現に最も重要な因子であるが、その制御機序については解明されていない。我々が作出したTNF^{-/-} RelA^{-/-} マウスは、生後3-4週以内に死亡し、特徴的な病理組織像として肝臓を始めとする多臓器へのリンパ球浸潤が見られる。このマウスの脾臓細胞ではFoxp3の発現が欠失しており、これらの細胞を免疫不全マウスに投与すると自己免疫疾患様の病態を呈した。in vitroにおいてTNF^{-/-} RelA^{-/-} マウス由来の脾臓細胞 (CD4⁺/CD25⁻) をTGF-βを用いて刺激しても、Foxp3の発現誘導はされなかった。さらに、正常マウス由来のFoxp3陽性T細胞をTNF^{-/-} RelA^{-/-} マウスに投与することにより、病態の進行に対する抑制効果が見られた。以上のことから、TNF^{-/-} RelA^{-/-} マウスに観察される病態は自己免疫疾患であり、RelAがFoxp3の発現制御を通して自己免疫疾患の制御機構に重要な役割を担っていることを明らかにした。

(3) NF-κB/RelA subunit plays the critical role on autoimmunity.

Regulatory T cells (Treg) engage in the control for immune homeostasis. Foxp3 is the most critical for the function of those regulatory T cells. However it still remains to be elucidated that on the mechanism of transcriptional activation for Foxp3. Those mice die within 3-4 weeks after birth. Histological feature is that there are a lot of lymphocytes infiltrating in livers and closely similar to autoimmune diseases. Administration of TNF^{-/-} RelA^{-/-} spleen cells into immune-deficient mice (SCID) developed autoimmune disease-like status. Spleen cells were defect from TNF^{-/-} RelA^{-/-} mice have no expression of Foxp3. With in vitro induction of regulatory T cells from CD4⁺/CD25⁻ spleen cells using TGF-β, Foxp3⁺ cells did not appear. And administration of CD4⁺/CD25⁺ cells derived from wild type mice suppressed autoimmune disease-like status in TNF^{-/-} RelA^{-/-} mice. Thus we demonstrated that RelA was the critical regulator for regulatory T cells through regulation of Foxp3 expression.

職員とメンバー構成 Members

サブチームリーダー Subteam Leader
土井 貴裕 Takahiro DOI, M.D., Ph.D.

開発研究員 Research & Development Scientist
三瀬 節子 Setsuko MISE, Ph.D.

特別研究員 Postdoctoral Researcher
深澤 太郎 Taro FUKAZAWA, Ph.D.

派遣職員 Agency Staff
小川 ちいみ Chiimi OGAWA / 坂田 ひろみ Hiromi SAKATA

パートタイマー Part-Timer
鈴木 かおり Kaori SUZUKI / 田中 可恵子 Kaeko TANAKA

