

論文の内容の要旨

論文題目 **Critical role of genomic enhancer in converting TCR signal to apoptosis in thymic negative selection**
(胸腺ネガティブ選択においてTCRシグナルをアポトーシスに導くエンハンサーの同定と解析)

氏 名 荒井 未来

【研究背景】

T細胞は獲得免疫の中心を担う細胞である。それぞれのT細胞は、細胞ごとに異なる1種類のT細胞受容体(T cell receptor ; TCR)をその表面に発現しており、TCRによって異物を認識する。T細胞は胸腺で分化するが、その際、遺伝子再構成によって膨大なTCRレパートリーが作られる¹。これによって、生体は未知の病原体をも排除可能としている。しかし、出来上がったTCRの中には自己を認識するものも含まれる。この自己応答性T細胞を排除するため、T細胞は分化の際、ネガティブセレクションとよばれる過程を経験する。ネガティブセレクションでは、出来上がったTCRに対して、主要組織適合遺伝子複合体(major histocompatibility complex ; MHC)に自己抗原(self-peptide)がのったもの(self-pMHC)が提示される¹。Self-pMHCに高い親和性を示すTCRを発現するT細胞は自己応答性とみなされ、アポトーシスによって排除される¹。ネガティブセレクションにはアポトーシス促進遺伝子 *Bim* が必須であることが過去の研究から示されている^{2,3}。しかし、self-pMHCとの結合によるTCR刺激がどのように*Bim*へと伝わるのかについては、不明な点が多い。また*Bim*はネガティブセレクション以外にも、発生過程における四肢の水かきの消滅、抹消での免疫機能の恒常性維持など様々な過程で働くユビキタな遺伝子である^{2,3}。その*Bim*が胸腺におけるネガティブセレクション時にどのような制御を受けているのかも不明である。

本研究では上記の問いに答えるため、エンハンサーに着目した。エンハンサーとは細胞種及びシグナル依存的な遺伝子の発現を規定するゲノム領域である⁴。我々は、*Bim*近傍に胸腺で特異性の高いエンハンサー領域、 E^{BAB} を同定した。 E^{BAB} ノックアウトマウス(ΔE^{BAB} マウス)の胸腺細胞は、TCRシグナルによって誘導されるアポトーシス及び*Bim*の発現に不全を示した。しかし、 ΔE^{BAB} マウスは抹消及び制御性T細胞の恒常性に異常を示さなかった。したがって E^{BAB} は、胸腺ネガティブセレクション特異的に*Bim*の発現を制御しているエンハンサー領域であることが示された。

【結果・考察】

ΔE^{BAB} 胸腺には high affinity TCR clone が蓄積する

我々はまず公共の ChIP-seq データを用いて、H3K27ac^{high}かつ H3K4me3^{low}であるエンハンサー候補領域⁴を探索し、*Bim* 近傍に胸腺で特異性の高いエンハンサー候補領域を発見した。これを E^{BAB} と名づけ、 E^{BAB} の生理的機能を明らかにすべく、 E^{BAB} ノックアウトマウス (ΔE^{BAB} マウス) を作成した。

まず ΔE^{BAB} 胸腺細胞を anti-CD4 抗体及び anti-CD8 抗体で染色し、 E^{BAB} の T 細胞分化過程に対する影響を調べた。 ΔE^{BAB} マウスでは CD4/CD8 の分布に変化がみられ、double negative (DN)、CD4 single positive (CD4 SP)、CD8 SP の割合が増加、double positive (DP) の割合が減少していた。その原因を探るため、胸腺細胞の RNA-seq を行った。その結果、自己抗原に対して高い親和性を示す TCR を発現しているクローン (high affinity TCR clone) に特徴的な遺伝子の発現が上昇していた。そこで、胸腺細胞を anti-TCR β 抗体及び anti-CD69 抗体で染色し、 ΔE^{BAB} 胸腺における high affinity TCR clone の蓄積を調べた。 ΔE^{BAB} 胸腺では、TCR β ^{high}/CD69^{high} 集団の割合が上昇している様子が観察されたことから、high affinity TCR clone が蓄積していると考えられた。

ΔE^{BAB} 胸腺細胞は TCR シグナル依存的なアポトーシスの不全を起こす

ΔE^{BAB} 胸腺において high affinity TCR clone が蓄積することから、我々は、 ΔE^{BAB} マウスがネガティブセレクションにおけるアポトーシスに異常をきたしているという仮説を立てた。まず野生型 (WT) および ΔE^{BAB} 胸腺細胞に anti-CD3 抗体及び anti-CD28 抗体を処理することで *ex vivo* でネガティブセレクション過程を模し、その際のアポトーシス細胞の割合を AnnexinV/PI 染色により計測した。 ΔE^{BAB} では WT と比較して、TCR シグナル依存的な初期アポトーシス細胞 (Annexin V⁺/PI⁻) の割合が減少していた。

