

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 1日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21590533

研究課題名（和文）制御性T細胞におけるF o x p 3 c o m p l e xの解析

研究課題名（英文）Analysis of the transcriptional complexes containing Foxp3

研究代表者

大倉 永也（OHKURA NAGANARI）

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授

研究者番号：20300949

研究成果の概要（和文）：

制御性T細胞(Treg)は、免疫恒常性維持に必須の細胞群である。本研究では、Tregの分化誘導因子であるFoxp3に注目し、Foxp3転写コンプレックスを形成する因子の同定を試みた。結果、制御性T細胞の機能に関わる因子としてゲノムオーガナイザー Satb1とT細胞特異的転写因子 Bcl11bを見いだした。Satb1は、制御性T細胞に認められる特異的な脱メチル化パターン形成に必要であり、Bcl11bはFoxp3依存的転写制御に必須の因子であった。これらの結果から、Foxp3は、complexの構成要素に応じた転写制御をおこないTreg抑制活性を発揮していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Regulatory T (Treg) cells engage in the maintenance of immunological self-tolerance. The transcription factor Foxp3 has been recognized as a master regulator of Treg cells, yet the molecular mechanisms by which Foxp3 controls its target genes still remain elusive. By characterizing transcriptional complexes containing Foxp3, we found that the T cell-specific transcription factor Bcl11b and genome organizer Satb1 were important for exerting Treg functions. Bcl11b-deficient Treg cells lost suppressive activity, resulting in the development of severe autoimmune diseases. In Satb1-deficient mice, Treg cells lost the Treg-specific DNA hypomethylation pattern. These results indicate that Bcl11b and Satb1 are essential constituents of Foxp3-containing complexes for exerting Treg-specific transcriptional regulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学

キーワード：制御性 T 細胞、Foxp3, transcriptional complex, 転写制御

1. 研究開始当初の背景

制御性 T 細胞（以下 Treg と略）は、獲得免疫応答の過剰な反応を優性的に抑制する細胞群として、坂口らにより同定された (Fehervari & Sakaguchi, Scientific American)。Treg は、免疫応答を負に制御できることから、自己免疫病、アレルギー等の治療に応用可能である。さらに Treg の増殖、制御能を強化すれば、移植臓器に対する免疫寛容を誘導できる (Sakaguchi & Powrie, Science, 2007)。また逆に正常個体から Treg を除去すると悪性腫瘍に対する有効な免疫応答を惹起、あるいは強化できることから、Treg の量的、機能的操作は、抗腫瘍効果を高めうる可能性がある。しかし、Treg を効果的にコントロールしうる方法、薬剤はいまだ実用化されておらず、臨床応用が待たれている。以前我々は、Foxp3 を介した転写制御機構について、AML1/Runx1 が Foxp3 と結合し転写制御に関与することを明らかにした (Ono et al., Nature, 2007)。また他の研究機関からも NFAT や NFkB との結合が報告されている (Wu et al., Cell, 2006; Bettelli et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2005)。しかしこれらの転写因子群は、Foxp3 との局所的相互作用を 1 : 1 の対応で見たに過ぎない。Foxp3 による転写制御の真の理解には、Foxp3 を発端としてアッセンブリされた巨大転写 complex の全貌を理解し、その制御機構を epigenetic な変化を含めて明らかにしていく必要がある。

2. 研究の目的

近年、Treg の発生、分化のマスター制御遺伝子として、転写因子 Foxp3 が同定された (Hori et al., Science 2003)。Foxp3 の発現は Treg (CD4+, CD25+) に主に限定され、Foxp3 の恒常的発現により通常の T 細胞を Treg へと誘導できる。Foxp3 は forkhead 型転写因子であることから、DNA への直接的結合を介して転写制御を行い、Treg への分化を制御していると考えられる。しかし今のところ、Foxp3 を介した転写調節は、標的遺伝子の多様性、T cell receptor (TCR) 刺激依存的機能発現、同一細胞内における正および負の転写制御など、不明な点が多い。この制御メカニズムの解明は、Treg の分化や、免疫自己寛容などの理解に重要であるばかりでなく、免疫疾患や悪性腫瘍を対象とした創薬の開発に利用できる。そこで本研究では、Treg の成立に必要な転写制御機構の全体像を明らかにすることを目的とし、Foxp3 を核とした転写制御 complex の分離、同定と、その制御メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

