

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07476

研究課題名(和文) パイオニア転写因子BATF-IRF4複合体が制御するCTL分化機序の解明

研究課題名(英文) Elucidating molecular mechanism of CD8 T cell differentiation by investigating BATF-IRF4 complex

研究代表者

倉知 慎 (Kurachi, Makoto)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：00396722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：疲弊状態からの回復も含めてCD8陽性T細胞(CTL)応答を最適化するには分子・時期特異的な介入が重要であり、そのためにはCTL分化に関する分子機序の詳細な解明が必要である。CTL分化を制御することが明らかとなっている転写因子BATFの機能解析を行った。BATF変異体を併用して、BATFが含まれる転写開始複合体の組成解析を行う基礎検討を行った。BATFが調節するエピジェネティック修飾変化を明らかにする目的で、ChIP-PCR、ATAC-seqを用いて解析したところ、BATF欠損でヒストン修飾、クロマチン開放領域に差が生じることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パンデミック感染症に対するワクチン開発や癌免疫療法では、最終的にはいかに強靱な抗原特異的T細胞(特にCTL)を誘導・維持できるかが鍵となる。しかし、「免疫記憶」が免疫システムにおける最も大きな特徴の一つであるにも関わらず、CTL分化の分子基盤の理解は脆弱である。これまでの細胞分化時に多数の遺伝子の発現を秩序よく調節するためには、転写因子やエピジェネティック変化はランダムではなく、連携的かつ統合的に作用する必要がある。我々のBATF機能解析成果は、CTLリプログラミングの鍵となる分子やゲノム領域を同定することを通じて、T細胞関連難治性疾患に対する新規の診断・予防・治療法の開発に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：To optimize the CD8-positive T cell (CTL) response, including recovery from exhaustion, molecular and time-specific interventions are important, which requires a detailed understanding of the molecular mechanisms of CTL differentiation. We used ChIP-PCR and ATAC-seq to identify epigenetic modifications regulated by BATF, and found that BATF deficiency caused differences in histone modifications and chromatin open regions. We found that BATF deficiency causes differences in histone modifications and chromatin open regions.

研究分野：免疫学

キーワード：CD8陽性T細胞 免疫記憶 転写調節因子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

CD8 陽性 T 細胞(CTL)はその精密な抗原認識力や強力な細胞傷害性から、生体内異物に対して最終的な防御機能を果たしている。慢性感染症や腫瘍では CTL は Exhaustion(疲弊)と呼称される機能不全状態に陥るが、PD-1 などの抑制性受容体を阻害することで疲弊 CTL の一部が機能回復を示し、疾患のコントロールが可能になることが示された。即ち、Exhaustion は完全に不可逆な終末像ではなく、適切な介入を行えば疲弊状態を修復し、自家免疫細胞による副作用が少ない難治性疾患治療が可能になることを意味する。疲弊状態からの回復も含めて CTL 応答を最適化するには分子・時期特異的な介入が重要であり、そのためには CTL 分化に関する分子機序の詳細な解明が必要である(Kurachi et al, Nat Rev Immunol, 2015)。

細胞分化において遺伝子発現を調節するのは転写因子とエピジェネティクスである。転写因子は複数の因子が階層性と秩序だった順番をもってクロマチンに作用することで遺伝子発現を厳密に調節する。その起点を制御する分子として、パイオニア転写因子が提唱されている。パイオニア転写因子はクロマチンが圧縮状態でもエンハンサー配列を認識して結合し、ヒストン修飾分子等と呼び込むことで閉鎖クロマチンを開放し、後続の転写因子等を集めて活性化エンハンサーを確立するとされ、転写因子とクロマチン構造をつなぐマスター分子として急速に注目されている。外部刺激の結果、パイオニア転写因子が、いつ・どのような因子群を・いかなる順番で呼集し、どのようにクロマチン・ランドスケープを変化させて遺伝子発現セットを調節しているかという連関がゲノムワイドに明らかになれば、細胞分化の制御機構の全体像が格段に鮮明になると期待される。しかし、CTL 分化でパイオニア転写因子が存在するのか、またクロマチン構造がいつ・どのように変化していくのかについては全く不明である。

