

博士論文

転写因子 BATF による
制御性 T 細胞の恒常性維持機構

村上 龍一

目次

目次...p2-4

略語一覧...p5-6

Footnote...p6

第一章 序論...p7-13

第一節 歴史的背景...p7-11

1. 制御性 T 細胞...p7-10

1-1. 制御性 T 細胞の発見と機能...p7-8

1-2. 制御性 T 細胞に特徴的な遺伝子発現調節機構...p8-9

1-3. 制御性 T 細胞の生体内における局在とその意義...p9-10

2. 転写因子 BATF...p11

2-1. 転写因子 BATF の発見...p11

2-2. 近年明らかになった BATF の機能...p11

第二節 本研究の背景と目的...p12-13

第二章 BATF は Treg による自己免疫疾患抑制に必要である...p14-23

第一節 序...p14-15

第二節 BATF 欠損 Foxp3⁺ Treg、IRF4 欠損 Foxp3⁺ Treg の炎症抑制能解析..p16

2-1. 組織炎症と生存率...p16

2-2. リンパ組織の肥大...p16

第三節 IRF4 と協調出来ない変異 BATF 強制発現 A384T Foxp3⁺ Treg の炎症抑制能の検討...p17-18

3-1. IRF4 と協調出来ない変異 BATF 強制発現 A384T Foxp3⁺ Treg の抑制能解析...p17

3-2. IRF4 と協調出来ない変異 BATF 強制発現 A384T Foxp3⁺ Treg の恒常性解析...p17-18

第四節 考察...p19-20

図表...p21-23

第三章 BATF は Treg の恒常性維持に関わる分子発現を制御する...p24-46

第一節 序...p24

第二節 BATF 強制発現 A384T Foxp3⁺ Treg の表現型解析...p25-27

2-1. BATF 強制発現 A384T Foxp3⁺ Treg の増殖能および表現型解析...p25-26

2-2. IRF4 と協調出来ない変異 BATF 強制発現 A384T Foxp3⁺ Treg の増殖能および表現型解析...p27

第三節 BATF 欠損 Foxp3⁺ Treg の表現型解析...p28-32

3-1. BATF 欠損 Foxp3⁺ Treg の増殖能解析...p28

3-2. BATF 欠損 Foxp3⁺ Treg の網羅的遺伝子発現解析...p28-31

3-3. BATF 欠損 Foxp3⁺ Treg の表現型解析...p31-32

第四節 考察...p33-35

図表...p36-46

第四章 BATF と Foxp3 は相互依存的に転写制御領域に結合する...p47-72

第一節 序...p47-48

第二節 Treg、Tconv 間での BATF ゲノム結合パターンの比較解析...p49-51

2-1. Treg 選択的 BATF 結合領域の存在...p49

2-2. Treg 選択的 BATF 結合領域のモチーフ解析...p49-50

2-3. Treg 選択的 BATF 結合領域への Foxp3 の結合...p50-51

第三節 Treg 選択的 BATF ゲノム結合の Foxp3 依存性解析...p52-54

3-1. Foxp3 依存的な BATF 結合領域の存在...p52

3-2. Foxp3 依存的 BATF 結合領域のモチーフ解析...p53

3-3. Foxp3 依存的 BATF 結合領域への Foxp3 の結合...p53

3-4. Treg 選択的 BATF 結合領域と Foxp3 依存的 BATF 結合領域の重複...p53-54

第四節 Foxp3 ゲノム結合の BATF 依存性解析...p55-56

4-1. BATF 依存的な Foxp3 結合領域の存在...p55

4-2. BATF 依存的 Foxp3 結合領域のモチーフ解析...p55

4-3. BATF 依存的 Foxp3 結合領域への BATF の結合...p55-56

4-4. Foxp3-BATF 相互依存的結合領域の存在...p56

第五節 Foxp3-BATF 相互依存的結合領域の特性解析...p57-59

5-1. Foxp3-BATF 相互依存的結合領域の転写開始点から距離の解

析...p57

5-2. Foxp3-BATF 相互依存的結合領域と Treg 特異的 DNaseI 高感受性領域、p300 結合領域との重複...p57-58

5-3. Foxp3-BATF 相互依存的結合 p300 結合 Treg 特異的 DNaseI 高感受性領域近傍に存在する遺伝子の発現解析...p58-59

第六節 考察...p60-62

図表...p63-76

第五章 BATF は Foxp3 と協調して非リンパ組織への細胞移動に関わる分子の発現を亢進する...p77-83

第一節 序...p77

第二節 R397W Foxp3⁺ Treg の表現型解析...p78

第三節 Foxp3 と BATF による増殖、非リンパ組織恒常性に関わる分子の協調制御...p79

第四節 考察...p80

図表...p81-83

第六章 総括と展望...p84-89

第一節 本研究の総括...p84-86

第二節 今後の展望...p87-89

2-1. Foxp3-BATF 相互依存的結合領域が転写制御領域であるかの検証...p87-88

2-2. Foxp3-BATF の協調が Treg の非リンパ組織における恒常性維持、抑制能に寄与するかの検証...p88

2-3. Treg の非リンパ組織における恒常性制御による自己免疫疾患・悪性腫瘍に対する治療の可能性...p88-89

第七章 材料と方法...p90-98

参考文献...p99-113

謝辞...p114-115

略語一覧

+ (上つき) : 陽性

- (上つき) : 陰性

^{high} (上つき) : 高発現

^{low} (上つき) : 低発現

-マウス : 遺伝子欠損マウス

AICE : AP-1-IRF composite element (GAAATGA(G/C)TCA あるいは TGA(G/C)TCANNNNGAAA)

A384T Spl+LN 細胞 : Foxp3^{A384T} マウスの脾臓およびリンパ節細胞

A384T Foxp3⁺ Treg : Foxp3^{A384T} マウスから取得した Treg

C2 GlcNAcT : Core 2 β -1,6-*N*-acetylglucosaminyltransferase

bp : base pair

DC : 樹状細胞

EAE : Experimental autoimmune encephalomyelitis

E-sel lig : E-selectin ligand

FACS : Fluorescence-activated cell sorter

FCM : フローサイトメトリー

FPKM : Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments(100 万 Read 中で遺伝子のエクソン 1Kb にマッピングされた Tag 数)

GO : Gene ontology

HBSS : Hanks' balanced salt solution

IL- : Interleukin-

IP : 免疫沈降

IPEX syndrome : immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy

X-linked syndrome

mAbs : モノクローナル抗体

MGI : Mouse Genome Informatics

naïve T 細胞 : CD44^{low}CD62L^{high}Foxp3⁻CD4⁺ T 細胞

P-sel lig : P-selectin ligand

R397W Foxp3⁺ Treg : Foxp3^{R397W} マウスから取得した Treg

RV : レトロウィルス

-RV : -レトロウィルス強制発現

SD : 標準偏差

TCR : T 細胞受容体

Treg : 制御性 T 細胞

Tconv : 通常型 T 細胞

TSS : 転写開始点

WT : 野生型

自己寛容 : 自己免疫応答抑制機構

Treg 特徴的遺伝子: Foxp3^+ Treg で Foxp3^- Tconv と比べ発現が高いもしくは低い遺伝子 (本論文の第二章以降では 2 倍以上発現が高いもしくは低い遺伝子のことを Treg 特徴的高発現遺伝子、Treg 特徴的低発現遺伝子とよぶ)

Footnote

1. 本論文では抑制能の有無に関わらず便宜的に Foxp3^+ T 細胞を Treg とよぶことにする。
2. 本論文では $\text{Foxp3}^{\text{hCD2}}$ マウスを使用しており、 hCD2^+ 細胞を Treg として扱っている。本文中(第七章を除く)においては、混乱を避けるため、 hCD2^+ 細胞を Foxp3^+ 細胞と記述する。

第一章 序論

第一節 歴史的背景

1. 制御性 T 細胞

1-1. 制御性 T 細胞の発見と機能

免疫系は自己/非自己を区別し、非自己である外来抗原を認識し攻撃、排除する一方で、自己抗原を攻撃、排除せず生体の恒常性を維持する洗練されたシステムである[1,2]。

免疫系が自己を認識、攻撃しない仕組みのひとつとして、自己抗原とアフィニティーの高い T 細胞受容体(T cell receptor, TCR)を有する T 細胞が胸腺で成熟する過程で胸腺髄質上皮細胞(medullary thymic epithelial cell, mTEC)によって提示される自己抗原からのシグナルを受けてアポトーシスを起こす Negative selection が知られている[3,4,5]。一方、Negative selection を逃れた自己反応性 T 細胞が末梢においても存在することが知られており[6,7]、これらは自己を攻撃する能力を有するが、通常、ヒト、マウスでは T 細胞が自己を過剰に攻撃し自己免疫疾患を誘発することはない。以上のことから、末梢において自己に対する免疫応答を抑制する仕組みの存在が示唆されてきたが、その実体は明らかでなかった。

末梢における自己免疫応答抑制機構(自己寛容)には、自己反応性 T 細胞が末梢で自己抗原と遭遇することでアナジーを生じる/除去される受動的な自己寛容と、自己反応性 T 細胞を積極的に抑制する細胞が存在する能動的な自己寛容が存在すると考えられる。1980 年代に、T 細胞亜集団の一部を除去した場合に自己免疫疾患が発症すること、さらに新生児胸腺摘出(Neonatal Thymectomy)によって生じる自己免疫疾患が T 細胞亜集団の移入によって抑えられることが発見され、T 細胞集団内に自己反応性 T 細胞を積極的に抑える集団、抑制性 T 細胞が存在すること、また、抑制性 T 細胞による能動的な自己寛容が末梢における恒常性維持に重要な役割を果たすことが示唆された[8,9,10]。しかしながら、抑制性 T 細胞の実体は何であるかについては依然として不明であった。

1995 年に IL-2 receptor α -chain(CD25)を発現する CD25⁺ T 細胞が CD25⁻ T 細胞により誘発される様々な自己免疫疾患を抑制することが発見され[11]、2003 年にヒトに生じる致死的な自己免疫疾患である immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome (IPEX syndrome)および致死的な自己免疫疾患を発症するマウス Strain である Scurfy マウスの疾患原

因遺伝子である転写因子 *FOXP3*(ヒト)/*Foxp3*(マウス)が $CD4^+CD25^+$ 抑制性 T 細胞の分化に重要な役割を果たすことが示されたことで[12,13,14,15,16,17,18]、末梢において能動的な自己寛容を誘導する実体 “*Foxp3*⁺ $CD25^+$ 制御性 T 細胞 (Regulatory T cell, Treg)” が明らかとなった。さらに、上述したように *Foxp3* が欠損することで機能的 Treg が欠損した場合、致死的な自己免疫疾患が発症することから、末梢における自己寛容のうち Treg による能動的な自己寛容が重要な役割を果たすことも示された。その後の研究により、Treg は自己寛容ばかりでなく、外来抗原、癌抗原に対する免疫応答[19,20]、移植抗原に対する免疫応答[21]など様々な免疫応答を抑制することが明らかとなった[22]。

様々な疾患における Treg の重要性が示唆されたことから、Treg が免疫を抑制するメカニズムについて精力的な研究が行われ、Treg は多様なメカニズムで免疫応答を抑制的に制御することが現在までに示されている。代表的な抑制機構としては IL-10 などの免疫抑制サイトカイン産生[23]など液性因子による抑制と、CTLA-4 による樹状細胞上の共刺激分子の発現低下[24,25]など細胞接着に依存する抑制が知られているが、依然として Treg が *in vivo* で抑制能を発揮する分子基盤の全容は明らかでなく、今後のさらなる解析が期待される[26,27]。

1-2. 制御性 T 細胞に特徴的な遺伝子発現調節機構

Foxp3 を欠損した $CD4^+CD25^+$ Treg が抑制能をもたないこと[16,18]、*Foxp3* を強制発現した T 細胞が抑制能を有すること[15] から *Foxp3* が Treg の抑制能を制御していることはまぎれもない事実である。また、Treg における機能分子である *CD25*、*CTLA4*、*GITR* などの発現が *Foxp3* 強制発現により亢進する[15]ことから *Foxp3* が Treg において重要な転写因子であることが示唆されていた。

一方で、*Foxp3* ノックアウト GFP ノックインマウスの解析から *Foxp3* が発現しなくとも GFP を発現し、いくつかの Treg 特徴的遺伝子発現パターンを示す”Wannabe” Treg が分化することが明らかとなってきた[28,29]。さらに、*Foxp3* を T 細胞に強制発現した場合に Mock 強制発現 T 細胞と比較して発現変動する遺伝子群および *Foxp3* ノックアウト GFP ノックインマウスから取得した GFP⁺ T 細胞において *Foxp3*⁺ Treg と比較して発現変動する遺伝子群は、*Foxp3*⁺ Treg において *Foxp3*⁻ Tconv と比較して発現変動する遺伝子群全てを反映しないことが明らかとなった[30,31]。これらの報告をもとに、Treg に特徴的

な遺伝子発現パターンは **Foxp3** ばかりでなく他のファクターによっても調節されていることが示唆され、そのファクターに関する研究が進んでいった。その結果、**Foxp3** は単独ではなく **Runx1**, **NFAT**, **Eos** (*Ikzf4*), **phospho-STAT3**, **IRF4**, **T-bet**, **GATA3**, **ROR γ t**, **ROR α** , **Foxo1**, **Foxo3**, **Satb1**, **HIF-1 α** など様々な転写因子と協調/競合して **Treg** 特徴的な遺伝子発現パターンをつくり出すという報告[32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42]と、**Foxp3** とは独立した **Epigenetic** な制御により **Treg** の遺伝子発現の一部が規定されるという報告[43]がなされ、**Treg** 特徴的な遺伝子群は、**Foxp3** および **Foxp3** と協調する転写因子、**Foxp3** とは独立した **Epigenetic** な制御により創りだされると考えられるようになった。

1-3. 制御性 T 細胞の生体内における局在とその意義

2004 年に Dr. Thomas Schwarz らのグループは UV により誘導されるハプテン特異的な **Treg** がハプテンにより誘導される接触過敏症を抑制出来るかを検証した。彼らは、UV 照射した皮膚にハプテンを塗布したマウスから取得したリンパ節細胞(これらがハプテンの種類特異的な抑制能をもち **CD4**、**CD25** を発現することから、Schwarz らはこれらの細胞群をハプテン特異的 **Treg** としている)を接触過敏症の感作前に“血管内投与”した場合、接触過敏症の炎症を抑制出来るが、感作後から惹起前までに“血管内投与”した場合、接触過敏症の炎症を抑制出来ないことを明らかにした。一方、彼らは、感作後惹起前までにハプテン特異的 **Treg** を惹起部位に“皮内投与”した場合、接触過敏症の炎症を抑制出来ることを明らかにした。この結果は、ハプテン特異的な **Treg** が接触過敏症炎症を抑えるためには、炎症惹起部位に“存在する”ことが重要であることを強く示唆しており、本研究以降、**Treg** が抑制能を発揮するためには炎症を抑制すべき組織に局在することが重要であると考えられるようになった[44,45]。

その後、マウスおよびヒトにおいて、皮膚、肺、腸管、肝臓、脂肪組織、胎盤、筋肉などの様々な非リンパ組織において **Treg** が存在することが示され、それら非リンパ組織に **Treg** が“存在する”ことで組織における炎症抑制及び恒常性維持が制御されていることが確認された[46,47,48,49,50,51,52,53]。

以上の結果から、**Treg** が非リンパ組織において恒常性を維持する分子基盤を解明することは、組織の恒常性維持機構および恒常性破綻により生じる炎症性疾患の発症機構を理解する上で非常に重要であると考えられる。また、マウスもしくはヒトの **Treg** が **CCR4**、**E-selectin ligand**(**E-sel lig**)、**P-selectin**

ligand(P-sel lig)、GPR15 など非リンパ組織への細胞移動に関わる分子を高発現していることが示され[53,54,55,56,57,58,59]、Treg は非リンパ組織に移行しやすく、それにより非リンパ組織における恒常性を維持している可能性が示されていた。しかしながら、Treg がそれら非リンパ組織への細胞移動に関わる分子を高発現する分子基盤は何か？という疑問を含め、Treg の非リンパ組織における恒常性維持機構の全容は依然として不明であった[55,60,61]。

2. 転写因子 BATF

2-1. 転写因子 BATF の発見

BATF は 1995 年に Epstein-Barr virus により刺激されたヒト B 細胞からクローニングされた AP-1 ファミリーに属する転写因子である[62,63]。さらに、同時期に行われた BATF の機能解析の結果、BATF は他の AP-1 ファミリー転写因子である JUN や Fos と異なり転写の活性化に関わる Transactivation domain をもたず、他の AP-1 ファミリー転写因子による転写を抑制するように働くことが示された。このことから BATF は AP-1 ファミリーによる転写のドミナントネガティブレギュレーターと考えられるようになった[63,64,65,66,67]。

2-2. 近年明らかになった BATF の機能

上述したように、発見当初において、BATF は AP-1 ファミリーによる転写を抑制する働きをもつと考えられていた。しかしながら、2009 年に *Batf* 遺伝子欠損(-/-)マウスが作製され、それを用いた研究が進められることで BATF の新たな機能的側面が明らかとなった。BATF-JUN ヘテロ二量体は IRF4 と(一部 IRF8 とともに)協調して AP-1-IRF composite element(AICE :GAAATGA(C/G)TCA あるいは TGA(C/G)TCANNNGAAA)に結合し、様々な遺伝子の転写を亢進することで、様々な T 細胞/B 細胞/樹状細胞サブセット(Th17、Tfh、Th2、Th9、effector CD8⁺ T cell, GC B cell, CD8 α ⁺ DC)の機能分化を制御することが示され[63,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77]、BATF は他の転写因子と協調することで転写を亢進する機能ももつことが明らかとなった。一方、*Batf* 遺伝子欠損マウスでは脾臓 CD4⁺ T 細胞中の Foxp3⁺ Treg の割合がやや低下することは知られていたが[68]、Treg における BATF の機能は依然として明らかでなかった。

第二節 本研究の背景と目的

歴史的背景でも述べた通り、Treg は自己に対する過剰な免疫応答を防ぎ、生体の恒常性を維持する上で必須の細胞であり、2003 年に転写因子 Foxp3 が Treg の分化、機能に非常に重要な役割を果たす転写因子であることが示され、その後、Foxp3 の機能解析が精力的に行われてきた[15,16,18]。しかしながら、Foxp3 がどのようにして Treg の機能を調節しているのかその全容は依然として明らかでなかった。私が本研究を行った研究室では、Foxp3 の新たな機能を明らかにするため、Foxp3 の変異によって生じるヒトの自己免疫疾患である IPEX に注目し、ヒト IPEX 患者にみられる Foxp3 の変異が Treg の遺伝子発現および機能に与える影響を検証した。その結果、Foxp3⁺Treg で Foxp3⁻Tconv と比べ発現が高いもしくは低い遺伝子(Treg 特徴的遺伝子)のうちほとんどの発現は正常であるが、一部の遺伝子発現のみに影響をきたす Foxp3 変異(Foxp3^{A384T})を同定した。Foxp3^{A384T} 変異は Foxp3 の制御する遺伝子の一部にのみ影響を与える変異であるが、Foxp3^{A384T} マウスから取得した Treg(A384T Foxp3⁺ Treg)は末梢特に非リンパ組織における恒常性を破綻し、*in vivo*での抑制能を欠いていた。一方で、A384T Foxp3⁺ Treg の胸腺における分化、*in vitro*の抑制活性は正常であった。Dr. Shohei Hori らは、この原因遺伝子を探る過程で、Treg において Tconv と比べて発現が高く、naïve T 細胞への Foxp3 強制発現(-RV)によって発現上昇し、A384T Foxp3⁺ Treg で WT Foxp3⁺ Treg と比べ発現が低下している AP-1 ファミリー転写因子 BATF を同定した[171]。Mock-RV A384T Foxp3⁺ Treg は Foxp3^{A384T} マウスの脾臓およびリンパ節細胞(A384T Spl+LN 細胞)を *Rag1*^{-/-}マウスに移入することで生じる大腸炎を抑制出来ないが、BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg はその大腸炎を抑制し、非リンパ組織における恒常性を回復した。さらに *Batf*^{-/-}Foxp3⁺ Treg は A384T Foxp3⁺ Treg と同様に末梢特に非リンパ組織での恒常性を破綻しており、大腸炎抑制能を欠いていた。以上の結果から、Treg に発現する BATF は Treg の末梢非リンパ組織における恒常性および大腸炎抑制能を制御していることが示された[171]。

しかしながら、BATF がどのようにして Treg の末梢非リンパ組織における恒常性維持に関わるのか？という疑問を含め、BATF が Treg のどのような機能的側面に影響を与えるかは依然として不明であった。さらに、本章第一節でも述べた通り、Treg が非リンパ組織における恒常性を維持する仕組みの全容は明らかでなかった。

以上を踏まえ、私は BATF が Treg の表現型にどのような影響を与えるかを解析することを通して、“Treg に特徴的な非リンパ組織における恒常性維持の分子機構”を解明するべく研究を開始した。

第二章 BATF は Treg による自己免疫疾患抑制に必要である

第一節 序

第一章 第二節でも述べた通り、BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg は A384T Spl+LN 細胞を *Rag1*^{-/-}マウスに移入することで生じる大腸炎を抑えることが出来、また非リンパ組織における恒常性を回復しており、*Batf*^{-/-} Treg はその抑制能および非リンパ組織における恒常性を欠くことが明らかになった[171]。しかしながら、*Batf*^{-/-} Treg がその他の組織における炎症を抑制することが出来るかは依然として不明であった。本章では、Treg に発現する BATF が Treg による自己免疫疾患抑制能の一端を担っているかを個体レベルで明らかにするために、Treg 特異的 BATF 欠損マウス(*Foxp3*^{GFPCre}*Batf*^{fllox} マウス)を作製し、非免疫下における表現型解析を行った。

また、BATF が様々な免疫細胞において IRF4 と協調して遺伝子発現調節、機能的分化を誘導するという知見[71,72,73,74,75,76,77]を踏まえ、同様に Treg においても BATF が IRF4 と協調して機能(抑制能、恒常性維持能)を制御するかどうかを検証するため、次に記す二つの実験を行った。

一つ目の実験では、Treg 特異的 IRF4 欠損マウス(*Foxp3*^{GFPCre}*Irf4*^{fllox} マウス)の非免疫下における表現型解析を行い、その表現型と Treg 特異的 BATF 欠損マウスの表現型が類似するかどうかを検証した。Treg 特異的 IRF4 欠損マウスの表現型については既に報告があるが[36,78,79,80]、本研究で使用した *Foxp3*^{GFPCre} マウスと先行研究で使用された *Foxp3*^{YFPCre} マウスでは *Foxp3* 自身への発現影響が異なることが示唆されていることから[172]、公正を期すために、本研究では当研究室で作製した *Foxp3*^{GFPCre}*Irf4*^{fllox} マウスを解析し、*Foxp3*^{GFPCre}*Batf*^{fllox} マウスと表現型を比べた。

二つ目の実験では、BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg が *Rag1*^{-/-}マウスに A384T Spl+LN 細胞を移入することで生じる大腸炎を抑制出来るというモデルを利用した。このモデルにおいて AP-1 binding motif(TGACTCA)には結合出来るが IRF4 と協調して AICE に結合することが出来ない変異 BATF(H55Q、4xMut)、IRF4 と協調して AICE に結合出来る変異 BATF(E77K)を強制発現した A384T Foxp3⁺ Treg が大腸炎を抑制出来るかを検証することで、BATF と IRF4 の協調が Treg の炎症抑制に寄与するかどうかを検証した[71]。さらに、変異 BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg が野生型 BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg 同様に A384T Foxp3⁺ Treg において defect がみられる末梢非リンパ組織における恒常性を回

復出来るかどうかについても同時に検証した。

第二節 BATF 欠損 Foxp3^+ Treg、IRF4 欠損 Foxp3^+ Treg の炎症抑制能解析

2-1. 組織炎症と生存率

まず、非免疫下において $\text{Foxp3}^{\text{GFPCre}} \text{Batf}^{\text{fllox}}$ マウス、 $\text{Foxp3}^{\text{GFPCre}} \text{Irf4}^{\text{fllox}}$ マウスの組織における炎症スコアおよび生存率を調べた。その結果、 $\text{Foxp3}^{\text{GFPCre}} \text{Batf}^{\text{fllox}}$ マウス、 $\text{Foxp3}^{\text{GFPCre}} \text{Irf4}^{\text{fllox}}$ マウスでは 3 週齢においてコントロール群である $\text{Foxp3}^{\text{GFPCre}} \text{WT}$ マウスと比べ、皮膚において有意な炎症が生じ、さらに、肺においても有意ではないが炎症が生じていた(図 1A)。さらに、12 週齢に至るまでにその 80%程度が死に至ることが明らかとなった(図 1B)。 $\text{Foxp3}^{\text{GFPCre}} \text{Batf}^{\text{fllox}}$ マウス、 $\text{Foxp3}^{\text{GFPCre}} \text{Irf4}^{\text{fllox}}$ 間では、生存率、皮膚や肺における炎症スコアに有意な差はみられなかった(図 1A, B)。以上の結果から、 $\text{Foxp3}^{\text{GFPCre}} \text{Batf}^{\text{fllox}}$ マウスは $\text{Foxp3}^{\text{GFPCre}} \text{Irf4}^{\text{fllox}}$ マウスと同程度の組織炎症を含む致死的な自己免疫疾患様の症状を呈することが明らかとなった。

