〔別紙２〕

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏　名　　木村　翔彦

本論文において申請者は、forkhead（FKH）転写因子 Foxp3 および Foxo1 による制御性 T（regulatory T, Treg）細胞の遺伝子発現制御機構について研究し、1 アミノ酸残基の違いによって規定されるそれぞれの DNA 認識特性が重要であることを明らかにした。

本論文の研究成果

1. 研究の背景と作業仮説　Foxp3 を発現する Treg 細胞は自己免疫など病的な免疫応答の抑制において中心的な役割を担い、生体の恒常性維持に不可欠である。Foxp3 は Treg 細胞の分化および機能に必須であるが、加えて近年 Foxo1 も Treg 細胞の分化および機能に重要であることが報告されている。しかしながら、これら FKH 転写因子を介した Treg 細胞の遺伝子発現制御機構は未解明の点が多く残されている。

申請者は、ヒト immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked（IPEX）症候群患者が有する Foxp3 の 1 アミノ酸置換変異 A384T（Ala384 の Thr への置換）において見られる表現型から研究開始に至る洞察を得た。A384T 変異は FKH 転写因子間で良く保存された DNA 認識部位に位置し、新たな DNA 結合特異性を賦与する gain-of-function 変異であった。また P サブファミリー以外の FKH 転写因子における当該アミノ酸は Ser または Thr であり、DNA と相互作用することが報告されている。これらの知見から申請者は、当該アミノ酸残基が FKH 転写因子の DNA 結合活性および遺伝子発現制御活性を規定する一つの重要な因子であるという作業仮説を立てた。この仮説を検証するため、Foxp3 の Ala384 を Ser または Thr と置換した変異体（A384S および A384T）、Foxo1 の Ser209 を Ala または Thr と置換した変異体（S209A および S209T）を作製し、当該アミノ酸残基の機能解析を行った。

2. Foxp3 Ala384 の機能解析　申請者は Foxp3 の Ala384 が DNA 結合活性と遺伝子発現制御活性に与える影響について解析を行った。Electrophoretic mobility shift assay（EMSA）により Foxp3 変異体の結合活性を比較したところ、A384S および A384T は FKH 転写因子が共通して認識する canonical 配列 GTAAACA に対する結合活性を野生型（WT）よりも増強しており、加えて WT が認識しない類似した “atypical” 配列 GTCAACA などに対して新たに結合能を獲得していることがわかった。これらの結果は、Foxp3 では Ala 残基がこれらの FKH モチーフ配列との結合活性を減弱するために重要であることを示唆する。変異が Foxp3 の遺伝子発現制御活性に与える影響を調べるため、Foxp3 変異体をレトロウイルス（RV）により導入した $CD4^{+}Foxp3^{-}$ T 細胞を RNA-seq およびフローサイトメトリー（FCM）を用いて解析した。この際 Foxp3 標的遺伝子として、A384T 変異によって発現が抑制される転写因子をコードした *Batf* と、Treg 細胞の抑制機能に重要である *Ctla4* に注目した。RNA-seq 解析の結果、A384S は WT と A384T の中間の遺伝子発現制御活性を有することがわかった。そして A384S は A384T と同様に *Batf* 発現を選択的に抑制し、*Ctla4* など他の Foxp3 標的遺伝子の発現を WT と同程度に誘導した。*Batf* プロモーターレポーターアッセイの結果、A384S は A384T と同様に WT よりも *Batf* プロモーター活性を強く抑制し、その抑制効果は FKH モチーフ配列依存的であることがわかった。これらの結果から、A384S は A384T と同様の DNA 結合の gain-of-function 変異であり、両者は類似した遺伝子発現制御活性を有することが示唆された。このことは逆に言えば、Foxp3 では当該アミノ酸が Ala であることが *Batf* など特定の遺伝子の発現制御に重要であることを意味している。

3. Foxo1 Ser209 の機能解析　以上の結果は、対照的に他の FKH 転写因子では Ser 残基が DNA

結合活性および遺伝子発現制御活性に重要である可能性を示唆している。そこで申請者は、Foxo1 の当該アミノ酸 Ser209 の機能解析を行った。まず Foxo1 が認識する FKH モチーフ配列を同定するため、Treg 細胞および通常型 T（Tconv）細胞の Foxo1 ChIP-seq 解析を行った。その結果、Foxo1 は FKH モチーフ配列として GTAAACA、GTCAACA および insulin response element（IRE）配列 CAAAACA を認識することが示唆された。これらの配列に対する Foxo1 変異体の DNA 結合活性を EMSA により調べたところ、S209A および S209T は GTAAACA および GTCAACA に対して WT と同程度に結合した一方で、CAAAACA に対する結合活性を大きく低下していた。これらの結果から、Foxo1 において Ser209 は canonical 配列や “atypical” 配列などの FKH モチーフ配列との結合活性には顕著な影響を及ぼさないが、IRE 配列認識に不可欠であることが明らかになった。

