

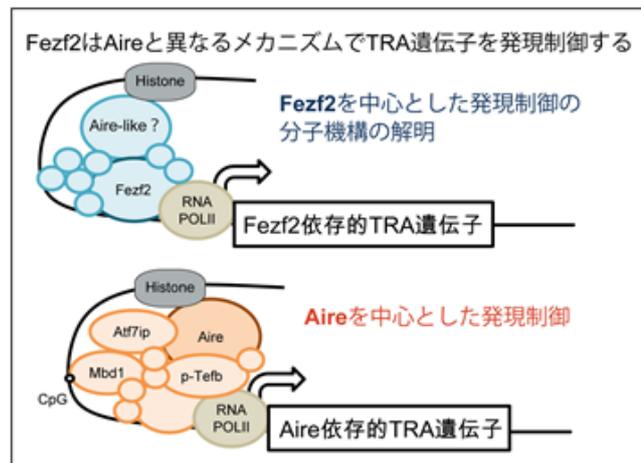
中枢免疫寛容の分子基盤の解明

東京大学大学院医学系研究科免疫学

高場 啓之

獲得免疫系を司るT細胞は胸腺で出来上がり、自己の成分に反応するT細胞は胸腺の髄質層で除去される。この時、からだ中の自己成分タンパク質(自己抗原)を胸腺髄質上皮細胞が異所的に発現させることで、自己応答性T細胞は除去される。しかし、胸腺髄質上皮細胞がどのように自己抗原を発現させているのか、その分子メカニズムはよく解っていない。胸腺内の自己抗原応答性のT細胞の集団除去しつつ(負の選択機構)、一部は制御性T細胞と呼ばれている細胞集団へ分化する。申請者は近年、胸腺の髄質上皮細胞(medullary thymic epithelial cells; mTEC)で選択的に発現している転写因子Fezf2を同定し、胸腺上皮細胞におけるFezf2の機能解析を行ったところ、Fezf2が自己抗原を発現誘導させていることや、負の選択と自己免疫寛容に働く分子であることを突き止めた(Takaba et al., Cell, 2015)。本申請は、Fezf2の生理学的な機能解析を軸に、胸腺内の負の選択に関わる自己抗原の発現制御機構を明らかにすることを研究目的に据えた。

減数分裂時の精子や脳内の海馬などにおいて、染色体がダイナミックに変化することにより、多様な遺伝子発現が制御されていることが知られている。最近、mTECでも、転写制御因子Aireを介して染色体がダイナミックに変化しており、この細胞集団はからだ中のほぼ全ての遺伝子が無作為に自己抗原として発現させている可能性が示唆されている。昨年、申請者は、mTECで組織特異抗原(Tissue-restricted antigen; TRA)の遺伝子発現を制御する重要な転写因子Fezf2を同定し、AireとFezf2が、からだ中の遺伝子発現がTRAとして発現制御されていることを示した。Fezf2は、これまで自己抗原を制御していると考えられていた唯一の分子である転写制御因子Aireとは異なる下流の遺伝子を制御していると予想された。しかし、mTECにおけるFezf2と相互作用する分子やFezf2の具体的なTRA遺伝子発現の制御機構は不明であった(右図参照)。



申請者は、まずAire欠損マウスとFezf2欠損マウスを用いて、野生型mTECで比較した場合に変動するFezf2依存的な遺伝子とAire依存的な遺伝子を明らかにした。Aire依存的な遺伝子とFezf2依存的な遺伝子はほとんど別の遺伝子であることが確認された。また、Aire依存的な遺伝子は多くのTRA遺伝子が発現誘導しており、Fezf2依存的な遺伝子は誘導と抑制の両方に関わることが明らかになった。