Foxp3 発現に伴う 2 次的影響や不要な変異を避けるため、必要時のみ任意に Foxp3 を発現できる細胞株の樹立をまず目指した。これは、doxycycline により発現誘導が可能な tet-ON system を利用することにより行った。FLAG-tag を付加した Foxp3 を tet-ON system により発現するユニットを構築し、Jurkat 細胞に遺伝子導入をおこない、必要な特性を備えた細胞株を樹立した。本細胞を大量培養し、Foxp3 発現誘導後、T cell receptor (以下 TCR と略) 刺激を加え、Foxp3 complex を

Jurkat 細胞内において再構成させた。この状態の細胞から核を分離し、浸透圧による lysis 後 genomic DNA を酵素的に完全に分解し、比重、塩組成調整後、anti-FLAG agarose beads により Foxp3 を含む転写 complex を分離した。Beads に結合した Foxp3 complex は、FLAG peptide を用いて beads から分離し、グリセロール密度勾配超遠心法によりさらに分画した。分画した fraction (1MDa~200KDa) を SDS-PAGE 展開後、MALDI-TOF-MS または LC-MS/MS により構成タンパク質を順次決定し complex 構成タンパク質の同定をおこなった。これら同定した因子は、Foxp3 との相互作用をもつ因子であるかについて多方面から検証を加えたのち、Treg への分化、effector 細胞への抑制活性、および Treg 関連細胞表面マーカー、サイトカイン、転写因子の発現制御への関与について検討を加えた。さらに Foxp3 機能発現への関連が示唆された遺伝子については、遺伝子欠損マウスモデルを入手し、Treg 機能発現における役割について解析を行った。

4. 研究成果

本研究では、制御性 T 細胞の成立に必須な転写因子 Foxp3 に注目し、Foxp3 転写コンプレックスの同定、解析を試み、その制御機構、および制御性 T 細胞の機能発現、分化誘導、制御性 T 細胞特異的遺伝子発現にどのように関わっているのかを明らかにすることを目的とした。質量分析により同定した Foxp3 転写 complex 中、制御性 T 細胞の機能に関わる可能性のある因子として genome organizer Satb1 と T 細胞特異的転写因子 Bcl11b を同定した(図 1)。培養細胞における過剰発現系では、Satb1 および Bcl11b は Foxp3 と特異的に結合することが示された。Satb1 を欠損するマウスでは、制御性 T 細胞に認められる特異的な脱メチル化パターンが消失し、Treg 抑制

機能が失われた。さらにこのマウスでは、末梢 T 細胞内において Foxp3 発現誘導が亢進し、CD4+ T 細胞中に占める Foxp3+ T 細胞率も上昇していた。Foxp3+ T 細胞が多数存在することにもかかわらず自己免疫疾患を発症することから、Foxp3 単独では Treg 抑制機能発現には不十分であることが示唆された。また制御性 T 細胞で特異的に Bcl11b を欠損するマウスを解析した結果、このマウスは Foxp3 欠損マウス (Scurfy mice) と非常に似通った表現型を示し、生後数週間で自己免疫疾患を発症し死に至った(図 2)。さらに遺伝子発現パターンも Foxp3 欠損 Treg と Bcl11b 欠損 Treg とで高い相関を示し、Bcl11b は Foxp3 による転写調節に必須の因子であることが明らかとなった。Bcl11b は Foxp3, Runx1 と巨大 complex を形成し、Treg 機能発現に関わる複数の遺伝子調節領域への結合が認められた。さらにこのマウスでは、制御性 T 細胞内におけるサイトカインの抑制が不十分であり、抑制性分子である CTLA-4 の発現低下も認められた。これらの結果は、Foxp3 に依存した転写調節には、複数の共役因子が必要であり、これらの協調作用により Treg 抑制機能が発揮されることが明らかになった。

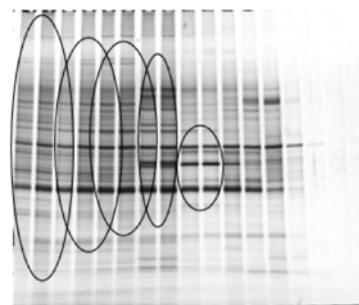


図 1. Foxp3 を含む転写 complex の分離。グリセロール密度勾配超遠心により complex を分画し(x 軸)、濃縮後 SDS-PAGE により構成タンパク質を展開した(y 軸)。これらの complex から Bcl11b および Satb1 を同定した。

