

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19545

研究課題名（和文）中枢免疫寛容を維持する自己抗原の発現制御機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of Molecular Mechanisms of Self-antigen expression for Central Immune Tolerance

研究代表者

高場 啓之（Takaba, Hiroyuki）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・助教

研究者番号：50637444

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：これまでに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解っている。近年、胸腺の髄質上皮細胞でも、クロマチン状態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を抗原として発現させていることが解ってきた。本萌芽的研究費を元に、申請者らは転写制御因子AireとFezf2の上流に位置する重要なクロマチン制御因子Chd4を同定した。胸腺上皮細胞はChd4を用いて、多様な遺伝子を異所的に発現制御されていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らが独自に見出した転写因子Fezf2を相互作用する因子をスクリーニングすることでFezf2と相互作用するクロマチン制御因子Chd4を同定した。胸腺上皮細胞はChd4を用いて、多種多様な遺伝子を抗原として異所的に誘導されていることが明らかとなった。Chd4は転写制御因子AireとFezf2の上流に位置する重要な因子であり、胸腺上皮細胞はChd4を用いて、多様な遺伝子を異所的に発現制御されていることが明らかとなり、自己免疫寛容の分子基盤の一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：It is widely known that a diverse set of genes are expressed by sperm and hippocampus. To this end, the changes of chromatin conformation are quite important. Recently, medullary epithelial cells express almost genes as antigens for T cell selection in the thymus. Based on this observations, we identified a chromatin remodeler Chd4 which plays key roles for Aire- and Fezf2-dependent genes in the medullary thymic epithelial cells. This study expand our knowlege how many genes are ectopically expressed in the thymus.

研究分野：免疫学

キーワード：自己免疫寛容

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物は獲得免疫システムと呼ばれる生体防御機構を所持している。この獲得免疫システムの特徴は、T細胞とB細胞と呼ばれるリンパ球が発現している抗原受容体によって、これまで罹ったことのない病原菌に対してでも応答し、生体内から除去することを可能にしている。およそ100年に渡る免疫学の研究から、この二種類のリンパ球の内T細胞は獲得免疫システムを担う最も重要な細胞集団であることが知られている。T細胞は胸腺と呼ばれる独立した臓器で、分化・成熟をしており、胸腺内においてT細胞は、膜たんぱく質となるT細胞抗原受容体遺伝子をDNA組換え酵素RAGにより、確率的に10の12乗もののオーダーで抗原受容体として創り出している。しかし、この時に問題となるのが自己反応性のT細胞が創り上げられてしまうことである。この問題を避けるために、胸腺内で自己成分応答性T細胞は、細胞死が誘導されることで、自己免疫疾患に陥ることを回避している。この現象は免疫学の教科書において「負の選択」と呼称されている。

しかしながら、どのように自己応答性のT細胞が除去されるのか、特に、どのようにして自己応答性成分(胸腺外で発現する遺伝子=末梢抗原)を胸腺内で発現させているのか、その分子メカニズムは不明な点が多い。最近、胸腺の髄質上皮細胞(medullary thymic epithelial cells; mTECs)でも、クロマチン状態を変化させ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を発現させている可能性が示された。これまでに、転写制御因子Aireがこの現象に関わることが示唆されていた。しかし、Aireのみではすべての自己抗原は制御されていないことが報告されていた。近年、われわれの研究により自己抗原遺伝子を制御する重要な転写因子としてFezf2が同定され、Aireを含めたいくつかの重要な転写制御因子の組み合わせによって、からだ中の遺伝子発現が異所的に発現誘導されている可能性が示された(Takaba *et al.*, *Cell.*, 2015)。しかしながら、Fezf2とAireがどのように多種多様にある遺伝子を自己抗原として発現誘導しているのか、よく分かっていなかった。

2. 研究の目的

本計画は、胸腺内の髄質上皮細胞の転写制御因子Aireや転写因子Fezf2を介した遺伝子発現制御機構を、クロマチン制御に着目して理解することを目的とした。本研究計画は、AireやFezf2が具体的にどのように自己抗原遺伝子の発現を制御しているかを明らかにすることで、将来的に、自己応答性T細胞の選別機構と、特に自己免疫疾患の相関を予測するデータベースを作成するためのステップにあたる。