2-2. リンパ組織の肥大

抑制能を有する機能的な Treg を消失し、組織炎症を含む致死的な自己免疫疾患を呈する *Scurfy* マウス、 $\text{Foxp3}^{-/-}$ マウスでは、lymphoproliferative disorder(脾臓、リンパ節の肥大およびそれらの組織における細胞数増加)が確認される[16]。これを踏まえて、 $\text{Foxp3}^{\text{GFPCre}} \text{Batf}^{\text{fllox}}$ マウス、 $\text{Foxp3}^{\text{GFPCre}} \text{Irf4}^{\text{fllox}}$ マウスで同様の傾向がみられるかを検証した。その結果、3 週齢の $\text{Foxp3}^{\text{GFPCre}} \text{Batf}^{\text{fllox}}$ マウス、 $\text{Foxp3}^{\text{GFPCre}} \text{Irf4}^{\text{fllox}}$ マウスにおける皮膚所属リンパ節細胞数は $\text{Foxp3}^{\text{GFPCre}} \text{WT}$ マウスと比べ大きく増加していることが明らかとなった(図 1C)。一方、 $\text{Foxp3}^{\text{GFPCre}} \text{Batf}^{\text{fllox}}$ マウス、 $\text{Foxp3}^{\text{GFPCre}} \text{Irf4}^{\text{fllox}}$ マウスの脾臓細胞数、腸間膜リンパ節細胞数は $\text{Foxp3}^{\text{GFPCre}} \text{WT}$ マウスと有意な差はなかった(図 1C)。また、 $\text{Foxp3}^{\text{GFPCre}} \text{Batf}^{\text{fllox}}$ マウス、 $\text{Foxp3}^{\text{GFPCre}} \text{Irf4}^{\text{fllox}}$ マウス間で皮膚所属リンパ節細胞数に有意な差はみられなかった(図 1C)。以上の結果から、 $\text{Foxp3}^{\text{GFPCre}} \text{Batf}^{\text{fllox}}$ マウスは $\text{Foxp3}^{\text{GFPCre}} \text{Irf4}^{\text{fllox}}$ マウスと同程度の lymphoproliferative disorder を呈することが明らかとなった。

第三節 IRF4 と協調出来ない変異 BATF 強制発現 A384T Foxp3⁺ Treg の炎症抑制能の検討

3-1. IRF4 と協調出来ない変異 BATF 強制発現 A384T Foxp3⁺ Treg の抑制能解析

本章第二節において Foxp3^{GFPCre} Batf^{fllox} マウス、Foxp3^{GFPCre} Irf4^{fllox} マウスが類似した自己免疫疾患様症状を呈することが示され、BATF および IRF4 が協調して Treg の抑制能を制御する可能性が支持された。そこで、私は AP-1 binding motif には結合出来るが IRF4 と協調して AICE に結合することが出来ない変異 BATF(H55Q、4xMut)、IRF4 と協調して AICE に結合することが出来る変異 BATF(E77K)を用いることで、BATF と IRF4 の協調が Treg の抑制能に必要なかを検証した(図 2A)。具体的には、A384T Spl+LN 細胞(Ly5.2⁺)を *Rag1*^{-/-}マウスに移入することで生じる大腸炎が Mock、BATF^{WT}(BATF)、BATF^{E77K}(E77K)、BATF^{H55Q}(H55Q)、BATF^{4xMut}(4xMut)-RV A384T Foxp3⁺ Treg(Ly5.1⁺)の共移入により抑制されるかを検証した。その結果、これまでの報告通り、BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg は A384T Spl+LN 細胞移入による体重減少、大腸炎を抑制した(図 2B, C)。また、E77K-RV A384T Foxp3⁺ Treg 移入群の体重変化率(100x 細胞移入 5 週後の体重/細胞移入前の体重)は BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg 移入群と有意な差はないが、H55Q-RV A384T Foxp3⁺ Treg、4xMut-RV A384T Foxp3⁺ Treg 移入群の体重変化率は BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg 移入群と比べ有意に低下することが示された(図 2B)。さらに、E77K-RV A384T Foxp3⁺ Treg 移入群の大腸炎スコアは BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg 移入群と有意な差はないが、H55Q-RV A384T Foxp3⁺ Treg、4xMut-RV A384T Foxp3⁺ Treg 移入群の大腸炎スコアは BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg 移入群と比べ有意に高いことが示された(図 2C)。このことから IRF4 と協調出来ない変異 BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg は BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg よりも大腸炎抑制能を欠く(減じる)ことが明らかとなった。以上の結果から、BATF は IRF4 と協調して Treg の抑制能を制御していることが強く示唆された。

3-2. IRF4 と協調出来ない変異 BATF 強制発現 A384T Foxp3⁺ Treg の恒常性解析

IRF4 と協調出来ない変異 BATF 強制発現 A384T Foxp3⁺ Treg が末梢リンパ組織/非リンパ組織において恒常性を維持出来るかどうかを確認するため、3-1.

の実験の際、細胞移入 5 週後に脾臓、腸間膜リンパ節、小腸から細胞を取得し、CD4⁺ T 細胞中の RV 感染(GFP⁺)Foxp3⁺Ly5.1⁺Treg の割合をフローサイトメトリ(FCM)で解析した。解析の際、移入前の RV 感染効率(Ly5.1⁺ 細胞中の GFP⁺ 細胞の割合)が各群において異なることを考慮し、どの細胞群においても感染効率を 100% と仮定してノーマライズを行い、CD4⁺ T 細胞中の GFP⁺Foxp3⁺Ly5.1⁺ Treg の割合を算出した。その結果、いずれの組織においても CD4⁺ T 細胞中の E77K-RV A384T Foxp3⁺ Treg の割合は、CD4⁺ T 細胞中の BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg の割合と有意な差はみられないのに対し、脾臓、小腸粘膜固有層における CD4⁺ T 細胞中の H55Q-RV A384T Foxp3⁺ Treg、4xMut-RV A384T Foxp3⁺ Treg、Mock-RV A384T Foxp3⁺ Treg の割合は CD4⁺ T 細胞中の BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg の割合と比べ有意に低いことが示された(図 3)。また、腸間膜リンパ節における CD4⁺ T 細胞中の H55Q-RV A384T Foxp3⁺ Treg、4xMut-RV A384T Foxp3⁺ Treg の割合も CD4⁺ T 細胞中の BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg の割合と比べ減少傾向にあった(図 3)。さらに、小腸粘膜固有層における CD4⁺ T 細胞中の H55Q-RV A384T Foxp3⁺ Treg、4xMut-RV A384T Foxp3⁺ Treg の割合は脾臓、腸間膜リンパ節におけるそれよりも減少傾向にあった(図 3)。このことから IRF4 と協調出来ない変異 BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg は *Rag1*^{-/-}マウスに移入する条件においてリンパ組織、非リンパ組織において共に BATF 強制発現 A384T Foxp3⁺ Treg よりも CD4⁺ T 細胞中の割合が減少することが明らかとなった。また、その割合低下は、非リンパ組織のひとつである小腸においてより顕著であることも示された。以上の結果から、BATF は IRF4 と協調して Treg の末梢特に非リンパ組織における恒常性を制御していることが強く示唆された。

第四節 考察

本章において、私は Treg 特異的 BATF 欠損マウスが皮膚や肺における炎症を含む致死的な自己免疫疾患様症状を呈することを示した。また、Treg 特異的 BATF 欠損マウスの表現型が Treg 特異的 IRF4 欠損マウスと類似していることを示した。以上の結果および BATF と IRF4 が様々な免疫細胞において協調して AICE に結合し、機能分化を誘導するという報告[71,72,73,74,75,76,77]を踏まえて、BATF が IRF4 と協調することが Treg の抑制能に重要であるかを検証した。検証のため、AP-1 binding motif には正常に結合出来るが、IRF4 と協調して AICE には結合出来ない変異 BATF(H55Q、4xMut)に着目し、コントロールとして AP-1 binding motif にも AICE にも WT BATF とほぼ同程度結合出来る変異 BATF(E77K)を用いた。そして、E77K-RV A384T Foxp3⁺ Treg は BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg とほぼ同程度の大腸炎抑制能をもつ一方、H55Q-RV、4xMut-RV A384T Foxp3⁺ Treg は大腸炎抑制能をもたないことを示した。さらに、lymphopenic な環境にある *Rag1*^{-/-}マウス内において、脾臓、腸間膜リンパ節、小腸粘膜固有層のいずれにおいても E77K-RV A384T Foxp3⁺ Treg の CD4⁺ T 細胞中の割合は、BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg のそれと有意な差がないのに対し、H55Q-RV、4xMut-RV A384T Foxp3⁺ Treg の CD4⁺ T 細胞中の割合は、BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg のそれよりも脾臓において有意に低下し、さらに非リンパ組織のひとつである小腸においてより顕著に低下することを示した。以上の結果から、BATF は IRF4 と協調することで Treg の抑制能、末梢特に非リンパ組織における恒常性を制御している可能性が考えられた。

これまでに様々な免疫細胞において BATF の重要性は明らかになっていたが、Treg において BATF が重要な機能を担っていることを明らかにしたのは本研究がはじめてである。

Treg 特異的 BATF 欠損マウスは様々な非リンパ組織に炎症を呈するが、その中で最も顕著なものが皮膚炎であった。Dr. Shohei Hori らの解析により、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg は末梢特に非リンパ組織における恒常性を破綻していることが示されたのは既に述べたが、非リンパ組織の中でも皮膚において *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg の数が最も顕著に減少することが示されている[171]。*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg は *in vitro* において多少の defect はあるものの WT Foxp3⁺ Treg とほぼ同等に effector T 細胞の増殖抑制能を有することを考慮すると、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg は

非リンパ組織(特に皮膚)に存在出来ないために、組織(特に皮膚)炎症を抑制出来ないことが強く示唆された。この仮説は、イントロでも述べた通り、Treg が非リンパ組織炎症を抑えるためには組織に“存在する”必要があること[44,45,46,47,48,49,50,51,52,53]からも強く支持される。

本章では、BATF と IRF4 が協調して AICE に結合することが Treg の抑制能、末梢特に非リンパ組織における恒常性維持能において重要な役割を果たしていることを示唆した。しかしながら、変異 BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg の割合を確認したのは、脾臓、腸間膜リンパ節、小腸粘膜固有層のみであり、この仮説を検証するためには、その他のリンパ組織・非リンパ組織における変異 BATF 発現 Treg の割合/数を解析する必要がある。この解析のためには、先に Dr. Kenneth Murphy らのグループが CD8α⁺ DC の分化における BATF および IRF4 の協調を解析した際に用いた方法[71]、すなわち、*Batf*^{-/-} 骨髄細胞に野生型もしくは変異 BATF を強制発現し放射線照射したマウスに移入して混合骨髄キメラを作製し、骨髄細胞中の造血幹細胞から分化してくる野生型 BATF 強制発現 *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg と変異 BATF 強制発現 *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg の割合を、非リンパ組織・リンパ組織において比較する方法が適切であると考えられる。

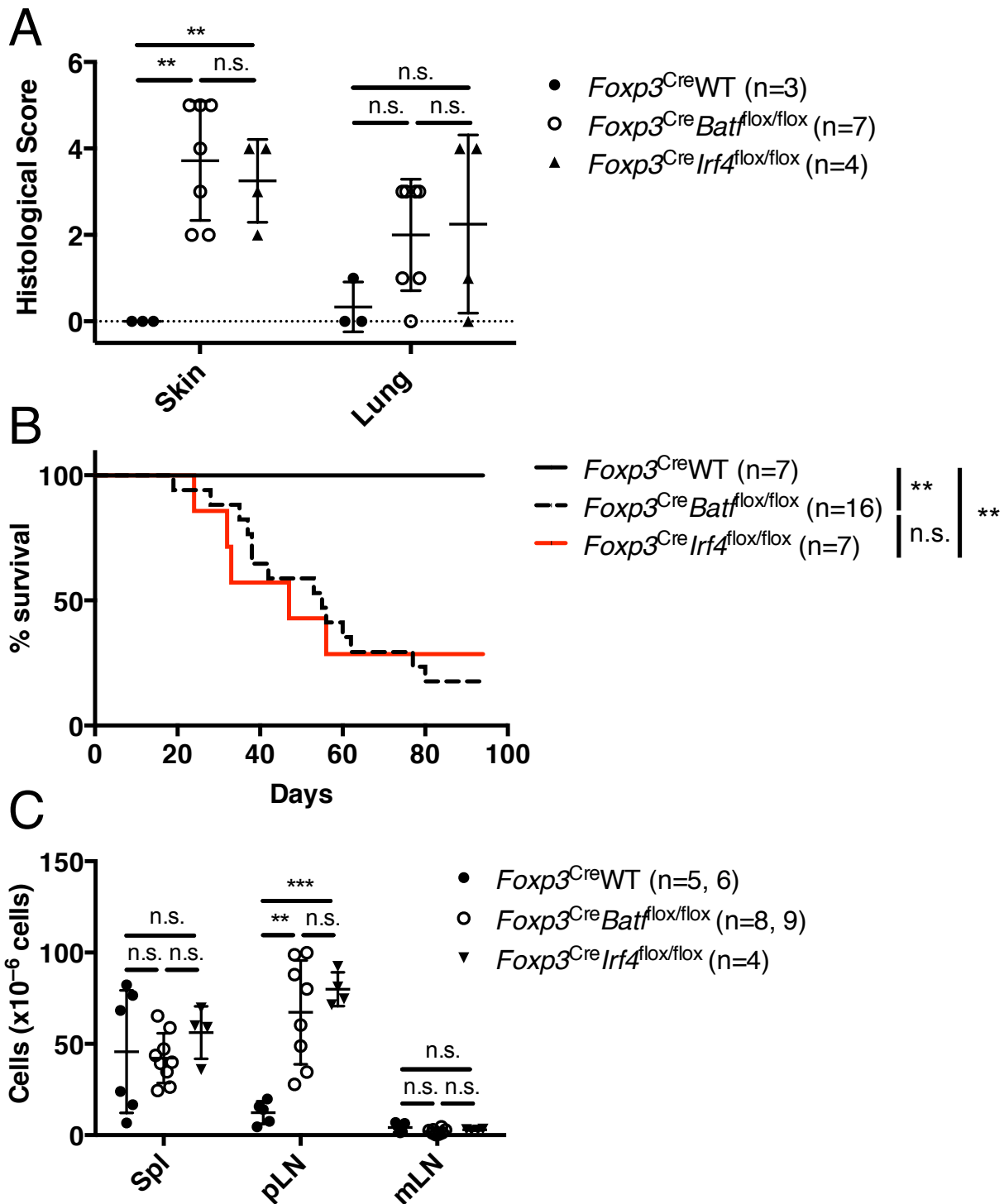


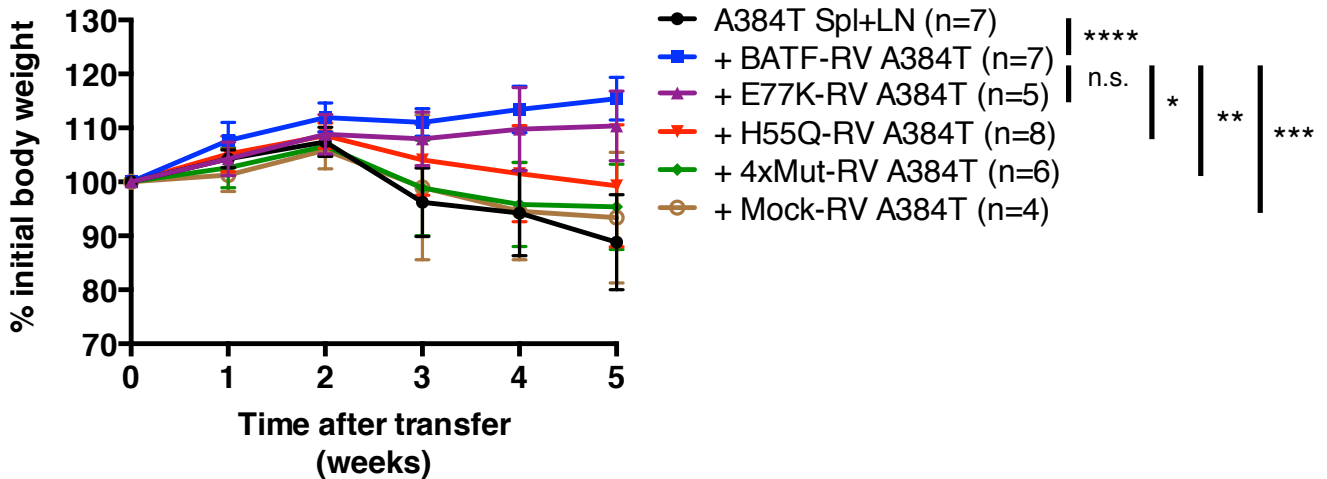
図1 Treg特異的BATF欠損マウス、Treg特異的IRF4欠損マウスの表現型解析

(A) 3週齢における皮膚及び肺の炎症スコア。各個体の炎症スコア及び炎症スコア平均値 \pm 標準偏差(SD)を表示。** $p < 0.01$ 、n.s.:有意差なし($p > 0.05$)。One-way ANOVAによる統計解析を行った。(B) 生存曲線。** $p < 0.01$ 、n.s.:有意差なし($p > 0.05$)。Log-rank testによる統計解析を行った。(C) 3週齢における脾臓(Spl)、皮膚所属リンパ節(pLN)、腸間膜リンパ節(mLN)の細胞数。各個体における細胞数及び細胞数の平均値 \pm SDを表示。*** $p < 0.005$ 、** $p < 0.01$ 、n.s.:有意差なし($p > 0.05$)。One-way ANOVAによる統計解析を行った。

A

	WT BATF	E77K BATF	H55Q BATF	4xMut BATF
AP-1 binding motif	○	○	○	○
AICE	○	○	×	×

B



C

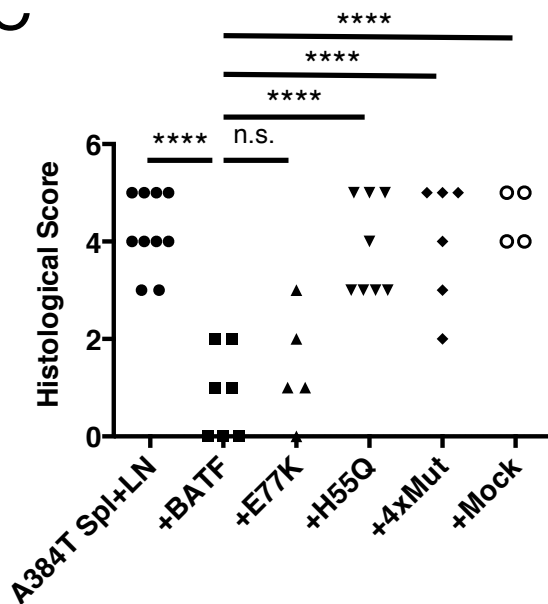


図2 変異BATF強制発現(-RV)A384T Foxp3⁺ Tregによる大腸炎抑制能解析 その1

(A) 変異BATFとAP-1 binding motif、AICEとの結合の有無。(B,C) 変異BATF-RV A384T Foxp3⁺ Tregによる大腸炎抑制実験。(B) 体重推移。縦軸は細胞移入前の体重を100%とした時の各群の体重の割合の平均値±SD。(C) 細胞移入5週後の大腸炎スコア。各個体の大腸炎スコアを表示。(B,C) * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.005$ 、**** $p < 0.001$ 、n.s.:有意差なし($p > 0.05$)。One-way ANOVAによる統計解析を行った。

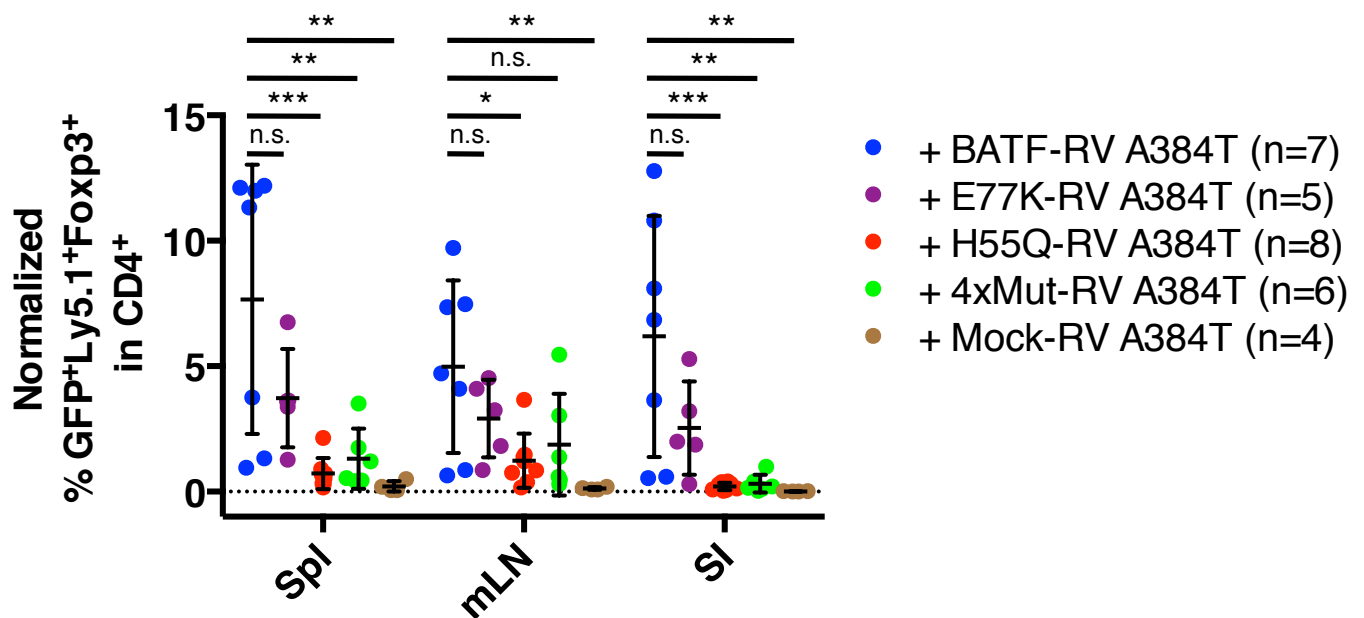


図3 変異BATF強制発現(-RV)A384T Foxp3⁺ Tregによる大腸炎抑制能解析 その2

(A,B) 変異BATF-RV(GFP reporter) A384T Foxp3⁺ Tregによる大腸炎抑制実験。(A)細胞移入前のA384T Foxp3⁺ Treg(Ly5.1⁺)への変異BATF感染効率(GFP⁺の割合)を100%とした時の移入5週後の脾臓(Spl)、腸間膜リンパ節(mLN)、小腸粘膜固有層(SI)における変異BATF感染(GFP⁺)Ly5.1⁺細胞のCD4⁺T細胞中の割合(%). 各群の値および平均値±SDを記す。*p<0.05、**p<0.01、***p<0.005、n.s.:有意差なし(p>0.05)。One-way ANOVAによる統計解析を行った。

第三章 BATF は Treg の恒常性維持に関わる分子発現を制御する

第一節 序

第二章第四節でも述べた通り、Treg 特異的 BATF 欠損マウスが組織炎症を含む致死的な自己免疫疾患を発症すること、*Batf*^{-/-}Treg は末梢特に非リンパ組織における恒常性を破綻していること、Treg が非リンパ組織炎症を抑えるためには組織に“存在する”必要があること[44,45,46,47,48,49,50,51,52,53]を踏まえ、Treg 特異的 BATF 欠損マウスが組織炎症を生じる原因のひとつが *Batf*^{-/-}Treg の非リンパ組織における恒常性破綻である可能性が考えられた。それを踏まえ、私は本章において BATF が Treg の非リンパ組織における恒常性を維持する分子機構を解明するべく研究を行った。BATF が Treg の非リンパ組織における恒常性を維持する機構として、BATF が Treg の増殖、非リンパ組織への移行、生存を制御する可能性が考えられるが、私は、本研究において主に増殖および非リンパ組織への移行に着目し研究を行った。

第二節では、BATF 発現を低下し非リンパ組織における恒常性を破綻している A384T Foxp3⁺ Treg の増殖、非リンパ組織への移行に関わるケモカイン受容体発現、非リンパ組織における恒常性維持に関わるサイトカイン受容体発現を WT Foxp3⁺ Treg のそれと比較した。さらに、A384T Foxp3⁺ Treg に BATF を強制発現することでこれらの表現型が変化するか(回復するか)を検証した。また、この際、IRF4 との協調能を欠く変異 BATF も用いることで BATF と IRF4 の協調の重要性も確認した。

第三節では、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg の表現型を解析した。BATF による Treg の機能制御機構を網羅的に調べるため、増殖や特定の分子発現のみを検証するばかりでなく、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg の網羅的な遺伝子発現解析も行った。そして、網羅的遺伝子発現解析から明らかとなった BATF 依存的遺伝子に関して pathway 解析および curation を行い、BATF が非リンパ組織への移行に関わる複数の Treg 特徴的高発現遺伝子の発現を亢進することを明らかにした。

第二節 BATF 強制発現 A384T Foxp3⁺ Treg の表現型解析

白血球が組織間を移動する際に、組織で産生されるケモカインと、リンパ球に発現するケモカイン受容体の相互作用が非常に重要な役割を果たす[53,55]。

第一章第一節 1-3.でも述べた通り、Treg は Tconv と比べて皮膚、肺などの非リンパ組織への細胞移動に関わるケモカイン受容体 CCR4 を高発現しており[54,56]、CCR4 欠損 Treg は皮膚や肺における恒常性を欠き、皮膚炎、肺炎、大腸炎を抑制出来ないことが示されている[47,81]。

近年の研究から、CCR4 以外のケモカイン受容体の Treg における機能解析も進んでおり、ケモカイン受容体 CXCR3 欠損 Treg は WT Treg と比較してマウス Experimental autoimmune encephalomyelitis(EAE)モデルにおいて脊髄で減少し、ConA によって誘導されるマウス肝炎モデルにおいて肝臓で減少することが示され、それらの非リンパ組織における Treg の減少が CXCR3 欠損マウスで EAE、ConA-induced hepatitis が悪化する原因であることが示唆されている[82,83]。また、ケモカイン受容体 CCR6 欠損 Treg はマウス EAE モデルにおいて脊髄で減少すること、大腸で減少し Effector T 細胞を *Rag2*^{-/-}マウスに移入することで生じる大腸炎を抑制出来ないことも示された[84,85]。ケモカイン受容体 CCR4、CXCR3、CCR6 が非リンパ組織への細胞移動に関わる一方、ケモカイン受容体 CCR7 はリンパ組織への細胞移動に関わる[53,55]。CCR7 欠損 Treg はリンパ節の傍皮質への移行能を欠き、*in vivo*において免疫応答の感作を抑制出来ないことが示されている[86,87,88,89]。

Treg の非リンパ組織における恒常性維持はケモカイン-ケモカイン受容体相互作用による非リンパ組織への移行ばかりでなく、非リンパ組織における Treg の維持によっても制御されている[61,90]。2014 年に炎症状態で上皮細胞から放出されるサイトカインである Interleukin-33(IL-33)[91]が炎症時の大腸における Treg の恒常性維持に重要な役割を担うことが明らかとなっている[90]。

2-1. BATF 強制発現 A384T Foxp3⁺ Treg の増殖能および表現型解析

BATF 発現が低下している A384T Foxp3⁺ Treg が非リンパ組織における恒常性を破綻する機構、BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg が非リンパ組織における恒常性を回復する機構を調べるため、Proliferation dye でラベルした Mock-RV WT Foxp3⁺ Treg、Mock-RV A384T Foxp3⁺ Treg、BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg(Ly5.2⁺)を放射線照射したマウス(Ly5.1⁺)に移入し、移入 7 日後にドナー RV

感染細胞の増殖、リンパ組織への細胞移動に関わるケモカイン受容体 CCR7、非リンパ組織への細胞移動に関わるケモカイン受容体 CCR4、CXCR3、CCR6、非リンパ組織における Treg の恒常性維持に関わるサイトカイン IL-33 の受容体 ST2 の発現を FCM で解析した。

その結果、Mock-RV A384T Foxp3⁺ Treg では Mock-RV WT Foxp3⁺ Treg と比べ Proliferation dye⁻ 細胞(増殖した細胞、*注釈)、増殖に伴い CCR7 発現が低下した細胞、CCR4、CCR6、ST2 発現が上昇した細胞の割合が低いことが示された(図 4、図 5A-C)。一方、Mock-RV A384T Foxp3⁺ Treg、Mock-RV WT Foxp3⁺ Treg 間で CXCR3 発現が上昇した細胞の割合は変わらなかった(図 4、図 5C)。以上の結果から、BATF 発現を低下する A384T Foxp3⁺ Treg では WT Foxp3⁺ Treg と比べ、非リンパ組織における Treg の恒常性維持に関わる CCR4、CCR6、ST2 の発現および増殖能が低下すること、リンパ組織における Treg の恒常性維持に関わる CCR7 の発現が上昇することが明らかとなった。

また、BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg では Mock-RV A384T Foxp3⁺ Treg と比べて、Proliferation dye⁻ 細胞、増殖に伴い CCR7 発現が低下した細胞、CCR4、CXCR3 発現が上昇した細胞の割合が高いことが示された(図 4、図 5A-C)。一方、BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg と Mock-RV A384T Foxp3⁺ Treg 間で CCR6、ST2 発現が上昇した細胞の割合は変わらなかった(図 4、図 5C)。以上の結果から、BATF 強制発現により非リンパ組織における Treg の恒常性維持に関わる CCR4、CXCR3 の発現上昇、リンパ組織における Treg の恒常性維持に関わる CCR7 の発現低下、増殖亢進が誘導されることが明らかとなった。

これらの結果から、BATF 発現を低下する A384T Foxp3⁺ Treg において WT Foxp3⁺ Treg と表現型に違いがあり、BATF 強制発現によってその表現型が回復するものとして、増殖、増殖に伴う CCR4 発現上昇、CCR7 発現低下が見いだされた。Foxp3^{A384T} マウス、Treg 特異的 BATF 欠損マウスが皮膚、肺を中心とした自己免疫疾患を呈すること[171](第二章)、A384T Foxp3⁺ Treg、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg の数が皮膚において大きく減少すること[171]、CCR4 欠損 Treg は皮膚や肺に移行出来ず、皮膚や肺における炎症を抑制出来ないこと[47,54,56,81]から、CCR4 は BATF が発現制御する重要な分子の一つであると考えられた。

*注釈 細胞分裂に従って Proliferation dye の蛍光は希釈されていくため、増殖した細胞は Proliferation dye⁻ 細胞となる。

2-2. IRF4 と協調出来ない変異 BATF 強制発現 A384T Foxp3⁺ Treg の増殖能および表現型解析

IRF4 と協調出来ない変異 BATF(H55Q)-RV A384T Foxp3⁺ Treg および IRF4 と協調出来る変異 BATF(E77K)-RV A384T Foxp3⁺ Treg が、野生型 BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg と同様の CCR4 発現および増殖を示すかについて検証した。本章第二節 2-1.と同様に、Proliferation dye でラベルした Mock-RV A384T Foxp3⁺ Treg、BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg、E77K-RV A384T Foxp3⁺ Treg、H55Q-RV A384T Foxp3⁺ Treg(Ly5.1⁺)を放射線照射したマウス(Ly5.2⁺)に移入し、移入 5 日後にドナーRV 感染細胞の増殖、CCR4 発現を FCM で解析した。

その結果、IRF4 と協調出来る E77K-RV A384T Foxp3⁺ Treg は BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg と比べて Proliferation dye⁻ 細胞(増殖した細胞)の割合がやや低いものの、Mock-RV A384T Foxp3⁺ Treg、H55Q-RV A384T Foxp3⁺ Treg と比べ Proliferation dye⁻ 細胞(増殖した細胞)、CCR4 を発現上昇した細胞の割合が高いことが示された(図 6A-D)。また、IRF4 と協調出来ない H55Q-RV A384T Foxp3⁺ Treg の Proliferation dye⁻ 細胞、CCR4 を発現上昇した細胞の割合は Mock-RV A384T Foxp3⁺ Treg と同程度であり、BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg、E77K-RV A384T Foxp3⁺ Treg よりも有意に低いことが示された(図 6A-D)。以上の結果から、BATF は IRF4 と協調することで Treg において増殖および CCR4 発現を誘導し、それにより非リンパ組織移行型の Treg が増え、非リンパ組織における Treg の恒常性が維持されていることが示唆された。

第三節 BATF 欠損 Foxp3⁺ Treg の表現型解析

これまでの、BATF を発現低下している A384T Foxp3⁺ Treg において WT Foxp3⁺ Treg と比べ変化する表現型、BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg において Mock-RV A384T Foxp3⁺ Treg と比べ変化する表現型について検証してきた。本節では、Treg において BATF が制御する遺伝子、分子をより直接明らかにするため、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg の表現型解析を行った。

3-1. BATF 欠損 Foxp3⁺ Treg の増殖能解析

A384T Foxp3⁺ Treg では WT Foxp3⁺ Treg と比べ増殖能が低下していること、BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg では Mock-RV A384T Foxp3⁺ Treg と比べ増殖能が亢進することを踏まえ、BATF が実際に Treg の増殖を制御するかどうかを検証するために、WT Foxp3⁺ Treg と *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg の増殖を比較した。この際、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg は WT Foxp3⁺ Treg と違い CCR7^{low} サブセットを欠くこと(141)を考慮し、WT Foxp3⁺ Treg と *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg の増殖を公平に比較するため、これらの細胞に共通に存在する CCR7^{high} サブセットをソートし Proliferation dye でラベルした後、T 細胞を欠く *Cd3ε*^{-/-}マウスに移入した。この際、*in vivo*において Treg が生存する際に必要となる IL-2 のソースとして、Foxp3⁻ Tconv を同時に移入した。移入した Treg と Tconv は Congenic marker を使用することで区別した(Treg:Ly5.2⁺、Tconv:Ly5.1⁺)。移入 5 日後にドナー Treg(Ly5.2⁺)の増殖および CCR7 の発現を検証した。その結果、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg は WT Foxp3⁺ Treg と比べ増殖する割合、CCR7 を発現低下する割合が低いことが明らかとなった(図 7A-C)。このことから、BATF は Treg の増殖および増殖に伴う CCR7 の発現低下を亢進することが明らかとなった。

3-2. BATF 欠損 Foxp3⁺ Treg の網羅的遺伝子発現解析

これまでの検証の結果、BATF は Treg の増殖、CCR7 の発現低下、CCR4 の発現上昇など Treg における様々な機能を制御していることが示された。この結果を踏まえ、私は BATF が Treg において発現制御する遺伝子群を網羅的に調べるため、WT Foxp3⁺ Treg、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg、WT Foxp3⁻ Tconv、*Batf*^{-/-} Foxp3⁻ Tconv の RNA-seq 解析を行った。RNA-seq は、polyA tail を有するすべての RNA から cDNA を逆転写により合成し、合成した cDNA ライブラリーの配列を次世代シーケンサーにより読んだ後、読んだ配列のゲノムアノテ

ションを行うことで、個々の遺伝子の転写量を全ゲノムレベルで定量的に測定する方法である[92]。

まず、BATF が Foxp3⁺ Treg、Foxp3⁻ Tconv において同様に遺伝子発現を制御しているかを検証するために、WT Foxp3⁺ Treg で *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg と比べ 2 倍以上発現が高いもしくは低い遺伝子を抽出し、WT Foxp3⁻ Tconv におけるそれらの遺伝子の FPKM 値(Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments)を *Batf*^{-/-} Foxp3⁻ Tconv におけるそれらの遺伝子の FPKM 値と比較した。その結果、WT Foxp3⁺ Treg で *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg と比べ 2 倍以上発現が高い遺伝子群、2 倍以上発現が低い遺伝子群共に WT Foxp3⁻ Tconv、*Batf*^{-/-} Foxp3⁻ Tconv 間で FPKM 値に有意な差はみられなかった(図 8A, B)。このことから、Treg における BATF 依存的遺伝子の多くは Tconv 細胞において BATF 依存的でないことが示唆された。実際に、WT Foxp3⁺ Treg において *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg と比べて 2 倍以上発現が高い遺伝子の 6%のみが WT Foxp3⁻ Tconv において *Batf*^{-/-} Foxp3⁻ Tconv と比べて発現が 2 倍以上高い遺伝子であり、WT Foxp3⁺ Treg において *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg と比べて 2 倍以上発現が低い遺伝子のうち 12%のみが WT Foxp3⁻ Tconv において *Batf*^{-/-} Foxp3⁻ Tconv と比べて発現が 2 倍以上低い遺伝子であった(図 8C)。以上の結果から、BATF は Treg において Tconv で発現制御する遺伝子群とは異なる遺伝子群の発現を制御している可能性が考えられた。これを踏まえ、私は BATF が Treg 特徴的遺伝子を制御するのではないかと考えた。

この仮説を検証するため、私は WT Foxp3⁺ Treg で *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg と比べ 2 倍以上発現が高いもしくは低い遺伝子群の WT Foxp3⁺ Treg における FPKM 値と WT Foxp3⁻ Tconv における FPKM 値を比較した。その結果、WT Foxp3⁺ Treg で *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg と比べ 2 倍以上発現が高い遺伝子の WT Foxp3⁺ Treg における FPKM 値は WT Foxp3⁻ Tconv における FPKM 値と比べて有意に高いこと、WT Foxp3⁺ Treg で *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg と比べ 2 倍以上発現が低い遺伝子の WT Foxp3⁺ Treg における FPKM 値と WT Foxp3⁻ Tconv における FPKM 値に有意な差はないことが示された(図 9A, B)。このことから、Treg において BATF 依存的に発現亢進する遺伝子の多くは Treg 特徴的高発現遺伝子であることが示唆された。実際に、WT Foxp3⁺ Treg において *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg と比べて 2 倍以上発現が高い遺伝子の 41%が WT Foxp3⁺ Treg において WT Foxp3⁻ Tconv と比べて発現が 2 倍以上高い遺伝子であった(図 9C)。

以上の結果から、BATF は Treg において Treg 特徴的高発現遺伝子の発現を亢進する機能をもつことが明らかとなった。

一方、WT Foxp3⁺ Treg において *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg と比べて 2 倍以上発現が高い遺伝子は Treg 特徴的高発現遺伝子のうち 10%のみしか占めないことが示され(図 10A)、*in vivo*における Treg の抑制能、恒常性維持に重要であることが知られている Treg 特徴的高発現遺伝子 *Il2ra*[87,93,94]、*Ctla4*[24,25]、*Ikzf4*[35]、*Tnfrsf18*[95]の発現は WT Foxp3⁺ Treg、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg でほとんど変わらないことも示された(図 10B-D)。以上の結果から、BATF は、*Il2ra*、*Ctla4*、*Ikzf4*、*Tnfrsf18* などとは異なる分子の発現誘導を介して Treg に抑制能、恒常性維持能を付与していると考えられた。

次に BATF 依存的 Treg 特徴的高発現遺伝子(WT Foxp3⁺ Treg で *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg、WT Foxp3⁻ Tconv と比べて 2 倍以上発現が高い遺伝子)にどのような遺伝子が含まれるかを検証するため、WEB-based Gene SeT AnaLysis Toolkit(Webgestalt)[96,97]を使用し、これらの遺伝子群の Gene Ontology(GO)解析[98]、KEGG パスウェイ解析[99,100]、WIKI パスウェイ解析[101]を行った。その結果、どの解析においても Chemokine に関連した GO もしくはパスウェイ、Cell adhesion に関連した GO もしくはパスウェイが有意に見いだされた(図 11、図 12A, B)。本章第一節でも述べた通り、私は BATF が Treg の非リンパ組織における恒常性を維持する機構のひとつとして BATF が Treg の非リンパ組織への細胞移動を制御する可能性を考えていた。Chemokine 関連分子、Cell adhesion 関連分子は非リンパ組織への細胞移動に関わる分子であるため、私は、同定した BATF 依存的 Treg 特徴的高発現遺伝子中に含まれる Chemokine 関連遺伝子、Cell adhesion 関連遺伝子など非リンパ組織への移行に関わりうる遺伝子を Mouse Genome Informatics(MGI)の GO classifications に基づいて調べた[174]。その結果、BATF 依存的 Treg 特徴的高発現遺伝子 73 遺伝子中に Cell adhesion、Cell migration、Chemokine receptor のいずれかに分類される遺伝子が 16 遺伝子同定された(図 13)。また、これら 16 遺伝子中には、非リンパ組織への細胞移動に関わることが知られている遺伝子 *Ccr4*、*Ccr8*、*Itgae*、*Itgb1*、*Gcnt1*、*Gpr15*が含まれていた。ここで、これら非リンパ組織への細胞移動に関わる BATF 依存的 Treg 高発現遺伝子の機能について簡単に紹介する。*Ccr4*は本章第二節においても述べた通り Treg の皮膚、肺への移行に関わるケモカイン受容体 CCR4 をコードする遺伝子であり、CCR4 欠損 Treg は皮膚炎、