申請者は Foxo1 による Treg 細胞の遺伝子発現制御について調べるため、2 種類の Foxo1 コンディショナルノックアウト（cKO）マウス（*Foxp3*$^{\mathrm{YFPCre/hCD2}}$*Foxo1*^{flox} 雌および *ROSA26*$^{\mathrm{CreERT2}}$*Foxo1*^{flox}）を作製し、FCM、RNA-seq および定量 PCR を用いて解析した。*Foxp3*$^{\mathrm{YFPCre/hCD2}}$*Foxo1*^{flox} 雌マウスの解析の結果、Foxo1 は Treg 細胞の二次リンパ組織局在に重要であり、BATF や CTLA-4 など多数の Treg 細胞機能分子の発現を制御することが明らかになった。また *ROSA26*$^{\mathrm{CreERT2}}$*Foxo1*^{flox} マウスの解析から、Foxo1 による BATF 発現制御は T 細胞受容体を介した刺激に依存的であり、Tconv 細胞ではほとんど見られず、Treg 細胞の ICOS^{lo} 分画においてのみ見られることがわかった。Ser209 が Foxo1 の BATF および CTLA-4 発現誘導活性に重要である可能性について検討するため、*ROSA26*$^{\mathrm{CreERT2}}$*Foxo1*^{flox} マウスより作製した Foxo1 cKO T 細胞に対して RV により Foxo1 変異体を導入して FCM 解析を行った。その結果、Treg 細胞において S209A および S209T は WT と比べて BATF および CTLA-4 発現誘導能が低いことがわかった。しかし S209A 変異によって Foxo1 の FKH モチーフ配列依存的な *Batf* プロモーター賦活能は障害されなかった。これらの結果から、Foxo1 において Ser209 は BATF や CTLA-4 発現制御活性に重要である一方で、S209A 変異による Foxo1 の BATF 発現誘導能の低下はプロモーター活性以外の要因によることが明らかになった。

<u>4. A384T Foxp3 による Foxo1 の機能障害の可能性の検討</u>　当該アミノ酸残基が Foxp3 と Foxo1 の DNA 認識特性および遺伝子発現制御活性を決定する重要な因子であることがわかったが、仮説から派生した疑問がある：A384T Foxp3 が高い DNA 結合活性により Foxo1 の DNA 結合および遺伝子発現制御機能を障害することで BATF 発現を抑制する可能性が考えられた。申請者はこの可能性を検討するため、ChIP-seq および A384T ノックイン Foxo1 cKO マウス（*Foxp3*$^{\mathrm{A384T}}$*ROSA26*$^{\mathrm{CreERT2}}$*Foxo1*^{flox}）を用いて A384T Foxp3^{+} Treg 細胞における Foxo1 の DNA 結合および機能分子発現制御活性を解析した。A384T Foxp3^{+} Treg 細胞の Foxo1 ChIP-seq の結果、*Batf* プロモーターを含む全ゲノムレベルにおいて、A384T Foxp3 が WT Foxp3 よりも強く結合する領域で Foxo1 の結合 peak 強度が低下する傾向はほとんど見られなかった。また A384T Foxp3^{+} Treg 細胞において Foxo1 の BATF および CTLA-4 発現誘導活性は障害されていなかった。これらの結果から、A384T Foxp3 が WT Foxp3 と比べて強く DNA に結合することにより Foxo1 の DNA 結合を阻害する傾向はほとんど見られず、A384T Foxp3 の示す BATF 発現抑制活性は Foxo1 による BATF 発現誘導の障害によるものではないことがわかった。

<u>5. Foxp3 と Foxo1 の競合関係に関する考察</u>　申請者は研究の総括として Foxp3 と Foxo1 の競合関係について考察した。過去の報告において、Treg 細胞の分化に伴って Foxp3 が Foxo1 を置き換える可能性など、Foxp3 と Foxo1 は同様の配列認識により競合関係にあると提唱されている。申請者はこの報告と本論文の研究結果を総合し、1 アミノ酸残基の違いによって Foxp3 と Foxo1 が異なる DNA 結合特異性を有していることから、両者の競合関係が標的遺伝子に依存している可能性を考察した。Canonical 配列 GTAAACA に対しては、Foxp3 と Foxo1 がともに結合でき、実際に競合関係が報告されている *Jak1* 遺伝子近傍の結合 peak 領域には GTAAACA が存在するなど、両者が共通の配列認識により競合する可能性があることに言及している。一方

