

# Id2/Id3 による転写制御とアレルギー炎症

京都大学ウイルス・再生医科学研究所再生免疫学分野  
宮崎正輝

## 1. はじめに

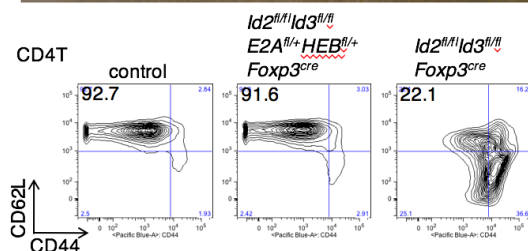
免疫システムは、病原体に対する防御反応と自己抗原や無害な抗原に対する寛容という二つのバランスにより成り立つ。寛容の破綻は自己免疫疾患やアレルギー疾患を起し、免疫反応の閾値 (threshold) の低下が原因として考えられる。制御性T (Treg) 細胞は、炎症抑制の中心的な役割を担い、特異的転写因子Foxp3によりその細胞プログラムが規定されている<sup>1)</sup>。最近、Treg細胞において様々な転写因子が炎症反応により誘導され、炎症反応に応じたTreg細胞の機能に重要であることが報告されている<sup>2)</sup>。申請者は、Treg細胞特異的にHLH型転写因子Id2とId3を欠損マウスを作成したところ、ヒトのアレルギー性疾患 (気管支喘息、アトピー性皮膚炎、好酸球性食道炎) と類似のTh2型の全身性炎症反応の亢進を認め、Id2/Id3による転写制御がTreg細胞によるアレルギー炎症抑制に重要であることを報告した<sup>3)</sup>。このことはFoxp3とは異なる転写制御の重要性を示唆したことから、Treg細胞におけるId2/Id3による転写制御機構の解明を試みた。

## 2. 方法及び結果

Treg細胞特異的にId2/Id3を欠損させた (Id2<sup>fl/fl</sup>Id3<sup>fl/fl</sup>Foxp3<sup>Cre</sup>) マウスは、激しい全身性炎症反応のために10-12週齢で死亡してしまうこと、またマウスの解析結果は炎症による影響を否定できない。そこでTh2型炎症抑制のため、IL-4欠損マウスと掛け合わせ (Il4<sup>-/-</sup>Id2<sup>fl/fl</sup>Id3<sup>fl/fl</sup>Foxp3<sup>Cre</sup>)、炎症のない状況でのTreg細胞の反応の解析を試みた。予想に反して、Il4<sup>-/-</sup>Id2<sup>fl/fl</sup>Id3<sup>fl/fl</sup>Foxp3<sup>Cre</sup>マウスは、寿命が延長しTh2型炎症疾患の発症は遅延したが、Id2<sup>fl/fl</sup>Id3<sup>fl/fl</sup>Foxp3<sup>Cre</sup>マウスと同様な皮膚炎、気管支炎、食道炎を示した。このことは、Id2<sup>fl/fl</sup>Id3<sup>fl/fl</sup>Foxp3<sup>Cre</sup>マウスにおけるTh2反応は、IL-4に完全に依存しているわけではないことを示した。

次に、Id2/Id3欠損によるTreg細胞の機能異常が、本当に拮抗阻害しているE2A及びHEBによる転写活性の上昇によるものなのかを検査するため、Id2<sup>fl/fl</sup>Id3<sup>fl/fl</sup>Foxp3<sup>Cre</sup>マウスとE2A<sup>fllox</sup>、HEB<sup>fllox</sup>マウスと掛け合わせて、rescueされるのかどうかを検査した。結果、E2A<sup>fl/+</sup>HEB<sup>fl/+</sup>によりId2<sup>fl/fl</sup>Id3<sup>fl/fl</sup>Foxp3<sup>Cre</sup>マウスの全身性炎症反応は正常になり、FACSでのCD4T細胞の解析においても、Treg細胞による炎症抑制により、エフェクター細胞が減少し、ナイーブ細胞が増加し、野生型と同等になった(右図)。このことは、Treg細胞の機能異常は、E2A及びHEBの機能亢進によることが結論づけられた。

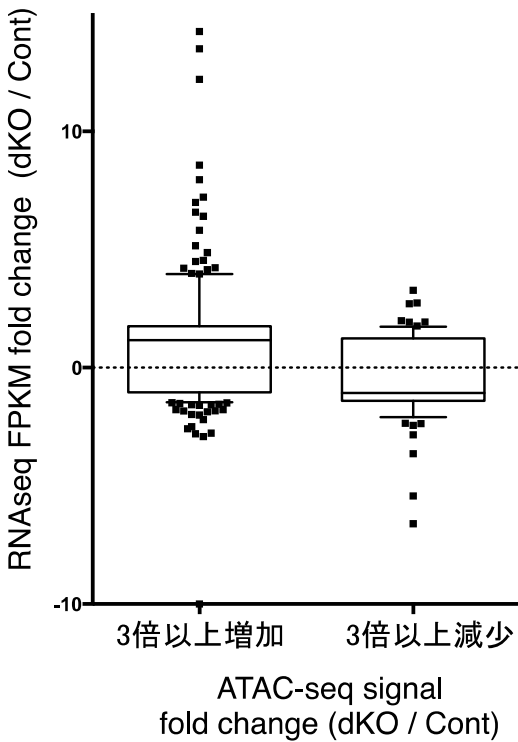
次に、炎症のない状態でのId2/d3欠損Treg細胞の転写制御機構を解析するため、Id2<sup>fl/fl</sup>Id3<sup>fl/fl</sup>Foxp3<sup>Cre/+</sup>雌マウスからTreg細胞をsortingすることにした。Id2<sup>fl/fl</sup>Id3<sup>fl/fl</sup>Foxp3<sup>Cre/+</sup>雌マウスでは、WT TregとId2/3欠損Treg細胞が混在するため、炎症反応が抑制されていたため、このマウスからId欠損Treg細胞を単離して分子機構の解析を行った。RNA-seq法によるトランスクリプトーム解析と、ATAC-seq (Assay for Transposase Accessible Chromatin using sequencing)を行い、エンハンサー及びプロモーター領域のオープン



ンクロマチン領域について解析を行った<sup>4)</sup>。Id2/Id3欠損細胞では、相対的にE2Aを主体としたEタンパク質の活性が上昇していることが原因であることから、E2AのChIP-seq解析のデータと合わせて統合的な解析を行った。

野生型及びId2/Id3欠損Treg細胞におけるATAC-seqの結果から、それぞれおよそ57,000ヶ所のオープンクロマチン領域を同定し、そのうち47,000ヶ所が野生型とId2/Id3欠損Treg細胞で共有されていた(右図)。そのオープンクロマチン領域の分布を検討したところ、両者とも40%がイントロン(Intron)、約35%がインタージェニック(Intergenic)であり、約20%がプロモーター領域であった。

次に両者のオープンクロマチン領域のシグナルピークを比較し、アクセシビリティの変化を検討した。右図は、3倍以上の変化したものを赤(増加)、青(減少)で表したものです。さらにATAC-seqの結果とRNA-seqの結果を、統合させて解析を行いました。結果、ATAC-seqによりクロマチンアクセシビリティが3倍以上増加、または減少した領域の遺伝子発現

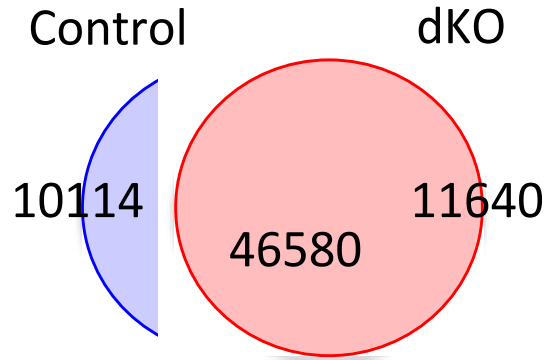


量は、有意に増加または減少しており、オープンクロマチンの変化と遺伝子発現は相関しておりま

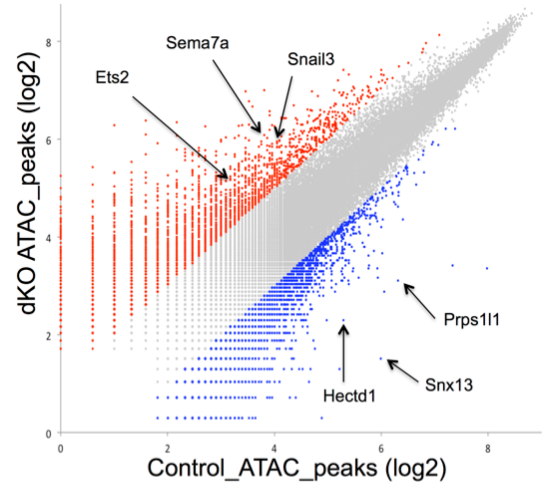
した(左図)。このことはE-Id因子によるエンハンサー機能調節が、Treg細胞における遺伝子発現プログラムを変化させたことを示唆します。

が2倍以上減少した領域においては、Erg, BORIS, Runx1の結合配列が見出された。このことは、Id2/Id3の欠損によりE2AのDNA結合能が更新し、エンハンサー領域を変化させたことを示し、Id因子によりE2AのDNA結合能を阻害することで、Treg細胞の機能を制御していることを直接的に示す結果である(右図)。

最後に、Id2/Id3欠損Treg細胞で、実際にどのような分子群が誘導されるのか、野生型Treg細胞とId2/Id3欠損Treg細胞を単離し、RNA-seq法によってトラウンسكريプトーム解析を行った。



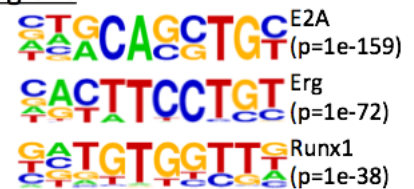
【オープンクロマチン領域】



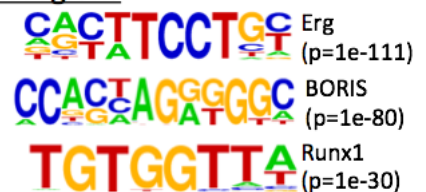
【オープンクロマチン領域の比較】

次にこうしたクロマチンアクセシビリティの変化がE2Aによる物なのか明らかにするために、ATAC-seqで大きく変化した領域を抽出し、モチーフ解析を行い、どのような転写因子が結合するのかを検討した。結果、Id2/Id3欠損Treg細胞でクロマチンアクセシビリティが2倍以上増加した領域では、E2A, Erg, Runx1の結合配列が有意に高頻度に認められた。一方、クロマチンアクセシビリティ

Up regions



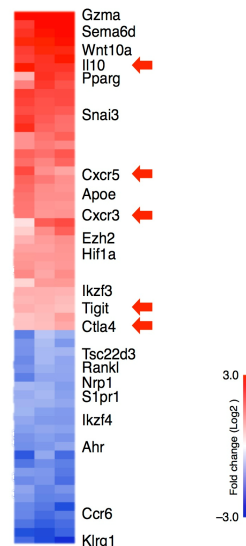
Down regions



【モチーフ解析】

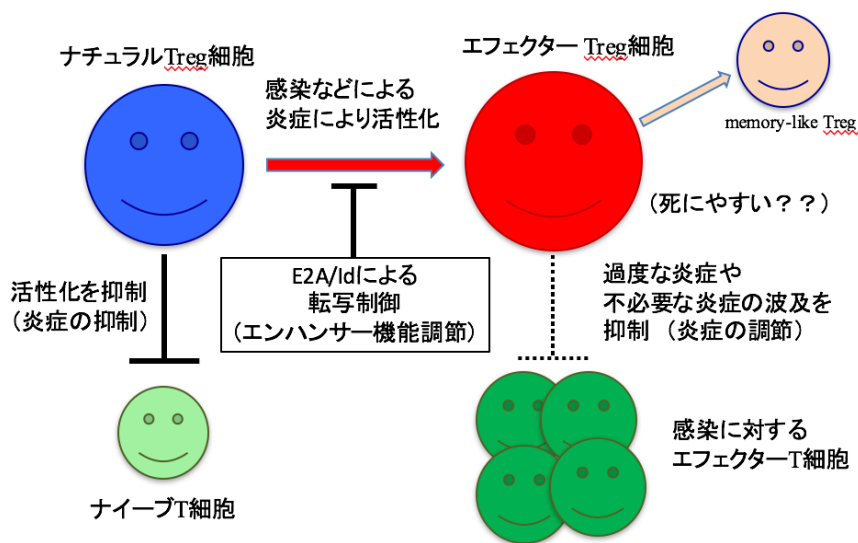
図に示すように、Id2/Id3欠損Treg細胞では、Gzma, Wnt10a, IL10, Cxcr5, Cxcr3、Ctla4などの活性化分子が有意に発現上昇を示した。またHif1a, Pparg, Apoeなど、活性化Treg細胞や末梢組織に特異的にTreg細胞で認められる転写因子の上昇も有意に認めた（右図）。

こうした結果は、Id2/Id3によりTreg細胞がナチュラルTreg細胞から、活性化Treg細胞へと変化し、エフェクター型Treg細胞（eTreg）へと分化したと考えられた。このことから、Id2/Id3は、E2A/HEBのDNA結合能を阻害し、転写制御することで、ナチュラルTregからエフェクターTreg細胞への分化を抑制する、ゲートキーパーとして機能している可能性が考えられた。



### 3. 考察

今回の結果は、Id2/Id3による転写制御がTreg細胞の活性化を制御することを、トランスクリプトーム解析と、オープンクロマチン領域から明らかにした。Treg細胞は、胸腺で分化し、ナチュラルTreg細胞として末梢リンパ組織にてT細胞の活性化を抑制する。一方、感染や炎症が起きた時には、Treg細胞も他のT細胞同様に活性化し、エフェクターTreg細胞として炎症組織に移動し、炎症が過剰にならないように制御する<sup>5)</sup>。今回の結果は、Id因子によるE2A/HEBの転写制御が、ナチュラルTreg細胞からエフェクターTreg細胞への活性化のゲートキーパーとして機能していることを示している（下図）。しかしながら、なぜId2/Id3欠損マウスでは、全身性のTh2型炎症反応が起きてしまうのか、その機序については不明である。今後は、この転写制御の分子機構の解明とともに、その生物学的意義についても明らかにしていきたい。



### 4. 参考文献

- 1) Sakaguchi S. et al. ; Cell 133 May 30, 775-787, 2008
- 2) Wing JB. and Sakaguchi S. ; Front Immunol. Jun 29;3:178, 2012
- 3) Miyazaki M., et al., Nat Immunol. 2014; 15: 767-76.
- 4) Buenrostro et al., 2013; Nat. Methods.
- 5) Cretney E., et al., 2013; Trends in Immunology Vol. 34