

201024060A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

難治性炎症性腸疾患のゲノムおよびエピゲノム解析による  
病因・病態・治療抵抗性機序の解明

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 笹月 健彦

平成23年(2011)4月

## 目 次

I. 総括研究報告		
難治性炎症性腸疾患のゲノムおよびエピゲノム解析による 病因・病態・治療抵抗性機序の解明	-----	1
笹月 健彦		
II. 分担研究報告		
1. 難治性炎症性腸疾患のゲノム解析による病因・病態・治療抵抗性機序 の解明	-----	5
日比 紀文		
2. 炎症性腸疾患におけるエピゲノム変化の炎症と 発癌における意義に関する研究	-----	7
土肥 多恵子		
3. 炎症性腸疾患のゲノム解析に関する研究	-----	9
山本 健		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	1 1
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	1 3

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)  
総括研究報告書

難治性炎症性腸疾患のゲノムおよびエピゲノム解析による病因・病態・治療抵抗性機序の解明

研究代表者 笹月 健彦 九州大学高等研究院特別主幹教授

**研究要旨**

炎症性腸疾患 (IBD) の病因、病態および抗 TNF  $\alpha$  抗体療法抵抗性の遺伝的機序を、ゲノム情報およびエピゲノム情報により解明し、これらと臨床情報を加えた三大情報の統合的解析を進め、本疾病克服への道を拓く。患者の臨床・病理情報とゲノム情報のみならず、炎症現場のゲノム・エピゲノム情報を加えて、病因、激症化、抗 TNF  $\alpha$  抗体治療抵抗性、癌化に関して統合的に解明しようとする点が本研究の特色である。特にエピゲノム解析はこれまで行われておらず、極めて独創的な切り口である。本年度は、診断や治療過程が明確で質の高い臨床情報を備えた患者群収集の体制整備、これまでに全ゲノム相関解析によって報告された42遺伝子の抽出と解析用プローブの整備、ならびにクローン病 TNF  $\alpha$  抗体療法治療抵抗性粘膜の生検組織を用い、エピゲノム解析を進めるための実験条件設定を進め、所期の目的を達成するための基盤を整えた。

**研究分担者 氏名・所属・職名**

日比紀文

慶應義塾大学医学部内科学・教授

土肥多恵子

国立国際医療研究センター研究所肝炎免

疫研究センター・消化器疾患研究部長

山本 健

九州大学生体防御医学研究所・准教授

ず、炎症現場のゲノム・エピゲノム情報を加えて、病因、激症化、抗TNF  $\alpha$  抗体治療抵抗性、癌化に関して統合的に解明しようとする点が本研究の特色である。特にエピゲノム解析はこれまで行われておらず、極めて独創的な切り口である。治療抵抗性の解明は、不要な治療をあらかじめ回避することに繋がり、患者負担の軽減とともに医療経済的な効果が得られ重要である。

**A. 研究目的**

炎症性腸疾患 (IBD) の病因、病態および抗 TNF  $\alpha$  抗体療法抵抗性の遺伝的機序を、ゲノム情報およびエピゲノム解析により解明し、これらと臨床情報を加えた三大情報を統合的に解析することにより、難治性IBDの病因・病態・抗 TNF  $\alpha$  抗体治療抵抗性機序を解明し、本疾病克服への道を拓く。

IBDは、緩解再燃を繰り返し重症化すること、高発癌性であること、さらに治療抵抗性を示す頻度が高いことが問題である。その解決のためには、(1)発症および進展に寄与する遺伝子群の解明、(2)TNF  $\alpha$  抗体治療抵抗性に関する遺伝子群の解明、(3)大腸発癌のリスクに関与する遺伝子変異の解明、および(4)これらのエピゲノム変化の解明を行うことが必須であり、それに基づいた、患者負担の軽減を図る治療法の開発は喫緊の課題である。

患者の臨床・病理情報とゲノム情報のみなら

**B. 研究方法**

臨床検体の収集:抗TNF  $\alpha$  抗体治療反応性に関わる遺伝的要因を解明するためには、バイアスがかからない前向き研究を実施するための抗 TNF  $\alpha$  抗体新規投与群を収集する組織構築が必須である。このための倫理審査承認を得た後、共通のインフォームド Consentのもと、九州大学、慶應大学を中心に組織を整備して検体収集を行う。

ゲノム解析:これまでに全ゲノム相関解析によって報告された遺伝子多型を文献より抽出し、これらを本研究の解析対象遺伝子とする。一塩基多型遺伝子型の決定はTaqMan法を用いる。またHLAについては、強い相関が期待されることからHLA-A, C, B, DRB1, DQB1 および DPB1の6座について別途解析する。遺伝子型や対立遺伝子頻度の差異を治療抵抗性の有無において検討する。ゲノム統計遺伝学解析にはPLINK、SAS、Rなどのプログラムを用いる。

エピゲノム解析:クローン病大腸の生検組織を用いた治療抵抗性エピゲノム因子の解析を以下の方法により実施する。

- (1) 抗TNF- $\alpha$ 抗体治療の対象症例から治療前の内視鏡検査の際に2個の生検組織を採取する。第一段階として20名のエントリーを行う。
  - (2) 治療効果の判定を目的とした内視鏡検査を、治療開始後4-8週間または主治医が適当と判断した時期に行い、この際に治療後の生検組織を採取する。治療無効例の治療後の試料を確保するため、20名のエントリーで収集できなかった場合は第二段階として10名のエントリーを追加する。
2. 生検試料から上皮細胞を粘膜固有層細胞を分取し、セルソーターを用いてマクロファージ分画を精製した後、次の解析を行う予定とした。
- (1) RNAを用いたマイクロアレイ解析またはSAGE解析による網羅的遺伝子発現解析。
  - (2) Bisulfateシーケンス法によるDNAメチル化解析。L-1のメチル化解析を含む。
  - (3) 抗ヒストン3K4抗体を用いたChIPシーケンス(遺伝子発現促進的修飾)
  - (4) 抗ヒストン3K27抗体を用いたChIPシーケンス(発現低下修飾)

(倫理面への配慮)

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(文部科学省、厚生労働省、経済産業省、平成13年3月29日(平成20年12月1日一部改正))に則り、各検体採取機関、およびゲノム解析機関においては倫理委員会の承認のもと研究を遂行する。ゲノム解析について九州大学ならびに国立国際医療センターでは既に承認を得ており(九州大学許可番号416-00、国立国際医療研究センターNo937)、慶應義塾大学においても審査中である。

### C. 研究結果

検体収集機関においては、外来および入院患者の臨床情報から、ゲノム解析に供する詳細な臨床情報を備えた患者群を選択する体制が整った。

候補遺伝子多型の選択を行い、これまでに全ゲノム相関解析にて報告されたIBD感受性遺伝子より42遺伝子を抽出した(HLA-B, HLA-DRB1, ATG16L1, ATG5, C11orf30, CARD9, CCL2, CCR6, CDKAL1, CEP72, CUL2, DLD, FCGR2A, GCKR, ICOSLG, IFNG, IKZF1, IL10, IL12B, IL18RAP, IL23R, IRGM, ITLN1, JAK2, KIF21B, LRRK2, LYRM4, MST1, NKX2-3, ORMDL3, PSMG

1, PTGER4, PTPN2, PTPN22, PUS10, REL, RNF186, SLC22A23, SLC26A3, STAT3, TNFSF15, ZNF365)。これらの遺伝子の中には、日本人を対象とした全ゲノム相関解析によって同定された遺伝子も含まれており、本研究における治療抵抗性に関わる遺伝子および治療感受性の個体差を解明する上での重要な標的遺伝子群である。これらの遺伝子の一塩基多型を解析するためのプローブを整備し、検体収集の後に遺伝子型決定とその結果を用いた解析を進めるための準備を整えた。また、HLA6遺伝子座についてのタイピング手法については既に確立されており、検体収集後ただちに解析が実施される。

エピゲノム解析においては、現在治療前症例のエントリーを開始し、試料を蓄積中である。クローン病大腸の生検2個分の組織から、 $9 \times 10^5$ 個の細胞を回収することができ、上皮細胞マーカーEpCAM陰性の白血球は、 $2.2 \times 10^5$ 個であった。セルソーターで分画後は、CD3+細胞  $2 \times 10^4$ 個、CD33+細胞  $7 \times 10^3$ 個が分取できた。遺伝子発現解析についてはこれまでの手術摘出標本を用いた検討では、上皮細胞 $5 \times 10^5$ 細胞でSAGE-シーケンスが可能であった。メチル化解析(MBP2)、ヒストン修飾解析(H3K4とH3K27)の実施には4症例をプールすれば良いことがわかった。CD3+細胞とCD33+細胞を別々に解析することも可能で、CD3+細胞の解析には2症例、CD33+細胞では5症例をプールすれば良いことが明らかになった。

### D. 考察

治療低応答および抵抗性の問題こそが難治性疾患の本質的な問題である。本研究により、TNF $\alpha$ 抗体治療反応性および抵抗性に関連する因子が明らかとなれば、現在約30%が治療抵抗性を示す抗TNF $\alpha$ 抗体治療の際、応答する患者をあらかじめ選択することができ、患者の負担軽減とともに医療経済的な効果が期待される。

SNPを用いたIBDの全ゲノム解析が日本人もふくめほぼ終了し、現段階では、そこで同定された遺伝子がIBDのどのような病態に特異的に関連するのかが問われている。診断や治療過程が明確で質の高い臨床情報を備えた患者群の収集と、それを対象としたIBD感受性遺伝子を網羅した中規模ゲノム解析により、IBD感受性遺伝子群の中から、本研究が目的とする治療応答性に関わる遺伝子の同定が期待される。

また、クローン病TNF- $\alpha$ 抗体療法治療抵抗性の粘膜の生検組織を用いたエピゲノム解析を進めるための準備が整い、実際に細胞分離を

開始したところ、倫理委員会への申請時の最低予定集積症例数で、実際に解析可能な細胞数が確保できることが検証された。炎症現場のレトロトランスポゾンを含むゲノム変異・エピゲノム変化を確定し、IBDの病因、病態、抗TNF $\alpha$ 抗体治療抵抗性機序の解明を進めることにより、IBD難治化の根源的理解が可能になる。

## E. 結論

IBDの治療抵抗性をゲノムおよびエピゲノムレベルで解明するための42遺伝子の抽出および解析プローブの整備、ならびにクローン病TNF- $\alpha$ 抗体療法治療抵抗性の粘膜の生検組織の準備が整い、試料の収集を開始した。

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Doi K, Fujimoto T, Koyanagi M, Tsunoda T, Tanaka Y, Yoshida Y, Takashima Y, Kuroki M, Sasazuki T, Shirasawa S. ZFAT is a critical molecule for cell survival in mouse embryonic fibroblasts. *Cell Mol Biol Lett*. 2011 Mar;16(1):89-100.
2. Van Schaeybroeck S, Kyula JN, Fenton A, Fenning CS, Sasazuki T, Shirasawa S, Longley DB, Johnston PG. Oncogenic Kras promotes chemotherapy-induced growth factor shedding via ADAM17. *Cancer Res*. 2011 Feb 1;71(3):1071-80.
3. Di Nicolantonio F, Arena S, Tabernero J, Grosso S, Molinari F, Macarulla T, Russo M, Cancelliere C, Zecchin D, Mazzucchelli L, Sasazuki T, Shirasawa S, Geuna M, Frattini M, Baselga J, Gallicchio M, Biffo S, Bardelli A. Deregulation of the PI3K and KRAS signaling pathways in human cancer cells determines their response to everolimus. *J Clin Invest*. 2010 Aug 2;120(8):2858-66.
4. Tsunoda T, Takashima Y, Tanaka Y, Fujimoto T, Doi K, Hirose Y, Koyanagi M, Yoshida Y, Okamura T, Kuroki M, Sasazuki T, Shirasawa S. Immune-related zinc finger gene ZFAT is an essential transcriptional regulator for hematopoietic differentiation in blood islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 10;107(32):14199-204.
5. Yoshida Y, Tsunoda T, Takashima Y, Fujimoto T, Doi K, Sasazuki T, Kuroki M, Iwasaki A, Shirasawa S. ZFAT is essential for endothelial cell assembly and the branch point formation of capillary-like structures in an angiogenesis model. *Cell Mol Biol Lett*. 2010 Dec;15(4):541-50.
6. She QB, Halilovic E, Ye Q, Zhen W, Shirasawa S, Sasazuki T, Solit DB, Rosen N. 4E-BP1 is a key effector of the oncogenic activation of the AKT and ERK signaling pathways that integrates their function in tumors. *Cancer Cell*. 2010 Jul 13;18(1):39-51.
7. Tsunoda T, Takashima Y, Fujimoto T, Koyanagi M, Yoshida Y, Doi K, Tanaka Y, Kuroki M, Sasazuki T, Shirasawa S. Three-dimensionally specific inhibition of DNA repair-related genes by activated KRAS in colon crypt model. *Neoplasia*. 2010 May;12(5):397-404.
8. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Viña M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens*. 2010 Apr;75(4):291-455.
9. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Viña M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J. An update to HLA nomenclature, 2010. *Bone Marrow Transplant*. 2010 May;45(5):846-8.
10. Sasawatari S, Yoshizaki M, Taya C, Tazawa A, Furuyama-Tanaka K, Yonekawa H, Dohi T, Makrigiannis AP, Sasazuki T, Inaba K, Toyama-Sorimachi N. The Ly49Q receptor plays a crucial role in neutrophil polarization and migration by regulating raft trafficking. *Immunity*. 2010 Feb 26;32(2):200-13.
11. 久松理一、日比紀文 総説 『クローン病の長期予後について考える』日本消化器病学会雑誌 2011 108 巻 3号 p373-380
12. 久松理一、日比紀文 特集：小腸疾患：診断と治療の進歩 II. 診療の進歩 6. Crohn病 日本内科学会雑誌第100巻 2011 第1号 p85-95
13. Naruse H, Hisamatsu T, Yamauchi Y, Chang JE, Matsuoka K, Kitazume MT, Arai K, Ando S, Kanai T, Kamada N, Hibi T. Intracellular bacteria recognition contributes to maximal interleukin (IL)-12 production by IL-10-deficient macrophages. *Clin Exp Immunol*. 2011 Apr;164(1):137-44.
14. Takayama T, Kamada N, Chinen H, Okamoto S, Kitazume MT, Chang J, Matuzaki Y, Suzuki S, Sugita A, Koganei K, Hisamatsu T, Kanai T, Hibi T. Imbalance of NKp44(+)NKp46(-) and NKp44(-)NKp46(+) natural killer cells in the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2010 Sep;139(3):882-92.

15. Takada Y, Hisamatsu T, Kamada N, Kitazume MT, Honda H, Oshima Y, Saito R, Takayama T, Kobayashi T, Chinen H, Mikami Y, Kanai T, Okamoto S, Hibi T. Monocyte chemoattractant protein-1 contributes to gut homeostasis and intestinal inflammation by composition of IL-10-producing regulatory macrophage subset. *J Immunol.* 2010 1;184(5):2671-6.
  16. Kamada N, Hisamatsu T, Honda H, Kobayashi T, Chinen H, Takayama T, Kitazume MT, Okamoto S, Koganei K, Sugita A, Kanai T, Hibi T. TL1A produced by lamina propria macrophages induces Th1 and Th17 immune responses in cooperation with IL-23 in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16(4):568-75.
  17. Kamada N, Hisamatsu T, Honda H, Kobayashi T, Chinen H, Kitazume MT, Takayama T, Okamoto S, Koganei K, Sugita A, Kanai T, Hibi T. Human CD14+ macrophages in intestinal lamina propria exhibit potent antigen-presenting ability. *J Immunol.* 2009 1;183(3):1724-31.
  18. Wada Y, Hisamatsu T, Kamada N, Okamoto S, Hibi T. Retinoic acid contributes to the induction of IL-12-hypoproducing dendritic cells. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15(10):1548-56.
  19. Burkly LC, Dohi T. The TWEAK/Fn14 Pathway in Tissue Remodeling: For Better or for Worse. *Adv Exp Med Biol* 2011;691:305-322.
  20. Kato N, Yamamoto K, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies five novel variants associated with blood pressure in East Asians. *Nat. Genet.* 2011 in press
  21. Takeuchi F, Yamamoto K, et al. Association of obesity susceptibility genetic variants with type 2 diabetes in the Japanese. *Diabetologia*, 2011 in press
  22. Teshiba R, Yamamoto K, et al. Identification of TCTE3 as a gene responsible for congenital diaphragmatic hernia using a high-resolution single-nucleotide polymorphism array. *Pediatr Surg Int.* 2011; 27(2): 193-198.
  23. Akiyama K, Yamamoto K, et al. Genome-wide association study to identify genetic variants present in Japanese patients harboring intracranial aneurysms. *J Hum Genet.* 2010; 55(10):656-661.
  24. Tanaka F, Yamamoto K, et al. Strong interaction between the effects of alcohol consumption and smoking on esophageal squamous cell carcinoma among individuals with ADH1B and/or ALDH2 risk alleles. *Gut*, 2010; 59(11):1457-1464.
  25. Yokomizo A, Yamamoto K, et al. Histopathologic subtype-specific genomic profiles of renal cell carcinomas identified by high-resolution whole-genome single nucleotide polymorphism array analysis. *Oncol Lett.*, 2010; 1: 1073-1078.
  26. Kukita Y, Yamamoto K, et al. A definitive haplotype map as determined by genotyping duplicated haploid genomes finds a predominant haplotype preference at copy number variation events. *Am. J. Hum. Genet.*, 2010; 86(6):918-928.
  27. Shiota M, Yamamoto K, et al. P300/CBP-associated factor regulates Y-box binding protein-1 expression and promotes cancer cell growth, cancer invasion and drug resistance. *Cancer Sci.* 2010; 101(8):1797-1806
  28. Takeuchi F, Yamamoto K, et al. Blood pressure and hypertension are associated with seven loci in the Japanese population. *Circulation*, 2010; 121(21): 2302-2309.
  29. Takeuchi F, Yamamoto K, et al. Common variants at the GCK, GCKR, G6PC2-ABCB11 and MTNR1B loci are associated with fasting glucose in two Asian populations. *Diabetologia.* 2010; 53(2): 299-308.
- 学会発表
- 国外
1. T Dohi, R Kawashima, Y I. Kawamura, J Michaelson, and L C. Burkly. Effect of combination treatment with TNF-inhibitor and anti-TWEAK antibody in mouse hapten-induced colitis *Digestive Disease Week 2010*, May 3, 2010
  2. Kawamura YI., M Toyota, R Kawashima, T Okada, T Hagiwara, Y J. Kawamura, F Konishi, T Matsumoto, and T Dohi. IL-6 induces expression of DNA methyltransferases, gene silencing and malignant type glycosylation in ulcerative colitis and colitic cancer. *Digestive Disease Week 2010*, May 3, 2010
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)  
分担研究報告書

難治性炎症性腸疾患のゲノムおよびエピゲノム解析による病因・病態・治療抵抗性機序の解明  
-難治性炎症性腸疾患のゲノム解析による病因・病態・治療抵抗性機序の解明-

研究分担者 日比 紀文 慶應義塾大学医学部内科学教授

### 研究要旨

炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎(ulcerative colitis; UC)やクローン病(Crohn's disease; CD)はいまだ原因不明の慢性難治性炎症性腸疾患であるが、その疾患関連遺伝子が genome-wide association study (GWAS) や候補遺伝子解析によって同定されつつある。しかし、治療反応性に関する遺伝学的背景は解明されていない。抗 TNF  $\alpha$  抗体製剤が治療の中心となりつつあるが、同剤に対する治療抵抗性が大きな課題として残されている。そこで本研究においては、両疾患について、近年治療の中心となっている抗 TNF  $\alpha$  抗体製剤に対する治療応答性をゲノムレベルで解析する。

### A. 研究目的

炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎(ulcerative colitis; UC)やクローン病(Crohn's disease; CD)はいまだ原因不明の慢性難治性炎症性腸疾患であるが、その疾患関連遺伝子が genome-wide association study (GWAS) や候補遺伝子解析によって同定されつつある。しかしながら、治療に直結する情報は未だ得られていない。

それらの疾患における病態には何らかの免疫学的機序が関与していると考えられ、臨床的にはアミノサリチル酸製剤、副腎皮質ステロイド、免疫抑制剤の投与を中心とした薬物療法や白血球除去療法、抗 TNF  $\alpha$  抗体製剤等を用いて治療されているが、治療抵抗性の問題こそが難治性疾患の本質的な問題であり、再燃と緩解を繰り返すことが多い。

そこで本研究においては、両疾患について、近年治療の中心となっている抗 TNF  $\alpha$  抗体製剤に対する治療応答性をゲノムレベルで解析する。抗 TNF  $\alpha$  抗体製剤に対する治療応答性を規定する因子は解明されておらず、実際には、TNF  $\alpha$  抗体治療抵抗を示す患者が存在し、その割合はクローン病においては約30%の一次無効例、および有効例の中の約30%におよぶ二次無効例が報告されている。潰瘍性大腸炎に関しては、本邦では2010年6月より抗 TNF  $\alpha$  抗体治療が承認されているが既に承認されている

白血球除去療法や新たに承認された経口タクロリムス治療との使い分け、適応症例の選別が問題となっている。

本研究により遺伝子レベルで抗 TNF  $\alpha$  抗体製剤に対する応答性が規定されていることが明らかになれば対象患者の選別が可能になり、副作用の軽減や医療経済的側面で大きな有益性があると考えられる。

### B. 研究方法

プロジェクト全体の多施設共同研究では、対象群数は UC 500名、CD 300名であるが、そのうち、慶應義塾大学では、UC 30名、CD 30名を対象とする。末梢血液3mlを採取、検体として使用し、遺伝子多型の解析を行う。

- ① 末梢血液よりDNAを抽出する。個別タイピングにおいては、PCRで多型領域を増幅し、TaqMan法によりその遺伝子型を決定する。
- ② 患者群と対照群との間で、遺伝子型分布の差を統計学的に検討すると共に、様々な臨床マーカー(発症年齢、病理組織像、臨床病期分類、治療抵抗性)との相関を検討する。

\*血液試料はEDTA採血後にただちに九州大学へ郵送される。九州大学でゲノム解析に供され、ゲノムの抽出ならびに解析が行われる(慶應義塾大学医学部倫理委員会申請中)。

### C. 研究結果

外来および入院患者の臨床情報から、ゲノム解析に供する詳細な臨床情報を備えた患者群を選択する体制が整った。

#### D. 考察

治療抵抗性の問題こそが難治性疾患の本質的な問題である。本研究により、TNF $\alpha$ 抗体治療抵抗性に関連する因子が明らかとなれば、クローン病においては30%の一次無効例、および有効例の中の1/3におよぶ二次無効例についてあらかじめ選別することができ、患者の負担軽減とともに医療経済的な効果が期待される。また潰瘍性大腸炎においてはその有効性はクローン病よりもやや低いと考えられており、既存の治療法(タクロリムスや白血球除去療法など)との使い分けが大きな課題となっている。本研究により抗TNF $\alpha$ 抗体治療への応答性が遺伝子レベルで明らかになれば本剤にตอบสนองする患者をあらかじめ選択することができ、医療費の削減、副作用の軽減などにつながる。

#### E. 結論

IBDの治療抵抗性をゲノムレベルで解明するにあたり、最適な解析対象群を選択する体制が整備された。

#### G. 研究発表

論文発表

1. 久松理一、日比紀文 総説 『クローン病の長期予後について考える』日本消化器病学会雑誌 2011 108 巻 3 号 p373-380
2. 久松理一、日比紀文 特集：小腸疾患：診断と治療の進歩 II. 診療の進歩 6. Crohn病 日本内科学会雑誌第100巻 2011 第1号 p85-95
3. Naruse H, Hisamatsu T, Yamauchi Y, Chang JE, Matsuoka K, Kitazume MT, Arai K, Ando S, Kanai T, Kamada N, Hibi T. Intracellular bacteria recognition contributes to maximal interleukin (IL)-12 production by IL-10-deficient

macrophages. Clin Exp Immunol. 2011 Apr;164(1):137-44.

4. Takayama T, Kamada N, Chinen H, Okamoto S, Kitazume MT, Chang J, Matuzaki Y, Suzuki S, Sugita A, Koganei K, Hisamatsu T, Kanai T, Hibi T. Imbalance of NKp44(+)NKp46(-) and NKp44(-)NKp46(+) natural killer cells in the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. Gastroenterology. 2010 Sep;139(3):882-92.
5. Takada Y, Hisamatsu T, Kamada N, Kitazume MT, Honda H, Oshima Y, Saito R, Takayama T, Kobayashi T, Chinen H, Mikami Y, Kanai T, Okamoto S, Hibi T. Monocyte chemoattractant protein-1 contributes to gut homeostasis and intestinal inflammation by composition of IL-10-producing regulatory macrophage subset. J Immunol. 2010 1;184(5):2671-6.
6. Kamada N, Hisamatsu T, Honda H, Kobayashi T, Chinen H, Takayama T, Kitazume MT, Okamoto S, Koganei K, Sugita A, Kanai T, Hibi T. TL1A produced by lamina propria macrophages induces Th1 and Th17 immune responses in cooperation with IL-23 in patients with Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. 2010;16(4):568-75.
7. Kamada N, Hisamatsu T, Honda H, Kobayashi T, Chinen H, Kitazume MT, Takayama T, Okamoto S, Koganei K, Sugita A, Kanai T, Hibi T. Human CD14+ macrophages in intestinal lamina propria exhibit potent antigen-presenting ability. J Immunol. 2009 1;183(3):1724-31.
8. Wada Y, Hisamatsu T, Kamada N, Okamoto S, Hibi T. Retinoic acid contributes to the induction of IL-12-hypoproducing dendritic cells. Inflamm Bowel Dis. 2009;15(10):1548-56.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



難治性炎症性腸疾患のゲノムおよびエピゲノム解析による病因・病態・治療抵抗性機序の解明  
-炎症性腸疾患におけるエピゲノム変化の炎症と発癌における意義-

研究分担者 土肥多恵子 国立国際医療研究センター研究所  
肝炎免疫研究センター消化器疾患研究部長

### 研究要旨

潰瘍性大腸炎やクローン病は、再燃緩解を繰り返し発癌のリスクも高い難治疾患であることから、治療抵抗性の機序を解明し、これを克服することが予後改善のために最も必要とされている。本研究では治療抵抗性の機序解明のためのアプローチとして、炎症現場におけるエピゲノム修飾を明らかにすることを目的としている。その方法として治療抵抗性を示す症例の大腸生検検体のエピゲノム修飾の網羅的解析を計画した。本年度は計画の倫理委員会への申請を行い承認を受けた上で、標本の採取を開始した。

#### A. 研究目的

潰瘍性大腸炎やクローン病は、近年著しい増加傾向にある若年発症の重篤な慢性炎症性疾患である。難治性の粘膜傷害が特徴で下痢、発熱、腹痛を症状として緩解再燃を繰り返すため、患者の社会生活に大きな支障を来すばかりでなく、緩解時にも食生活に制限が必要などQOLが著しく障害される。病因として、腸内細菌に対する過剰な免疫応答が指摘されてはいるが、根治療法がなく、近年開発された抗体医薬にも応答しない患者が約3割にも及ぶため、更なる対策が必要である。慢性化により発癌のリスクも高くなることから、治療抵抗性の機序を解明し、これを克服することが予後改善のために最も必要とされている。治療抵抗性に関わる因子としては、ゲノム多型に加えて、炎症によって誘導されるエピゲノム修飾による遺伝子の異常な活性化および不活化やDNAメチル化による遺伝子サイレンシングの固定化も、重要であると予測される。さらに、我々はヒトゲノム上ゲノム以外の配列であるトランスポゾンにも注目した。Long interspersed nuclear element, (L-1)はヒトゲノムの17%を占め、レトロトランスポゾンとしてDNAに挿入されているが、挿入部位によっては遺伝子機能を障害して疾患発症の誘因となり、また chromosomal rearrangementを引き起こす。このため、活性化L-1は、ゲノム不安定性の原因としても重要である。通常L1エレメントはDNAメチル化によりサイレンシングされているが、我々は、

潰瘍性大腸炎手術摘出標本組織においてもL-1の低メチル化がみられることを既に見いだししている。この事実は、L-1は炎症によって活性化が誘導される可能性を示している。その結果が炎症性腸疾患の病態にどのように関わっているかは未だ明らかにされていないが、炎症発癌に関連している可能性が強いと考えている。本研究では治療抵抗性の機序解明のためのアプローチとして、炎症現場におけるエピゲノム修飾について、レトロトランスポゾン活性化状態を含めて明らかにすることを目的としている。

#### B. 研究方法

- クローン病大腸の生検組織を用いた治療抵抗性エピゲノム因子の解析として以下の方法による計画を立てた。
  - 抗TNF- $\alpha$ 抗体治療の対象症例から治療前の内視鏡検査の際に2個の生検組織を採取する。第一段階として20名のエントリーを行う。
  - 治療効果の判定を目的とした内視鏡検査を、治療開始後4-8週間または主治医が適当と判断した時期に行い、この際に治療後の生検組織を採取する。治療無効例の治療後の試料を確保するため、20名のエントリーで収集できなかった場合は第二段階として10名のエントリーを追加する。
- 生検試料から上皮細胞を粘膜固有層細胞を分取し、セルソーターを用いてマクロファージ分

画を精製した後、次の解析を行う予定とした。

- (1) RNAを用いたマイクロアレイ解析または SAGE解析による網羅的遺伝子発現解析。
- (2) Bisulfateシーケンス法によるDNAメチル化解析。L-1のメチル化解析を含む。
- (3) 抗ヒストン3K4抗体を用いたChIPシーケンス(遺伝子発現促進的修飾)
- (4) 抗ヒストン3K27抗体を用いたChIPシーケンス(発現低下修飾)

(倫理面への配慮)

本計画は、平成22年12月16日国立国際医療研究センター倫理委員会の承認を受けた(承認番号937)。

### C. 研究結果

現在治療前症例のエントリーを開始し、試料を蓄積中である。クローン病大腸の生検2個分の組織から、 $9 \times 10^5$ 個の細胞を回収することができ、上皮細胞マーカーEpCAM陰性の白血球は、 $2.2 \times 10^5$ 個であった。セルソーターで分画後は、CD3+細胞  $2 \times 10^4$ 個、CD33+細胞  $7 \times 10^3$ 個が分取できた。遺伝子発現解析についてはこれまでの手術摘出標本を用いた検討では、上皮細胞 $5 \times 10^5$ 細胞でSAGE-シーケンスが可能であった。メチル化解析(MBP2)、ヒストン修飾解析(H3K4とH3K27)にそれぞれ最低 $1 \times 10^4$ 個が必要であるが、各群 $1 \times 10^5$ 個スタートとすると、白血球で上記4項目を解析するには4症例をプールすれば良いことがわかった。CD3+細胞とCD33+細胞を別々に解析することも可能で、CD3+細胞の解析には2症例、CD33+細胞では5症例をプールすれば良いことが明らかになった。

### D. 考察

クローン病TNF- $\alpha$ 抗体療法治療抵抗性の粘膜の生検組織を用いたエピゲノム解析を進めるための準備が整ったので、実際に細胞分離を開始したところ、倫理委員会への申請時の最低予定集積症例数で、実際に解析可能な細胞数が確保できることが検証された。炎症の重症度により細胞数にはばらつきが出ると予想されるが、それも含めて細胞をマクロファージ、T細胞、上皮細胞とをそれぞれ精製分離してエピゲノム解析することが可能であり、3-5症例分をプールし、治療有効群と無効群を比較することで精度の高い結果が得られると考えている。

### E. 結論

クローン病 TNF- $\alpha$  抗体療法治療抵抗性の粘膜の生検組織を用いたエピゲノム解析を進めるための準備が整い、試料の収集を開始した。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Burkly LC, Dohi T. The TWEAK/Fn14 Pathway in Tissue Remodeling: For Better or for Worse. Adv Exp Med Biol 2011;691:305-322.

学会発表

国外

1. T Dohi, R Kawashima, Y I. Kawamura, J Michaelson, and L C. Burkly. Effect of combination treatment with TNF-inhibitor and anti-TWEAK antibody in mouse hapten-induced colitis Digestive Disease Week 2010, May 3, 2010
2. Kawamura YI., M Toyota, R Kawashima, T Okada, T Hagiwara, Y J. Kawamura, F Konishi, T Matsumoto, and T Dohi. IL-6 induces expression of DNA methyltransferases, gene silencing and malignant type glycosylation in ulcerative colitis and colitic cancer. Digestive Disease Week 2010, May 3, 2010

国内

1. 土肥多恵子 消化管の炎症発癌における再生上皮の意義 第14回IBD若手研究者の会 新潟 2010年4月21日
2. 河村由紀、豊田実、川島麗、萩原輝記、河村裕、小西文雄、斉藤幸夫、松本譽之、神奈木玲児、今井浩三、土肥多恵子. IL-6誘導性DNA高メチル化がもたらす潰瘍性大腸炎およびcolitic cancerの糖鎖発現異常. 第82回日本生化学会総会(神戸)2010年口演 10月24日
3. 河村由紀、土肥多恵子、IL-6はDNAメチル基転移酵素の異所性発現を介して潰瘍性大腸炎における糖鎖発現異常を誘導する。第69回日本癌学会学術総会 大阪、9月22日

### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)  
分担研究報告書

難治性炎症性腸疾患のゲノムおよびエピゲノム解析による病因・病態・治療抵抗性機序の解明  
-炎症性腸疾患のゲノム解析に関する研究-

研究分担者 山本 健 九州大学生体防御医学研究所准教授

**研究要旨**

コモン SNP を用いた炎症性腸疾患の全ゲノム解析が日本人も含めほぼ終了し、現段階では、そこで同定された遺伝子多型および遺伝子が炎症性腸疾患のどのような病態に特異的に関連するかが問われている。本研究では、炎症性腸疾患の治療抵抗性を規定する遺伝子の同定を目指している。これを効率的に進めるためには、診断や治療過程が明確で質の高い臨床情報を備えた患者群の収集と、それを対象としたIBD感受性遺伝子を網羅した中規模ゲノム解析が不可欠である。検体収集機関と連携し、これまでに全ゲノム相関解析で同定された 42 遺伝子を抽出し、解析対象群の集積後、効率良く早急にゲノム解析を実施するための体制を整備した。

**A. 研究目的**

潰瘍性大腸炎(UC)およびクローン病(CD)の病因、病態および抗TNF $\alpha$ 抗体療法抵抗性の遺伝的機序を、ゲノム解析により解明し、さらに、これらと臨床情報を統合的に解析することにより、難治性炎症性腸疾患の病因・病態・抗TNF $\alpha$ 抗体治療抵抗性機序を解明し、本疾病克服への道を拓く。

炎症性腸疾患(IBD)は、緩解再燃を繰り返し重症化すること、高発癌性であること、さらに治療抵抗性を示す頻度が高いことが問題である。その解決のためには、(1)発症および進展に寄与する遺伝子群の解明、(2)TNF $\alpha$ 抗体治療抵抗性に関与する遺伝子群の解明、(3)大腸発癌のリスクに関与する遺伝子変異の解明、および(4)これらのエピゲノム変化の解明を行うことが必須であり、それに基づいた、患者負担の軽減を図る治療法の開発は喫緊の課題である。

本分担研究では、上記の(1)、(2)を担当し、ゲノム解析に重点的に取り組む。

**B. 研究方法**

臨床検体の収集:検体収集機関である慶應義塾大学消化器内科および九州大学消化器内科と連携し、倫理審査承認のもと、末梢血検体の収集と患者情報を収集する。本研究分担者は、匿名化検体より定法にしたがって末梢血

DNAを抽出し、ゲノム解析を実施する。

ゲノム解析:これまでに全ゲノム相関解析によって報告された遺伝子多型を文献より抽出し、これらを本研究の解析対象遺伝子とする。一塩基多型遺伝子型の決定はTaqMan法を用いる。遺伝子型や対立遺伝子頻度の差異を治療抵抗性の有無において検討する。ゲノム統計遺伝学解析にはPLINK、SAS、Rなどのプログラムを用いる。

(倫理面への配慮)

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(文部科学省、厚生労働省、経済産業省、平成13年3月29日(平成20年12月1日一部改正))に則り、各検体採取機関、およびゲノム解析機関においては倫理委員会の承認のもと研究を遂行する。ゲノム解析について九州大学では既に承認を得ている(九州大学許可番号416-00)。

**C. 研究結果**

候補遺伝子多型の選択を行い、これまでに全ゲノム相関解析にて報告されたIBD感受性遺伝子より42遺伝子を抽出した(HLA-B, HLA-DRB1, ATG16L1, ATG5, C11orf30, CARD9, CCL2, CCR6, CDKAL1, CEP72, CUL2, DLD, FCGR2A, GCKR, ICOSLG, IFNG, IKZF1, IL10, IL12B, IL18RAP, IL23R, IRGM, ITLN1, JAK2, KIF21B, LRRK2, LYRM4, MST1, NKX2-3, ORMDL3, PSMG

1,PTGER4,PTPN2,PTPN22,PUS10,REL,RNF186,SLC22A23,SLC26A3,STAT3,TNFSF15,ZNF365)。これらの遺伝子の中には、日本人を対象とした全ゲノム相関解析によって同定された遺伝子も含まれており、本研究における治療抵抗性に関わる遺伝子および治療感受性の個体差を解明する上での重要な標的遺伝子群である。これらの遺伝子の一塩基多型を解析するためのプローブを整備し、検体収集の後に遺伝子型決定とその結果を用いた解析を進めるための準備を整えた。

#### D. 考察

コモンSNPを用いたIBDの全ゲノム解析が日本人もふくめほぼ終了し、現段階では、そこで同定された遺伝子がIBDのどのような病態に特異的に関連するのかが問われている。本研究では、IBDの治療抵抗性を規定する遺伝子の同定を目指している。これを効率的に進めるためには、診断や治療過程が明確で質の高い臨床情報を備えた患者群の収集と、それを対象としたIBD感受性遺伝子を網羅した中規模ゲノム解析が不可欠である。検体収集機関と連携し、解析対象遺伝子を抽出することによって、所期の目的を達成するための一段階をクリアした。

#### E. 結論

IBD の治療抵抗性をゲノムレベルで解明するにあたり、これまでに全ゲノム相関解析で同定された 42 遺伝子を抽出し、解析対象群の集積後、効率良くゲノム解析を実施するための体制を整備した。

#### G. 研究発表

論文発表

1. Kato N, Yamamoto K, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies five novel variants associated with blood pressure in East Asians. *Nat. Genet.* 2011 in press
2. Takeuchi F, Yamamoto K, et al. Association of obesity susceptibility genetic variants with type 2 diabetes in the Japanese. *Diabetologia*, 2011 in press
3. Teshiba R, Yamamoto K, et al.

Identification of TCTE3 as a gene responsible for congenital diaphragmatic hernia using a high-resolution single-nucleotide polymorphism array. *Pediatr Surg Int.* 2011; 27(2): 193-198.

4. Akiyama K, Yamamoto K, et al. Genome-wide association study to identify genetic variants present in Japanese patients harboring intracranial aneurysms. *J Hum Genet.* 2010; 55(10):656-661.
5. Tanaka F, Yamamoto K, et al. Strong interaction between the effects of alcohol consumption and smoking on esophageal squamous cell carcinoma among individuals with ADH1B and/or ALDH2 risk alleles. *Gut*, 2010; 59(11):1457-1464.
6. Yokomizo A, Yamamoto K, et al. Histopathologic subtype-specific genomic profiles of renal cell carcinomas identified by high-resolution whole-genome single nucleotide polymorphism array analysis. *Oncol Lett.*, 2010; 1: 1073-1078.
7. Kukita Y, Yamamoto K, et al. A definitive haplotype map as determined by genotyping duplicated haploid genomes finds a predominant haplotype preference at copy number variation events. *Am. J. Hum. Genet.*, 2010; 86(6):918-928.
8. Shiota M, Yamamoto K, et al. P300/CBP-associated factor regulates Y-box binding protein-1 expression and promotes cancer cell growth, cancer invasion and drug resistance. *Cancer Sci.* 2010; 101(8):1797-1806
9. Takeuchi F, Yamamoto K, et al. Blood pressure and hypertension are associated with seven loci in the Japanese population. *Circulation*, 2010; 121(21): 2302-2309.
10. Takeuchi F, Yamamoto K, et al. Common variants at the GCK, GCKR, G6PC2-ABCB11 and MTNR1B loci are associated with fasting glucose in two Asian populations. *Diabetologia.* 2010; 53(2): 299-308.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
土肥多恵子	コロニックパッチ	清野 宏	臨床粘膜免疫学	シナジー	東京	2010年	157-163
土肥多恵子	IBDの実験モデル	日比紀文	炎症性腸疾患	医学書院	東京	2010年	315-319

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tsunoda T, Takashima Y, Tanaka Y, Fujimoto T, Doi K, Hirose Y, Koyanagi M, Yoshida Y, Okamura T, Kuroki M, Sasazuki T, Shirasawa S.	Immune-related zinc finger gene ZFAT is an essential transcriptional regulator for hematopoietic differentiation in blood islands.	Proc Natl Acad Sci U S A.	107	14199-14204	2010
Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Viña M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J.	Nomenclature for factors of the HLA system, 2010.	Tissue Antigens.	75	291-455	2010
Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Viña M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW,	An update to HLA nomenclature, 2010.	Bone Marrow Transplant.	45	846-848	2010

Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J.					
Kukita Y, Yahara K, Tahira T, Higasa K, Sonoda M, Yamamoto K, Kato K, Wake N, Hayashi K.	A definitive haplotype map as determined by genotyping duplicated haploid genomes finds a predominant haplotype preference at copy number variation events.	Am. J. Hum.Genet.	86	918-928	2010
Burkly LC, Dohi T.	The TWEAK/Fn14 Pathway in Tissue Remodeling: For Better or for Worse.	Adv Exp Med Biol	691	305-322	2011
Naruse H, Hisamatsu T, Yamauchi Y, Chang JE, Matsuoka K, Kitazume MT, Arai K, Ando S, Kanai T, Kamada N, Hibi T.	Intracellular bacteria recognition contributes to maximal interleukin (IL)-12 production by IL-10-deficient macrophages.	Clin Exp Immunol.	Apr;164(1)	137-44	2011
Takayama T, Kamada N, Chinen H, Okamoto S, Kitazume MT, Chang J, Matuzaki Y, Suzuki S, Sugita A, Koganei K, Hisamatsu T, Kanai T, Hibi T.	Imbalance of NKp44(+)/NKp46(-) and NKp44(-)/NKp46(+) natural killer cells in the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease.	Gastroenterology.	Sep;139(3)	882-92	2010
久松理一 日比紀文	総説 『クローン病 の長期予後について 考える』	日本消化器病学 会雑誌	108 巻 3 号	373-380	2011
久松理一 日比紀文	特集：小腸疾患：診 断と治療の進歩 II. 診療の進歩 6.Crohn 病	日本内科学会雑 誌	第 100 巻 第 1 号	85-95	2011

## SPECIAL REPORT

# An update to HLA Nomenclature, 2010

SGE Marsh<sup>1</sup>, ED Albert<sup>2</sup>, WF Bodmer<sup>3</sup>, RE Bontrop<sup>4</sup>, B Dupont<sup>5</sup>, HA Erlich<sup>6</sup>, M Fernández-Viña<sup>7</sup>, DE Geraghty<sup>8</sup>, R Holdsworth<sup>9</sup>, CK Hurley<sup>10</sup>, M Lau<sup>11</sup>, KW Lee<sup>12</sup>, B Mach<sup>13</sup>, M Maiers<sup>14</sup>, WR Mayr<sup>15</sup>, CR Müller<sup>16</sup>, P Parham<sup>17</sup>, EW Petersdorf<sup>18</sup>, T Sasazuki<sup>18</sup>, JL Strominger<sup>19</sup>, A Svejgaard<sup>20</sup>, PI Terasaki<sup>11</sup>, JM Tiercy<sup>21</sup> and J Trowsdale<sup>22</sup>

<sup>1</sup>Anthony Nolan Research Institute, London, UK; <sup>2</sup>Laboratory of Immunogenetics, Department of Pediatrics, University of Munich, Munich, Germany; <sup>3</sup>Weatherall Institute of Molecular Medicine, Oxford University, Oxford, UK; <sup>4</sup>Biomedical Primate Research Centre, Rijswijk, The Netherlands; <sup>5</sup>Sloan-Kettering Institute for Cancer Research, New York, NY, USA; <sup>6</sup>Roche Molecular Systems, Alameda, CA, USA; <sup>7</sup>MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA; <sup>8</sup>Fred Hutchinson Cancer Center, Seattle, WA, USA; <sup>9</sup>Victorian Transplantation and Immunogenetics Service, Melbourne, Victoria, Australia; <sup>10</sup>Department of Oncology, Georgetown University, Washington, DC, USA; <sup>11</sup>Terasaki Foundation, Los Angeles, CA, USA; <sup>12</sup>Hallym University, Anyang City, South Korea; <sup>13</sup>University of Geneva, Geneva, Switzerland; <sup>14</sup>National Marrow Donor Program, Minneapolis, MN, USA; <sup>15</sup>Medical University of Vienna, Vienna, Austria; <sup>16</sup>Zentrales Knochenmarkspender-Register, Ulm, Germany; <sup>17</sup>Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA; <sup>18</sup>International Medical Centre of Japan, Tokyo, Japan; <sup>19</sup>Harvard University, Cambridge, MA, USA; <sup>20</sup>State University Hospital, Copenhagen, Denmark; <sup>21</sup>Hôpital Cantonal Universitaire, Geneva, Switzerland and <sup>22</sup>Cambridge University, Cambridge, UK

**The WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System met during the 15th International Histocompatibility and Immunogenetics Workshop in Buzios, Brazil in September 2008. This update is an extract of the main report that documents the additions and revisions to the nomenclature of human leukocyte antigen (HLA) specificities following the principles established in previous reports.**

*Bone Marrow Transplantation* (2010) **45**, 846–848; doi:10.1038/bmt.2010.79; published online 29 March 2010

**Keywords:** HLA; Nomenclature; update

### Introduction of colon-delimited HLA allele names

The convention of using a four-digit code to distinguish HLA alleles that differ in the proteins they encode was introduced in the 1987 Nomenclature Report.<sup>1,2</sup> Since then additional digits have been added, and currently an allele name may be composed of four, six or eight digits depending on its sequence.

The first two digits describe the allele family, which often corresponds to the serological antigen carried by the allotype. The third and fourth digits are assigned in the order in which the sequences have been determined.

Alleles whose numbers differ in the first four digits must differ in one or more nucleotide substitutions that change the amino-acid sequence of the encoded protein. Alleles that differ only by synonymous nucleotide substitutions within the coding sequence are distinguished by the use of the fifth and sixth digits. Alleles that differ only by sequence polymorphisms in introns or in the 5' and 3' untranslated regions that flank the exons and introns are distinguished by the use of the seventh and eighth digits.

In 2002 we faced the issue of the *A\*02* and *B\*15* allele families having more than 100 alleles.<sup>3</sup> At that time the decision taken was to name further alleles in these families in the rollover allele families *A\*92* and *B\*95*, respectively. For *HLA-DPB1* alleles, it was decided to assign new alleles within the existing system; hence, once *DPB1\*9901* had been assigned the next allele would be assigned *DPB1\*0102*, followed by *DPB1\*0203*, *DPB1\*0302* etc.

When these conventions were adopted, it was anticipated that the nomenclature system would accommodate all the HLA alleles likely to be sequenced. Unfortunately this is not the case, as the number of alleles for certain genes is now fast approaching the maximum possible with the current naming convention.

With the ever-increasing number of HLA alleles described, it has been decided to introduce colons (:) into the allele names to act as delimiters of the separate fields. To facilitate the transition from the old to the new nomenclature, a single leading zero must be added to all fields containing the values 1–9, but beyond that no leading zeros are allowed. This will help to lessen any confusion in the conversion to the new style of nomenclature.

Correspondence: Professor SGE Marsh, HLA Informatics Group, Anthony Nolan Research Institute, Royal Free Hospital, London NW3 2QG, UK.

E-mail: steven.marsh@ucl.ac.uk

Received 25 February 2010; accepted 25 February 2010; published online 29 March 2010

Hence:

<i>A*01010101</i>	becomes	<i>A*01:01:01:01</i>
<i>A*02010102L</i>	becomes	<i>A*02:01:01:02L</i>
<i>A*260101</i>	becomes	<i>A*26:01:01</i>
<i>A*3301</i>	becomes	<i>A*33:01</i>
<i>B*0808N</i>	becomes	<i>B*08:08N</i>
<i>DRB1*01010101</i>	becomes	<i>DRB1*01:01:01:01</i>

For allele families that have more than 100 alleles, such as the *A\*02* and *B\*15* groups, it will be possible to encode these in a single series. Thus, the *A\*92* and *B\*95* alleles will now be renamed into the *A\*02* and *B\*15* allele series. For example:

<i>A*9201</i>	becomes	<i>A*02:101</i>
<i>A*9202</i>	becomes	<i>A*02:102</i>
<i>A*9203</i>	becomes	<i>A*02:103</i> etc
<i>B*9501</i>	becomes	<i>B*15:101</i>
<i>B*9502</i>	becomes	<i>B*15:102</i>
<i>B*9503</i>	becomes	<i>B*15:103</i> etc

The names *A\*02:100* and *B\*15:100* will not be assigned. In case of other allele families in which the number of alleles reaches 100, these will be numbered sequentially; for example, *A\*24:99* will be followed by *A\*24:100*.

The *DPB1* allele names that have been previously assigned names within the existing system will also be renamed, for example:

<i>DPB1*0102</i>	becomes	<i>DPB1*100:01</i>
<i>DPB1*0203</i>	becomes	<i>DPB1*101:01</i>
<i>DPB1*0302</i>	becomes	<i>DPB1*102:01</i>
<i>DPB1*0403</i>	becomes	<i>DPB1*103:01</i>
<i>DPB1*0502</i>	becomes	<i>DPB1*104:01</i> etc

The 'w' will be removed from the *HLA-C* allele names, but will be retained in the *HLA-C* antigen names, to avoid confusion with the factors of the complement system and epitopes on the *HLA-C* molecule, often termed C1 and C2, that act as ligands for the killer-cell Ig-like receptors.

<i>Cw*0103</i>	becomes	<i>C*01:03</i>
<i>Cw*020201</i>	becomes	<i>C*02:02:01</i>
<i>Cw*07020101</i>	becomes	<i>C*07:02:01:01</i> etc

The changes to the HLA Nomenclature will be officially introduced in April 2010. A full list of old and new HLA allele names will be made available through the IMGT/HLA Database ([www.ebi.ac.uk/imgt/hla](http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla)) and the HLA Nomenclature web site ([hla.alleles.org](http://hla.alleles.org)).<sup>4</sup>

### Reporting of ambiguous HLA allele typing

The level of resolution achieved by many of the HLA typing technologies used today does not always allow

for a single HLA allele to be unambiguously assigned. Often it is only possible to resolve the presence of a number of closely related alleles. This is referred to as an ambiguous 'string' of alleles. In addition, typing strategies are frequently aimed at resolving alleles that encode differences within the peptide-binding domains, but fail to exclude those that differ elsewhere. For some purposes it is helpful to provide codes that aid the reporting of certain ambiguous allele 'strings'. The decision was taken to introduce codes to allow for the easy reporting of the following:

(a) *HLA alleles that encode for identical peptide-binding domains*: HLA alleles having nucleotide sequences that encode the same protein sequence for the peptide-binding domains (exons 2 and 3 for HLA class I and exon 2 only for HLA class II alleles) will be designated by an upper case 'P', which follows the allele designation of the lowest-numbered allele in the group.

For example, the string of allele names below share the same  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  domain protein sequence encoded by exons 2 and 3:

*A\*02:01:01:01/A\*02:01:01:02L/A\*02:01:01:03/A\*02:01:02/A\*02:01:03/A\*02:01:04/A\*02:01:05/A\*02:01:06/A\*02:01:07/A\*02:01:08/A\*02:01:09/A\*02:01:10/A\*02:01:11/A\*02:01:12/A\*02:01:13/A\*02:01:14/A\*02:01:15/A\*02:01:17/A\*02:01:18/A\*02:01:19/A\*02:01:21/A\*02:01:22/A\*02:09/A\*02:66/A\*02:75/A\*02:89/A\*02:97/A\*02:132/A\*02:134/A\*02:140*

This string can be reduced to *A\*02:01P*.

(b) *HLA alleles that share identical nucleotide sequences for the exons encoding the peptide-binding domains*: HLA alleles that have identical nucleotide sequences for the exons encoding the peptide-binding domains (exons 2 and 3 for HLA class I and exon 2 only for HLA class II alleles) will be designated by an upper case 'G', which follows the allele designation of the lowest-numbered allele in the group.

For example, the string of allele names below have identical exon 2 and 3 nucleotide sequences:

*A\*02:01:01:01/A\*02:01:01:02L/A\*02:01:01:03/A\*02:01:08/A\*02:01:11/A\*02:01:14/A\*02:01:15/A\*02:01:21/A\*02:09/A\*02:43N/A\*02:66/A\*02:75/A\*02:83N/A\*02:89/A\*02:97/A\*02:132/A\*02:134/A\*02:140*

This string can be reduced to *A\*02:01:01G*.

These reporting codes will be implemented in April 2010 and will be made available through the IMGT/HLA Database ([www.ebi.ac.uk/imgt/hla](http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla)) and the HLA Nomenclature web site ([hla.alleles.org](http://hla.alleles.org)).<sup>4</sup>

A full list of all currently assigned HLA alleles and antigens, together with information on the changes documented here, is published in the WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System, 2010.<sup>1</sup>

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.



## References

- 1 Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA *et al*. Nomenclature for Factors of the HLA System, 2010. *Tissue Antigens* 2010; **75**: 291–455.
- 2 Bodmer WF, Albert E, Bodmer JG, Dupont B, Mach B, Mayr WR *et al*. Nomenclature for Factors of the HLA System, 1987. In: Dupont B (ed). *Immunobiology of HLA*. Springer-Verlag: New York, 1989, pp 72–79.
- 3 Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA *et al*. Nomenclature for Factors of the HLA System, 2002. *Tissue Antigens* 2002; **60**: 407–464.
- 4 Robinson J, Malik A, Parham P, Bodmer JG, Marsh SGE. IMGT/HLA Database—sequence database for the human major histocompatibility complex. *Tissue Antigens* 2000; **55**: 280–287.

# Immune-related zinc finger gene ZFAT is an essential transcriptional regulator for hematopoietic differentiation in blood islands

Toshiyuki Tsunoda<sup>a,b,1</sup>, Yasuo Takashima<sup>a,b,1</sup>, Yoko Tanaka<sup>a,b</sup>, Takahiro Fujimoto<sup>a,b</sup>, Keiko Doi<sup>a,b</sup>, Yumiko Hirose<sup>b</sup>, Midori Koyanagi<sup>a,b</sup>, Yasuhiro Yoshida<sup>a</sup>, Tadashi Okamura<sup>c</sup>, Masahide Kuroki<sup>b</sup>, Takehiko Sasazuki<sup>c</sup>, and Senji Shirasawa<sup>a,b,2</sup>

<sup>a</sup>Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, and <sup>b</sup>Center for Advanced Molecular Medicine, Fukuoka University, Fukuoka 814-0180, Japan; and <sup>c</sup>International Medical Center of Japan, Tokyo 162-8655, Japan

Edited by Stuart H. Orkin, Children's Hospital and the Dana Farber Cancer Institute, Harvard Medical School and The Howard Hughes Medical Institute, Boston, MA, and approved July 2, 2010 (received for review February 26, 2010)

TAL1 plays pivotal roles in vascular and hematopoietic developments through the complex with LMO2 and GATA1. Hemangioblasts, which have a differentiation potential for both endothelial and hematopoietic lineages, arise in the primitive streak and migrate into the yolk sac to form blood islands, where primitive hematopoiesis occurs. ZFAT (a zinc-finger gene in autoimmune thyroid disease susceptibility region / an immune-related transcriptional regulator containing 18 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-type zinc-finger domains and one AT-hook) was originally identified as an immune-related transcriptional regulator containing 18 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-type zinc-finger domains and one AT-hook, and is highly conserved among species. ZFAT is thought to be a critical transcription factor involved in immune-regulation and apoptosis; however, developmental roles for ZFAT remain unknown. Here we show that *Zfat*-deficient (*Zfat*<sup>-/-</sup>) mice are embryonic-lethal, with impaired differentiation of hematopoietic progenitor cells in blood islands, where ZFAT is exactly expressed. Expression levels of *Tal1*, *Lmo2*, and *Gata1* in *Zfat*<sup>-/-</sup> yolk sacs are much reduced compared with those of wild-type mice, and ChIP-PCR analysis revealed that ZFAT binds promoter regions for these genes in vivo. Furthermore, profound reduction in TAL1, LMO2, and GATA1 protein expressions are observed in *Zfat*<sup>-/-</sup> blood islands. Taken together, these results suggest that ZFAT is indispensable for mouse embryonic development and functions as a critical transcription factor for primitive hematopoiesis through direct-regulation of *Tal1*, *Lmo2*, and *Gata1*. Elucidation of ZFAT functions in hematopoiesis might lead to a better understanding of transcriptional networks in differentiation and cellular programs of hematopoietic lineage and provide useful information for applied medicine in stem cell therapy.

During embryonic development, mesodermal progenitors give rise to hemangioblasts, which have a differentiation-potential for both endothelial and hematopoietic lineages (1–3). Hemangioblasts arise in the primitive streak and then migrate into the extraembryonic yolk sac to form blood islands (4, 5). Blood islands are foci of hemangioblasts, which form a luminal layer of endothelial cells with a property of producing hematopoietic progenitor cells, and are eventually assembled into a functional vascular network to transfer nutrients from the yolk sac to the embryo proper (6, 7).

Recent studies have revealed that TAL1, a basic helix-loop-helix transcription factor, is an essential transcription factor for differentiation of hemangioblasts into hemogenic endothelium (1, 8–12). TAL1 also plays pivotal roles in vascular and hematopoietic developments through the complex with LMO2 and GATA1 (9, 13–17). LMO2 functions as a bridging molecule between TAL1 and GATA1 in the DNA-binding complex (14). GATA1 also functions as a key molecule in the differentiation process of the erythroid lineage (18, 19). However, the transcriptional regulations upstream of these genes remain elusive.

The human ZFAT gene was originally identified as a susceptibility gene for autoimmune thyroid diseases (20). The mouse *Zfat* gene encodes an immune-related transcriptional regulator con-

taining 18 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-type zinc-finger domains and one AT-hook and is highly conserved from fish to human (21). ZFAT is predominantly expressed in placenta, thymus, spleen, and lymph nodes (20, 21). ZFAT was a critical transcriptional regulator in immune-regulation (21) and an antiapoptotic molecule in lymphoblastic leukemia cell line (22). Recently, ZFAT was reported to be associated with IFN- $\beta$  responsiveness in multiple sclerosis (23). However, developmental roles for ZFAT remain unknown.

In this study, we generated *Zfat*-deficient (*Zfat*<sup>-/-</sup>) mice and found that *Zfat*-deficiency results in early embryonic lethality, with the reduction in the number of blood islands and impaired differentiation of hematopoietic progenitor cells in blood islands. Furthermore, in vitro and in vivo molecular analyses revealed that ZFAT directly regulates the transcription factors including *Tal1*, *Lmo2*, and *Gata1* in blood islands. Taken together, these results suggested that ZFAT plays critical roles in the development of hematopoietic system in blood islands.

## Results

**Zfat-Deficient Mice with Early Embryonic Lethality.** To examine developmental roles for ZFAT, we targeted the *Zfat* allele for disruption by homologous recombination (Fig. 1A). In construction of the targeting vector, a 1.4-kb fragment of *Zfat* genomic DNA including exon 8 was replaced with neomycin resistance (*neo*) gene (Fig. 1A). Targeted ES cell clones with homologous recombination and heterozygous (*Zfat*<sup>+/-</sup>) mice were confirmed by Southern blot analysis (Fig. 1B, Left) and by PCR (Fig. 1B, Right). Then, *Zfat*<sup>+/-</sup> mice with the genetic background of C57BL/6 were established and analyzed in this study. *Zfat*<sup>+/-</sup> mice were viable, fertile, and phenotypically indistinguishable from wild-type (*Zfat*<sup>+/+</sup>) littermates. Obvious developmental abnormalities in T or B cells from *Zfat*<sup>+/-</sup> mice were not observed in the thymus or spleen, where ZFAT is abundantly expressed (20, 21) (Fig. S1); however, the possibilities of altered immune-responses in peripheral T and B cells of *Zfat*<sup>+/-</sup> mice are not excluded and a full understanding of the ZFAT function in the immune system awaits future studies.

Author contributions: T.T., Y. Takashima, T.S., and S.S. designed research; T.T., Y. Takashima, Y. Tanaka, T.F., K.D., Y.H., M. Koyanagi, Y.Y., T.O., and M. Kuroki performed research; T.T., Y. Takashima, and S.S. analyzed data; and T.T., Y. Takashima, and S.S. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

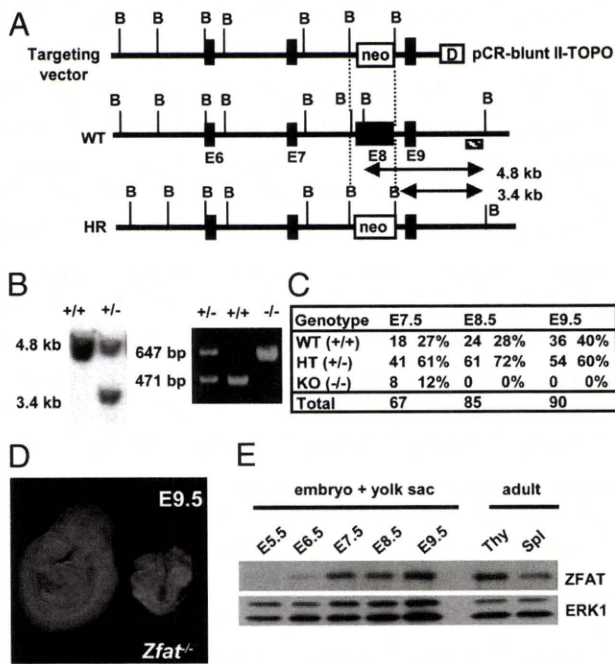
This article is a PNAS Direct Submission.

Freely available online through the PNAS open access option.

<sup>1</sup>T.T. and Y. Takashima contributed equally to this work.

<sup>2</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: sshirasa@fukuoka-u.ac.jp.

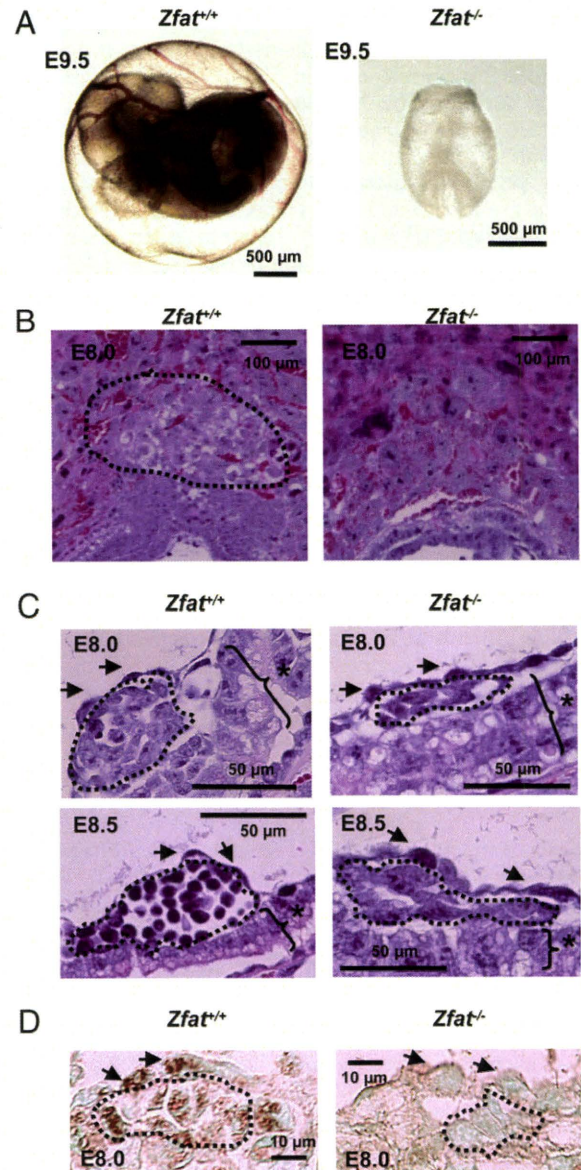
This article contains supporting information online at [www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1002494107/-DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1002494107/-DCSupplemental).



**Fig. 1.** *Zfat* is indispensable for mouse embryonic development. (A) Targeting disruption of the *Zfat* gene. WT, wild-type; HR, homologous recombination; B, BglII site; closed box: E, exon; neo, neomycin resistance cassette; D, DTA (diphtheria-toxin A fragment); shaded box: external probe. (B) Southern blotting of BglII-digested DNA using 3' external probe (Left). PCR-based genotyping of *Zfat*<sup>+/-</sup> progeny (Right). (C) Genotyping statistics of progeny from *Zfat*<sup>+/-</sup> mice. The number and ratio of embryos showing normal development are shown. (D) Typical phenotype of *Zfat*<sup>-/-</sup> embryos at E9.5. (E) ZFAT expression during early developmental stage. Thy, thymocyte; Spl, splenocyte; ERK1, loading control.

Intercrosses between *Zfat*<sup>+/-</sup> mice failed to produce *Zfat*<sup>-/-</sup> mice, indicating that *Zfat*<sup>-/-</sup> mice died either in utero or shortly after birth. Developmental abnormalities in *Zfat*<sup>-/-</sup> embryos did occur by E8.5 (Fig. 1C) and no *Zfat*<sup>-/-</sup> embryos showed the embryonic turning at E9.5 (Fig. 1D), suggesting that embryonic development in *Zfat*<sup>-/-</sup> mice was severely impaired before the stage of embryonic turning. ZFAT protein expression in embryos with yolk sacs was observed from E6.5 and was gradually increased to the expression level of thymocytes or splenocytes in adult tissues, and was kept high at least by E9.5 (Fig. 1E). All these results indicated that ZFAT is a critical molecule during midgestation and its deficiency results in early embryonic lethality, demonstrating that ZFAT is essential for mouse embryonic development.

**Impaired Differentiation of Hematopoietic Progenitor Cells in Blood Islands of *Zfat*-Deficient Mice.** Dysfunction of the vascular system is a common cause of early embryonic lethality during midgestation (24). Initial inspection using a microscope indicated that *Zfat*<sup>-/-</sup> yolk sacs were bloodless at E9.5 (Fig. 2A), whereas the vascular system in *Zfat*<sup>+/-</sup> yolk sacs seemed to be normally developed (Fig. S2). Histological analyses of placentas revealed that the spongiotrophoblast layer was not well developed in *Zfat*<sup>-/-</sup> placentas at E8.0, the abnormality of which was consistently detected in *Zfat*<sup>-/-</sup> placentas (Fig. 2B). The phenotype observed in the spongiotrophoblast layer was utilizable as a marker for *Zfat*<sup>-/-</sup> yolk sacs. Histological analyses revealed that hematopoietic progenitor cells in *Zfat*<sup>+/-</sup> blood islands differentiated into the more developed cells from E8.0 to E8.5, whereas those in *Zfat*<sup>-/-</sup> blood islands were spindle-shaped at both E8.0 and



**Fig. 2.** Impaired differentiation of hematopoietic progenitor cells in *Zfat*<sup>-/-</sup> blood islands. (A) Embryos with yolk sacs from *Zfat*<sup>+/-</sup> or *Zfat*<sup>-/-</sup> mice at E9.5. (Scale bars, 500  $\mu$ m.) (B) H&E-stained sections of *Zfat*<sup>+/-</sup> and *Zfat*<sup>-/-</sup> placentas at E8.0. Region surrounded by the dotted line represents spongiotrophoblast layer. (Scale bars, 100  $\mu$ m.) (C) H&E-stained sections of blood islands of *Zfat*<sup>+/-</sup> and *Zfat*<sup>-/-</sup> yolk sacs at E8.0 (Upper) and E8.5 (Lower). Region surrounded by the dotted line represents hematopoietic progenitor cells. Arrows, endothelial cells; asterisks, visceral endodermal cells. (Scale bars, 50  $\mu$ m.) (D) ZFAT protein expression in endothelial and hematopoietic progenitor cells in *Zfat*<sup>+/-</sup> blood islands at E8.0. The region surrounded by the dotted line represents hematopoietic progenitor cells. Arrows, endothelial cells. (Scale bars, 10  $\mu$ m.)

E8.5 (Fig. 2C), suggesting that differentiation of hematopoietic progenitor cells in *Zfat*<sup>-/-</sup> blood islands was impaired.

**Reduction in the Number of Blood Islands and Hematopoietic Progenitor Cells in *Zfat*<sup>-/-</sup> Yolk Sacs.** To further characterize the abnormalities in *Zfat*<sup>-/-</sup> blood islands, the number of endothelial, hematopoietic progenitor, and visceral endodermal cells in blood islands were examined at E8.0 based on the morphological assessment described (25). The number of endothelial and visceral endodermal cells between *Zfat*<sup>+/-</sup> and *Zfat*<sup>-/-</sup> blood islands

were not significantly different ( $P > 0.1$ ) (Table 1). Of interest was that the number of blood islands in *Zfat*<sup>-/-</sup> yolk sacs and hematopoietic progenitor cells in *Zfat*<sup>-/-</sup> blood islands were significantly decreased by 2.3-fold ( $*P = 0.014$ ; Table 1) and 2.9-fold ( $**P = 0.004$ ; Table 1), respectively, compared with those of *Zfat*<sup>+/+</sup> mice. Furthermore, the ratios of hematopoietic progenitor cells per endothelial cells in *Zfat*<sup>+/+</sup> and *Zfat*<sup>-/-</sup> blood islands were 1.43 and 0.71, respectively, with a statistically significant difference ( $P = 0.0037$ ). Taken together, these results suggested that proper differentiation in the hematopoietic lineage was impaired in *Zfat*<sup>-/-</sup> blood islands.

**ZFAT Expression Does Not Affect Apoptosis or Proliferation in Yolk Sac Blood Islands.** In immunohistochemical analysis using anti-ZFAT monoclonal antibody M16 (Fig. S3), ZFAT signals were evidently detected in endothelial and hematopoietic progenitor cells of *Zfat*<sup>+/+</sup> blood islands at E8.0, whereas ZFAT signals were not observed in endothelial cells or hematopoietic progenitor cells of *Zfat*<sup>-/-</sup> blood islands (Fig. 2D), indicating that ZFAT was exactly expressed in endothelial and hematopoietic progenitor cells in blood islands at E8.0. Furthermore, signals of *Ki-67* as a proliferation marker were evenly detected in endothelial and hematopoietic progenitor cells in both *Zfat*<sup>+/+</sup> and *Zfat*<sup>-/-</sup> blood islands at E8.0, and signals of activated caspase-3 as an apoptosis marker were rarely detected in *Zfat*<sup>+/+</sup> or *Zfat*<sup>-/-</sup> blood islands at E8.0 (Fig. S4). Taken together, these results indicate that ZFAT expression in blood islands does not function by inhibiting apoptosis or promoting progenitor cell proliferation, suggesting that ZFAT may instead be involved in promoting hematopoietic progenitor differentiation.

**ZFAT Regulates the Genes Involved in Hematopoietic Differentiation in Blood Islands.** To address a possibility whether ZFAT regulates the genes essential for development of hematopoietic progenitor cells in blood islands, we performed real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) assay for the hematopoiesis-related genes, including *Tall1*, *Lmo2*, *Gata1*, *Gata2* (26) and *Kit* (1, 27), and *Gapdh* as a control gene in yolk sacs at E7.5. Expression levels of *Tall1*, *Lmo2*, and *Gata1* in *Zfat*<sup>-/-</sup> yolk sacs were decreased by 50-, 20-, and 200-fold, respectively, compared with those of *Zfat*<sup>+/+</sup> yolk sacs (Fig. 3A; \*,  $P < 0.001$ ), whereas the expressions of *Gata2* and *Kit* were not different between *Zfat*<sup>+/+</sup> and *Zfat*<sup>-/-</sup> yolk sacs (Fig. 3A;  $P > 0.05$ ). Reduced expressions of *Tall1*, *Lmo2*, and *Gata1* were consistent with the histological features in blood islands in *Zfat*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 2), suggesting that ZFAT is an essential regulator for the expression of the hematopoiesis-related genes, including *Tall1*, *Lmo2*, and *Gata1* in blood islands.

**Direct-Regulation of *Tall1*, *Lmo2*, and *Gata1* by ZFAT.** We, next, determined whether or not ZFAT directly regulates *Tall1*, *Lmo2*, and *Gata1* expressions. In luciferase reporter assay using 1-kb probes for the promoter regions of *Tall1*, *Lmo2*, and *Gata1* genes, the luciferase activities by ZFAT fused with a transcriptional activator-domain (AD-ZFAT) were increased by 2.6-, 5.7-, and

2.8-fold, compared with those by a transcriptional activator-domain construct (AD), respectively (Fig. 3B,  $P < 0.05$ ). ZFAT binding regions were further narrowed down with 200-bp probes from the 1-kb probes showing the activities. The luciferase activities for the 200-bp probes for *Tall1*, *Lmo2*, and *Gata1* were increased to 5.5-fold (Tall1-3), 4.3-fold (Lmo2-3), and 3.7-fold (Gata1-5), respectively (Fig. 3B; \*\*,  $P < 0.01$ ).

To address the bindings of ZFAT with these DNA sequences in vivo, ChIP-PCR assays on yolk sacs at E7.5 and on adult kidney as a control tissue, where ZFAT is rarely expressed (21), using anti-ZFAT M16 antibody (Fig. S3) and control IgG, were done for the 200-bp regions with the highest luciferase activity (Tall1-3, Lmo2-3, and Gata1-5) and the promoter region of *Kifap3* as a hematopoiesis-unrelated control gene. Differences of ChIP DNA concentrations were semiquantified by 35- and 42-cycle end-point PCR products. Promoter regions for *Tall1*, *Lmo2*, and *Gata1* in the M16-ChIP DNA from E7.5 yolk sacs were enriched and compared with those of control IgG-ChIP DNA, whereas M16-ChIP DNA for *Tall1*, *Lmo2*, and *Gata1* in kidney as a control tissue were not enriched (Fig. 3C); taken together, these data are suggestive of the specificity of anti-ZFAT M16 antibody and the bindings of ZFAT with these promoter regions. Furthermore, quantification by real-time qPCR assay for ChIP DNA showed that total amount of promoter regions for *Tall1*, *Lmo2*, and *Gata1* in the M16-ChIP DNA were 126.4 units, 88.5 units, and 13.2 units, respectively (Fig. 3D,  $P < 0.05$ ), whereas M16-ChIP DNA on the promoter regions for *Cd41*, *Runx1*, and *Flk-1*—the expressions of which are reported to be regulated by a TAL1-LMO2-GATA1 transcriptional complex (4, 5, 14, 28–32)—were not enriched in the end-point PCR or ChIP-qPCR assays (Fig. S5), suggesting that ZFAT specifically binds to the promoter regions for *Tall1*, *Lmo2*, and *Gata1* in yolk sacs at E7.5.

The ZFAT binding regions detected in the *Tall1*, *Lmo2*, and *Gata1* genes are mapped in the genome, showing that ZFAT binds to the distinct regions from the known regulatory regions including the -187 element in *Tall1* (33), the proximal promoter and the -75 enhancer element in *Lmo2* (34, 35), and the CACCC motif in *Gata1* (36, 37) (Fig. 3E).

**Reduction in Protein Expressions of TAL1, LMO2, and GATA1 and TAL1-Downstream Genes in *Zfat*<sup>-/-</sup> Blood Islands.** Immunohistochemical analysis on *Zfat*<sup>+/+</sup> and *Zfat*<sup>-/-</sup> blood islands at E8.0 was performed to confirm the expression levels of TAL1, LMO2, and GATA1. The signals for TAL1, LMO2, and GATA1 were observed in *Zfat*<sup>+/+</sup> blood islands, especially in hematopoietic progenitor cells, whereas all these expressions were much reduced in *Zfat*<sup>-/-</sup> blood islands (Fig. 4), suggesting that ZFAT is indispensable for the proper expressions of TAL1, LMO2, and GATA1 in hematopoietic progenitor cells in blood islands at E8.0.

Real-time qRT-PCR assay at E7.5 showed that expression levels of *Cd41*, *Runx1*, and *Flk-1* in *Zfat*<sup>-/-</sup> yolk sacs were decreased by 50-, 6.6-, and 4-fold, respectively, compared with *Zfat*<sup>+/+</sup> yolk sacs (Fig. 3A; \*,  $P < 0.001$ ), although these genes were not directly regulated by ZFAT (Fig. S5). Protein expres-

**Table 1. Reduction in the number of blood islands and hematopoietic progenitor cells in *Zfat*-deficient yolk sac at E8.0**

	WT-1	WT-2	WT-3	KO-1	KO-2	KO-3	Mean ± SD		t test (P value)
							WT	KO	
Number of slides analyzed	21	19	13	16	14	12			
Number of blood islands	44	42	32	25	14	13	39 ± 6	17 ± 6	0.014*
Number of endothelial cells	328	433	350	383	206	183	370 ± 55	257 ± 109	0.19
Number of hematopoietic progenitor cells	439	632	526	232	148	173	532 ± 96	184 ± 43	0.004**
Number of visceral endodermal cells	376	414	395	412	205	207	395 ± 19	275 ± 118	0.16

\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .