

平成 26 年 5 月 9 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2009～2013

課題番号：21229008

研究課題名(和文) T細胞分化を制御する転写因子ネットワークの解明

研究課題名(英文) Analyses of transcription factors networks that govern T lymphocyte development

研究代表者

谷内 一郎 (TANIUCHI, Ichiro)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・グループディレクター

研究者番号：20284573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 159,500,000円、(間接経費) 47,850,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの健康維持に必須の免疫系の機能調節に重要なT細胞の分化を制御する転写因子ネットワークの解明を目指して研究を行った。本研究の成果として、胸腺内でのCD4ヘルパーとCD8キラー系列決定機構においてThpok転写因子とRunx転写因子の拮抗的相互作用が中心的な役割を果たすこと、Thpok遺伝子のエピジェネティック制御機構の解明、新規のThpok発現調節因子としてBcl11b転写因子とSATB1転写因子の同定といった成果を得た。また、CD4ヘルパーT細胞には腸管ではCD8を再発現し、キラー活性を有する細胞へのリプログラムする分化可塑性を有していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：T lymphocytes are known to play important roles in the control of the immune system that is essential to maintain homeostasis in our body, thereby keeping our health. It is therefore important to understand molecular mechanisms that govern differentiation of several T lymphocyte subsets. This study mainly focused on a transcription factors network that regulates CD4-helper versus CD8-cytotoxic lineage determination and revealed that antagonistic interplay between ThPOK and Runx transcription factors is central to control this lineage dichotomy. In addition, this study not only provided novel insights into an epigenetic regulation of Thpok gene but also identified Bcl11b and SATB1 as novel upstream factors regulating Thpok gene expression. Furthermore, we found an unappreciated developmental plasticity retained in CD4+ T cells that allow them to be reprogrammed to acquire cytotoxic-related features upon exposure to the gut specific environment.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：リンパ球 T細胞 転写因子ネットワーク

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

免疫系の機能調節に重要な T 細胞は機能の異なる幾つかの細胞亜群から構成されるが、その分化プログラムは未だ詳細には解明されていない。特に転写因子による遺伝子発現制御機構からの理解が不足していた。私は 2008 年に胸腺内でのヘルパー T 細胞とキラー T 細胞への分化運命決定では ThPOK 転写因子と Runx 転写因子の相反的な相互作用が重要であることを解明したことから、この発見を基盤に T 細胞分化を制御する転写因子ネットワークを更に解明すべく研究を開始した。

2. 研究の目的

胸腺内及び末梢組織でのヘルパー/キラー系列への分化運命決定を制御する転写因子ネットワークを解明する。また Runx 転写因子を研究の中心に据えて、その他の制御性 T 細胞、NKT 細胞、gdT 細胞等の T 細胞亜群の分化を制御する転写因子ネットワークを解明する。

3. 研究の方法

発生工学的手法により、転写因子の機能や遺伝子発現を制御するゲノム領域の機能を修飾したマウスを作製することで、転写因子の生体内での機能や作用機序を解明する。またそれら変異マウス由来の生物試料を用いて、生化学的、分子生物学的、バイオインフォマティクスの解析を行い、転写因子の標的遺伝子、ゲノム領域間相互作用の測定、相互作用する分子の同定を行うことで転写因子ネットワークを解明する。

4. 研究成果

胸腺内でのヘルパー/キラー系列への分化運命決定については、*Thpok* 遺伝子のヘルパー系列特異的な発現を制御する機構の解明が最重要である。これまでに遺伝子発現を負に制御する活性を持つサイレンサー領域 (*Thpok* サイレンサー) と遺伝子発現を正に制御する活性を持つ 2 種類のエンハンサーを同定した (論文 3)。これら制御領域に変異を持つマウスの解析結果から、*Thpok* サイレンサーが *Thpok* 遺伝子発現のオン/オフ状態を規定するスイッチとして機能を担うと考えられた。そこで *Thpok* サイレンサー活性を制御する分子機構を解明すべく、新規 *Thpok* サイレンサー結合因子の同定を試みた。その為にはサイレンサー内の機能配列の同定が必要であり、まずノックイン変異導入を含む総括的な機能配列の同定を行った。その結果を基に、野生型及び変異型サイレンサー配列をプローブとし、プルダウンによるサイレンサー結合因子の生化学的精製を行った。複数の候補分子の同定後に、Runx タンパクとのタンパク相互作用の有無、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法による *in vivo* でのサイレンサ