肺炎、大腸炎を抑制出来ないことが示されている [47,53,54,55,56,81]。 *Ccr8* は Th2 細胞が皮膚へ移行する際に必要であることが示されているケモカイン受容体 CCR8 をコードする遺伝子である[102]。 *Itgae* は炎症皮膚、腸管粘膜固有層における T 細胞の retention に関わるとされる α E β 7 integrin の構成分子 CD103 をコードする遺伝子である[103,104,105]。一方で、CD103 欠損 T 細胞は腸管粘膜固有層でも正常に維持されるという報告もあり、T 細胞が非リンパ組織にて恒常性を維持する際の CD103 の機能は未だ controversial である[103,106]。 *Itgb1* は炎症皮膚、肺への白血球移行に関わる α 4 β 1 integrin の構成分子 Integrin β 1 をコードする遺伝子である[107,108,109]。 α 4 β 1 integrin のリガンドは血管内皮細胞に発現する VCAM-1 であり[109]、 α 4 β 1 integrin と VCAM-1 の結合は、リンパ球が血管上皮に結合し上皮上をローリングした後組織へ移行する際に、重要な役割を果たしている[110]。 *Gcnt1* は、血管内皮細胞に発現する E-selectin、P-selectin と結合する機能的な E-sel lig、P-sel lig の形成に必要な糖転移酵素 Core 2 β -1,6-*N*-acetylglucosaminyltransferase (C2 GlcNAcT) をコードする遺伝子である[107,109,111,112,113,114]。機能的な E-sel lig、P-sel lig 発現を欠く α -1,3-fucosyltransferase VII (Fut7) 欠損 Treg は皮膚への移行能を大きく低下しており、皮膚における炎症を抑制出来ないことが報告されている[48]。すなわち、Treg が皮膚に移行し、皮膚炎症を抑えるためには機能的な E-sel lig、P-sel lig の発現が重要であると考えられる[55]。このことから、C2 GlcNAcT による機能的な E-/P-sel lig の形成も Treg が皮膚に移行し、皮膚炎症を抑える上で非常に重要な役割を担っていると考えられる。 *Gpr15* は大腸粘膜固有層への T 細胞の移行を制御する分子 GPR15 をコードする遺伝子である[57]。

以上の結果から、BATF は非リンパ組織への細胞移動に関わる遺伝子を複数含む Treg 特徴的高発現遺伝子群の発現亢進に関与することが明らかとなった。

3-3. BATF 欠損 Foxp3⁺ Treg の表現型解析

非リンパ組織のうち皮膚において *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg の数が最も減少すること、Treg 特異的 BATF 欠損マウスが皮膚および肺を中心とした自己免疫疾患を発症することを踏まえ、非リンパ組織への細胞移動に関わる BATF 依存的 Treg 高発現遺伝子のうち、皮膚、肺への細胞移動に関わると報告されている遺伝子 *Ccr4*、*Gcnt1*、*Itgb1* に着目した。そして、これらの遺伝子によって発現制御される分子である CCR4、E-sel lig、P-sel lig (E-/P-sel lig)、Integrin β 1 が実際に

BATF 依存的 Treg 高発現分子であるかどうかを検証することとした。

Batf^{-/-}マウスは lymphoproliferative disorder の症状を呈すること[171]から、WT マウスおよび *Batf*^{-/-}マウスでは *in vivo* の環境が異なると考えられる。そのため、*Batf*^{-/-}マウスから取得した *Batf*^{-/-} Treg の表現型は BATF 欠損によるものなのか、BATF 欠損によって生じる lymphoproliferative disorder により 2 次的に生じたものなのかを区別することが出来ない。そこで、同個体内で WT Treg、*Batf*^{-/-} Treg を共存させ、両者の表現型を同環境下において比較するため、混合骨髄キメラを作製した。野生型マウス、*Batf*^{-/-}マウスから取得した骨髄細胞を放射線照射した野生型マウスに移入し、8~10 週間後にドナーの骨髄細胞に含まれる造血幹細胞から新たに分化してきた WT Foxp3⁺ Treg、WT Foxp3⁺ Tconv、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg、*Batf*^{-/-} Foxp3⁻ Tconv の表現型を解析した。ドナーWT 細胞、*Batf*^{-/-} 細胞、ホスト細胞は Cogenetic marker を用いて区別した。解析の際、リンパ組織への移行に関わる CCR7 と共に CCR4、E-/P-sel lig、Integrinβ1 の発現を FCM にて解析した。結果、WT Foxp3⁺ Treg では CCR7^{low}CCR4⁺E-sel lig⁺P-sel lig^{high}Integrinβ1^{high} サブセットが存在するが、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg、WT Foxp3⁻ Tconv、*Batf*^{-/-} Foxp3⁻ Tconv ではそれらのサブセットはほとんど存在しないことが示された(図 14)。また、コントロールとして、野生型マウスの骨髄細胞同士を混ぜて混合骨髄キメラを作製した場合でも、WT Foxp3⁺ Treg では、CCR7^{low}CCR4⁺E-sel lig⁺P-sel lig^{high}Integrinβ1^{high} のサブセットが存在するが、WT Foxp3⁻ Tconv ではそれらのサブセットはほとんど存在しないことが示された(Data not shown)。以上の結果から、BATF は Treg 特徴的に CCR7 発現低下、CCR4、E-/P-sel lig、Integrinβ1 の発現上昇を制御していることが明らかとなった。

第四節 考察

本章において、私は BATF が非リンパ組織における Treg の恒常性を制御する分子基盤を探った。

第二節では、BATF の発現を低下する A384T Foxp3⁺ Treg では WT Foxp3⁺ Treg と比べ非リンパ組織における Treg の恒常性維持に関わる CCR4、CCR6、ST2 の発現および増殖能が低下すること、リンパ組織への細胞移動に関わる CCR7 の発現が上昇することを示した。さらに、BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg では Mock-RV A384T Foxp3⁺ Treg と比べ、非リンパ組織への細胞移動に関わる CCR4、CXCR3 の発現が上昇すること、リンパ組織への細胞移動に関わる CCR7 の発現が低下すること、増殖が亢進することを示した。また、IRF4 と協調出来ない変異 BATF-RV A384T Foxp3⁺ Treg では CCR4 発現、増殖能が Mock-RV A384T Foxp3⁺ Treg と同程度であることを示した。

第三節では、Treg において BATF が制御する遺伝子群を網羅的に解析することで、BATF が Treg で発現亢進する遺伝子の半分程度が Treg 特徴的高発現遺伝子であること、また、それらのうちに *Ccr4*, *Gcnt1*, *Itgb1* など非リンパ組織への細胞移動に関わる遺伝子が複数含まれることを示した。また、混合骨髄キメラを作製して、WT Foxp3⁺ Treg、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg、WT Foxp3⁻ Tconv、*Batf*^{-/-} Foxp3⁻ Tconv を同個体内で共存させ、WT Foxp3⁺ Treg と比べ、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg、WT Foxp3⁺ Tconv、*Batf*^{-/-} Foxp3⁻ Tconv では CCR4、E-/P-sel lig、Integrinβ1 の発現が低く、CCR7 の発現が高いことを示した。以上のことから、BATF は Treg cell-intrinsic に Treg 特徴的高発現分子である CCR4、E-/P-sel lig、Integrinβ1 の発現亢進、Treg 特徴的低発現分子である CCR7 の発現低下を誘導していることが明らかとなった。さらに、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg では WT Foxp3⁺ Treg と比べ、増殖能が低下していることも示した。

本章の結果から、BATF は Treg において CCR4、E-/P-sel lig、Integrinβ1 などの非リンパ組織への移行に関わる分子を制御することで、Treg の非リンパ組織における恒常性を制御している可能性が考えられた。ここでは、BATF が制御するこれらの分子発現が Treg で Tconv と比べて高い意義について考察する (BATF が制御するこれらの分子発現が Treg で高い理由については次章(第四章)で検証するため、ここでは触れない)。皮膚、肺、腸管などの非リンパ組織は常に外来抗原と接する場であり、また、物理的な傷害を容易に受ける。そのため、外来抗原に対する免疫応答や物理的傷害による自然炎症が頻繁に起きると考え

られる。非リンパ組織の恒常性を保つためには、そうして起こった免疫応答や自然炎症が効率よく鎮静化される必要がある。私は BATF 依存的に Treg が非リンパ組織への移行に関わる分子を高発現する生理学的な意義は、非リンパ組織に Treg が効率的に移行し、効率的に組織炎症を抑える事で、非リンパ組織の恒常性を維持するためであると考えている。

本章において私は BATF が Treg の増殖を亢進していることを示した。では、BATF はどのようにして Treg の増殖を亢進しているのでしょうか。Treg が *in vivo* において増殖する際には、IL-2 および抗原提示細胞である樹状細胞(DC)との相互作用が必要であることが示されている[87,93,94,115]。本章第三節で行った RNA-seq 解析の結果、IL-2 の受容体である CD25 をコードする遺伝子 *Il2ra*、IL-2 シグナルの下流で重要な役割を果たす STAT5A、STAT5B をコードする遺伝子 *Stat5a*、*Stat5b* 発現は *Batf*^{+/+} Foxp3⁺ Treg、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg 間で差がみられないことが示されていること(図 10B、Data not shown)から、WT Foxp3⁺ Treg、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg 間で IL-2 による増殖には大きな差はないと考えられる。また、この考察は *in vitro* で TCR 刺激を入れるための Anti-CD3//28 Beads および IL-2 存在下で培養した場合に、WT Foxp3⁺ Treg、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg 間で増殖がほとんど変わらないこと(Data not shown)からも支持される。それでは、BATF は Treg と DC との相互作用に影響を与えているのでしょうか？本章にて私が同定した非リンパ組織移行に関わるとされている BATF 依存的 Treg 高発現分子である CCR4、E-/P-sel lig、Integrin β 1 によって構成される α 4 β 1 integrin のリガンドもしくは受容体としてしられる CCL17・CCL22(CCR4 ligand)、E-selectin(E-sel lig の受容体)、P-selectin(P-sel lig の受容体)、VCAM-1(α 4 β 1 integrin のリガンド)をコードする遺伝子(*Ccl17*、*Ccl22*、*Sele*、*Selp*、*Vcam1*)の発現分布をマウスの多様な免疫細胞の網羅的トランスクリプトーム解析データベースである Immunological Genome Project (Immgen) データベース[116,117]を用いて調べたところ、*Ccl17*、*Ccl22*、*Selp*、*Sele*、*Vcam1* は非リンパ組織、リンパ組織を問わず様々な樹状細胞亜集団にも高発現していることが示されていた(Data not shown)。以上の結果から、BATF は Treg において CCR4、E-/P-sel lig、Integrin β 1 を発現亢進することで Treg と DC の相互作用を促進し、結果 Treg の増殖が亢進する可能性が考えられた。この考察は、CCR4 が抗原に感作された T 細胞と活性化した DC の結合を促進するという報告からも支持される[118]。今後、二光子励起顕微鏡を用いて、WT Foxp3⁺

Treg もしくは *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg と DC の相互作用を皮膚および皮膚所属リンパ節においてライブイメージングすることで、より直接的に BATF が Treg と DC の相互作用に寄与しているかを明らかに出来ると期待している。

本章において BATF 発現を低下する A384T Foxp3⁺ Treg では ST2、CCR6 などの非リンパ組織における恒常性維持に関わる分子の発現が低下していたが、BATF を A384T Foxp3⁺ Treg に強制発現した場合でもこれらの分子発現は有意に上昇しなかった。このことから、A384T Foxp3⁺ Treg には BATF の発現低下とは独立に ST2、CCR6 が発現低下する機構が存在する可能性が示された。一方、A384T Foxp3⁺ Treg では CXCR3 などの発現は WT Foxp3⁺ Treg と同等であるが、BATF 強制発現により CXCR3 の発現は亢進した。このことから、BATF により発現制御される分子の中に、BATF 発現低下により発現影響を受けやすい分子(CCR4 など)、発現影響を受けにくい分子(CXCR3 など)が存在する可能性も示された。しかしながら、これらの可能性については本研究ではこれ以上追求していない。

