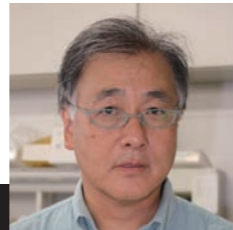


生体応答情報技術開発サブチーム

Subteam for BioSignal Integration

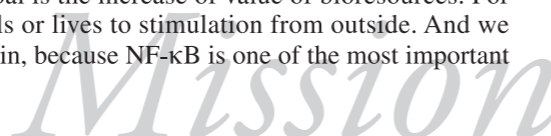


サブチームリーダー 土井 貴裕 (医博)
Takahiro DOI, M.D., Ph.D.

ミッションと事業概要

我々のチームのミッションは、(1) 理研BRC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。そして最終的には、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 RIKEN BRC, (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22年度の成果

Development of Technology in 2010-2011

(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

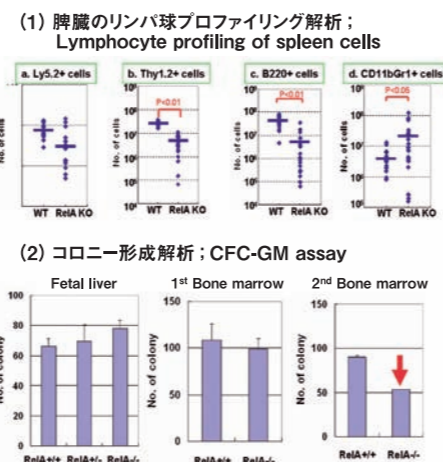
NF-κB consists of five members; RelA, RelB, c-Rel, p50 and p52 and functions as the major mediator for response against a various types of stimuli from outside. In the cytoplasm, NF-κB is present as a heterodimer complex. After activation, NF-κB translocates to the nucleus and transcriptionally regulates 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) NF-κB/RelAによるリンパ球分化の制御機構の解析

RelAの造血能における働きを解析することを目的として、RelA欠損骨髄を再構築したマウスについてプロファイリング解析を行った。脾臓リンパ球の解析を行った結果、コントロール (同胞のWT胎児肝の移植により骨髄を再構築したマウス) に比較して、著しくBリンパ球 (B220+) ならびにTリンパ球 (CD3+)

リンパ球分化能の解析 (図1)

Analysis of lymphopoiesis (Fig.1)



が減少していた。2次移植の骨髄のプロファイリング解析では、リンパ球の前駆細胞 (Lin-IL-7Rα+) が減少していることが明らかとなった。この骨髄細胞を用いて *in vitro* においてCFC-GMアッセイを行い造血幹細胞について解析した結果、2次移植のRelA欠損骨髄ではコロニー形成が著しく低下していた。2次移植にて再構築した骨髄を用いてさらに3次移植を行った結果、RelA欠損骨髄を移植したマウスは全例早期に死亡した。これらのことから、RelAは造血幹細胞の維持に重要な働きをしていることが示唆された。

(2) Analysis of the regulatory mechanism for lymphopoiesis with NF-κB/RelA

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. The number of Lin-IL-7Rα+ cells, which contained common lymphoid progenitors, was also reduced in the bone marrow. And we detected with CFC assay that colony forming activity was significantly decreased in RelA-deficient bone marrow cells. After the third transplantation, all mice which receive RelA-deficient hematopoietic cells died. Taken together, it was indicated that RelA could play the critical role for maintaining hematopoietic stem cells.

(3) NF-κB/RelAによる骨代謝機構の制御機構の解析

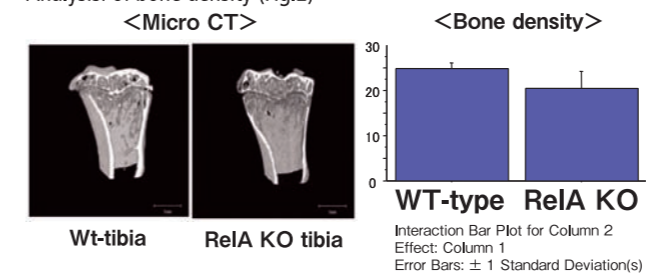
RelA欠損骨髄を再構築したマウスでは、骨の脆弱化、さらには骨粗鬆症様の病態が観察された。 *in vitro* にて骨形成能を解析した結果、これらのマウスでは正常の骨形成能を有していた。一方、 *in vitro* で骨髄細胞から破骨細胞を誘導したところ、RelA欠損の骨髄からは破骨細胞が過剰に出現した。これまででは、破骨細胞と骨芽細胞の間にはバランス的機構が存在して骨形成を維持していることがコンセンサスとして言われてきたが、このRelA欠損骨髄再構築マウスにおいては、破骨細胞のみが過剰増殖しており、宿主由来の正常型骨芽細胞は反応性に増殖していないことが明らかとなった。このことから、RelA欠損の破骨細胞は骨芽細胞への情報伝達機構が欠損していることが示唆された。

(3) Analysis of the regulatory mechanism for bone metabolism with NF-κB/RelA

RelA-deficient fetal liver- or bone marrow-chimeric mice were much more gracile and more osteoporotic than wild type chimeric mice. Bone formation activity was almost. In RelA-deficient bone marrow-chimeric mice, only osteoclast cells derived from RelA-deficient bone marrow cells are hyperactive and normal osteoblast cells derived from recipients are not reactive for osteoporotic status. Although the recent consensus mentions that there might be balancing mechanism between osteoclast and osteoblast cells. These data demonstrate that the signaling for bone metabolism from osteoclast cells (RelA-deficient) to osteoblast cells (normal type) would be absent in those RelA-deficient bone marrow-chimeric mice.

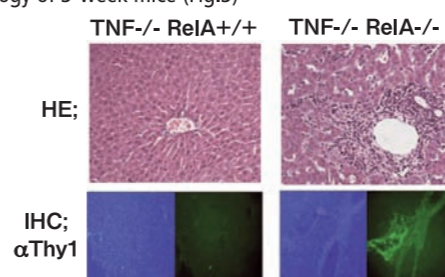
骨密度の解析 (図2)

Analysis of bone density (Fig.2)



肝臓の組織像;3週齢 (図3)

Histology of 3-week mice (Fig.3)



(4) NF-κB/RelAによる自己免疫疾患の制御機構の解析

制御性T細胞は、免疫機構の恒常性に重要な役割を果たしている。Foxp3はT細胞の機能発現に最も重要な因子であるが、その制御機構については解明されていない。RelA欠損に加えて腫瘍壊死因子 (TNF) を欠損するマウスは、生まれてくるものの生後3-4週にて死亡し、肝臓では著明なリンパ球浸潤が見られた。リンパ球の解析の結果、このマウスではFoxp3+T細胞が欠失していることが判明した。TNF^{-/-} RelA^{-/-} マウスの脾臓細胞を投与した免疫不全マウス (Scid) では、自己免疫疾患様病態が発症した。さらに、正常マウス由来のFoxp3+制御性T細胞を投与によって、TNF^{-/-} RelA^{-/-} マウスの延命効果が観察された。これらのことから、TNF^{-/-} RelA^{-/-} マウスは、制御性T細胞が欠失して自己免疫疾患を発症していることが示された。

(4) Analysis of the regulatory mechanism for autoimmune disease with NF-κB/RelA

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. Mice lacking RelA and TNF are born, but die within 3-4 weeks after birth. Histological feature is that there are a lot of lymphocytes infiltrating in livers. Lymphocyte profiling assay revealed that Foxp3+ regulatory T cells were absent in the spleens of TNF^{-/-} RelA^{-/-} mice. Administration of TNF^{-/-} RelA^{-/-} spleen cells into immune-deficient mice (Scid) induced autoimmune disease-like status. And TNF^{-/-} RelA^{-/-} mice lived much longer with administration of normal Foxp3+ regulatory T cells. Taken together, it was indicated that TNF^{-/-} RelA^{-/-} mice develop autoimmune disease due to deficiency of regulatory T cells.

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.
- 特任職員
小川 ちいみ Chiimi OGAWA 坂田 ひろみ Hiromi SAKATA
田中 可恵子 Kaeko TANAKA
- パートタイマー [Part-Timer]
鈴木 かおり Kaori SUZUKI