ーへの結合の確認等により、真の結合因子の絞り込みを行った。次に、最終的な候補因子はその遺伝子変異マウスを入手或は作製し、機能解析を行い、機能的にサイレンサー活性制御に関与する分子を同定した。その結果、新規に Bcl11b 転写因子と SATB1 タンパクを新規の *Thpok* 遺伝子発現調節因子であることを確認した。

複数の Bcl11b 変異マウスの解析結果から、Bcl11b は *Thpok* サイレンサーの機能発現に必須であるばかりでなく、エンハンサーを介した *Thpok* 遺伝子の発現上昇にも必要であることが判明した。すなわち、Bcl11b 転写因子は *Thpok* 遺伝子の発現の正と負の制御に関与し、この Bcl11b 転写因子を介した両方向性の制御の欠損により *Thpok* 遺伝子の発現は系列特異性と発現上昇を欠損し、その結果 I 型及び II 型 MHC 拘束性細胞が共に部分的に運命転換されるという、これまでに報告されていない大変ユニークな表現型を示すことを見出した (図 1)。

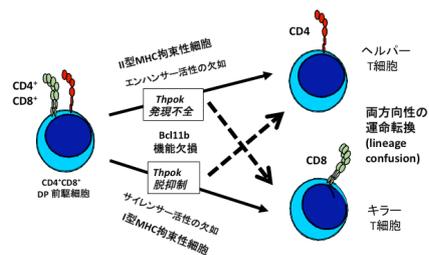


図1. Bcl11b転写因子の機能欠損による*Thpok*遺伝子発現制御不全とヘルパー/キラー系列決定の混乱(lineage confusion)

次に Bcl11b 転写因子が相反する機能を持つサイレンサーとエンハンサーの活性を共に制御する分子機構の解明を試みた。両制御領域の位置関係を改変した変異マウスの解析結果等から、Bcl11b 転写因子が局所クロマチン構造変化を制御する可能性が考えられた。この仮説を検証する為には新規の解析手法である挿入式クロマチン免疫沈降法 (iChIP) を実施した結果、ヘルパー T 細胞とキラー T 細胞では *Thpok* 遺伝子座においてプロモーター領域と制御領域との相互作用が異なる事を示す結果を得た。

次に SATB1 変異マウスの解析から SATB1 欠損により II 型 MHC 拘束性細胞の分化過程において *Thpok* 遺伝子の発現低下が見られた。また ChIP 法により SATB1 は *Thpok* 近位エンハンサーに結合すること、*Thpok* 遺伝子の発現低下は近位プロモーター活性の低下によることが判明し、これらの結果から SATB1 は *Thpok* 近位エンハンサーの活性化に必須であることが判明した。SATB1 もクロマチン構造の変換に関与する核内タンパクであることを考慮すると、これらの結果から *Thpok* 遺伝子座上の局所クロマチン構造の変換が TCR 信

号下流で *Thpok* 遺伝子の発現制御に中心的な制御であると考えられ、従来とは異なる新規の分化制御モデルを提唱する基盤となる成果が得られた。

一方、発生学的手法により *Thpok* サイレンサー周囲に loxP 配列を挿入し、Cre タンパクの発現により誘導的に *Thpok* サイレンサーを除去出来る系を構築した。このマウスを用いて、分化した CD8⁺キラーT細胞から *Thpok* サイレンサーを除去しても *Thpok* 遺伝子の発現抑制状態が維持される結果を得た。同時に分子生物学的解析によりキラーT細胞への分化過程で、*Thpok* 遺伝子座のプロモーター領域で、ヒストン H3K27Me3 修飾が蓄積することを見出した。これらの結果から、CD8⁺キラーT細胞では、エピジェネティック機構によりサイレンサー非依存的に遺伝子不活性化状態が維持されることを証明した。更に *Thpok* サイレンサーのコピー数を増加することでサイレンサー機能が增強されれば、ヘルパー細胞でも *Thpok* 遺伝子座に同様のエピジェネティックジーンサイレンシングが確立されることを見出した。この結果は、正の選択後に *Thpok* サイレンサーの不活性化が適切な時間持続する必要がある事を示し、エピジェネティック機構の視点から何故持続的な TCR 信号がヘルパーT細胞の分化に必要なかという問題への回答を示した成果と言える(論文2)。

次に腸管に存在する CD4⁺CD8aa⁺腸管上皮内細胞(CD4⁺CD8aa⁺IEL)の分化過程を解析した。その結果、CD4⁺CD8aa⁺IEL はヘルパー系列の CD4⁺T細胞から分化すること、その際 *Thpok* サイレンサーを介した *Thpok* 遺伝子の発現抑制と共に Runx3 の発現誘導が必須であることを発見した。この成果は CD4⁺T細胞には腸管という特殊な環境下では CD8⁺キラー様T細胞に再プログラム可能な分化可塑性が備わっていることを明らかにするばかりでなく、末梢組織においても胸腺内と同様に ThPOK と Runx の相互拮抗作用が CD4/CD8 細胞亜群の分化制御に重要な役割を果たすことを明らかにした成果である(論文4)。

Runx タンパクのC末端に存在する進化上保存された VWRPY 配列は遺伝子発現抑制に重要であることが知られている。この VWRPY 配列の欠損により、*Thpok* サイレンサーの活性は部分的に、*Cd4* サイレンサーの活性は完全に障害されることを見出した(論文5)。このことから、両サイレンサーは共に Runx 転写因子依存性であるが、遺伝子発現抑制様式は異なると考えられた。興味深いことに *Thpok* 遺伝子座と *Cd4* 遺伝子座間でサイレンサー領域を置換したマウスを作製し、それぞれのサイレンサーの異所性遺伝子座での VWRPY 配列への依存性を解析した所、*Thpok* サイレンサー活性は *Cd4* 遺伝子座上では VWRPY 配列に完全に依存し、逆に *Cd4* サイレンサー活性は *Thpok*

遺伝子座上では VWRPY 配列に殆ど依存しないことが判明した。この結果は少なくとも両サイレンサーを介した遺伝子発現抑制様式は、サイレンサーの核酸配列ではなく、むしろ相互作用する周辺の制御領域の特性に大きく依存することを示すものであり、制御領域の機能発現様式の理解に新しい知見をもたらす成果と言える。

一方、これまでに Runx タンパクの VWRPY 配列を介した Th2 型サイトカインの発現抑制は Th2 型の免疫応答の抑制に必須であることを示して来た。本研究課題では Runx タンパクは Th2 型サイトカイン以外に CC ケモカイン遺伝子群の発現抑制にも関与することを発見した。また VWRPY 配列を介して Runx 複合体に結合する新規非コード RNA を同定した。また、非コード RNA のノックダウン/ノックアウトにより Th1 細胞で IL4 の過剰産生が起こることを見出し、Runx タンパク複合体の新規機能調節機構を明らかにした。

また、Runx/Cbfb2 複合体の欠損により胸腺細胞数が減少するが、それは前駆細胞の胸腺への移入障害に起因することを見出した。マウス胎児の解析により、胎児肝での胸腺ホーミング能を獲得する細胞群の減少が見られたことから、Runx/Cbfb2 複合体は胸腺外での胸腺ホーミングの付与に重要である新規知見を得た。

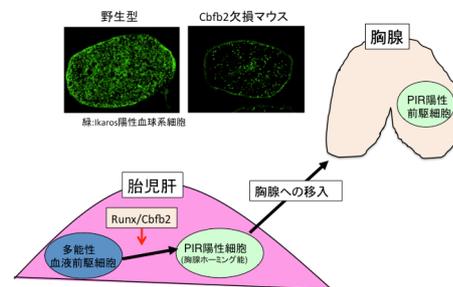


図2. Cbfb2欠損による胎児期での胸腺前駆細胞の分化異常

最後に、皮膚に特異的な gdT 細胞である DETC 細胞の分化には Runx3/Cbfb2 複合体の活性が必須であることを発見した。更に成獣 RAG 欠損マウスの皮膚において gdT 細胞前駆細胞の特性を備える細胞群を同定したことから、gdT 細胞の胸腺外での分化経路の可能性について、検討を加えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 26 件)

- ①. Boucheron N, Tschisnarov R, Goeschl L, Moser M. A, Lagger S, Sakaguchi S, Winter M, Lenz F, Vitko D, Breitwieser FP, Müller L, Hassan H, Bennett K. L, Colinge J, Schreiner W, Egawa T,

- Taniuchi I, Matthias P, Seiser C, Ellmeier W. CD4⁺ T cell lineage integrity is controlled by the histone deacetylases HDAC1 and HDAC2. Nat. Immunol. 査読有、2014, doi: 10.1038/ni.2864
- ②. Tanaka H, Naito T, Muroi S, Seo W, Chihara R, Miyamoto C, Kominami R and Taniuchi I. Epigenetic Thpok silencing limits the time window to choose CD4⁺ helper-lineage fate in the thymus. EMBO J. 査読有, 32:1183-94, 2013.
- ③. Muroi S, Tanaka H, Miyamoto C and Taniuchi I. Fine-tuning of Thpok gene activation by an enhancer in close proximity to its own silencer J. Immunol. 査読有, 190:1397-401, 2013.
- ④. Mucida D, Husain M. M, Muroi S, van Wijk F, Shinnakasu R, Naoe Y, Reis B, Huang Y, Lambolez F, Docherty M, Attinger A, Shui J.W, Kim G, Lena C, Sakaguchi S, Miyamoto C, Wang P, Atarashi K, Park Y, Nakayama T, Honda K, Ellmeier W, Kronenberg M, Taniuchi I and Cheroutre H. Transcriptional Reprogramming of Mature CD4 T helper Cells generates distinct MHC class II restricted Cytotoxic T Lymphocytes. Nat. Immunol. 査読有, 14:281-9, 2013.
- ⑤. Seo W, Tanaka H, Miyamoto C, Levanon D, Groner Y and Taniuchi I. Roles of VWRPY-motif-mediated gene repression by Runx proteins during T cell development. Immunol. Cell Biol. 査読有, 90:827-30, 2012.
- ⑥. Sakaguchi S, Hombauer M, Bilic I Naoe Y, Schebesta A, Taniuchi I and Ellmeier W. The zinc finger protein MAZR is part of the transcription factor network controlling CD4/CD8 cell fate decision of DP thymocytes. Nat. Immunol. 査読有, 11:442-448, 2010.

[学会発表] (計 23 件)

- ①. 谷内一郎. 「RUNX 転写因子と炎症制御」第 63 回日本アレルギー学会秋季大会. 2013 年 11 月 28 日、東京、日本
- ②. 谷内一郎. 「Local Chromatin Loop in CD4/CD8 lineage Choice」第 6 回国際 KTCC 会議. 2013 年 6 月 4 日、京都、日本
- ③. 谷内一郎. 「Transcriptional and Epigenetic Regulation of CD4/CD8 Lineage Choice」コールドスプリングハ

ーバーアジア会議. 2011 年 9 月 9 日、Suzhou, 中国

- ④. 谷内一郎. 「Transcriptional and Epigenetic Regulation of CD4/CD8 Lineage Choice」オーストリア免疫学会. 2011 年 9 月 15 日、Graz、オーストリア.
- ⑤. 谷内一郎. 「Transcriptional Regulation of CD4/CD8 Lineage Choice」第 14 回国際免疫学会議. 2010 年 8 月 22 日、神戸、日本.

[その他]

ホームページ等

<http://www.rcai.riken.jp/group/regu/index.html>

<http://www.riken.jp/en/research/rikenresearch/highlights/7324/>

http://www.riken.jp/en/pr/press/2013/20130121_1/

<http://www.youtube.com/watch?v=5I7R1-YWv3U&list=PLupuoB0sASq6sZ2QPdcl7iE3miS6kcEMO>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷内 一郎 (Taniuchi Ichiro)
独立行政法人理化学研究所・
統合生命医科学研究センター・
グループディレクター
研究者番号：20284573

(2) 研究分担者

該当しない (○)
研究者番号：

(3) 連携研究者

該当しない (○)
研究者番号：