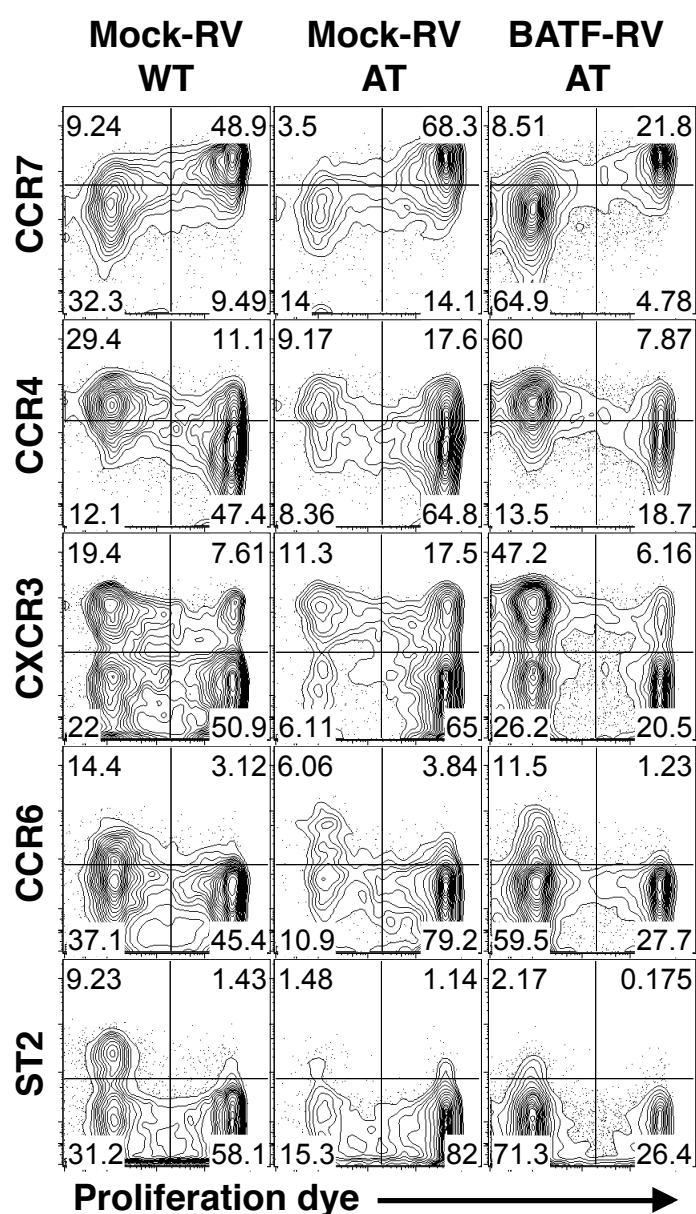


図4 BATF-RV A384T Foxp3⁺ Tregの表現型解析 その1

Proliferation dyeでラベルしたMock-RV(Thy1.1 reporter) WT Foxp3⁺ Treg (Mock-RV WT, Ly5.2⁺)、Mock-RV A384T Foxp3⁺ Treg (Mock-RV AT, Ly5.2⁺)、BATF-RV(Thy1.1 reporter) A384T Foxp3⁺ Treg (BATF-RV AT, Ly5.2⁺)を放射線照射したマウス(Ly5.1⁺)に移入し、7日後に移入したRV感染Foxp3⁺ Treg(Ly5.2⁺Thy1.1⁺)の表現型解析を行った。脾臓におけるドナーRV感染細胞の代表的なFCM解析例。

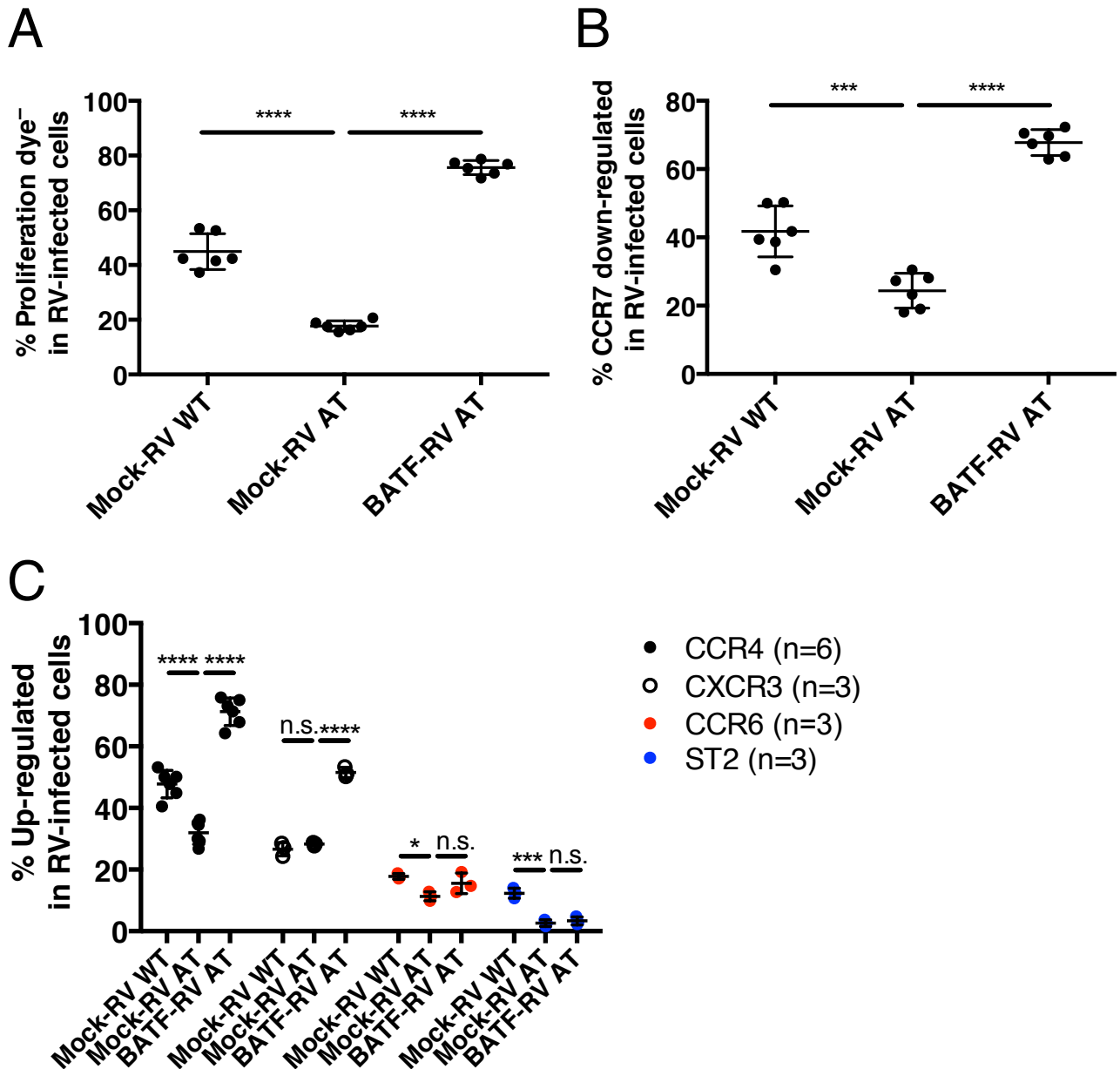
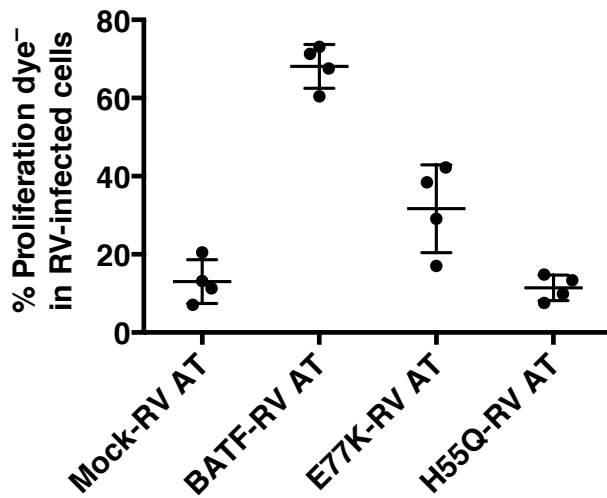


図5 BATF-RV A384T Foxp3⁺ Tregの表現型解析 その2

Proliferation dyeでラベルしたMock-RV(Thy1.1 reporter) WT Foxp3⁺ Treg (Mock-RV WT, Ly5.2⁺)、Mock-RV A384T Foxp3⁺ Treg (Mock-RV AT, Ly5.2⁺)、BATF-RV(Thy1.1 reporter) A384T Foxp3⁺ Treg (BATF-RV AT, Ly5.2⁺)を放射線照射したマウス(Ly5.1⁺)に移入し、7日後に移入したRV感染Foxp3⁺ Treg (Ly5.2⁺Thy1.1⁺)の表現型解析を行った。(A-C) 脾臓におけるドナーRV感染細胞(Ly5.2⁺Thy1.1⁺)中の(A) Proliferation dye⁻細胞の割合(%), n=6、(B) CCR7の発現が低下した細胞の割合(%), n=6、(C) CCR4、CXCR3、CCR6、ST2の発現が上昇した細胞の割合(%). 各個体における割合および平均値±SDを表示。*p<0.05、***p<0.005、****p<0.001、n.s.:有意差なし(p>0.05)。One-way ANOVAによる統計解析を行った。

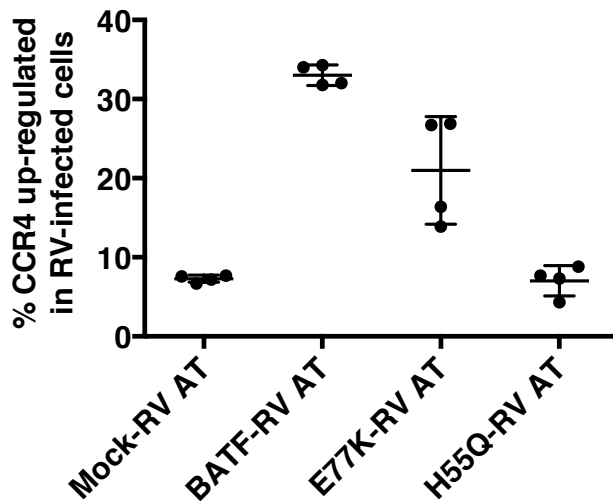
A



B

	+BATF	+E77K	+H55Q	+Mock
+BATF	--	****	****	****
+E77K	****	--	**	*
+H55Q	****	**	--	n.s.
+Mock	****	*	n.s.	--

C



D

	+BATF	+E77K	+H55Q	+Mock
+BATF	--	**	****	****
+E77K	**	--	***	***
+H55Q	****	***	--	n.s.
+Mock	****	***	n.s.	--

図6 変異BATF-RV A384T Foxp3⁺ Tregの表現型解析

Proliferation dyeでラベルしたMock-RV(GFP reporter) A384T Foxp3⁺ Treg (Mock-RV AT, Ly5.1⁺)、BATF^{WT}-RV(GFP reporter) A384T Foxp3⁺ Treg (BATF-RV AT, Ly5.1⁺)、BATF^{E77K}-RV(GFP reporter) A384T Foxp3⁺ Treg (E77K-RV AT, Ly5.1⁺)、BATF^{H55Q}-RV(GFP reporter) A384T Foxp3⁺ Treg (H55Q-RV AT, Ly5.1⁺)を放射線照射したマウス (Ly5.2⁺)に移入し、5日後に移入したRV感染細胞(Ly5.1⁺GFP⁺)の表現型解析を行った。(A) 脾臓におけるドナーRV感染細胞(Ly5.1⁺GFP⁺)中のProliferation dye⁻細胞の割合(%), n=4、各個体における割合および平均値±SDを表示。(B) (A)の統計検定結果。(C) 皮膚所属リンパ節におけるドナーRV感染細胞(Ly5.1⁺GFP⁺)中のCCR4発現が上昇した細胞の割合(%), n=4、各個体における割合および平均値±SDを表示。(D) (C)の統計検定結果。(B, D) *p<0.05、***p<0.005、****p<0.001、n.s.:有意差なし(p>0.05)。One-way ANOVAによる統計解析を行った。