次に、OT-II transgenic system (OT-II tg) を用い、上記の仮説を *in vivo* で検証した。OT-II tg マウスの T 細胞は、chicken ovalbumin 323-339 残基 (OVA₃₂₃₋₃₃₉) を認識する TCR を発現している^{2,5}。我々は、WT; OT-II tg, $E^{BAB+/-}$; OT-II tg, ΔE^{BAB} ; OT-II tg マウスを作成し、それぞれに OVA₃₂₃₋₃₃₉ 及びコントロールとして OVA₂₅₇₋₂₆₄ を腹腔内投与し、72 時間後の胸腺細胞の様子を anti-CD4/CD8 抗体染色によって調べた。WT; OT-II tg, $E^{BAB+/-}$; OT-II tg では、OVA₃₂₃₋₃₃₉ の腹腔内投与によって、CD4 SP の割合の顕著な減少が観察された。この減少は、 ΔE^{BAB} ; OT-II tg ではレスキューされていた。以上の結果から、 E^{BAB} はネガティブセレクションにおける high affinity TCR clone の除去に必須であると考えられた。

E^{BAB} は TCR シグナル依存的な *Bim* の発現に必須である

次に我々は、 ΔE^{BAB} 胸腺細胞の TCR シグナル依存的なアポトーシス不全が、 E^{BAB} 近傍のアポトーシス促進遺伝子 *Bim* の発現異常によるものであるという仮説を立てた。まず、WT 及び ΔE^{BAB} 胸腺細胞に anti-CD3/CD28 抗体で刺激を与え、その際の *Bim* の発現を qRT-PCR によって調べた。

WTと比較して ΔE^{BAB} では、刺激による *Bim* の発現上昇の程度は低かった。このとき、TCR シグナル強度のマーカー遺伝子である *Nr4a1* の発現は、WTと ΔE^{BAB} とで同程度であった。

次に、TCR シグナル依存的な *Bim* の発現をより生理的な条件で調べるために、 $TCR\beta^{high}/CD69^{high}$ 胸腺細胞 (TCR activated) と $TCR\beta^{low}/CD69^{low}$ 胸腺細胞 (TCR inactivated) とをセルソーターで分け、それぞれにおける *Bim* の発現を測定した。 $TCR\beta^{high}/CD69^{high}$ における ΔE^{BAB} の *Bim* の発現は WTと比較して低かった。 $TCR\beta^{low}/CD69^{low}$ においても ΔE^{BAB} の *Bim* の発現は WTと比較して低い傾向であったものの、 $TCR\beta^{high}/CD69^{high}$ における影響の方がより顕著であった。以上より、 E^{BAB} は TCR シグナル依存的に *Bim* を制御することで、ネガティブセレクションに貢献していることが示された。

E^{BAB} は抹消 T 細胞及び制御性 T 細胞の恒常性に影響を及ぼさない

胸腺内で分化、成熟した T 細胞は抹消へと流出する。また、胸腺内の high affinity TCR clone の一部はネガティブセレクションを免れ、制御性 T 細胞へと分化し、抹消で過剰な免疫応答を抑制するはたらきをする。*Bim* KO マウスでは、抹消 T 細胞及び制御性 T 細胞の数が増加することが報告されている^{2,3}。そこで我々は、 ΔE^{BAB} マウスの抹消 T 細胞及び制御性 T 細胞の数を調べた。 ΔE^{BAB} マウスでは、抹消 T 細胞、制御性 T 細胞いずれの数の増加もみられなかった。したがって、 E^{BAB} の機能は胸腺ネガティブセレクションに特異的であることが示された。

【参考文献】

1. Klein, L., Kyewski, B., Allen, P.M. & Hogquist, K.A. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol* **14**, 377-391 (2014).
2. Bouillet, P. *et al.* BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* **415**, 922-926 (2002).
3. Labi, V. *et al.* Deregulated cell death and lymphocyte homeostasis cause premature lethality in mice lacking the BH3-only proteins Bim and Bmf. *Blood* **123**, 2652-2662 (2014).
4. Calo, E. & Wysocka, J. Modification of enhancer chromatin: what, how, and why? *Mol Cell* **49**, 825-837 (2013).
5. Barnden, M.J., Allison, J., Heath, W.R. & Carbone, F.R. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol* **76**, 34-40 (1998).