

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02748

研究課題名(和文) Foxp3結合因子Ikzf1を標的とした新たな免疫応答制御法開発のための基盤研究

研究課題名(英文) Fundamental research for the development of new immune response regulation methods targeting Foxp3 binding factor Ikzf1

研究代表者

市山 健司 (Ichiyama, Kenji)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授(常勤)

研究者番号：60777960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：制御性T細胞(Treg)を標的とした新たな免疫疾患治療法の開発に向けて、Treg機能における転写因子Foxp3とIkzf1の相互作用の役割を中心に解析を進めた。その結果、TregにおいてFoxp3とIkzf1の相互作用が阻害されると、Treg関連遺伝子周辺のエピゲノムが変化し、それに伴ってTreg特異的な遺伝子発現パターンおよびTregの機能安定性が破綻することで過剰な免疫応答が誘導され、最終的に自己免疫疾患様の致死的な炎症が発症することが明らかとなった。さらに、Ikzf1はヒトTregにおいてもその機能安定性維持に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正常個体中に存在する制御性T細胞(Treg)は、異常・過剰な免疫反応の抑制に特化したT細胞群であり、免疫自己寛容、免疫恒常性の維持に中心的な役割を果たしている。そしてその異常は、自己免疫病、アレルギー疾患、炎症性腸炎などの直接的原因となることが知られている。本研究成果は、Tregの機能安定性機構の基礎的理解を発展させた。今後、これら知見を基にヒトTregを標的とし、その量的・機能的増減による、がんや自己免疫疾患、移植臓器拒絶反応に対する新しい免疫応答制御法の開発、医療応用に繋がることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：To develop the new immune disease therapies targeting regulatory T cells (Treg), we examined the role of the interaction between the transcription factors Foxp3 and Ikzf1 in Treg function. The disruption of the interaction between Foxp3 and Ikzf1 in Treg resulted in induction of epigenomic changes around Treg-related genes, which in turn disrupts Treg-specific gene expression patterns and Treg functional stability, leading to excessive immune responses and ultimately to the development of lethal autoimmune disease-like inflammation. Furthermore, Ikzf1 also played an important role in maintaining functional stability of human Treg.

研究分野：分子免疫学

キーワード：Ikzf1 Foxp3 制御性T細胞 転写因子複合体 自己免疫疾患

1. 研究開始当初の背景

免疫システムは、個体にとって有害となる病原体を認識し、それに対して効果的な応答を惹起して病原体から生体を防御する (正の応答)。一方で、自己を構成する生体分子や共生細菌、食物といった異物に対しては過剰に反応しないよう寛容を誘導する (負の応答)。このように、免疫応答は常に正と負のバランスを適度に制御される必要があり、この恒常性維持機構が破綻するとアレルギー疾患や自己免疫疾患等の免疫疾患や免疫不全症となる。免疫システムの恒常性維持には免疫の中核と呼ばれるヘルパーT (Th) 細胞が主要な役割を果たしている。特に、胸腺で産生され積極的に負の応答を促す制御性T細胞 (Treg) は免疫自己寛容の確立・維持において中心的な働きを担っており、自己免疫応答やアレルギー反応、微生物免疫、移植免疫、腫瘍免疫など、あらゆる免疫応答の抑制的制御に関与すると考えられ、その重要性が明らかとなってきている。その為、Treg 発見以降、現在に至るまで世界中で活発に研究が展開されており、なかでも、Treg の分化、維持機構の解明とそれを基にした人為的な制御方法の確立が現在免疫学の重要研究課題の一つと考えられている。

Treg に関して、これまでに転写因子 Foxp3 の遺伝子異常が Treg の分化および免疫抑制機能の障害を引き起こすこと、また Foxp3 の異所的発現によって正常 T 細胞に Treg 機能の一部を付与できることから、Foxp3 は Treg のマスター制御遺伝子であることが報告されている。転写因子や修飾酵素など多くのタンパク質は他のタンパク質や生体高分子と相互作用し、複合体を形成することでその機能を果たすことが知られており、Treg においても Foxp3 が転写因子 AML1/Runx1 および NFAT と複合体を形成し、Treg 特異的な遺伝子発現を制御することが報告されている。しかしながら、NFAT 欠損マウス由来の Treg は正常な免疫抑制機能を有することが報告されており、また、Treg 特異的な AML1/Runx1 欠損マウスは Treg 機能に異常が認められるものの、Foxp3 欠損マウスと比較してその表現型の程度が軽いことから、これら転写因子以外にも Treg 機能において重要な役割を担う新たな Foxp3 結合因子の関与が示唆されている。申請者はこれまでに、Foxp3 複合体を介した Treg による免疫抑制機構の全容解明を目的として、免疫沈降法および質量分析法を用いた新規 Foxp3 結合因子の網羅的探索を行った。具体的には、まずヒト継代 T 細胞である Jurkat 細胞を用いて TET-ON システムにより Flag タグが付与された Foxp3 を過剰発現する細胞を独自で作製した。そして次に、その細胞を用いて抗 Flag 抗体による Foxp3 複合体の免疫沈降を行い、沈降物をグリセロール密度勾配遠心によって分画後、各画分のタンパク質を SDS-PAGE により分離し、ゲルから切り出したバンドを MALDI-TOF MS 解析することで Foxp3 と複合体を形成する新規結合因子の同定を試みた。その結果、興味深いことに、既知の結合因子である AML1/Runx1 や Bcl11b に加えて、転写因子 Ikzf1 を Foxp3 の新規結合因子として同定することに成功した。さらに、Foxp3 との相互作用に必要な Ikzf1 の領域を同定するため、種々の Ikzf1 欠損変異体を作製し、免疫沈降実験を行ったところ、Ikzf1 は自身の exon 5 領域(IkE5)を介して Foxp3 と複合体を形成することを見出した。

2. 研究の目的

本研究では、免疫自己寛容の確立と維持に不可欠である Treg の免疫抑制機能における新規 Foxp3 結合転写因子 Ikzf1 の生理的役割を分子レベルで明らかにし、それを基にした Treg 機能の人為的制御による画期的な免疫疾患治療法を提唱するための分子基盤の確立を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、Treg の免疫抑制機能における Ikzf1 の生理的意義の解明を目指し、次世代シーケンサーを用いた遺伝子改変マウスの網羅的解析を通して主に以下の3項目について研究を遂行した。(1)新規 Foxp3 結合因子、Ikzf1 の Treg 特異的変異マウスの表現型解析、(2)Ikzf1 の Treg 機能における役割およびその制御機構の解明、(3)ヒト Treg における IKZF1 の機能解明。