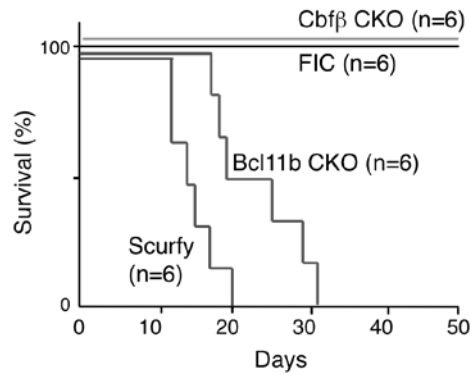


図 2. Treg 特異的に Bcl11b を欠損するマウスにおける生存曲線。Bcl11b 欠損マウスは、Foxp3 欠損マウス (Scurfy mice) と類似した生存曲線を示す。Cbfb を欠損するマウスやコントロール (FIC) マウスでは、致死性は認められない。

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 12 件)

Development and Maintenance of Regulatory T cells. Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. *Immunity*. 2013 Mar 21;38(3):414-23. 査読有り

T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. Ohkura N, Hamaguchi M, Morikawa H, Sugimura K, Tanaka A, Ito Y, Osaki M, Tanaka Y, Yamashita R, Nakano N, Huehn J, Fehling HJ, Sparwasser T, Nakai K, Sakaguchi S. *Immunity*. 2012 Nov 16;37(5):785-99. 査読有り

Treg cells acquire new directions, cytokines navigate. Ohkura N, Sakaguchi S. *Immunity*. 2012 Sep 21;37(3):443-4. 査読無し

Correlation of mutant menin stability with clinical expression of multiple endocrine neoplasia type 1 and its incomplete forms. Shimazu S, Nagamura Y, Yaguchi H, Ohkura N, Tsukada T. *Cancer Sci*. 2011 Nov;102(11):2097-102. 査読有り

Maturation of effector regulatory T cells. Ohkura N, Sakaguchi S. *Nat Immunol*. 2011 Apr;12(4):283-4. 査読無し

FOXP3+ regulatory T cells: control of FOXP3 expression by pharmacological agents. Ohkura N, Hamaguchi M, Sakaguchi S. *Trends Pharmacol Sci*. 2011 Mar;32(3):158-66. 査読有り

HTLV-1 bZIP factor induces T-cell lymphoma and systemic inflammation in vivo. Satou Y, Yasunaga J, Zhao T, Yoshida M, Miyazato P, Takai K, Shimizu K, Ohshima K, Green PL, Ohkura N, Yamaguchi T, Ono M, Sakaguchi S, Matsuoka M. *PLoS Pathog*. 2011 Feb 10;7(2):e1001274. 査読有り

Foxo1 and Foxo3 help Foxp3. Ohkura N, Sakaguchi S. *Immunity*. 2010 Dec 14;33(6):835-7. 査読無し

Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. Ohkura N, Sakaguchi S. *Semin Immunopathol*. 2010 Jun;32(2):95-106. 査読有り

Indispensable role of the Runx1-Cbfbeta transcription complex for in vivo-suppressive function of FoxP3+ regulatory T cells. Kitoh A, Ono M, Naoe Y, Ohkura N, Yamaguchi T, Yaguchi H, Kitabayashi I, Tsukada T, Nomura T, Miyachi Y, Taniuchi I, Sakaguchi S. *Immunity*. 2009 Oct 16;31(4):609-20. 査読有り

A novel modifier of regulatory T cells. Ohkura N, Sakaguchi S. *Nat Immunol*. 2009 Jul;10(7):685-6. 査読なし

MEN1 gene and its mutations: basic and clinical implications. Tsukada T, Nagamura Y, Ohkura N. *Cancer Sci*. 2009 Feb;100(2):209-15. 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

Ohkura N et al. Epigenetic conversion defines the regulatory T cell lineage. 第 41 回日本免疫学会 2012. 12. 5 神戸、日本

Ohkura N. et al. Epigenetic code for the development of regulatory T cells. 第 40 回日本免疫学会 2011. 11. 27、千葉、日本

Ohkura N. et al. Analysis of epigenetic

status in regulatory T cells. 14th International Congress of Immunology, 2010.8.22. Kobe, Japan.

Ohkura N. et al. Indispensable role of Runx complexes for regulatory T cell function. 1st SIGN-IFReC Joint Symposium. 2009.6.17. Singapore, Biopolis

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大倉 永也 (OHKURA NAGANARI)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授

研究者番号：20300949

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし