

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24年度の成果

Development of Technology in 2012-2013

(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 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) RelA による免疫制御機構の解析:

(i) NF-κB/RelA による自己免疫疾患の制御機構の解析: TNF/RelA 欠損マウスは、自己免疫疾患を発症する。生後数週間において、多臓器に著明なリンパ球浸潤を認める。自己応答性リンパ球の制御因子として、胸腺上皮に発現する Aire および制御性 T 細胞にて発現している Foxp3 が注目されている。これらについて、TNF/RelA 欠損マウスを用いて

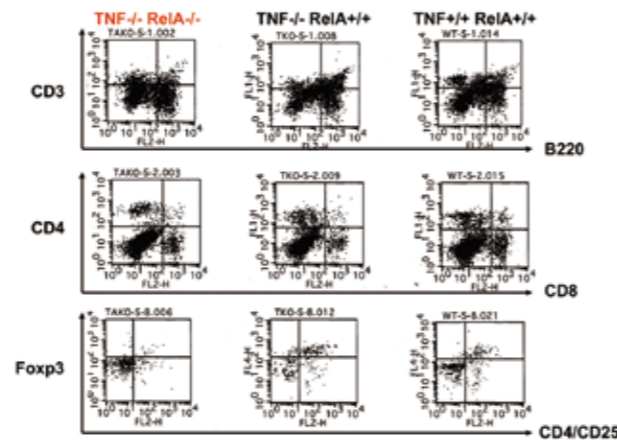


図1 脾臓のリンパ球の解析
Fig. 1 Lymphocyte profiling in spleens

解析を行い、①胸腺での Aire の発現が正常であること、②脾臓には Foxp3⁺ 制御性 T 細胞が欠如していること、が分かった (図1)。制御性 T 細胞は、CD4⁺/CD25⁻ 細胞から TGF-beta によって誘導されることが知られている。脾臓の細胞を用いた *in vitro* の培養にて Foxp3 の発現誘導を試みたところ、TNF/RelA 欠損マウス由来の細胞からは誘導されなかったことから、Foxp3 の誘導には RelA が不可欠な働きをしていることが判明した。

(ii) 胸腺由来の制御性 T 細胞と末梢性制御性 T 細胞の分化の違い: TNF/RelA 欠損マウスは、胸腺内に Foxp3⁺ 制御性 T 細胞が存在するものの、末梢には存在しないことが判明した。胸腺内の RelA 欠損制御性 T 細胞は、① *in vitro* においてエフェクター細胞の抑制効果があること、② *in vivo* において自己免疫疾患の発症を遅延させること、が分かり、RelA の欠損によっても制御性 T 細胞の基本的機能には問題がないことが判明した。以上のことから、①胸腺の制御性 T 細胞と末梢の制御性 T 細胞は由来が異なり、RelA は末梢の制御性 T 細胞の誘導に必須であること、②胸腺の制御性 T 細胞が末梢に移行する機序に RelA が必須の働きをしていること、が合わせ

て示された。

(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. (2) Analysis of regulatory mechanisms for immune system by RelA: (i) Analysis of regulatory mechanisms for autoimmune disease using TNF/RelA KO mice:

Mice deficient of TNF and RelA develop autoimmune disease. Those mice reveal lymphocyte infiltration in multiple organs. Foxp3 expressed in regulatory T cells (Treg) and Aire expressed in thymic epithelial cells are mentioned as the regulatory factors for autoimmune diseases. We found the following things with analysis of mice deficient of TNF and RelA; (i) Aire expression is normal in thymic epithelial cells, (ii) Foxp3⁺ Treg cells are absent in spleens (Figure 1), (iii) Foxp3⁺ Treg cells were not induced in vitro culture system. Thus we demonstrated that RelA played the essential roles on Foxp3 expression.

(ii) Difference between thymic Treg cells and splenic Treg cells: Treg cells are present also in thymi of wild type mice. And Treg cells are present also in thymi of mice deficient of TNF and RelA, although absent in spleens. These thymic Treg cells of mice deficient of TNF and RelA have suppression activity for effector cells with *in vitro* assay system. And occurrence of autoimmune disease was delayed with administration of those Treg cells *in vivo*. Thus we demonstrated; (i) RelA is essential only for induction of splenic Treg cells, not for thymic Treg cells, (ii) induction mechanisms of Treg cells are different between in thymic and spleens.

(3) NF-κB/RelA における造血能異常の解析:

TNF/RelA 欠損マウスは、末梢血において著明な貧血を呈する (図2A)。我々は転写因子 RelA の造血能における役割を明らかにするために解析を行った。TNF/RelA 欠損マウス

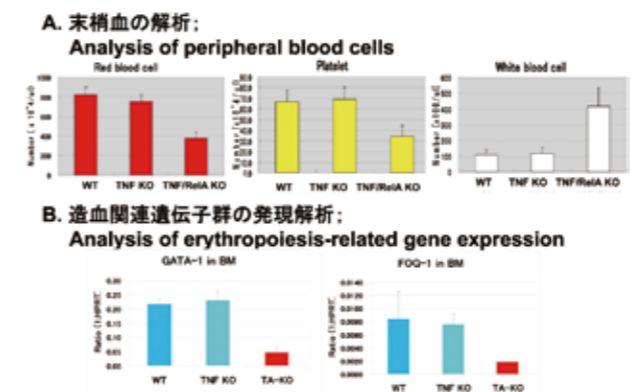


図2 血球分化能の解析
Fig. 2 Analysis of hematopoiesis

の造血幹細胞を解析する目的にて、①骨髄内の造血幹細胞 (KSL; c-Kit⁺/Sca-1⁺/Lin⁻) の比率の解析、②コロニー形成試験、を行った。その結果、TNF/RelA 欠損マウスにおいて、骨髄の KSL の比率は正常マウスと同等であるが、脾臓内の KSL の比率は有意に高かった。さらに、骨髄および脾臓を用いたコロニー形成試験では、骨髄由来のコロニーは軽度の減少であるのに対し、脾臓由来のコロニーは有意に増加していた。このことから、髄外造血が著名であることが判明した。さらに、赤血球関連遺伝子群の発現解析から、GATA-1, GATA-2, Tal-1, Lmo-2, EpoR の発現低下を見出した (図2B)。以上のことから、RelA は造血幹細胞の発生には必須ではないものの、赤血球の分化には必須の働きをしていることが判明した。

(3) Analysis of mechanisms of hematopoietic disorder in TNF/RelA deficient mice:

TNF/RelA deficient mice reveal severe anemia (Figure 2A). To elucidate the roles of RelA on erythropoiesis, we practiced FACS analysis of the ratio of KSL (c-Kit⁺/Sca-1⁺/Lin⁻) cells in bone marrows and spleens, and colony formation assay for detection of hematopoietic stem cells. The ratio of KSL cells in bone marrows of TNF/RelA KO mice was almost the same as control (wild type mice). However the KSL ratio in spleens was significantly higher in TNF/RelA deficient mice than in control mice. That demonstrates that significant extramedullary hematopoiesis is present in TNF/RelA KO mice. The expression analysis of erythropoiesis-related genes revealed that expression of the following genes was significantly low in TNF/RelA KO mice; GATA-1, GATA-2, Tal-1, Lmo-2 and EpoR (Figure 2B). Thus it was demonstrated that RelA played the critical roles on erythropoiesis.

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