研究代表者は CTL 疲弊の分子機序を探索する目的で PD-1 シグナルに関連すると報告された転写因子 BATF に着目し、BATF が CTL 応答の初期段階を決定的に制御していることを明らかにした(Kurachi et al, Nat Immunol, 2014)。BATF や IRF4 欠損 CTL は 5-6 回分裂すると突然 99% 以上が死滅するという劇的な表現型を示すことから、本研究の中心仮説として BATF と IRF4 は CTL 分化においてクロマチン構造を統御するパイオニア転写因子として作用すると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、CTL 分化のエピジェネティクスを統御しているパイオニア転写因子に着目し、細胞免疫学・分子生物学・ゲノミクスを解析することにより、生命科学の重大テーマである「免疫記憶」の分子基盤を明らかにすることを最終目標とした。具体的には、BATF は CTL 分化のパイオニア転写因子として作用しているかどうか、さらには CTL 分化のいつ・どのようにクロマチン構造を制御しているかを解析し、パイオニア転写因子の CTL 分化における特徴的な役割の解明を目指すとともに、得られた知見から、ワクチンへの応用や CTL 疲弊からの回復への関与も検討することを目的として、研究計画を立案した。

### 3. 研究の方法

我々は、以上の研究目的を達成するために、以下の方法で解析を遂行した。

#### (1) マウス CTL 培養系における BATF の役割の解析

パイオニア転写因子として作用しているかを示すためには、CTL 活性化後早期の解析が必要となる。抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体による *in vitro* 刺激培養系における BATF 欠損 CTL の増殖・分化を観察した。

マウス CTL 培養系において抗 H3K27me3 および抗 H3K27ac を用いて ChIP-qPCR により BATF による転写制御に関わるクロマチン修飾状態を検証した。

共免疫沈降法(Co-IP)により CTL 分化時に BATF が構成するタンパク質複合体の解析を行うため、複合体回収法の検討を行った。

酵素処理を用いた ATAC-seq および CUT&RUN-seq の CTL のクロマチン構造解析の適応可能性の検討を行った。

#### (2) LCMV マウス感染実験系における CTL の BATF 有無による動態解析

ウイルス感染における CTL 応答の解析を行うため、LCMV の gp33 抗原決定部位を認識する TCR Tg 細胞である P14 細胞を野生型マウスに養子移入し、LCMV の Arm 株(急性感染)と CI-13 株(慢性感染)を感染させ、P14 細胞が BATF 欠損時における CTL 分化をフローサイトメトリ法により解析した。

BATF 欠損 CTL にレトロウイルスによる遺伝子導入法を用いて、BATF1・BATF3・BATF H55Q 変

異体の導入を行い、LCMV 感染したマウスに養子移入し、CTL の増殖を比較した。セルソーターを用いて LCMV 感染後早期に野生型および BATF 欠損マウス由来活性化 CTL を回収し、*ex vivo* 培養により CTL の経時的な観察を行った。

#### 4. 研究成果

野生型および BATF 欠損マウス由来 CTL を、抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体により *in vitro* 刺激培養を行ったところ、BATF 欠損マウス由来 CTL は野生型 CTL と同程度の増殖速度および活性化マーカーの発現を示した。このことから、刺激開始後 24 時間という早期活性化 CTL を多量に作製することができたため、ChIP-qPCR によりヒストン修飾状態を観察した。その結果、転写制御抑制的に働く H3K27me3 は BATF 欠損時に少なく、転写制御促進的に働く H3K27ac は BATF 欠損時に多くなっていることが明らかになった。これらは、BATF による早期 CTL 分化時の転写制御がヒストン修飾を介して行われていることを示している。

どのように BATF がヒストン修飾を行っているかを解析するためには、Co-IP により BATF が具体的にどの関連因子と複合体を形成しているかを明らかにする必要がある。一方で、転写因子による複合体は結合力が低いことが多く、適切なクロスリンクが必要とされる。膜透過性のあるホモバイファンクショナル架橋試薬である DSP によるクロスリンクを用い、抗 BATF 抗体を用いた Co-IP を行うことで、BATF と協調して作用する可能性が示唆されている IRF4 複合体の保持に成功した。しかしながら、回収できたタンパク質は微量であったため質量分析による網羅的スクリーニングは行えなかった。したがって、Tag 付転写因子の強制発現系など、より高効率なタンパク質複合体回収法の開発が必要であり、さらなる検証を進めている。

LCMV マウス感染実験を実施し、急性感染時および慢性感染時において既知の抗原に対する抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞 (P14 細胞) の CTL 応答が誘導できることを確認した。慢性期の脾臓・肝臓・腎臓・血清中ウイルス量のプラークアッセイによる測定および PD-1 を代表とする疲弊マーカーの発現をフローサイトメトリー法により検出を行った。その結果、慢性期においてもウイルスが残存し、移入した P14 細胞は急性感染時には観察されない疲弊マーカーの発現上昇しており、CI-13 株を用いたマウス慢性感染モデルの樹立を確認した。また、BATF 欠損時の CTL 分化異常は、感染後 3 日よりほとんど増殖していないことに起因することが明らかとなった。

BATF 欠損 CTL にレトロウイルスによる遺伝子導入法を用いて、BATF1・BATF3・BATF H55Q 変異体を導入後、LCMV 感染したマウスに養子移入を行い、CTL の増殖を比較した。その結果、図 1 で示すように、BATF1 および BATF3 を導入した細胞は優位な増殖能を示し、分化異常から回復した。一方で、IRF4 との相互作用能を損失した BATF H55Q 変異体導入時には、増殖能を獲得できなかった。このことから、BATF3 は BATF1 の機能を代替することができること、IRF4 と協調して作用することが BATF1 の CTL 分化における機能として重要であることが明らかとなった。

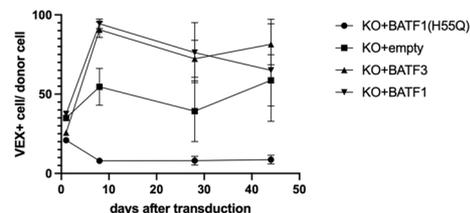


図 1. BATF1・BATF3・BATF H55Q 変異体導入時の CTL 増殖能

セルソーターを用いて LCMV 感染後早期に野生型および BATF 欠損マウス由来活性化 CTL を回収し、*ex vivo* 培養により CTL の経時的な観察を行った。その結果、図 2 で示すように、生体内においては増殖能を失う感染後 72 時間経過時点に回収および培養を行った BATF 欠損 CTL が、野生型 CTL と同様な増殖能を示すことが分かった。このことは、BATF 欠損による分化異常は *in vivo* における生理的な活性化・維持に伴う現象であり、*in vitro* 培養などの特殊な環境下においては回復しうる可能性を示唆している。一方で、BATF 欠損における CTL 分化異常の解明には生体検体における解析が重要であると

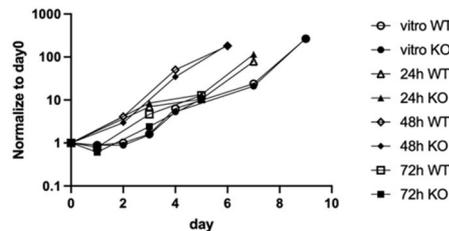


図 2. LCMV 感染後早期 CTL の *ex vivo* 培養時の増殖曲線

考えられ、転写因子と DNA 結合の解析に従来汎用されている ChIP 法は必要細胞数が  $10^7$  個であり、生体検体を用いた解析が非常に困難である。したがって、より少数細胞でクロマチン構造の解析が行える手法の開発が必要である。

酵素を使用したクロマチン構造解析の手法である ATAC-seq および CUT&RUN-seq は必要細胞数が  $10^4$  から  $10^5$  個と、ChIP-seq 法と比較して少数細胞で解析が行える。これらの解析手法の BATF 欠損時の分化異常解析への適応可能性の検討を行った。その結果、*in vitro* 培養系および *in vivo* 感染系において共通して、BATF 欠損時には一部のクロマチンが閉じた状態にあることが判明した。また、*in vitro* 培養系において、H3K4me3 の CUT&RUN-seq の解析結果は、従来の ChIP-seq による結果とほとんどの領域において同様なシグナルパターンを示すことが分かった。したがって、CUT&RUN-seq が BATF 欠損時の分化異常解析に適応できると考えられ、今後さらなる検討を加える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsao Hsiao-Wei, Kaminski James, Kurachi Makoto, Barnitz R. Anthony, Dilorio Michael A., LaFleur Martin W., Ise Wataru, Kurosaki Tomohiro, Wherry E. John, Haining W. Nicholas, Yosef Nir	4. 巻 7
2. 論文標題 Batf-mediated epigenetic control of effector CD8 differentiation <sup>+</sup> T cell	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Immunology	6. 最初と最後の頁 eabi4919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciimmunol.abi4919	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Aoki Hiroyasu, Ueha Satoshi, Shichino Shigeyuki, Ogiwara Haru, Shitara Kohei, Shimomura Manami, Suzuki Toshihiro, Nakatsura Tetsuya, Yamashita Makiko, Kitano Shigehisa, Kuroda Sakiko, Wakabayashi Masashi, Kurachi Makoto, Ito Satoru, Doi Toshihiko, Matsushima Kouji	4. 巻 9
2. 論文標題 Transient Depletion of CD4+ Cells Induces Remodeling of the TCR Repertoire in Gastrointestinal Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Immunology Research	6. 最初と最後の頁 624 ~ 636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2326-6066.CIR-20-0989	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Rome Kelly S., Stein Sarah J., Kurachi Makoto, Petrovic Jelena, Schwartz Gregory W., Mack Ethan A., Uljon Sacha, Wu Winona W., DeHart Anne G., McClory Susan E., Xu Lanwei, Gimotty Phyllis A., Blacklow Stephen C., Faryabi Robert B., Wherry E. John, Jordan Martha S., Pear Warren S.	4. 巻 217
2. 論文標題 Trib1 regulates T cell differentiation during chronic infection by restraining the effector program	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 20190888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20190888	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Beltra Jean-Christophe, Manne Sasikanth, Abdel-Hakeem Mohamed S., Kurachi Makoto, Wherry E. John	4. 巻 52
2. 論文標題 Developmental Relationships of Four Exhausted CD8+ T Cell Subsets Reveals Underlying Transcriptional and Epigenetic Landscape Control Mechanisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 825 ~ 841.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2020.04.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Li Yingfang, Que Lusheng, Fukano Kento, Koura Miki, Kitamura Kouichi, Zheng Xin, Kato Takano, Aly Hussein Hassan, Watashi Koichi, Tsukuda Senko, Aizaki Hideki, Watanabe Noriyuki, Sato Yuko, Suzuki Tadaki, Suzuki Hiroshi I., Hosomichi Kazuyoshi, Kurachi Makoto, Wakae Kousho, Muramatsu Masamichi	4. 巻 10
2. 論文標題 MCP1P1 reduces HBV-RNA by targeting its epsilon structure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20763-20763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-77166-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Johnnidis Jonathan B., Muroyama Yuki, Ngiow Shin Foong, Chen Zeyu, Manne Sasikanth, Cai Zhangying, Song Shufei, Platt Jesse M., Kurachi Makoto, Wherry E. John	4. 巻 6
2. 論文標題 Inhibitory signaling sustains a distinct early memory CD8+ T cell precursor that is resistant to DNA damage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Immunology	6. 最初と最後の頁 3702 ~ 3702
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciimmunol.abe3702	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chen Zeyu, Arai Eri, Khan Omar, Zhang Zhen, Ngiow Shin Foong, He Yuan, Huang Hua, Manne Sasikanth, Cao Zhendong, Baxter Amy E., Cai Zhangying, Freilich Elizabeth, Ali Mohammed A., Giles Josephine R., Wu Jennifer E., Greenplate Allison R., Hakeem Mohamed A., Chen Qingzhou, Kurachi Makoto, Shi Junwei	4. 巻 184
2. 論文標題 In vivo CD8+ T cell CRISPR screening reveals control by Fli1 in infection and cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 1262 ~ 1280.e22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2021.02.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanagaraj Arun, Sakamoto Naoya, Que Lusheng, Li Yingfang, Mohiuddin Md, Koura Miki, Wakae Kousho, Kurachi Makoto, Muramatsu Masamichi, Kitamura Kouichi	4. 巻 518
2. 論文標題 Different antiviral activities of natural APOBEC3C, APOBEC3G, and APOBEC3H variants against hepatitis B virus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 26 ~ 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.08.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Wein Alexander N., McMaster Sean R., Takamura Shiki, Dunbar Paul R., Cartwright Emily K., Hayward Sarah L., McManus Daniel T., Shimaoka Takeshi, Ueha Satoshi, Tsukui Tatsuya, Masumoto Tomoko, Kurachi Makoto, Matsushima Kouji, Kohlmeier Jacob E.	4. 巻 216
2. 論文標題 CXCR6 regulates localization of tissue-resident memory CD8 T cells to the airways	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 2748 ~ 2762
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20181308	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Chen Zeyu, Ji Zhicheng, Ngiow Shin Foong, Manne Sasikanth, Cai Zhangying, Huang Alexander C., Johnson John, Staupe Ryan P., Bengsch Bertram, Xu Caiyue, Yu Sixiang, Kurachi Makoto, et al.	4. 巻 51
2. 論文標題 TCF-1-Centered Transcriptional Network Drives an Effector versus Exhausted CD8 <sup>+</sup> T Cell-Fate Decision	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 840 ~ 855.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2019.09.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kurachi Makoto, Ngiow Shin Foong, Kurachi Junko, Chen Zeyu, Wherry E. John	4. 巻 51
2. 論文標題 Hidden Caveat of Inducible Cre Recombinase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 591 ~ 592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2019.09.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	玉井 利克 (Tamai Toshikatsu) (40782082)	金沢大学・医学系・助教  (13301)	
研究協力者	田辺 和 (Tanabe Yamato) (60909612)	金沢大学・医学系・博士研究員  (13301)	
研究協力者	藤澤 宗太郎 (Fujisawa Sotarou) (40965505)	金沢大学・医学系・助教  (13301)	
研究協力者	小浦 美樹 (Koura Miki)	金沢大学・医学系・技術補佐員  (13301)	
研究協力者	倉知 順子 (Kurachi Junko)	金沢大学・医学系・技術補佐員  (13301)	
研究協力者	放生 有紗 (Houjo Arisa)	金沢大学・医学系・大学院生(修士)  (13301)	

## 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

## 8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関