

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08629

研究課題名(和文) Treg細胞における転写因子E-Id蛋白質によるRegulome制御の統合的解析

研究課題名(英文) Analysis of regulome through E/Id protein axis in Treg cells

研究代表者

宮崎 和子 (Kazuko, Miyazaki)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・研究員

研究者番号：00311811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Id2/3欠損マウスのTreg細胞における遺伝子発現とオープンクロマチン解析から、エフェクターTreg細胞で高発現するエフェクター分子のいくつかはE/Id蛋白質によって発現調節されている可能性が示唆された。その1つのCXCR5遺伝子座に着目し、ゲノム相互作用を検討すると、生理的状態でも遺伝子座自体はactive compartmentに入っており、Idはゲートキーパーとして機能することが示唆された。また、Id2/Id3 flox Foxp3Cre/Foxp3DTRを作成して解析し、成獣期におけるId2/3によるTreg細胞の機能制御が全身性の炎症抑制に必須であ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

Treg細胞におけるエンハンサー機能調節の制御機構をゲノムワイドに解析した結果は、アレルギー反応の抑制における転写制御のメカニズムの解明につながり、社会的意義が深いと思われる。また、作成された新規マウスモデルで、Id2/Id3によるTreg細胞の機能制御が全身性の炎症抑制に必須であることを証明したことは、学術的に意義深い。それを用いて、成獣期において実際にどのようにTh2炎症が起こるのかを詳細に解析することが可能になり、今後の研究の発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The analysis of gene expression profiles and open chromatin regions in Id2/Id3-deficient Treg cells demonstrated that a set of effector molecules in effector Treg (eTreg) cells could be regulated by E-Id3 protein axis. Then, we examined the chromatin interactions in CXCR5 gene locus, which was one of the activation-related genes in eTreg cells and could be the direct target of E2A. From the result of Hi-C analysis that CXCR5 gene resided in the permissive "A" compartment in resting cells, we conclude that Id-proteins possibly function as a gatekeeper of eTreg cell differentiation. In addition, we proved that Id2 and Id3 expression in Treg cells plays an important role in the suppression of systemic inflammation not only in childhood but also in adulthood, which was revealed by the analysis of Id2-/Id3-flox Foxp3Cre/DTR mouse line.

研究分野：分子生物学

キーワード：転写制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

bHLH 型転写因子 E2A とその拮抗因子 Id タンパク質のバランスによる転写制御機構は、リンパ球分化において細胞分化の決定や活性化制御において重要な役割を果たすことが明らかにされてきた。

制御性 T(Treg)細胞は、炎症抑制の中心的な T 細胞であり、自己免疫疾患、腸炎、感染、そして癌免疫反応で大きな役割を担う。Treg 細胞の活性化により Id 蛋白質の発現が大きく変化することから、Treg 細胞特異的に Id2 と Id3 を欠損させたマウス (Id2^{fl/fl}; Id3^{fl/fl}; Foxp3^{Cre}; Id2/3 dKO) を作製して解析すると、このマウスでは、ヒトのアレルギー性疾患 (アトピー性皮膚炎、気管支喘息、好酸球形食道炎) と類似の病態を自然発症した。詳細なマウスの解析から、E-Id 蛋白質による転写制御が、制御性 T 細胞の分化および活性化、局在および維持において必須であるが明らかとなった。そしてこのことは、既知の Foxp3 によるものとは異なる転写制御ネットワークが Treg 細胞において重要な機能を担うことを意味し、免疫学的にも非常に重要な知見であった。

2. 研究の目的

本研究では、最新の分子生物学的解析法 (ATAC-seq/Hi-C) を用いて、エフェクター Treg 細胞への分化における、Id 因子による 'Regulome' 制御機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

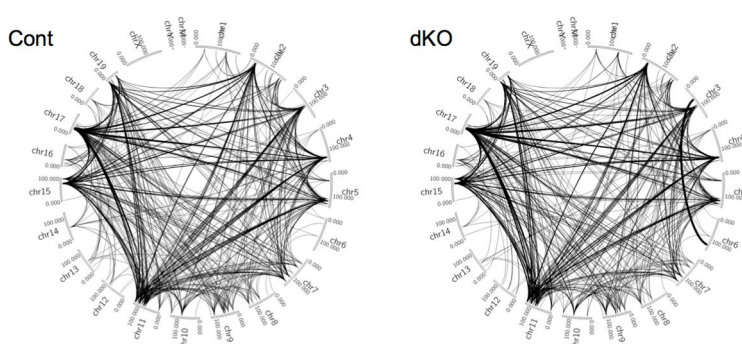
Id2 flox/flox-Id3 flox/flox-Foxp3Cre マウスおよび野生型マウスから Treg 細胞を単離し、ATAC-seq を行い、クロマチンアクセシビリティの解析を行った。野生型 DP 細胞を用いて CTCF と Cohesin の ChIP-seq を行った。また、Id2/3 dKO マウスおよび野生型マウスの CD4SP 細胞を単離し、Hi-C 実験を行い、ATAC-seq と ChIP-seq の結果をふまえて 3D ゲノム構造を比較した。

さらに、Id2 flox/flox; Id3 flox/flox; Foxp3Cre (Id2/Id3/Foxp3Cre) マウスで認められた全身性のアレルギー炎症が、本当に Treg 細胞の炎症抑制機能に依存しているのかを証明するために、Id2 flox/flox; Id3 flox/flox; Foxp3Cre/Foxp3-DTR マウスを作製し、検討した。

4. 研究成果

(1) Id2 flox/flox-Id3 flox/flox-Foxp3Cre マウスおよび野生型マウスから Treg 細胞を単離し、ATAC-seq を行い、全ゲノム領域でのオープンクロマチン領域を同定した。Id2/Id3 欠損 Treg 細胞において、約 10,000 ヶ所の特異的な領域があり、大部分が non-coding 領域のエンハンサー領域であった。転写因子モチーフ検索の結果、アクセシビリティが上昇した領域では E2A の結合モチーフが top にランクされたことから、拮抗因子 Id2/Id3 により E2A の転写活性が制御されることで、Treg 細胞の機能が調節されていることがゲノムワイド解析からも明らかになった。

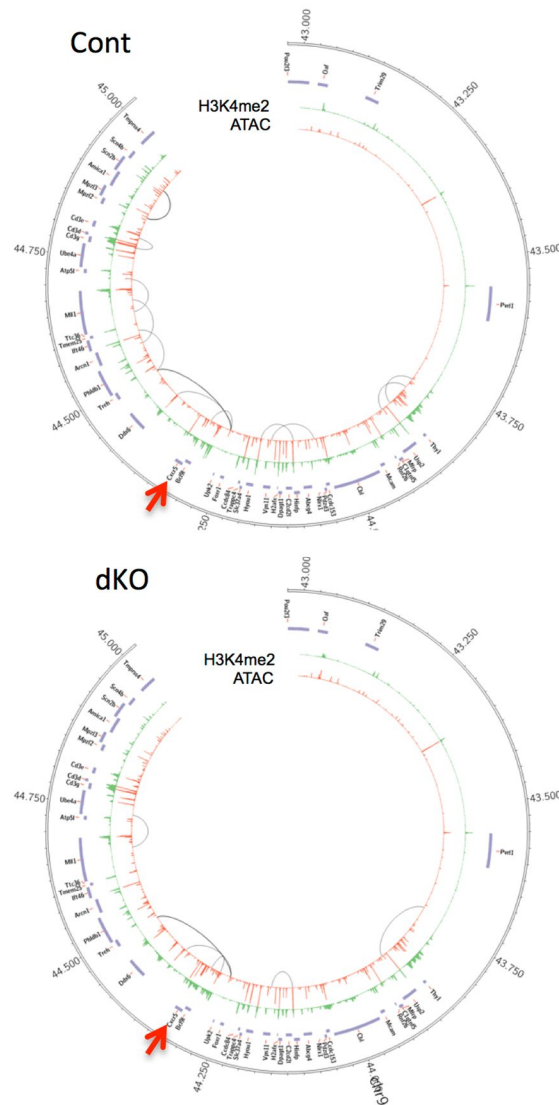
(2) 野生型と Id2dKO CD4SP 細胞の 3D ゲノム構造のゲノムワイドな解析を行った (図 1)。