Aireと相互作用するエピジェネティック制御分子はこれまでに複数同定されていたもの

の、Fezf2と相互作用するエピジェネティック制御分子は同定されていなかった。そこで、Fezf2と協調的に働くエピジェネティック制御分子を探索するため、ヒト腎上皮細胞がん293T細胞とマウスmTEC由来の細胞株1C6の培養細胞株にFlagタグをつけたFezf2タンパク質を大量発現させて、免疫沈降-質量分析法によるFezf2相互作用分子の網羅的スクリーニングを行った。これらの細胞株を用いて実験を行ったところ、双方の実験で唯一検出されたFezf2相互作用分子として、クロマチンリモデリング分子Chd4が同定された。免疫沈降-ウエスタンブロット法を行ったところ、AireとChd4は相互作用していないことが明らかになった。次に、実際にmTECにおいてFezf2とChd4が相互作用しているかどうかを調べるために、野生型マウスmTECのFezf2タンパク質を単離し回収できる品質の良い抗Fezf2モノクローナル抗体の作製を試みたが、高品質な抗体は得られなかった。そこで、Flagタグ付きのFezf2を発現する遺伝子改変マウス(Flag-Fezf2マウス)を、CRISPR/Cas9法を用いて作成した。Flag-Fezf2マウスの胸腺を使って、免疫沈降-ウエスタンブロット法を行ったところ、Fezf2とChd4の相互作用が確認された。Chd4は、クロマチン構造の制御に関与する重要な複合体であるNucleosome remodeling deacetylase (NuRD) 複合体を構成する主要な分子である。Fezf2とChd4以外のNuRD複合体の構成分子との結合を調べたところ、Fezf2はヒストン脱アセチル化酵素HDAC1/2、癌転移関連タンパク質MTA1、メチルCpG結合ドメインタンパク質MBD3と相互作用しており、ヒストンアセチルトランスフェラーゼp300とは相互作用は見られなかった。以上の結果からmTECにおいてFezf2はChd4とNuRD複合体と形成し遺伝子発現を制御していることが明らかとなった。その後、FlagタグノックインマウスのmTECをもちいて、ChIP-seq解析を行いマウスゲノム上のFezf2結合領域を同定し、ATAC-seq法による遺伝子発現領域とクロマチンダイナミクスとの関係性を明らかにした。すなわち、Fezf2はChd4-NuRD複合体を形成し、プロモーター領域でFezf2依存的な遺伝子の発現を制御していることが明らかとなった。また、共免疫沈降法とLC-MS/MS解析によるFezf2共役分子の網羅的解析といった実験を進め、クロマチン制御因子Chd4を同定した。胸腺上皮細胞特異的なChd4欠損マウスをもちいたRNA-seq解析では、Chd4はFezf2のみならず、Aire依存的な遺伝子も発現制御していることが示唆された。

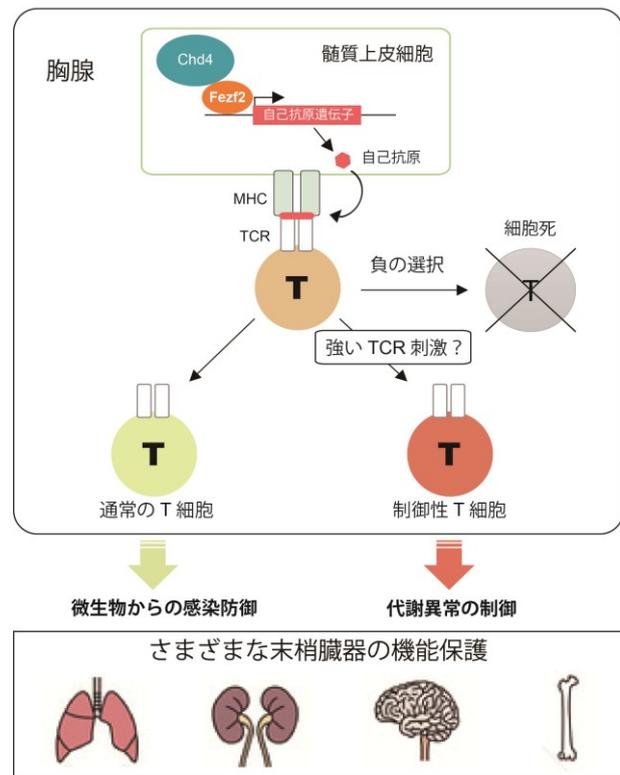
つぎに、Chd4がAire依存的な遺伝子発現を制御する分子メカニズムを解明するために、Aire欠損マウスとChd4cKOマウスのmTECのATAC-seqデータを比較した。その結果、スーパーエンハンサー領域において、Chd4とAireがともに、クロマチンアクセシビリティの制御に関与していることが明らかとなった。スーパーエンハンサーは、クラスターを成した巨大なエンハンサー領域であり、細胞種特異的な重要遺伝子の転写制御を担っている。近年、Aireはスーパーエンハンサーの制御を介した遺伝子発現に関与していること報告されていた。そこで我々は、Chd4とスーパーエンハンサーとの関連をより詳細に理解するために、スーパーエンハンサー活性を阻害する薬剤(I-BET 151)を投与されたマウスのmTECの遺伝子発現プロファイルデータを入手し、Chd4 依存的遺伝子の発現プロファイルデータとの比較を行った。その結果、I-BET 151によるスーパーエンハンサー活性の阻害によって発現が低下する遺伝子と、Chd4の欠損によって発現が低下する遺伝子の一致が認められた。さらに、一細胞RNA-seqのデータを用いて、スーパーエンハンサー近傍遺伝子とChd4またはAireによって発現を制御される遺伝子との共発現クラスターを同定した。しかし、スーパーエンハンサー近傍遺伝子とFezf2によって発現を制御される遺伝子との共発現クラスターは存在していなかった。以上の結果から、Chd4とAireは、直接相互作用をしていないにもかかわらず、協調的にスーパーエンハンサー領域のクロマチン構造を制御し、TRAを含む遺伝子群の発現制御を行っていることが示唆された。すなわち、Chd4はFezf2とAireという2つの異なる転写制御因子に働きかけ、異なる遺伝子サブセットの発現制御に関わっていることが明らかとなっ

た。

mTECでChd4を欠損するマウスではmTECにおけるTRAの発現に異常が起きるため、T細胞の負の選択が障害されると予想されたが、実際に胸腺上皮特異的Chd4欠損マウスでは自己抗体産生や末梢組織へのT細胞浸潤などの自己免疫疾患様の表現型が観察され、免疫寛容の破綻が起きていると考えられた。以上より、mTECにおけるクロマチン制御因子Chd4はFezf2またはAireと協調的にTRAの発現を制御することによって自己反応性T細胞の選別に寄与しており、自己免疫疾患の発症を防いでいると考えられた。

申請期間の間、申請者らはFezf2タンパク質と相互作用する自己免疫寛容因子Chd4タンパク質を同定し、どのようにmTECでTRAが発現誘導されるかを明らかにした。また、Fezf2の直接ゲノムに結合する配列をChIP-seq解析により同定した。ヒトFEZF2の結合モチーフが明らかとなれば、その部位にSNPが存在した場合、mTECにおけるTRA遺伝子の発現が変動する可能性がある。本申請の結果を活用すれば今後、ヒトのSNPから将来的に陥る可能性のある自己免疫疾患を予想するアルゴリズムを作成することが可能となる。関節リウマチや全身性エリテマトーデスなどに代表される自己免疫疾患は、主に自己反応性T細胞の自己成分に対する過剰な応答によって引き起こされると考えられている。また近年、末梢へ移行した胸腺由来の制御性T細胞は、脂質代謝の制御や筋組織損傷の修復など恒常性の維持に重要な働きを担うことが報告させている(Burzyn et al., Cell, 2013)。これらのT細胞集団はすべて自己抗原TRAを認識するという意味で一括りにすることが出来るが、現在でも、実際どんな自己抗原を認識しているか明確には解っていない。T細胞の抗原受容体(T cell receptor; TCR)は胸腺でのみ創出されることから、胸腺内における自己抗原を認識する受容体のTCRレパトアを特定すれば、全身に分布している自己応答性T細胞をすべて把握することが出来る。更に、自己応答性T細胞の組織ごとや場所ごとの機能解析を行うことで、将来的に、特定のTCRレパトアをもつT細胞がどのような機能担保を受けているか系譜として追っていくことが可能になる。

中枢性自己免疫寛容を維持する新しい分子基盤を解明



全身に分布している自己応答性T細胞をすべて把握することが出来る。更に、自己応答性T細胞の組織ごとや場所ごとの機能解析を行うことで、将来的に、特定のTCRレパトアをもつT細胞がどのような機能担保を受けているか系譜として追っていくことが可能になる。