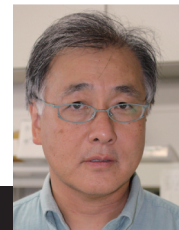


# 生体応答情報技術開発サブチーム

Subteam for BioSignal Integration

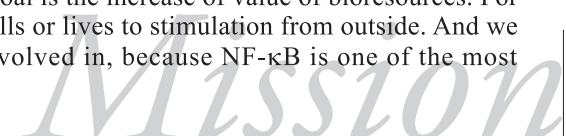


サブチームリーダー 土井 貴裕 (医博)  
Takahiro DOI, M.D., Ph.D.

## ミッションと事業概要

我々のチームのミッションは、(1)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。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 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23年度の成果

Development of Technology in 2011-2012

### (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<sup>-/-</sup> RelA<sup>-/-</sup> 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

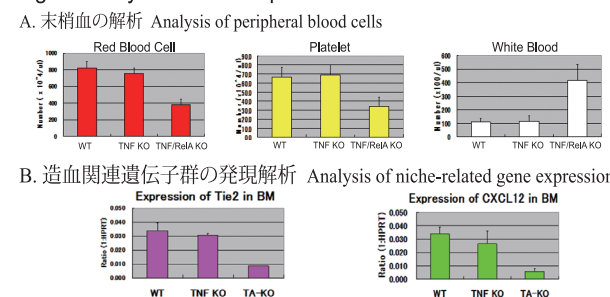
NF-κB consists of five members; RelA, RelB, c-Rel, p50 and p52 and functions as the major mediator for response against a various types of stimuli from outside. In the cytoplasm, NF-κB forms a heterodimer complex. After activation, NF-κB translocates to the nucleus and transcriptionally regulates many genes. RelA deficient mice are embryonic lethal due to TNF cytotoxicity. 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による血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TNF<sup>-/-</sup> RelA<sup>-/-</sup> マウスについて解析を行った。末梢血サンプルの解析から、これらのマウスには著明な異常 (貧血、リンパ球減少、血小板減少、顆粒球増多) が見られた (図1A)。

図1 血球分化能の解析

Fig. 1 Analysis of hematopoiesis



骨髄細胞を用いたコロニー形成能試験では、特に赤血球系のコロニーの著明な減少が見られた。赤血球の分化に関与すると考えられている遺伝子群の発現が低下していた。更に、造血ニッチ関連遺伝子群の発現を解析した結果、Tie2とCXCL12の著明な発現低下が見られた (図1B)。これらのことから、RelAは赤血球の分化機序と造血環境ニッチ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

For elucidation of the roles of RelA in hematopoiesis, we analyzed mice deficient of RelA and TNF (TA-KO). Those mice revealed hematopoietic disorder (anemia, thrombocytopenia, lymphocytopenia and granulocytosis) in the peripheral blood samples (Fig. 1A). With CFC (Colony Forming Cell) assay it was detected that colony forming activity was significantly decreased in RelA-deficient bone marrow cells, especially on erythropoiesis. Expression analysis demonstrated that several erythroid-related genes were downregulated in RelA-deficient bone marrow cells. And also expression of Tie2 and CXCL12 was significantly decreased in RelA-deficient bone marrow cells (Fig. 1B). These data demonstrate that RelA plays the critical roles both on the erythropoiesis and the maintenance of hematopoiesis-niche.

#### (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、骨粗鬆症様の病態が観察された。この病態の発症要因を追求するために、骨髄再構築マウスを用いて、*in vivo*にて骨形態計測解析を行った。図2に示すように、RelA欠損骨髄を再構築したマウスでは、ドナー由来の破骨細胞の著明な活性化が見られた。一方で、宿主由来の正常型骨芽細胞の活性化は見られなかった。これまでに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“カップリング因子”が存在することがコンセンサスとして言われてきたが、その実態は未だ不明である。本研究の示すところは、RelA欠損の破骨細胞からの“カップリング因子”が欠損していることが起因となって骨粗鬆症が発生していると推測されることである。このことから、破骨細胞が骨芽細胞に向けて出すと考えられている骨形成のシグナル因子 (カップリング因子) の制御を通して骨代謝にRelAが必須の働きをしていると考えられた。

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

RelA-deficient bone marrow-chimeric mice were more osteoporotic than wild type chimeric mice. For elucidation of the causal mechanism on osteoporosis, we did *in vivo* measurement of bone formation with Bone Morphometric Analysis. Shown in Fig. 2, osteoclast cells were hyperactivated in RelA-deficient bone marrow chimeric mice. Nevertheless osteoblast cells were not so activated in those mice. It has been suggested that there might be the mechanism balancing the activity of osteoclast and osteoblast cells with “Coupling factor”. However that remains to be elucidated. Our data demonstrates that RelA-deficient osteoclast cells would not produce “Coupling factor”. Taken together, it was speculated that RelA would play the critical role on bone metabolism through regulation of “Coupling factor”.

#### (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。が、その制御機構については解明されていない。TNF<sup>-/-</sup> RelA<sup>-/-</sup> マウスは、自己免疫に起因する重篤な炎症によって死亡する。このマウスでは、末梢 (脾臓) で制御性T細胞が欠失している。*in vitro*で制御性T細胞の誘導実験を行った結果、TNF<sup>-/-</sup> RelA<sup>-/-</sup> マウスの脾臓細胞からは制御性T細胞は誘導されなかった。このことから、RelAが制御性T細胞の誘導に重要な役割を果たしていることが示された。

図2 骨髄キメラマウスの骨形態形成能の解析

Fig. 2 Bone morphotomeric analysis of chimeric mice

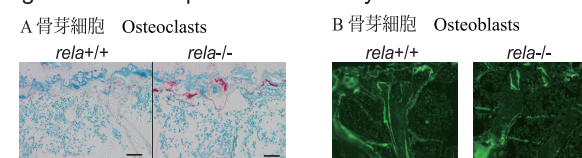
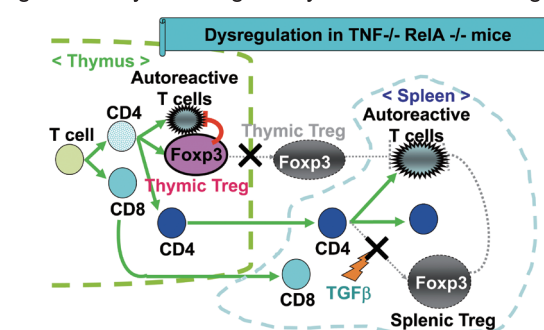


図3 制御性T細胞の制御機構の解析

Fig. 3 Analysis of regulatory mechanism for Treg



一方、TNF<sup>-/-</sup> RelA<sup>-/-</sup> マウスでは、胸腺に制御性T細胞が存在する。これらの胸腺制御性T細胞は、末梢へ移行しない。このことから、胸腺制御性T細胞の胸腺外への移行にはRelAが必須の働きをしていることが示唆された。更に、制御性T細胞の誘導機序は、胸腺と脾臓では異なっていることが示唆された。

#### (4) Analysis of the regulatory mechanism for regulatory T cells (Treg) with NF-κB/RelA

Regulatory T cells (Treg) engage in the control for immune homeostasis. However it still remains to be elucidated that on the mechanism of regulatory mechanism for Treg cells. Mice deficient of RelA and TNF die of severe inflammation caused by autoimmune diseases. In those mice, regulatory T cells (Treg cells) are absent in periphery. *In vitro* analysis for Treg induction demonstrated that Treg cells were not induced from spleen cells of those mice. This data demonstrates that RelA plays the critical role on the induction of Treg cells in periphery. On the other hand, Treg cells are present in thymi of those mice. Nevertheless those Treg cells never transfer from thymi to periphery, probably through the disorder of thymic epithelial cells in mice deficient of RelA and TNF. Taken together, it is speculated that RelA plays the critical roles on regulatory mechanisms of Treg cells. And also it is demonstrated that the induction mechanisms of Treg cells is different in thymi and spleens.

## 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.
- テクニカルスタッフ II [Technical Staff II]  
田中 可恵子 Kaeko TANAKA
- パートタイマー [Part-Timer]  
鈴木 かおり Kaori SUZUKI