3. 研究の方法

①、CRISPR/Cas9システムを用いたflag-Fezf2とAire-flagノックインマウスの樹立
これまでのわれわれの先行研究からCRISPR/Cas9を活用したflagノックインマウスの作製は100%成功していることと、N末にFlagタグを付加させたFezf2タンパク質は機能的に正常である報告がある(Lodato *et al.*, *Nat Neuroscience*, 2014)ため、上述した①で抗Fezf2モノクローナル抗体が出来なかった場合の代替案として、Fezf2遺伝子座5'末にflagタグをノックインさせたマウスを樹立する。同時にAireの場合はC末にflagがよくタグとして付加されているのでAire遺伝子座の3'にflagをノックインしたマウスを作製する。これら2系統のマウスを樹立することでmTECにおいてAireとFezf2がゲノム上のどの位置に結合し、TRA遺伝子を制御しているかをChIP-seqにより明らかにすることが可能となる。

②、ChIP-seq法を用いたmTECにおけるFezf2結合ゲノム領域の特定

野生型マウスのmTECを単離した後に、ChIP-seq法を用いてFezf2の結合部位を同定する。Fezf2欠損マウスのmTECのマイクロアレイ解析によって同定したFezf2依存的な末梢抗原が実際にFezf2によって直接の制御を受けるのかどうかを解析する。

③、ATAC-seq法を用いたFezf2によるオープンクロマチン領域の制御の解析

Aire陽性及び陰性、Fezf2陽性及び陰性という区分でmTECを分け、それらにおけるオープンクロマチン領域をFAIRE-seq法によって解析する。抗ヒストン抗体を用いたChIP-seq法による解析によって、Aireが活性化クロマチン領域の制御に関わっていることが示唆されているが、実際にオープンクロマチン領域の制御に関わっているのか、また、Fezf2もオープンクロマチン領域の制御に関わっているのかどうかを解析する。また、ChIP-seq法や、マイクロアレイに依る遺伝子発現解析との結果とも合わせて、クロマチン構造と末梢抗原の発現との関係性を明らかにしていく。

④、ヒト293細胞株やmTEC細胞株1C6にFezf2を大量発現させたものからタンパク質を抽出し、抗Fezf2抗体を用いた共免疫沈降法によって得られたFezf2と相互作用する分子をLC-MS/MSによって網羅的に解析する。[平成29,30年度]

これまで上記の手法で、転写制御因子であるAireと相互作用する分子を同定するために、いくつかの研究室で共免疫沈降法及びLC-MS/MSによる網羅的がなされた。その結果、Aireと相互作用する分子を機能の観点から、核への輸送、クロマチンへの結合、mRNA転写誘導、mRNA

プロセッシングといった大きく分けて4つのグループに分けることが出来ることが明らかになった(Abramson et al., Cell, 2010)。一方、われわれは Fezf2 との相互作用分子の網羅的解析を行うことで、Aire のように染色体や遺伝子発現の制御をする新規因子の同定をすることで、未だに未解明な自己抗原の発現制御機構に関して重要な知見が与えられうると考えている。また、Fezf2 は神経系にも発現していることから、胸腺内または中枢神経細胞内の Fezf2 の機能的な差異についても検証していくことが可能となる。Fezf2 の共役免疫沈降とプロテオーム解析によって上がってきた候補タンパク質の各々について、RNAi によるノックダウンアッセイを細胞株や ex vivo システムに依る胎児胸腺器官培養法 (fetal thymic organ culture: FTOC) を用いることで候補分子の機能解析を行う。

⑤、単一細胞レベルでの野生型マウス mTEC と Fezf2KO マウス mTEC の遺伝子の発現解析

昨年、野生型 mTEC を用いた Single cell RNA-seq 解析から、mTEC における Aire 依存的な末梢抗原の発現様式が単一細胞レベルでは異なることや、複数の TRA 遺伝子はクラスターとして協調的に発現制御されていることが示唆された (Meredith et al., Nature immunology, 2015)。この知見を踏まえ、われわれは Fezf2 依存的な末梢抗原の発現が mTEC の単一細胞ごとに違うのかどうかと、TRA 遺伝子ごとに制御様式に相関が存在し得るのかを解明する。実験手法としては、既に樹立されている Fezf2-tdTomato BAC トランスジェニックマウスを入手して、野生型及び Fezf2 欠損マウスの mTEC を単一細胞ごとに単離し RNA-seq 解析を行うことで、単一細胞レベルでの TRA 遺伝子の発現解析を行うことを予定している。その後、mTEC を遺伝子発現によってクラスターに分けた場合、野生型マウスと Fezf2 欠損マウスとの間でどのような遺伝子発現に違いが存在するかどうかを明らかにする。また、Fezf2 依存的な発現様式をとる TRA 遺伝子群がどのようなクラスターを形成し、ゲノム上における位置と、どのような相関があるのかを明らかにしたいと考えている。マウスやヒトなどは加齢に伴い自己免疫疾患が生じやすくなる。そこでわれわれは、マウスの週齢を経時的に追うことで、mTEC における TRA 遺伝子発現の制御機構について、時間軸を含めて解析していくことを予定している。