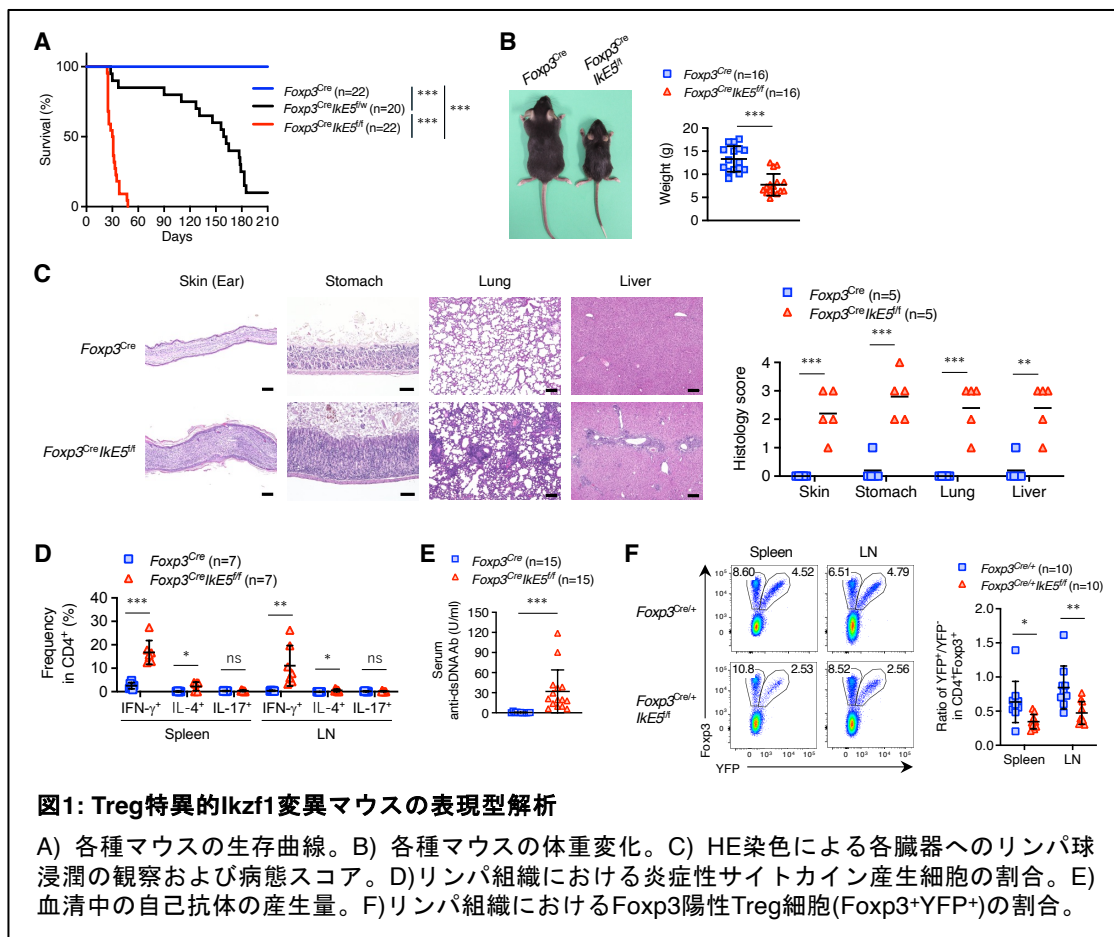
4. 研究成果

(1) 新規Foxp3結合因子、Ikzf1のTreg特異的変異マウスの表現型解析

転写因子Ikzf1とFoxp3の相互作用がTreg機能に及ぼす役割を検討するため、Treg特異的にIkzf1のFoxp3結合部位欠失変異体が発現する遺伝子改変マウス(Foxp3^{Cre}IkE5^{fl/fl})を独自に作製し、その表現型解析を中心に研究を遂行した。具体的には、まず、遺伝子改変マウスの生存曲線の作成および体重推移の測定を行うことで、遺伝子改変マウスが自然発生的に何か異常を示すかどうか

確認を行った。その結果、遺伝子改変マウスはコントロールマウスと比較して、顕著な体重減少を伴って早期に死亡することが明らかとなった(図1A,B)。そこで次に、早期死亡の原因が自己免疫疾患様の病態によるものかどうか検討するため、マウスの各臓器をHE染色し、さらに血清中の自己抗体を含む各種抗体産生およびサイトカイン産生を測定することで炎症等の異常症状の有無を確認した。その結果、遺伝子改変マウスでは各臓器にリンパ球の著しい浸潤が認められ、また血清中の自己抗体の産生増強やリンパ組織における炎症性サイトカイン産生細胞の増強が観察されたことから、自己免疫疾患様の激しい炎症が生じていることが明らかとなった(図1C-E)。また同時に、遺伝子改変マウス由来の脾臓やリンパ節に存在するTreg細胞の割合もFACS解析により確認したところ、遺伝子改変マウスにおいてTregの割合が有意に減少することが見出された(図1F)。

以上の結果から、TregでIkzf1とFoxp3の相互作用が消失することでマウスが自己免疫性の炎症疾患により早期に死亡し、Tregの分化、維持もしくは増殖に異常が生じることが明らかとなった。



(2) Ikzf1-Foxp3相互作用のTreg機能における役割およびその制御機構の解明

Ikzf1とFoxp3の相互作用阻害がTreg機能に及ぼす影響を詳細に検討するため、Treg特異的Ikzf1変異マウス由来のTregを用いてそのbiology解析を行った。まず、Treg関連遺伝子発現に及ぼす影響を検討するために、変異マウス由来のTregを用いてRNA-seq解析を行った。その結果、Ikzf1変異Tregでは通常発現が抑制されている様な遺伝子、例えばIFN- γ やIL-2の様な炎症性サイトカインの発現が顕著に上昇することが明らかとなった(図2A,B)。さらに、in vitroおよびin vivoの系を用いてTregの免疫抑制能に及ぼす影響も解析したところ、Ikzf1変異Tregは正常のTregと比較して免疫抑制の機能安定性が低下することも見出した(図2C)。興味深いことに、これらIkzf1変異Tregにおける機能安定性の異常は、IFN- γ に対する中和抗体である抗IFN- γ 抗体を処理することでキャンセルされた(図2D)。このことから、過剰なIFN- γ 産生がIkzf1変異Tregの機能安定性異常の主な原因である事が示唆された。

Foxp3は標的遺伝子のエンハンサーやプロモーター領域に結合してその転写活性を制御することが知られている。そこで次に、Ikzf1によるTreg関連遺伝子制御のより詳細な分子機構の解明を目的として、Ikzf1変異TregにおけるFoxp3結合の変化やエピゲノムの変化をChIP-seq解析およびATAC-seq解析で確認した。その結果、Ikzf1とFoxp3の相互作用阻害により、Foxp3の結合

パターンが変化し、特に、Foxp3の結合増強に伴ってクロマチン構造もクローズ型(転写抑制型)からオープン型(転写活性型)に変化することが明らかとなった(図2E,F)。

以上の結果から、TregでIkzf1とFoxp3の相互作用が欠失することでTreg関連遺伝子周辺のエピゲノムが変化し、それに伴ってTreg特異的な遺伝子発現パターンの破綻およびTregの免疫抑制能の異常が生じることが明らかとなった。

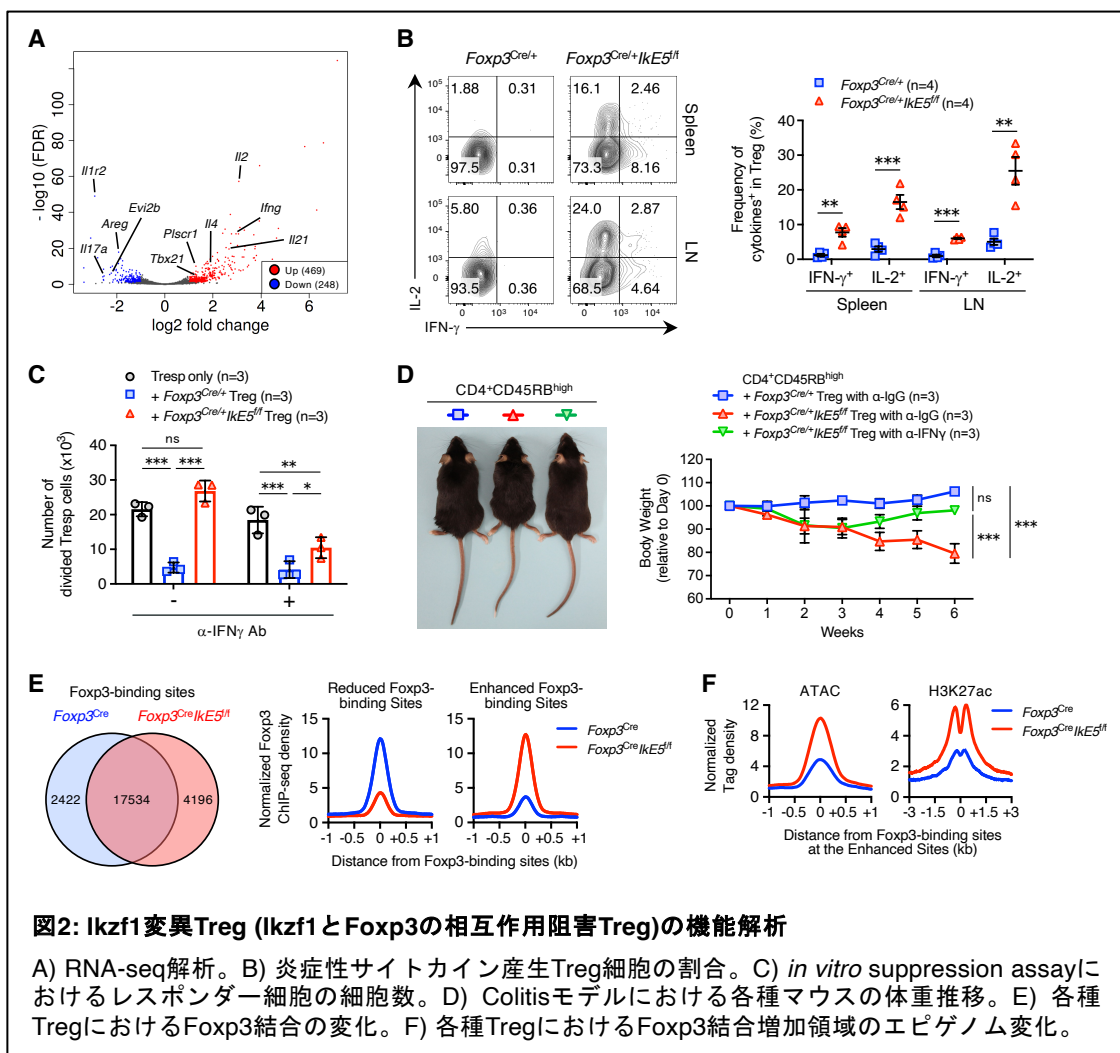


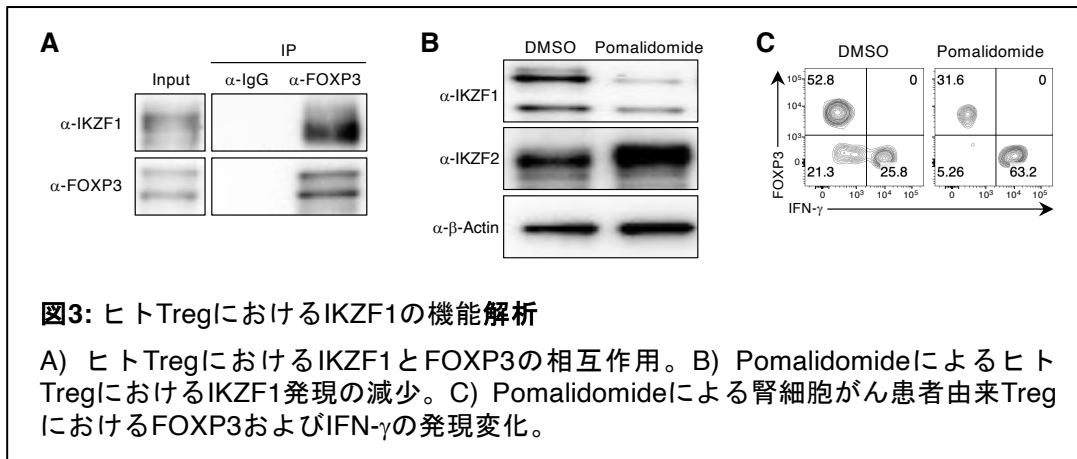
図2: Ikzf1変異Treg (Ikzf1とFoxp3の相互作用阻害Treg)の機能解析

A) RNA-seq解析。B) 炎症性サイトカイン産生Treg細胞の割合。C) *in vitro* suppression assayにおけるレスポナー細胞の細胞数。D) Colitisモデルにおける各種マウスの体重推移。E) 各種TregにおけるFoxp3結合の変化。F) 各種TregにおけるFoxp3結合増加領域のエピゲノム変化。

(3) ヒト Treg における IKZF1 の機能解明

Ikzf1とFoxp3の相互作用を標的とした新たな免疫疾患治療法の開発に向けて、ヒトTregにおけるIKZF1の役割について検討を行った。具体的には、まず、ヒトTregでもマウスと同様にIkzf1とFoxp3が相互作用するか確認するため、健康人末梢血由来のTregを用いてFOXP3を標的とした免疫沈降実験を行った。その結果、ヒトTregにおいてもIKZF1がFOXP3と相互作用して複合体を形成することが明らかとなった(図3A)。次に、ヒトTregにおけるIKZF1の役割を検討するため、IKZF1のloss-of-function実験を行った。サリドマイド誘導体であるポマリドマイド(Pomalidomide)はIKZF1の強力な分解誘導剤であることが知られている。実際に、PomalidomideがヒトTregでもIKZF1の分解を誘導するかどうか検討したところ、健康人末梢血由来のTregにおいてPomalidomide処理でIKZF1の発現がコントロール(DMSO)と比較して顕著に減少することが確認された(図3B)。そこで次に、PomalidomideがヒトTregの機能に及ぼす影響を確認したところ、腎細胞がん患者由来のTregにおいてPomalidomide処理によりFOXP3発現が顕著に低下し、それに伴ってIFN-γの産生が増加することを見出した(図3C)。

以上の結果から、ヒトにおいてもIKZF1はTregの機能安定性維持に重要な役割を担っている可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kenji Ichiyama, Jia Long, Yusuke Kobayashi, Yuji Horita, Takeshi Kinoshita, Yamami Nakamura, Chizuko Kominami, Katia Georgopoulos, Shimon Sakaguchi	4. 巻 -
2. 論文標題 Ikzf1 association with Foxp3 for Foxp3-dependent gene repression in Treg cells: induction of autoimmunity and tumor immunity by disrupting the association	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2023.08.12.553084	査読の有無 無
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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kenji Ichiyama
2. 発表標題 Exon 5 of Ikzf1 is required for Foxp3-dependent gene suppression to maintain the homeostasis of regulatory T cells.
3. 学会等名 The 51st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 市山健司
2. 発表標題 SRC2 and SRC3 cooperatively regulate Th17 cell development.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenji Ichiyama
2. 発表標題 Ikzf1 association with Foxp3 for Foxp3-dependent gene repression in Treg cells: induction of autoimmunity by disrupting the association
3. 学会等名 Keystone Symposia, Systemic Autoimmune and Autoinflammatory Diseases (B2) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 市山健司
2. 発表標題 Foxp3は転写因子Ikzf1との相互作用を介して制御性T細胞の機能安定性を制御する
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 腫瘍の予防およびまたは治療剤	発明者 市山健司、坂口志文、堀田裕司、木下武士	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2023/025690	出願年 2023年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Harvard Medical School		