

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04747

研究課題名(和文) 制御性T細胞による免疫制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanisms of regulatory T cell-mediated immune regulation

研究代表者

堀 昌平 (Hori, Shohei)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・教授

研究者番号：50392113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：制御性T細胞(Treg)は病的な免疫応答の抑制に重要である。Tregは遺伝子発現を変化させて炎症環境・組織環境に適応して免疫応答を制御しているが、この”適応性”の分子基盤は不明である。我々は、自己免疫疾患IPEX症候群患者に同定されているFoxp3変異を持ったマウスモデルを作製し、A384T変異が特定の非リンパ組織へのTregの集積を障害して炎症を惹起することを見いだした。そして、転写因子BATF発現の抑制がこの変異マウスにおけるTregの適応性障害の一因であることを明らかにした。本研究により、BATFがTregの適応性を制御する重要な役割を担うことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Foxp3+ regulatory T cells (Treg) are essential for the regulation of deleterious immune responses. Recent studies have shown that Treg cells change their gene expression in order to adapt to inflammatory or tissue environments to regulate immune responses. However, the molecular basis of this ability -adaptability- remains elusive. By generating mouse models harboring Foxp3 mutations identified in patients with the autoimmune disease IPEX, we have found that one mutation, A384T, induces tissue inflammation by specifically impairing the ability of Treg cells to accumulate in certain non-lymphoid tissues. Mechanistically, repressed expression of the transcription factor BATF contributed to the impaired adaptability of tissue Treg cells in the mutant mice. At the molecular level, the A384T mutation acted as a gain-of-function mutation in that it broadened the DNA-binding specificity of Foxp3. Our findings identify BATF as a critical regulator of Treg cell adaptability.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫寛容 自己免疫疾患 制御性T細胞 遺伝子発現制御 Foxp3 BATF

1. 研究開始当初の背景

自己免疫寛容が確立・維持され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、アレルギー疾患、炎症性疾患、がん、感染症など)を克服するためにも重要である。制御性 T 細胞(regulatory T cells; Treg)は、免疫応答を抑制することで免疫寛容と免疫恒常性の確立・維持に必須の役割を担っている。我々は、*scurfy* マウス及びヒト IPEX 症候群患者に発症する X 連鎖型の自己免疫疾患の原因遺伝子として同定された *Foxp3* が Treg 選択的に発現してその発生・分化と機能を司る“マスター転写因子”として働くこと、そして機能的 Treg の欠損が *scurfy* マウスに発症する自己免疫疾患の原因であることを明らかにし、自己免疫寛容と免疫恒常性維持における Treg の重要性を証明した。

近年、Treg は置かれた組織環境、炎症環境に応じて遺伝子発現を変化させることで様々な組織、炎症の場へ移動して生存、増殖、機能し、この適応性(adaptability)が炎症制御と組織の恒常性維持に重要であることが明らかにされてきた。しかしながら、この Treg の適応性のメカニズムは未だ解明されていない。

我々は、ヒト IPEX 症候群患者において同定されている *Foxp3* 変異(特に DNA 結合を担う forkhead (FKH)ドメインの変異である A384T, I363V, R397W)が Treg 分化と機能に与える影響を、マウス CD4 T 細胞における強制発現実験およびノックインマウスの作製により解析してきた。その結果、*Foxp3*^{I363V} 変異及び *Foxp3*^{R397W} 変異は機能欠失型変異であり、*Foxp3* 標的遺伝子の発現に全体的に影響を与えて Treg の発生・分化と機能を障害することを見いだした。一方、*Foxp3*^{A384T} 変異はこれら機能欠失型変異とは異なり、胸腺・末梢における Treg 分化(*Foxp3* 等 Treg signature genes の発現)と試験管内での T 細胞増殖抑制活性は阻害せず、一部の標的遺伝子の発現に選択的に影響を与え、特定の非リンパ組織に局在する CD44^{high}CCR7^{low} エフェクター型 Treg (以下 eTreg) の分化及び組織への集積を特異的に破綻させることがわかった。さらに、*Foxp3*^{A384T} 変異により発現が障害される *Foxp3* 標的遺伝子のなかで AP-1 転写因子 BATF の発現が顕著に低下しており、この *Batf* 発現制御異常が組織における Treg の適応障害の一因であることを明らかにした。これらの結果は、*Foxp3*^{A384T} 変異体が Treg の組織環境、炎症環境への適応性を選択的に障害することで自己免疫疾患を惹起しており、Treg の適応性に BATF が重要な役割を担っていることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究は、以上の知見にたち、*Foxp3*^{A384T} 変異および BATF に着目することで Treg の適応性を制御する分子機構を明らかにすることを目的とした。具体的には、(1) *Foxp3*^{A384T}

変異体による遺伝子発現制御の障害メカニズム、(2) BATF による eTreg 分化・集積の制御メカニズムとその意義、という 2 つの問題を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) *Foxp3*^{A384T} 変異体による遺伝子発現制御障害メカニズム