【図 1】 染色体間の genome interactions

染色体間の interaction には大きな違いは見られなかった。

(3) (1)の ATAC-seq の解析と遺伝子発現の変動解析を組み合わせて行ったところ、E2A が CTLA4, CXCR5, IL10 などのエフェクター-Treg 細胞で高発現するエフェクター分子の発現調節を制御されている可能性が示唆された。CXCR5 はエフェクター-Treg の1つである follicular regulatory Treg (TFR)のマーカであり、胚中心への移動に必須のケモカインレセプターである。そこで、CXCR5 遺伝子座に着目し、CXCR5 遺伝子を含む locus における 3D ゲノム構造を解析した。



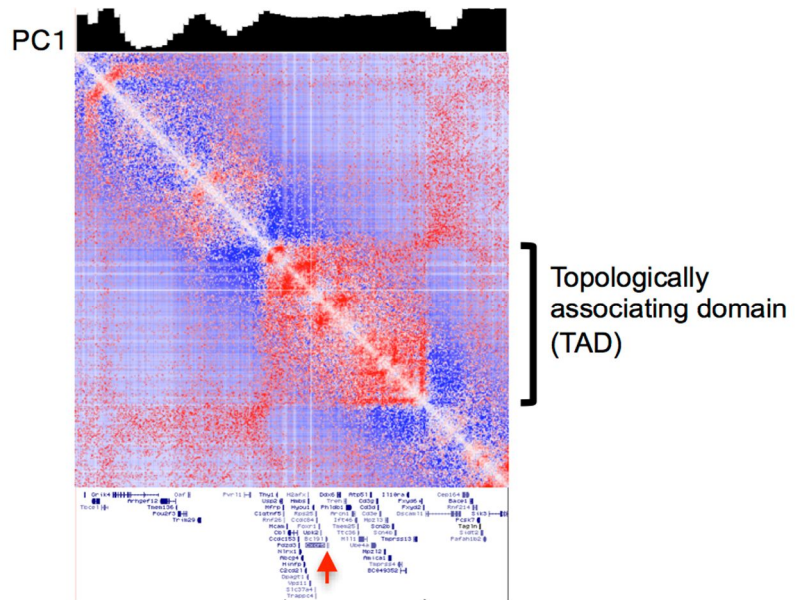
【図2】CXCR5 遺伝子座を含む circos plots

CXCR5 遺伝子座の ATAC-seq signal は、dKO で高くなっているが、Hi-C における interaction は変化がなかった。すなわち、chromatin interaction による制御ではなく、ローカルな転写活性に E2A が機能していることを示唆している。

(4) CXCR5 を発現していない DP 細胞での chromatin interaction を principal component analysis(PCA)を行い、interaction matrix を作成して検討した(図3)。PCA の結果から、first principal component (PC1) が高いと転写が permissive な "A"、低いと inert

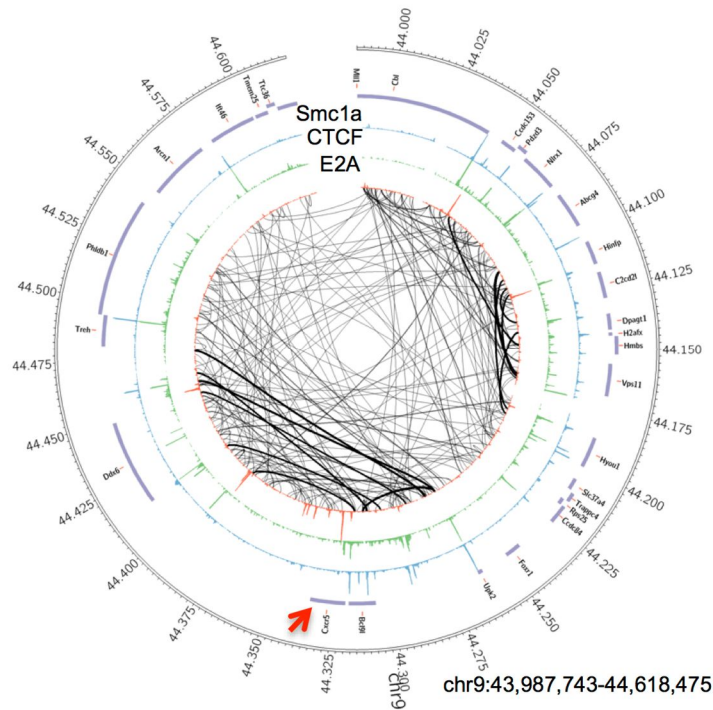
な "B" compartment というようにゲノム構造が大別される。CXCR5 遺伝子座を含む領域は、compartment A に含まれていた。また、CXCR5 遺伝子座は、chromatin interaction の頻度が高い topologically associating domain (TAD)内にあった(矢印は CXCR5 の遺伝子座を示す。)

これは、この locus 全体は、活性化によりすぐに遺伝子発現が可能な状態であることを示す。



【図3】genome interaction matrix (chr9:43,987,743-44,618,475)

(5) CTCF と Cohesin は chromatin looping 形成およびその構造を維持する機能を持つ分子である。CTCF と Cohesin(Smca1)の ChIP-seq を行い、Hi-C の結果と合わせた結果が図4である。CTCF や cohesin が存在する領域間での genome interaction が強く見られ、E2A との関連も示唆された。また、生理的状态の CXCR5 遺伝子座では、Id 蛋白が、E2A の活性を抑制することで、gatekeeper として機能している可能性が示唆された。



【図4】野生型 DP 細胞における CXCR5 遺伝子座を含む circos plot

(6) 炎症がない状況からどのように炎症を起こしていくのかという問題にアプローチするために、Id2/Id3 floxed Foxp3Cre/Foxp3DTRを作成した。このシステムにおいて、Diphtheria Toxin(DT)投与によって、Id2/Id3欠損Treg細胞のみになり、4週間ほどで全身性のTH2炎症が再現できた。また、このマウスによって、Id2/Id3による Treg細胞の機能制御が全身性の炎症抑制に必須であることが証明された。今後、このマウスモデルを使用することにより、成獣期にId2/3欠損Treg細胞欠損によってどのようにTh2炎症が起こるのかを詳細に解析することが可能になる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miyazaki Masaki, Miyazaki Kazuko, Chen Kenian, Jin Yi, Turner Jacob, Moore Amanda J., Saito Rintaro, Yoshida Kenichi, Ogawa Seishi, Rodewald Hans-Reimer, Lin Yin C., Kawamoto Hiroshi, Murre Cornelis	4. 巻 46
2. 論文標題 The E-Id Protein Axis Specifies Adaptive Lymphoid Cell Identity and Suppresses Thymic Innate Lymphoid Cell Development	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 818 ~ 834.e4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.04.022	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1件

1. 著者名 坂口志文 堀昌平 編	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 264
3. 書名 医学のあゆみ 制御性T細胞－研究の現在－	

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学ウイルス・再生医科学研究所 研究成果 https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/achievements/post-1717/ ライフサイエンス新着論文レビュー http://first.lifesciencedb.jp/archives/16546
--

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