“atypical” 配列 GTCAACA などに対しては、Foxp3 は Ala384 によって結合活性を失っており、これらの配列を制御領域に有する *Batf* などの遺伝子発現制御において両者は競合しないと推測される。また IRE 配列 CAAAACA に対しては、Foxo1 は Ser209 によって結合活性を有し、Foxp3 とは異なる遺伝子発現制御を行う可能性が考えられる。したがって、FKH 転写因子群の進化の過程で Foxp3 など P サブファミリーの当該アミノ酸が Ser から Ala に変化することが、遺伝子発現制御における競合を避けるために重要であったのではないかと考察した。

本論文の研究に対する評価

1. 本論文における申請者の研究方法と考察　申請者は本論文の序論において、研究領域である免疫学分野および研究背景に対する深い理解度を示した。免疫寛容の成立において中心的な役割を担う Treg 細胞の機能的側面や、Foxp3 および Foxo1 による Treg 細胞の機能制御について過去の報告を踏まえて詳細に論じている。その上で先行研究から得られた知見に基づき、1 アミノ酸残基の違いが FKH 転写因子の DNA 結合活性と遺伝子発現制御活性の決定因子であるという妥当な作業仮説を立てた。この仮説は FKH 転写因子間のアミノ酸配列アライメントから 1 アミノ酸残基の重要性を推測したものであり、鋭い洞察力と興味深い着眼点によるものである。

申請者はまず Foxp3 の Ala384 が DNA 結合特異性とそれを介した遺伝子発現制御活性を規定する重要な因子であることを明らかにした。A384S が A384T と同様に WT よりも強く FKH モチーフ配列に結合することから、Foxp3 では Ala384 がこれらの配列に対する結合能の低下に寄与することを示した。他の FKH 転写因子は当該位置の Ser 残基を介して DNA と相互作用することから、A384S/T においても同様に Ser/Thr 残基を介した結合が FKH モチーフ配列に対する結合活性を高めている可能性を考察している。さらに当該アミノ酸残基がリン酸化など翻訳後修飾を受ける可能性も考慮し、変異が DNA 結合活性や蛋白安定性に与える影響について包括的に議論している。また Foxp3 による制御対象遺伝子として *Batf* に着目し、A384S が A384T と同様に内在性 *Batf* 発現を抑制し、また *Batf* プロモーター活性を FKH モチーフ配列依存的に WT よりも強く抑制することを示した。これらの実験は Foxp3 の Ala384 を介した DNA 認識特性と遺伝子発現制御活性を関連付け、Foxp3 では Ala384 によって限定された FKH モチーフ配列に対する結合特異性が *Batf* の発現制御に重要であることを明瞭に示した。

Foxp3 変異体の解析により得られた知見から、Foxo1 では Ser209 が DNA 結合活性と遺伝子発現制御活性の決定因子である可能性が考えられた。この可能性を検討するため Foxo1 Ser209 の機能解析を行った結果、Ser209 が Foxo1 の IRE 配列認識と BATF および CTLA-4 発現制御活性に重要であることが明らかになった。申請者はまず ChIP-seq 解析により Foxo1 の結合する FKH モチーフ配列を調べ、Foxo1 が認識することが示唆された配列に対する Foxo1 変異体の結合活性を EMSA により評価した。これら一連の実験設計は合理的な論理の流れに沿っている。EMSA の結果、Foxo1 Ser209 は canonical 配列および “atypical” 配列の認識には顕著な影響を与えず、IRE 配列認識に必須であることがわかった。申請者は当該アミノ酸残基が Foxp3 と Foxo1 の DNA 認識特性に対して異なる影響を与える点について、結晶構造解析の報告を踏まえて詳細に考察している。また FKH 転写因子の DNA 認識における当該アミノ酸残基以外の構造的差異の必要性などを議論し、その原理・法則性をより深く追究する展望を示している。

申請者は Foxo1 の Treg 細胞における遺伝子発現制御活性を調べるため、2 種類の Foxo1 cKO マウスを用いて解析を行った。*Foxo1* など Treg 細胞の機能に重要である遺伝子を Treg 細胞選択的に欠損させると、機能的な Treg 細胞が分化しないことにより自己免疫疾患を発症し、炎症環境に起因する遺伝子発現プロファイルの撹乱が生じる。そこで申請者は、*Foxp3* 遺伝子の位置する X 染色体の不活化機構を利用して WT および Foxo1 cKO Treg 細胞をヘテロに有することで自己免疫疾患を発症しない Foxo1 cKO 雌マウスを作製し、炎症による副次的影響を排除するなど適切な実験手法を用いている。さらに CreERT2 による inducible な Foxo1 cKO マウスを用いて Treg 細胞と Tconv 細胞における Foxo1 の遺伝子発現制御活性の違いを調べ、また同

マウスより作製したFoxo1 cKO T細胞を用いてRVによる変異体導入実験を行うことでSer209を介したFoxo1のBATFおよびCTLA-4発現誘導活性について解析した。これらの実験系は、多様な遺伝子型のマウスの性質を十分に理解し、研究課題の解決に向けて合理的に設計されている。そして、S209AがWTと同程度にFKHモチーフ配列依存的な*Batf*プロモーター賦活能を有することから、Foxo1のSer209非依存的なFKHモチーフ配列認識と遺伝子発現制御の関係を示した。またFoxo1のSer209を介したIRE配列認識と遺伝子発現制御の関係について、IRE配列が存在する*Ctla4*プロモーターのレポーターアッセイにより解析する展望を示している。

申請者は仮説から派生した疑問として、A384T Foxp3がFoxo1のDNA結合および遺伝子発現制御活性を障害する可能性を検討した。解析の結果、A384T Foxp3によるBATF発現抑制がFoxo1の機能に対する障害によるものではないことが明らかになった。申請者は、A384T Foxp3がFoxo1の*Batf*プロモーターへの結合を障害しない理由として、両者の結合箇所がわずかに異なることを考察している。*Batf*プロモーターに存在する5つのFKHモチーフ配列のうち、Foxp3の結合は転写開始点（TSS）近傍の3つに、Foxo1の結合はTSSから遠い2つに集中していることを指摘した。この考察は得られたデータを緻密に観察してなされたものである。またChIP-seqで見られるFoxo1の結合peakの変化について、WTおよびA384T Foxp3^{+} Treg細胞の活性化状態の違いに言及するなど多様な可能性に配慮した的確な考察を行っている。

申請者は本論文の総括として、得られた研究結果を過去に報告されたFoxp3とFoxo1の競合関係と照らし合わせ、1アミノ酸残基によって規定されるFoxp3とFoxo1のDNA結合活性が両者の標的遺伝子を変化させ、競合を避けるために重要であるという可能性を提示した。さらにChIP-seq解析によりFoxp3とFoxo1のDNA結合を比較し、FKHモチーフ配列認識との関係についてもデータを示して考察している。申請者はこれらの考察を通して、FKH転写因子による遺伝子発現制御機構について新たな概念を提唱することにより本論文の研究を締め括った。

<u>2. 申請者の研究遂行能力</u>　申請者は研究課題の解決に向けて多面的なアプローチを行っている。EMSA、定量PCRといった分子生物学的手法と、マウスT細胞を用いたFCMなど細胞生物学的手法を組み合わせ、課題に応じて多様な実験系を設計して遂行した。加えて申請者は、EMSA用蛋白やRVベクターの設計・作製に要するクローニングなど遺伝子工学の技術や、RNA-seqおよびChIP-seqといった次世代シーケンシングによるhigh-throughput解析と得られた大規模データを用いたクラスター解析など遺伝子発現プロファイリングや結合peak強度のゲノムワイドな比較などバイオインフォマティクス的手法・概念にも通じている。これらの体系化された多様な実験技術・知識は今後の研究活動に大いに資すると期待される。

申請者は得られたデータに対して適切な解析を行っている。RVによるFoxp3およびFoxo1変異体導入実験では、RV導入レベルに対応した標的分子やレポーターの発現レベルを提示するなど、変異体による遺伝子発現制御についてdose dependencyを示す妥当な解析を行っている。またTreg細胞のFCM解析では、ICOSなどマーカー分子によって識別したsubsetに分離して蛋白発現レベルを比較するなど、ヘテロな細胞集団の構成を考慮している。これらのことから、申請者は実験に応じた適切な解析手法を選択して実践できると考えられる。

申請者は研究結果について詳細かつ十分に考察している。アミノ酸残基の変化がFKH転写因子のDNA結合活性に与える影響について、DNAとの相互作用、翻訳後修飾、蛋白安定性や核局在など様々な可能性に言及して考察している。またFKH転写因子のDNA結合パターンの変化について、ヘテロな細胞集団の活性化状態の違いも考慮して慎重に議論している。さらに本論文の研究はマウスを用いているが、ヒトの病態との関連や配列との相同性も考慮し、ヒトの疾患治療に向けた応用研究も視野に入れて考察している。最終的には研究結果と過去の報告を総合した新たな概念の提唱により研究を結んでおり、申請者は研究全体を通して高い考察力を示した。

したがって、本論文の研究は質、量ともに申し分ない水準であり、申請者は独立した研究者として研究を遂行できる非常に優れた能力を有していると考えられる。よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。