Foxp3 変異マウスの作製、*Foxp3* および BATF の ChIP-seq 解析、*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. *Immunity*, 2017 の通りに行った。*Batf* プロモーターの変異マウスは CRISPR-Cas9 系を用いて作製した。

(2) BATF による eTreg 分化・集積の制御メカニズムとその意義

Batf^{lox} マウスは大阪大学の黒崎知博教授からご供与いただき、*Foxp3*^{YFP^{Cre}} ノックインマウス(Jackson Laboratory)と交配させて Treg 特異的 BATF 欠損マウスを作出した。ROSA26-STOP-BATF ノックインマウスは、gene targeting 法により B6/J 由来 ES 細胞を用いて作製し、独自に作製した *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出した。BATF 欠損 Treg の遺伝子発現解析は RNA-seq 法により行った。BATF の ChIP-seq 解析は anti-BATF モノクローナル抗体(Cell Signaling Technology)を用いて Hayatsu et al. *Immunity*, 2017 の通りに行った。Treg, Tconv における open chromatin 領域は Kitagawa et al., *Nat Immunol*, 2017 らによる ATAC-seq データを用いて解析した。

4. 研究成果

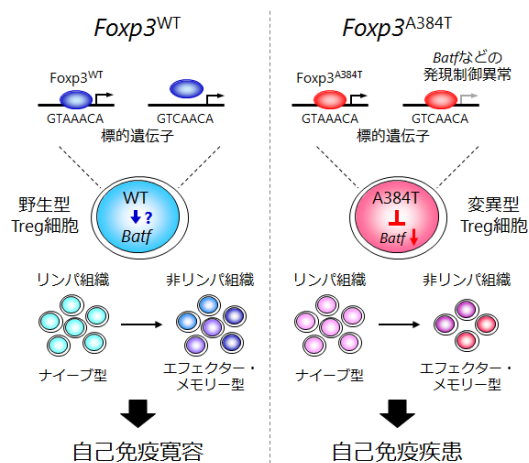
(1) *Foxp3*^{A384T} 変異体による遺伝子発現制御障害メカニズム

Foxp3^{A384T} 変異によりなぜ *Batf* などの特定の *Foxp3* 標的遺伝子の発現が障害されるのかを明らかにするために、まず野生型(WT) Treg、*Foxp3*^{A384T} 変異型 Treg を用いて、*Foxp3* ChIP-seq 解析を行い、WT 及び変異型 *Foxp3* が結合するゲノム領域を全ゲノムレベルで比較解析した。その結果、88%の結合領域については両者が同程度に結合していたのに対し、12%の領域については一方がより選択的に結合していた。一方が選択的に結合する領域に濃縮して存在する転写因子結合モチーフを検索した結果、WT Treg 選択的領域には有意なモチーフはみつからなかったが、変異型 Treg 選択的領域には FKH モチーフ、特に GTCAACA や GTACACA といった特定の FKH 結合配列が有意に濃縮されていた。このことから *Foxp3*^{A384T} 変異体は WT *Foxp3* が結合できないこれら特定の FKH 結合配列に選択的に結合する可能性が考えられ、様々な FKH モチーフ配列に対する結合活性をグルシフトアッセイにより生化学的に検討した。その結果、GTAAACA などの典型的な FKH 結合配列に対しては WT *Foxp3* および

Foxp3^{A384T} 変異体は同程度に結合したのに対し、上記 2 つの variant 配列に対しては Foxp3^{A384T} 変異体のみが選択的に結合した。

Foxp3^{A384T} 変異型 Treg における BATF 発現低下メカニズムを明らかにするために、Foxp3 ChIP-seq データを解析したところ、WT Foxp3 よりも Foxp3^{A384T} 変異体の方がより強くプロモーター領域に結合することがわかった。その領域には FKH 結合配列が 5 カ所存在しており、それらのうち 4 つはゲルシフトアッセイで Foxp3^{A384T} 変異体の方がより強く結合する配列であった。そして、マウス CD4 T 細胞を用いて *Batf* プロモーターのレポーターアッセイを行った結果、Foxp3^{A384T} 変異体はこれら 5 つの FKH 結合サイト依存的にプロモーター活性を抑制することがわかった。

以上の結果から、Foxp3^{A384T} 変異体は Foxp3 の DNA 結合特異性を拡大する機能獲得型変異であり、このために *Batf* プロモーターなどの特定の標的遺伝子に WT Foxp3 よりも強く結合することで遺伝子発現に影響を与えることが明らかになった (図) (Hayatsu, et al., *Immunity*, 2017)。



次に、5 つの FKH 結合サイトのうちどれが転写抑制に重要かをレポーターアッセイにより調べたところ、5'側から 3 番目と 5 番目のサイトが重要であることがわかった。そして、Foxp3^{A384T} 変異体による *Batf* プロモーター活性抑制のメカニズムと疾患発症における意義を個体レベル明らかにするために、これら 2 つのサイトを変異させたマウスを用いて作製した。Foxp3^{A384T} 変異マウスとこの *Batf* プロモーター変異マウスを交配させ、Treg における BATF 発現を調べたところ、BATF 発現の脱抑制が見られたことから、これら 2 つのサイトが Foxp3^{A384T} 変異体による BATF 発現抑制に重要であることが個体レベルで明らかにされた。今後、BATF 発現の脱抑制により Foxp3^{A384T} 変異マウスに発症する自己免疫疾患が抑制されるかを検討することで、Foxp3^{A384T} 変異体による BATF 発現抑制の疾患発症における意義を明らかにする予定である。

(2) BATF による eTreg 分化・集積の制御メカニズムとその意義

(i) 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作製と表現型解析

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 T cells; 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、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を発症し、皮膚、肺、肝臓、大腸など様々な臓器において Th1、Th2、Th17 細胞の集積を伴った炎症を示した。そして、これら組織において Treg の割合が減少し、特に eTreg サブセットが選択的に欠損していた。一方、Treg 特異的 BATF トランスジェニックマウスを作製して表現型を解析した結果、様々な組織において eTreg の選択的な増加・集積が見られた。

以上の結果から、BATF は eTreg の分化と組織への集積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。

(ii) 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 WT 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、接着分子といった非リンパ組織へのリンパ球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。

以上の結果から、BATF は非リンパ組織への移動に関わる遺伝子の発現を制御することにより eTreg 分化と組織への集積を制御すると

(iii) 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 75% であり、残り約 25% が Treg 選択的あるいは Tconv 選択的 BATF 結合領域であった。興味深いことに、Treg と Tconv に共通の BATF 結合領域および 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 結合領域は、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。

(iv) Foxp3 と BATF の機能的協調による eTreg 分化・集積の制御

Foxp3 と BATF の機能的協調関係を明らかにするために、まず Foxp3 の DNA 結合活性を消失させる amorphic 変異である Foxp3^{R397W} 変異のノックインマウスを用いて変異型 Treg の表現型を解析した。その結果、BATF 欠損マウスと同様に eTreg の割合が CD44^{low}CCR7^{high} サブセットよりもより大きく低下していた。また、Foxp3^{R397W} 変異型 Treg に WT Foxp3 を強制発現させて lymphopenic マウス (6Gy の放射線を照射した congenic マウス) に移入することで eTreg の割合が増加することがわかった。さらに、WT Treg において Foxp3 をノックダウンして lymphopenic マウスに移入すると、eTreg の分化・集積が障害された。これらの結果から、Foxp3 が eTreg の分化・集積に必要であることが明らかになった。

次に Foxp3 と BATF が機能的な協調関係を示すかを明らかにするために、Tconv に Foxp3、BATF を単独あるいは両者を強制発現させ、lymphopenic マウスに移入する実験を行った。その結果、Foxp3 のみの導入では対照群 (Foxp3、BATF 両者を導入していない Tconv) と比較して、CCR7^{low} エフェクターサブセットの割合に変化はなかったが、BATF のみの導入によりエフェクターサブセットが顕著に増加した。さらに、Foxp3 と BATF 両者を導入することでエフェクターサブセットが BATF 単独群よりもさらに増加した。このことから、Foxp3 と BATF は機能的に協調し eTreg 分化・集積を制御していると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Hayatsu N, Miyao T, Tachibana M, Murakami R, Kimura A, Kato T, Kawakami E, Endo TA, Setoguchi R, Watarai H, Nishikawa T, Yasuda T, Yoshida H, and Hori S. Analyses of a Mutant Foxp3 Allele Reveal BATF as a Critical Transcription Factor in the Differentiation and Accumulation of Tissue Regulatory T Cells. *Immunity* 47:268-83 e9, 2017. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.07.008
2. Maceiras AR, Almeida SCP, Mariotti-Ferrandiz E, Chacara W, Jebbawi F, Six A, Hori S, Klatzmann D, Faro J, and Graca L. T follicular helper and T follicular

regulatory cells have different TCR specificity. *Nat Commun* 8:15067, 2017.

DOI: 10.1038/ncomms15067

3. Zhang B, Chikuma S, Hori S, Fagarasan S, and Honjo T. Nonoverlapping roles of PD-1 and FoxP3 in maintaining immune tolerance in a novel autoimmune pancreatitis mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:8490-5, 2016. DOI: 10.1073/pnas.1608873113
4. Nishio J, Baba M, Atarashi K, Tanoue T, Negishi H, Yanai H, Habu S, Hori S, Honda K, and Taniguchi T. Requirement of full TCR repertoire for regulatory T cells to maintain intestinal homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:12770-5, 2015. DOI: 10.1073/pnas.1516617112

[学会発表] (計 11 件)

1. Hori S. Foxp3-dependent control of Treg cell function and homeostasis in tissues. 第 44 回日本免疫学会学術集会、2015 年 11 月 19 日、札幌
2. Hori S. Functional dissection of the Foxp3-centered molecular network in regulatory T cells. 第 45 回日本免疫学会学術集会、2016 年 12 月 5 日、沖縄

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~bisei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀 昌平 (HORI, Shohei)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：50392113