

平成 21 年 4 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790237

研究課題名（和文） 遺伝性自己免疫疾患のエピジェネティクス

研究課題名（英文） An epigenetic link between the DNA methylation and tissue-specific antigen expression in thymus.

研究代表者

堀家 慎一（HORIKE SHINICHI）

金沢大学・フロンティアサイエンス機構・特任助教

研究者番号：40448311

研究成果の概要：胸腺上皮細胞で強く発現している AIRE は、自己抗原の発現に関与していることが知られているがそのメカニズムは未だ明らかにされていない。そこで、我々は胸腺上皮細胞において Aire がエピジェネティックな制御機構を介して、自己抗原の発現に関与しているのではないかと考え、Ins2 遺伝子座における DNA のメチル化やヒストン修飾について解析を行った。その結果、少なくとも解析した 3 つの領域において DNA のメチル化レベルの違いは見られなかった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	510,000	3,810,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：遺伝子、ゲノム、発現制御、免疫学、DNA メチル化、ヒストン修飾

1. 研究開始当初の背景

多くの自己免疫疾患の基本的メカニズムとなる自己、非自己の識別機構の解明は、免疫学における最重要課題の 1 つである。しかしながら、I 型糖尿病、リウマチなど罹患者の多い自己免疫疾患の多くは、様々な環境因子と多数の遺伝子が関与する多因子疾患であり、その病因を分子レベルで解明することは非常に困難である。このため、フィンラン

ドに多数の疾患家系が存在する自己免疫性多腺性内分泌疾患 I 型の原因遺伝子として同定された AIRE 遺伝子の研究は、難解な自己免疫疾患発症機構解明の有力な糸口になるものと期待されている。

AIRE 遺伝子は胸腺髄質上皮細胞で高く発現しており、自己のゲノムから発現するプロテオームを網羅的に自己抗原として提示し、

それに反応するT細胞を除去し(ネガティブセクション)、自己抗原に対する免疫寛容を成立させるという重要な任務を課せられており、そのために胸腺髄質上皮細胞は、本来末梢組織でしか発現しないと信じられていた組織特異的遺伝子群を例外的に異所性に転写させる機構を備えている。さらに最近のマイクロアレイの解析より、AIREが胸腺髄質上皮細胞にて染色体ドメインレベルで異所性遺伝子発現を制御していることが示唆された。

2. 研究の目的

一般に正常に個体が発生し、各々の組織が正常な営み続ける為には、適切な時期、及び場所で適切な遺伝子が発現し、抑制される必要がある。そのような時期特異的・組織特異的遺伝子発現制御機構にDNAメチル化やヒストン修飾をはじめとするエピジェネティックな調節機構が大きな役割を果たし、調和のとれた個体発生や細胞分化が行われていることが近年明らかになってきた。我々はAIREが、胸腺髄質上皮細胞内においてそのようなエピジェネティックな調節機構を介して、組織特異的な制御を受けている遺伝子群の発現を変化させ、自己寛容の成立に働いているのではないかと考えている。AIREはこれまでの本研究室の実験結果から転写活性作用を持つことが示されているが、実際にどのような機構で遺伝子を活性化しているかは不明である。そこで本研究は、AIREが組織特異的遺伝子群を例外的に胸腺髄質上皮細胞内で異所性に転写させるメカニズムを解明することを目的とする。その結果、免疫システムの根幹である「自己と非自己の識別機構」基本原理について検証できる可能性も高いのではないかと期待している。

3. 研究の方法

(A) 胸腺髄質上皮細胞におけるメチル化およびヒストン修飾の解析

我々は、自己抗原の発現におけるAIRE依存性がDNAメチル化およびヒストン修飾などのエピジェネティックな遺伝子発現調節機構の違いから生じると考えている。胸腺髄質上皮細胞は前駆細胞から成熟な細胞に分化する際ゲノム全体のメチル化レベルが低下し、それに伴いAIREの発現が上昇するという仮説がある。一般に、多くの組織特異的な制御を受けている遺伝子群は、それらのプロモーター領域のメチル化により組織特異的な制御を受けていることが知られており、AIRE遺伝子もまたその1つでプロモーター領域の脱メチル化が発現の誘導を促すと考えられている。我々はメチル化により制御を受ける組織特異的な遺伝子群はAIRE非依存的であり、胸腺髄質上皮細胞の分化成熟過程でのメチル化レベルの低下に伴い、自己抗原の発現が誘導されると考えている。逆にヒストン修飾により制御を受ける組織特異的な遺伝子群はAIRE依存的であり、AIREによるクロマチンドメイン構造の変化が自己抗原の発現に重要であると考えている。そこで、これらの我々の仮説を実証するためにまず胸腺髄質上皮細胞におけるDNAメチル化酵素(Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b)の発現をRT-PCR法により解析する。さらに胸腺髄質上皮細胞から抽出したゲノムDNAを用い、サザンブロット解析およびBisulfite Sequencing法でDNAメチル化状態の解析を行う。特に、DNAのメチル化により制御されているインプリンティング遺伝子(*Igf2*、*H19*、*Cdkn1c*)近傍のCpGアイランドおよびLINE1などのリピート配列は、重要なメチル化部位であり、胸腺髄質上皮細胞の分化に伴い、脱メチル化が起こっているかを検討するのに良い指標となる。さらに、これまでの研究で報告

されているように胸腺髄質上皮細胞におけるIgf2のLoss of Imprinting (LOI)がどのような機構で起こっているかを検討することは、胸腺髄質上皮細胞におけるメチル化およびヒストン修飾の状態を知る上で興味深い。一般に、各種がんにおけるIgf2のLOIは、H19上流領域のCpGアイランドの高メチル化により引き起こされると考えられている。そこで、胸腺髄質上皮細胞におけるH19上流領域のCpGアイランドメチル化状態をIgf2のイントロンに位置するCpGアイランドも含めて検討する。

(B) Aire 結合領域のヒストンの修飾の解析

Aireが転写因子として機能するならば、Aire結合領域の近傍のヒストン修飾を変化させ、クロマチン構造を制御していると考えられる。我々は、Aireノックアウトマウスと正常マウスの胸腺髄質上皮細胞からクロスリンクされたクロマチンを抽出し、アセチル化、メチル化、ユビキチン化されたヒストンに対する抗体、さらにHDAC1に対する抗体で免疫沈降し、先に同定されたAire結合領域の近傍約50Kbにわたりヒストンテールの修飾およびHDAC1の結合部位を定量PCR法で解析しようと考えている。最近のマイクロアレイのデータより、Aireがクロマチンドメインレベルで下流の遺伝子群を制御していると考えられていることから、Aire結合領域近傍50-100kbのクロマチンおよびヒストンの修飾をAireノックアウトマウスと正常マウスで比較することは、Aireがクロマチンおよびヒストンの修飾に与える影響を検討する上で大変興味深い。

(C) クロマチンループを介した遺伝子発現制御の解析

最近、組織特異的発現制御を担う因子としてMAR結合蛋白質が注目されている。これらの蛋白質は、「MAR」と呼ばれる「核マトリックス」に親和性のある領域（核マトリックスアタッチメントリージョン、Matrix Attachment Region）に結合し、DNA配列をループ状にまとめ上げ、クロマチンリモデリング因子をリクルートすることでクロマチン構造変換を伴う新たな発現制御機構を担っている分子である。

AireもまたAT-リッチな塩基配列に結合すること、さらにAireが染色体ドメインレベルで異所性遺伝子発現を制御していることから、Aireが「MAR」と呼ばれる領域に結合し、細胞核内でクロマチンのループ構造の形成に関与している可能性が考えられる。そこで、高次クロマチンループ構造の形成におけるAireの役割を検証するために、Igf2-H19遺伝子近傍領域についてChIP-クロマチンループ解析を行う。この実験手法は、染色体の近接する領域をクロスリンクし、その領域をPCRを用いて同定するChromosome Conformation Capture (3C) 法を改良したものである。また、今回解析するIgf2-H19遺伝子領域は、最初に高次クロマチンループ構造が遺伝子発現制御に重要な役割を果たしていることが示された領域であり、かつAireノックアウトマウスを用いた実験でIgf2の発現がAireにより制御されていることが明らかにされていることから、今回のクロマチンループ構造の解析に適していると考えられる。これまでの研究結果より、正常マウスにおいてH19遺伝子の上流に位置するCpGアイランドとIgf2のイントロンに位置するCpGアイランドが核内で非常に近い位置にあり、クロマチンループ構造の基点となっていることが示されている。我々は、まずAireノックアウトマウスにおいてこれらの構造が保持されているかを解析する。さらに、正常なクロマチンループ構造が保持されていないとするならば、どのようなループ構造がAireノックアウトマウスにて存在するかを明らかにする。その上で、Igf2遺伝子発現

とAireによるクロマチンループ構造の形成のつながりを解析したい。

4. 研究成果

我々は胸腺上皮細胞における Aire の発現がエピジェネティックな制御、つまり DNA のメチル化によって制御されているかについて検討を行った。そこで、我々は Aire があまり発現していない脾臓や脳を含めた各種臓器から DNA を抽出した。また、胸腺上皮細胞は胸腺から MACS カラムを用いて CD45(-)、MHC ClassII (+) のフラクションを分離し、DNA を抽出した。DNA のメチル化解析は、Bisulfite Sequencing 法を用いて Aire の上流に位置する CpG アイランド領域を解析した。その結果、解析したすべての臓器において Aire の CpG アイランドが非メチル化状態であることがわかった。つまり、少なくともマウスにおいて Aire 遺伝子は、メチル化によって制御されていないことがわかった。逆に、HeLa 細胞などを含めたヒトの細胞では、AIRE の上流領域がメチル化されていた。つまり、今回の研究から AIRE/Aire 遺伝子の制御がヒトとマウスで異なっている可能性が示唆された。つぎに、我々は Aire による染色体ドメインレベルの遺伝子発現制御機構を解析するため、Igf2、Ins2 遺伝子座に着目し解析を行った。この領域は、ゲノム刷り込みをうける遺伝子がクラスターを形成している領域であると同時に Aire 依存的な自己抗原遺伝子 Ins2 が位置する領域でもあります。先に別の研究グループから胸腺上皮細胞において Igf2 遺伝子が両アレル発現をすることが示されていたのでこのことも含め、Aire がどのようなエピジェネティックな制御を介して自己抗原の転写に関与しているか検討した。そこで、B6 マウスと BALB/c マウスから生まれた F1 マウスを用いてアレルを識別し胸腺上皮細胞において Igf2 遺伝子の刷

り込み状態を検討した。しかしながら、先に報告された結果と異なり B6 マウス (母) X BALB/c マウス (父)、および BALB/c X マウス (母) B6 マウス (父) の各々のクロスから生まれてきた F1 マウスにおいて、Igf2 遺伝子は父方からのみ発現を示していた。

次に、我々はこの領域におけるエピジェネティックな修飾が Aire 依存的であるかどうか解析するため、①HeLa 細胞、②Aire を強制発現させた HeLa 細胞、③RNAi で Aire をノックダウンさせた HeLa 細胞の 3 つの細胞株を用いて、Igf2、Ins2 遺伝子座の DNA メチル化状態およびヒストン修飾を解析した。DNA のメチル化解析は、Bisulfite Sequencing 法を用いて Ins2 および Igf2、H19 遺伝子の上流に位置する CpG リッチな領域を解析した。その結果、少なくとも解析した 3 つの領域において DNA のメチル化レベルの違いは見られなかった。その上、各々のプロモーター領域のヒストン修飾の状態は、アセチル H3、アセチル H4、ジメチル H3-K4、ジメチル H3-K9、トリメチル H3-K27 のヒストン修飾を認識する抗体を用いて、DNA 免疫沈降法 (ChIP アッセイ) を行ったが明確な違いは見受けられなかった。今後、より高次なクロマチン構造であるクロマチンループ構造の変異がないか検討する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀家 慎一 (HORIKE SHINICHI)

金沢大学・フロンティアサイエンス機構・特任助教

研究者番号：40448311

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし