

制御性 T 細胞による免疫制御機構の解明

東京大学大学院薬学系研究科免疫・微生物学教室

堀 昌平

1. はじめに

免疫系が「自己」「非自己」を識別し「自己」に対する免疫寛容を獲得・維持するメカニズムを解明することは免疫学における最も本質的な課題の一つであり、またその破綻が関係する様々な疾患（自己免疫疾患、炎症性疾患、アレルギー、がん、感染症など）を克服するためにも重要である。免疫応答を抑制する機能を持つ制御性 T 細胞(regulatory T cells; Treg)は自己免疫寛容と免疫恒常性の維持に必須の役割を担っており、その異常が多様な疾患の発症に関わっていることが明らかにされてきた。我々は、ヒト自己免疫疾患 IPEX 症候群の原因遺伝子として同定された転写因子 Foxp3 が Treg 選択的に発現してその分化と機能を司る“マスター転写因子”として機能することを世界に先駆けて報告し、Treg が自己免疫寛容と免疫恒常性において中心的な役割を担っていることを明らかにした(Hori et al., 2003)。近年、Treg は細胞外環境からの様々な擾乱（例えば炎症、組織環境の変化）に対して Treg としての機能を維持する安定性を持ちつつ、その表現型（遺伝子発現）を変化させる可塑性を示すことが示された(Hori, 2014)。そして、Treg はこの可塑性な遺伝子発現により時々刻々変化する環境に適応し、置かれた環境に応じて適切に免疫応答を制御することが明らかにされてきた。しかしながら、Treg が様々な組織環境、炎症環境に適応して機能する能力、すなわち“適応性”(adaptability)を制御する分子メカニズムは未だ不明である。

我々は、Foxp3 による免疫制御メカニズムを明らかにするために、ヒト IPEX において同定されている Foxp3 変異に着目し、3 種の変異を導入したノックインマウスを作製し、変異が Treg 分化と機能に与える影響を分子から個体レベルにわたって解析してきた。その結果、二つの変異が機能欠失型変異であるのに対し、一つの変異 (Foxp3^{A384T} 変異) は Foxp3 の DNA 認識配列特異性を広げる機能獲得型変異であり、非リンパ組織に局在するエフェクター・メモリー型 Treg の分化と組織への集積を選択的に障害することにより組織選択的な自己免疫疾患を惹起した(Hayatsu et al., 2017)。そして、Foxp3^{A384T} 変異体は AP-1 転写因子 BATF など特定の標的遺伝子の発現を障害し、BATF 発現を低下させることにより組織環境における Treg の適応性を破綻させることを見出した。本研究は、この発見を手がかりとして、組織環境、炎症環境における Treg の適応性を制御するメカニズムを明らかにすることを目的とした。

2. 方法

Batf プロモーター活性のレポーターアッセイについては、(Hayatsu et al., 2017)の通りに行った。*Batf* プロモーターの変異マウスは CRISPR/Cas9 法を用いて作製した。*Batf*^{fllox} マウスは大阪大学の黒崎知博教授からご供与いただいた。ROSA26-STOP-BATF ノックインマウスは、gene targeting 法により B6/J 由来 ES 細胞をもちいて作製した。BATF 欠損 Treg の遺伝子発現解析は RNA-seq 法により行った。BATF および Foxp3 の結合領域は、抗 BATF 抗体(Cell Signaling Technology)および抗 Foxp3 抗体(Hayatsu et al., 2017)を用いた ChIP-seq 解析により同定した。Treg, Tconv における open chromatin 領域は(Kitagawa et al., 2017)らによる ATAC-seq データを用いて解析した。

3. 結果

3.1. Foxp3^{A384T} 変異体による BATF 発現抑制メカニズム

これまでのレポーターアッセイの結果から、Foxp3^{A384T} 変異体は *Batf* プロモーター中の 5 カ所の forkhead (FKH) 結合配列依存的に *Batf* プロモーター活性を抑制していることを見いだした。5 つの FKH サイトのうちどのサイトが重要かをレポーターアッセイにより検討したところ、5'側から数えて 3 番目と 5 番目が重要であることを見いだした。次に、変異体による BATF 発現抑制メカニズムを *in vivo* で明らかにするために、Foxp3^{A384T} 変異体が結合

できないようにこれら 2 つの FKH サイトを変異させたマウスを作製した。そして、これを *Foxp3*^{A384T} 変異マウスと交配させて BATF 発現に与える影響を検討したところ、FKH サイト変異マウスでは BATF 発現の脱抑制が見られた。以上の結果から、*Foxp3*^{A384T} 変異体はこれら 2 カ所の FKH サイトに結合することで BATF 発現を抑制していることが明らかになった。

3.2. Treg 特異的 BATF 欠損マウスおよび Treg 特異的 BATF トランスジェニックマウスの表現型解析

BATF は Treg のみならず、他の血球細胞にも発現し、特に *Foxp3*⁻ T 細胞 (conventional Tcells; Tconv) のエフェクター分化に重要な役割を担っている。Treg における BATF の機能を明らかにするために、*Foxp3*^{YFP^{Cre}} マウスと *Batf*^{fllox} マウスを交配させ、Treg 特異的 BATF 欠損マウスを作製した。その結果、このマウスは致死性の自己免疫疾患が発症し、皮膚、肺、肝臓、大腸など様々な臓器において Th1, Th2, Th17 細胞の蓄積を伴った炎症が見られた。一方、これら組織においては Treg の割合が減少し、特にエフェクター・メモリー型 Treg サブセットが選択的に欠損していた。

一方、我々は ROSA26-STOP-BATF ノックインマウスを作製し、*Foxp3*-iCre BAC トランスジェニックマウスと交配させて、Treg 特異的 BATF トランスジェニックマウスを作製した。その結果、このマウスでは様々な組織においてエフェクター・メモリー型 Treg サブセットの選択的な増加・蓄積が見られた。

以上の結果から、BATF はエフェクター・メモリー型 Treg の分化と組織における恒常性維持に重要な役割を担っており、Treg の生体内における免疫抑制機能に必須であることが明らかになった。

3.3. Treg において BATF によって発現制御される標的遺伝子の同定

Treg における BATF の機能的に重要な標的遺伝子を明らかにするために、Treg 特異的 BATF 欠損マウスおよび野生型マウスから Treg を単離し、RNA-seq 解析により遺伝子発現を調べた。その結果、BATF 欠損 Treg において 108 個の遺伝子の発現が有意に低下しており、それらにはケモカイン受容体、接着分子といった T 細胞の非リンパ組織への移動に関わる遺伝子が多く含まれていた。これらのうち、BATF の直接の標的遺伝子を同定するために、Treg および Tconv を用いて BATF の ChIP-seq 解析を行った。その結果、64 遺伝子の近傍に BATF 結合が認められ、これらが機能的な標的遺伝子と考えられた。

3.4. Treg 選択的 BATF 結合領域の同定とその性状解析

BATF ChIP-seq データを解析したところ、Treg および Tconv 両者において同程度に BATF が結合している領域が約 3/4 であり、残り約 1/4 が Treg 選択的あるいは Tconv 選択的な BATF 結合領域であった。興味深いことに、Treg と Tconv に共通の BATF 結合領域あるいは Tconv 選択的 BATF 結合領域の多くがプロモーター領域に見られたのに対し、Treg 選択的 BATF 結合領域はイントロン領域あるいは遺伝子間領域に多く見られた。また、これら Treg 選択的 BATF 領域は、Treg 選択的な open chromatin 領域であり、それらの多くに *Foxp3* が結合していた。以上の結果から、Treg において BATF は Treg 選択的なエンハンサー領域に結合し、*Foxp3* と機能的に協調的に遺伝子発現を制御している可能性が考えられた。

4. 考察

以上の結果から、*Foxp3*^{A384T} 変異体は *Batf* プロモーターの 3 番目と 5 番目の FKH 結合サイトに結合することでその転写活性を抑制すると考えられた。今後、*Foxp3*^{A384T} x FKH サイト変異マウスにおいて BATF 発現が脱抑制されることでエフェクター・メモリー Treg の異常と自己免疫疾患の発症が抑制されるのかを検討し、*Foxp3*^{A384T} 変異体による BATF 発現抑制がこの変異マウスが示す Treg 適応性異常と自己免疫疾患の主要な原因であることを明ら

かにしたい。

Treg 特異的 BATF 欠損マウスおよび Treg 特異的 BATF トランスジェニックマウスの解析から、BATF がエフェクター・メモリー Treg の分化と恒常性維持において中心的な役割を果たしており、生体内における免疫抑制機能に必須であることが明らかになった。これまでの RNA-seq および ChIP-seq 解析の結果から、BATF は少なくとも非リンパ組織への移行と組織における保持に関わるケモカイン受容体や接着分子の発現を制御することでエフェクター・メモリー Treg の組織移行と組織における維持を制御していると考えられた。その遺伝子発現制御機構に関しては、BATF は Treg 選択的なエンハンサー領域に結合して遺伝子発現を正に制御していると考えられた。また、これらの領域には Foxp3 も結合していたことから、Treg においては Foxp3 と BATF が機能的に協調することでエフェクター・メモリー Treg の分化と恒常性維持に働いている可能性が示唆された。今後、この可能性についてさらに研究を進めることで、Treg の組織環境、炎症環境における適応性を制御する分子機構を明らかにできるのではないかと期待される。

5. 参考文献

- Hayatsu, N., Miyao, T., Tachibana, M., Murakami, R., Kimura, A., Kato, T., Kawakami, E., Endo, T.A., Setoguchi, R., Watarai, H., *et al.* (2017). Analyses of a Mutant Foxp3 Allele Reveal BATF as a Critical Transcription Factor in the Differentiation and Accumulation of Tissue Regulatory T Cells. *Immunity* 47, 268-283 e269.
- Hori, S. (2014). Lineage stability and phenotypic plasticity of Foxp3(+) regulatory T cells. *Immunol Rev* 259, 159-172.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061.
- Kitagawa, Y., Ohkura, N., Kidani, Y., Vandenbon, A., Hirota, K., Kawakami, R., Yasuda, K., Motooka, D., Nakamura, S., Kondo, M., *et al.* (2017). Guidance of regulatory T cell development by Satb1-dependent super-enhancer establishment. *Nat Immunol* 18, 173-183.