⑥、Aire や Fezf2 以外の TRA 遺伝子を制御する新規転写制御因子の同定

mTEC において発現している末梢抗原 TRA のうち Aire や Fezf2 によって 60-70%程が制御されていることを明らかにしたが、未だに Aire ないし Fezf2 のどちらにも発現を依存していない末梢抗原が存在している (Takaba et al., Cell, 2015)。申請者が以前 Fezf2 を発見した際に行ったマイクロアレイデータをもちいた遺伝子発現解析の結果から、複数の候補遺伝子が得られた。新たなアプローチとして、④で行う single cell の mTEC での RNA-seq の結果から、Aire にも Fezf2 にも発現を依存していない末梢抗原の遺伝子発現が高い細胞のデータを抽出し、その中で特に発現の高い転写制御因子を候補遺伝子としようと考えている。得られた候補遺伝子については、ノックアウトマウスを作製・入手をし mTEC の解析を行う。

以上の項目を順次行っていくことを予定しているが、目的を達成するために十分な品質の抗体が手に入らなかった場合は、ノックインマウスを中心として研究を進めていく。また、その場合、1C6 や 293T といった細胞株に flag タグ付きの Fezf2 を大量発現させ、抗 flag 抗体で免疫沈降を行って研究を進めていくこととする。

4. 研究成果

まず mTEC における Fezf2 と Aire 間の転写制御プログラムの違いを明らかにするため、Fezf2 KO または Aire 欠損 mTEC をフローサイトメトリーにより分取し、RNA-sequencing 解析を行った。これまで同じ RNA-sequencing プラットフォーム (Ionproton) での同週齢のマウスを用いて解析を行ってみると Fold-change > +2 かつ q-value < 0.1 で、640 遺伝子が Fezf2 依存的な遺伝子であり、1553 遺伝子が Aire 依存的な遺伝子であった。123 遺伝子が Fezf2 かつ Aire 依存的な遺伝子であった。統計学的な解析を行った結果、Fezf2 依存的な遺伝子と Aire 依存的な遺伝子はそれぞれ非依存的であることが判った。すなわち、Fezf2 と Aire はそれぞれ独立した機構で、遺伝子発現を制御していることが明らかとなった。Fezf2 や Aire が TRA を誘導させているかを検証するために、今回 TRA を客観的な組織特異性を評価する数理学手法を用いることで定義付けし解析してみると、やはり Fezf2 と Aire は、どちらも TRA を mTEC で異所的に誘導させていることが解った。一方で、Aire はほとんどの遺伝子発現の誘導に関わるのに対し、Fezf2 は 450 以上の遺伝子が抑制されており、興味深いことに、その中には Ceacam19 や Msln などの腫瘍抗原が抑制されていることが明らかとなった。次に、この Bulk-RNA-seq データの結果をもとに、単一細胞レベルでの mTEC での Aire 依存的な遺伝子と Fezf2 依存的な遺伝子の mRNA の発現パターンの特徴を解析した。すると、Aire 依存的な遺伝子は全体の mTEC 細胞集団の中の 5%未満の細胞集団を単位として遺伝子発現が誘導されており、一定の組み合わせをもち Aire 依存的な遺伝子を発現させていることが解った (モザイクパターン)。一方で、Fezf2 は mTEC 全体で Fezf2 依存的な遺伝子を発現誘導させていることが明らかとなった (ブロードパターン)。

Fezf2 と Aire による遺伝子発現機構を分子レベルで明らかにするために、これまでに報告されているクロマチン免疫沈降シーケンシング (ChIP-seq) 解析を利用し、Fezf2 依存的な遺伝子と

Aire 依存的遺伝子の特徴の解析を行った。すると活性化ヒストンマーカである Trimethylated lysine 4 of histone 3 (H3K4me3)は転写開始地点 (transcriptional start sites (TSS)) で優位であるのに対し、Aire 依存的遺伝子は抑制マーカである trimethylated lysine 27 of histone 3 (H3K27me3)で低下していることが示された。他の活性化マーカの H3K4ac と H3K9ac も TSS において Fezf2 依存的遺伝子に関して優位な状態であることが解った。さらに、ATAC-seq (the assay for transposase-accessible chromatin using sequencing)解析を行った結果、Fezf2 依存的遺伝子は TSS 付近がオープンクロマチン状態であり、Aire 依存的遺伝子はクローズドクロマチン状態であることが解った。以上の結果は、Fezf2 依存的遺伝子は Aire 依存的な遺伝子とエピジェネティック状態から異なることが明らかとなった。

では、Fezf2 と Aire は、それぞれどのような転写制御機構をもっているのだろうか。これまで、Aire は転写因子 Irf4 やメチル化シトシンヒドロキシラーゼ Tet1 やプロモドメイン含有タンパク質 Brd4 といったさまざまな転写制御因子と相互作用することで、遺伝子を誘導させていることが明らかとなった(Gerald et al., Nature, 2008, Yoshida et al., Nat. Immunology, 2017)。一方で、Fezf2 はこれまで相互作用する因子群は報告がなかった。そこで、Fezf2 を発現させて共役免疫沈降と質量分析(MS; mass spectrometry)解析を行うことで、Fezf2 と相互作用する分子をスクリーニングすることを行った。使用した細胞としてはヒトの腎癌上皮細胞の 293T 細胞とマウス胸腺髄質上皮細胞株である 1C6 を使用した。それぞれ Fezf2 を過剰発現させ MS 解析で検出されたタンパク質の中でもっとも信頼性の高い候補分子として、クロマチン制御因子 Chd4(chromodomain helicase DNA binding protein 4)が挙げられた。Chd4 はクロマチンアッセムブリやヌクレオソームポジショニングに関わる制御因子として報告されている。Chd4 はエピジェネティックな制御を介して遺伝子発現を正と負に制御していることが明らかとなっている。免疫沈降法を用いて、Fezf2 と Chd4 は相互作用するが、Aire とはしないことが解った。また、Chd4 は NuRD (nucleosome remodeling and deacetylase) 複合体のサブユニットの一つであることが知られているため、Fezf2 が mTEC において NuRD 複合体と相互作用するかどうか検証した。Fezf2 に対する抗体で免疫沈降に用いるレベルで良い抗体が無かったため、Fezf2 と Chd4 の検証を行うために、CRISPR/Cas9 を活用し、Flag knock-in (KI) Fezf2 マウスを樹立した。少なくとも脳や mTEC で Flag がタンパク質として発現し、KI マウスで TEC が正常に分化していることを確認した後、まず Fezf2 と Chd4 が相互作用するか共役免疫沈降を行い検証した。その結果、すくなくとも Fezf2 は Chd4 と結合し、NuRD 複合体の因子である Hdac1/2、Mta1、MBD3 と相互作用することが明らかとなった。一方で、Fezf2 は Aire や、Chd4 の別の相互作用因子の一つである p300 とは相互作用していないことが明らかとなった。以上の結果から Fezf2 は Chd4 を含む NuRD 複合体と相互作用し、Fezf2 依存的な遺伝子を発現制御している可能性が示された。

胸腺の髄質において、Chd4 が mTEC において機能しているかどうかを明らかにするために Chd4 floxed マウスを用意し、Foxn1-Cre マウスと掛け合わせることで、胸腺上皮細胞特異的な Chd4 欠損(cKO; conditional knock-out)マウスを樹立した。Chd4 cKO マウスは胸腺の大きさは小さいが、正常に生まれてくることが分かった。野生型の胸腺に比べ、CD4 陽性 T 細胞は低下しているように見えるが、CD69+TCR β +CD4+CD8+胸腺細胞の割合や CD25+Foxp3+制御性 T 細胞の割合は変化していなかった。これらの結果は胸腺の正の選択と制御性 T 細胞の分化は Chd4 cKO マウスでは正常であることが示唆された。また、mTEC の数は多少低下していたが、胸腺皮質と髄質の構造は正常であり、Aire 陽性細胞の割合と Aire 遺伝子の発現量、未成熟と成熟 mTEC の割合は野生型と変わらない。また Chd4 cKO マウスは Fezf2 遺伝子の発現は低下していないことから、Chd4 は mTEC の分化に関与していない可能性が示された。

次に Chd4 の mTEC でどのような遺伝子発現の制御に関わるかを明らかにするために Chd4 cKO mTEC と野生型 mTEC を用いて RNA-seq 解析を行った。Chd4 依存的な遺伝子は 1464 遺伝子であることが分かった。また、先ほど定義づけた TRA を調べてみると Chd4 は TRA の発現制御に関与することが示された。Chd4 依存的に制御される遺伝子は Fezf2 依存的な遺伝子の 25%以上であった。以上の結果は、Chd4 が Fezf2 依存的な遺伝子をエピジェネティックな状態の制御に関与することを示している。Chd4 と Fezf2 のエピジェネティック状態の制御機構を明らかにするために、野生型と Fezf2 cKO、Chd4 cKO マウスを用いることで ATAC-seq を行った。

Fezf2 または Chd4 によって制御される部位(peak)を induced、neutral、そして repressed の三段階に分けると、Fezf2-induced と Chd4-induced peak は 50%以上が一致しており、興味深いことに、その領域は TSS に集積していた。統計的な解析を行った結果、Chd4 と Fezf2 は mTEC で協調的に同じ領域、とくにプロモーター領域のクロマチン状態を制御していることが明らかとなった。mTEC における転写因子 Fezf2 のゲノム上の位置を明らかにするために、次に ChIP-seq 解析を行った。すると Fezf2 は活性化マーカの H3K4me3 や H3K27ac の集積するプロモーター領域周辺に位置していた。以上の結果から、Fezf2 は Chd4 と協調して特定の TRA 遺伝子を直接的に制御していることが明らかとなった。

一方で、ATAC-seq と RNA-seq 解析の結果から Chd4 によって制御される Fezf2 依存的遺伝

子は全体の一部であり、残りの Chd4 依存的遺伝子の発現制御機構は不明であった。Chd4 依存的遺伝子かつ Fezf2 に非依存的な遺伝子の中に、casein (Csn1s1) や calgranulin (S100a8) といった遺伝子が見いだされたことから、Chd4 依存的遺伝子の中に Aire による関与もある可能性が見いだされた。統計学的な解析を詳細に行うと、驚くべきことに Chd4 によって依存的に制御される遺伝子の中で Aire によって制御される遺伝子は 30%以上あることが明らかとなった。以上の結果から、Chd4 は Fezf2 依存的な遺伝子のみならず、Aire 依存的な遺伝子も制御していることが明らかとなった。Chd4 がどのように Aire 依存的遺伝子を制御しているかを明らかにするために ATAC-seq データを調べてみると Aire-induced peak と Chd4-induced peak は一致していなかった。過去の文献より mTEC において Aire はスーパーエンハンサーと呼ばれる制御領域を介して TRA を発現誘導させている可能性が示されていた。そこで、H3K27ac の ChIP-seq 解析を活用し、有意なスーパーエンハンサー領域を抽出し、ATAC-seq データを解析すると、Chd4 はスーパーエンハンサーにおいて Aire と関わっていることが示された。さらに、Brd4 阻害剤を用いた mTEC におけるスーパーエンハンサー活性を低下させた場合において、Aire のみでなく Chd4 依存的遺伝子の発現も低下していることが明らかとなった。以上の結果は、Chd4 は、Aire 依存的な遺伝子発現に関してもスーパーエンハンサーを介して制御していることを示している。さらに、シングル RNA-seq データを活用し、mTEC をサブセットに分けた場合、Aire と Chd4 は 1 つのスーパーエンハンサーを介して、染色体を跨いで遺伝子発現を制御していることが明らかとなった。

最後に、Chd4 の免疫寛容に関する寄与を調べるため、Chd4 cKO マウスの末梢臓器を調べた。Chd4 cKO マウスは T 細胞を含んだ炎症性細胞の浸潤が、唾液腺、腎臓、肺、肝臓などの末梢組織で見いだされた。また、セントラルメモリー CD8T 細胞の増加やエフェクターメモリー CD4T 細胞の増加が脾臓や所属リンパ組織で見出された。さらに、RAG 欠損マウスの末梢組織と Chd4 cKO マウスの血清を用いた実験から、Chd4 cKO マウスの血清中より自己抗体産生が検出された。以上の結果から、胸腺上皮細胞の Chd4 が T 細胞の免疫寛容と自己免疫抑制に重要なタンパク質であることが示された。以上の結果は、2020 年 *Nature Immunology* 誌に掲載され (Tomofuji *et al.*, *Nat. Immunology*, in press)、T 細胞の負の選別機構と自己免疫寛容の分子基盤の理解を飛躍的に向上させた。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiroyuki Takaba and Hiroshi Takayanagi	4. 巻 38, 11
2. 論文標題 The mechanisms of T cell selection in the thymus	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Trends in immunology	6. 最初と最後の頁 805-8016
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.it.2017.07.010	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高場啓之
2. 発表標題 免疫学のセントラルドグマ
3. 学会等名 Conbio2017（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔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
---------------------------	-----------------------	----