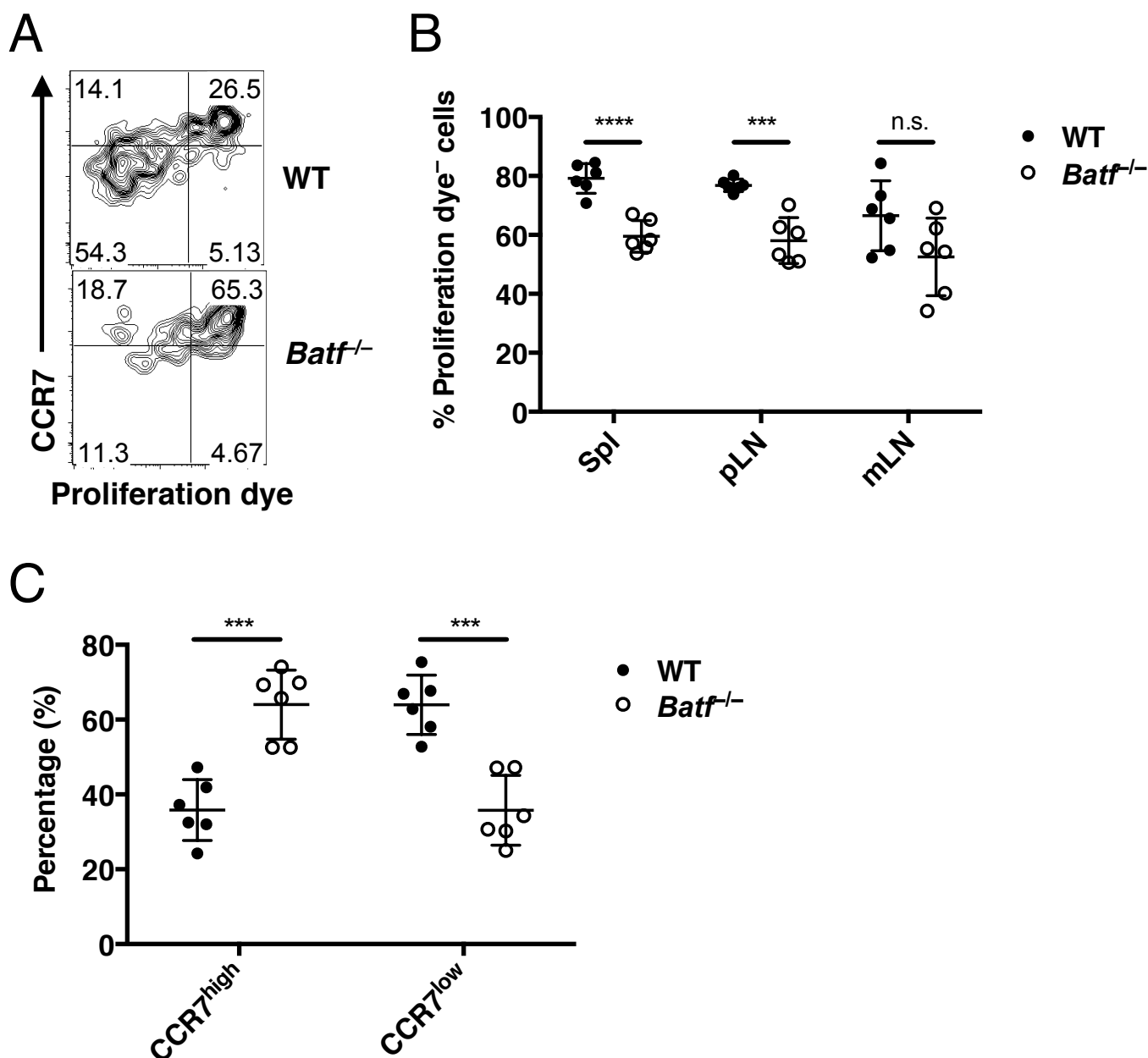


図7 *Batf*^{-/-}CCR7^{high}Foxp3⁺ Tregの増殖およびCCR7発現推移解析

Proliferation dyeでラベルしたWTおよび*Batf*^{-/-}マウス由来CCR7^{high} Foxp3⁺ Treg(Ly5.2⁺)をFoxp3⁻ Tconv(Ly5.1⁺)と共に*Cd3ε*^{-/-}マウスに移入し、5日後に移入したTreg (Ly5.2⁺)の表現型解析を行った。

(A) 脾臓におけるドナーTreg(Ly5.2⁺)の代表的なFCM解析結果。

(B) 脾臓(Spl)、皮膚所属リンパ節(pLN)、腸間膜リンパ節(mLN)におけるドナーTreg(Ly5.2⁺)中のProliferation dye⁻細胞の割合(%), n=6、各個体における割合および平均値±SDを表示。(C) 脾臓におけるドナーTreg(Ly5.2⁺)中のCCR7^{high}サブセット、CCR7^{low}サブセットの割合(%), n=6、各個体における割合および平均値±SDを表示。(B, C)

p<0.005、*p<0.001、n.s.:有意差なし(p>0.05)。TTESTによる統計解析を行った。

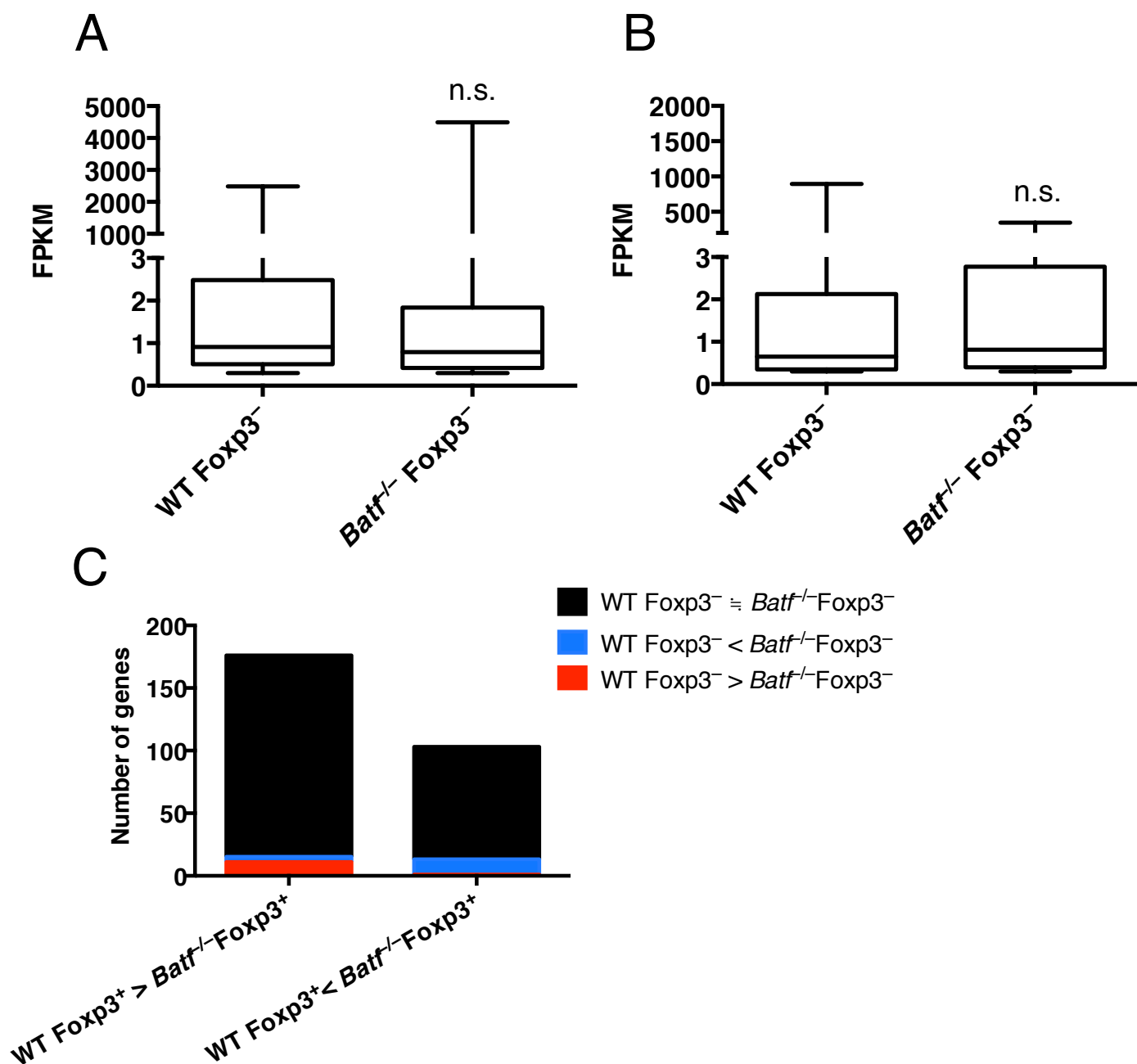


図8 *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Tregの網羅的遺伝子発現解析 その1

(A-C) WT Foxp3⁺ Treg、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg、WT Foxp3⁻ Tconv、*Batf*^{-/-} Foxp3⁻ TconvのRNA-seq解析。(A) WT Foxp3⁺ Tregで*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Tregと比べ2倍以上発現が高い遺伝子群のWT Foxp3⁻ Tconv、*Batf*^{-/-} Foxp3⁻ Tconv間でのFPKM値比較。n=176。n.s.:有意差なし(p>0.01)。(B) WT Foxp3⁺ Tregで*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Tregと比べ2倍以上発現が低い遺伝子群のWT Foxp3⁻ Tconv、*Batf*^{-/-} Foxp3⁻ Tconv間でのFPKM値比較。n=103。n.s.:有意差なし(p>0.01)。(A, B) Mann-Whitney UTESTによる統計検定を行った。Box-and-Whisker Plotを表示。(C) WT Foxp3⁺ Tregで*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Tregと比べ発現が2倍以上高いもしくは低い遺伝子群をWT Foxp3⁻ Tconv、*Batf*^{-/-} Foxp3⁻ Tconv間の発現比で分類した。WT Foxp3⁻ Tconvで*Batf*^{-/-} Foxp3⁻ Tconvと比べ2倍以上発現が高い遺伝子(赤色)、2倍以上発現が低い遺伝子(青色)、2倍未満しか発現が変わらない遺伝子(黒色)を表示。

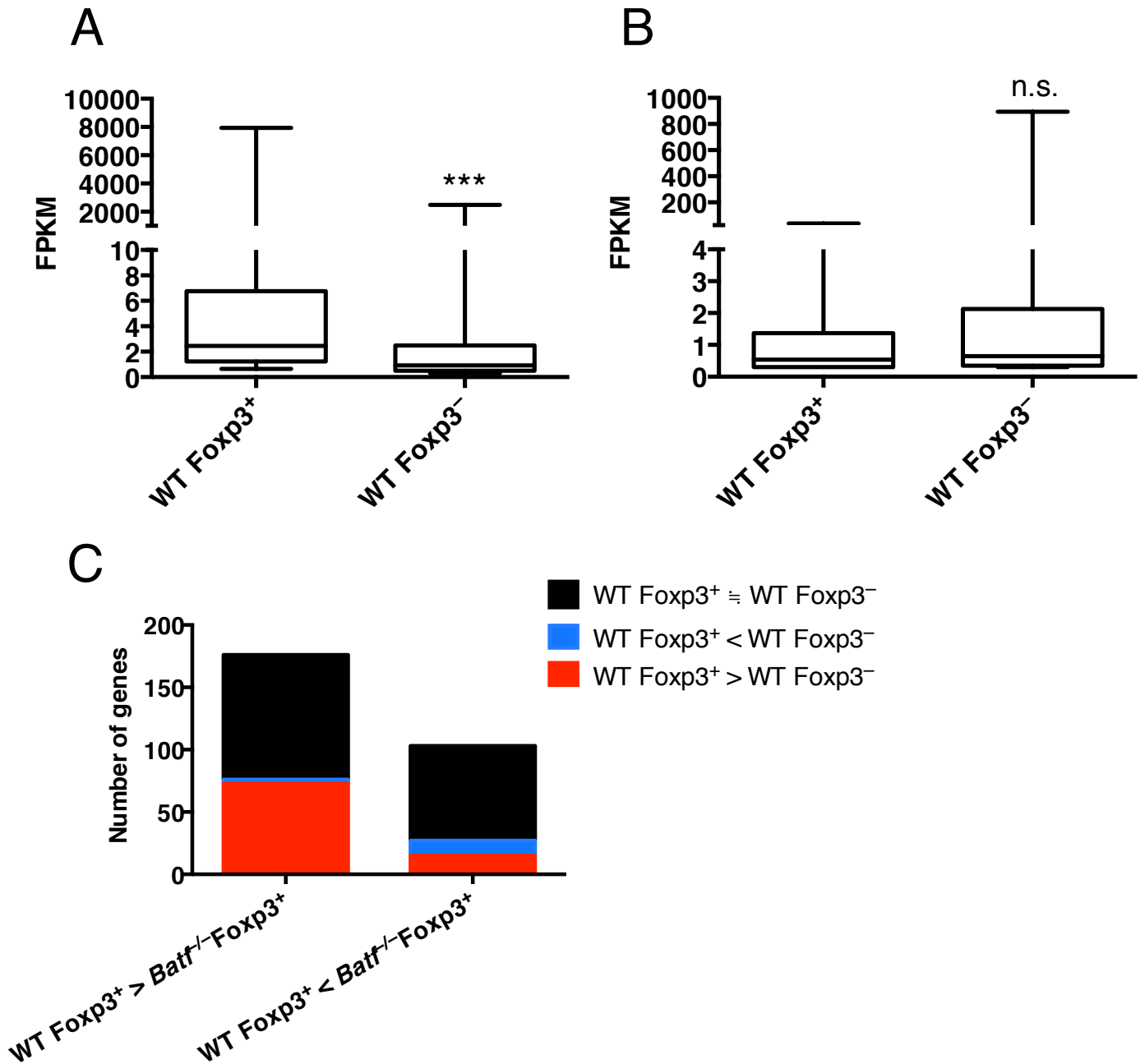


図9 *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Tregの網羅的遺伝子発現解析 その2

(A-C) WT Foxp3⁺ Treg、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg、WT Foxp3⁻ Tconv、*Batf*^{-/-} Foxp3⁻ TconvのRNA-seq解析。(A) WT Foxp3⁺ Tregで*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Tregと比べ2倍以上発現が高い遺伝子群のWT Foxp3⁺ Treg、WT Foxp3⁻ Tconv間でのFPKM値比較。n=176。

***p<0.0001。(B) WT Foxp3⁺ Tregで*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Tregと比べ2倍以上発現が低い遺伝子群のWT Foxp3⁺ Treg、WT Foxp3⁻ Tconv間でのFPKM値比較。n=103。n.s.:有意差なし(p>0.01)。(A, B) Mann-Whitney UTESTによる統計検定を行った。Box-and-Whisker Plotを表示。(C) WT Foxp3⁺ Tregで*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Tregと比べ発現が2倍以上高いもしくは低い遺伝子群をWT Foxp3⁺ Treg、WT Foxp3⁻ Tconv間の発現比で分類した。WT Foxp3⁺ TregでWT Foxp3⁻ Tconvと比べ2倍以上発現が高い遺伝子(赤色)、2倍以上発現が低い遺伝子(青色)、2倍未満しか発現が変わらない遺伝子(黒色)を表示。

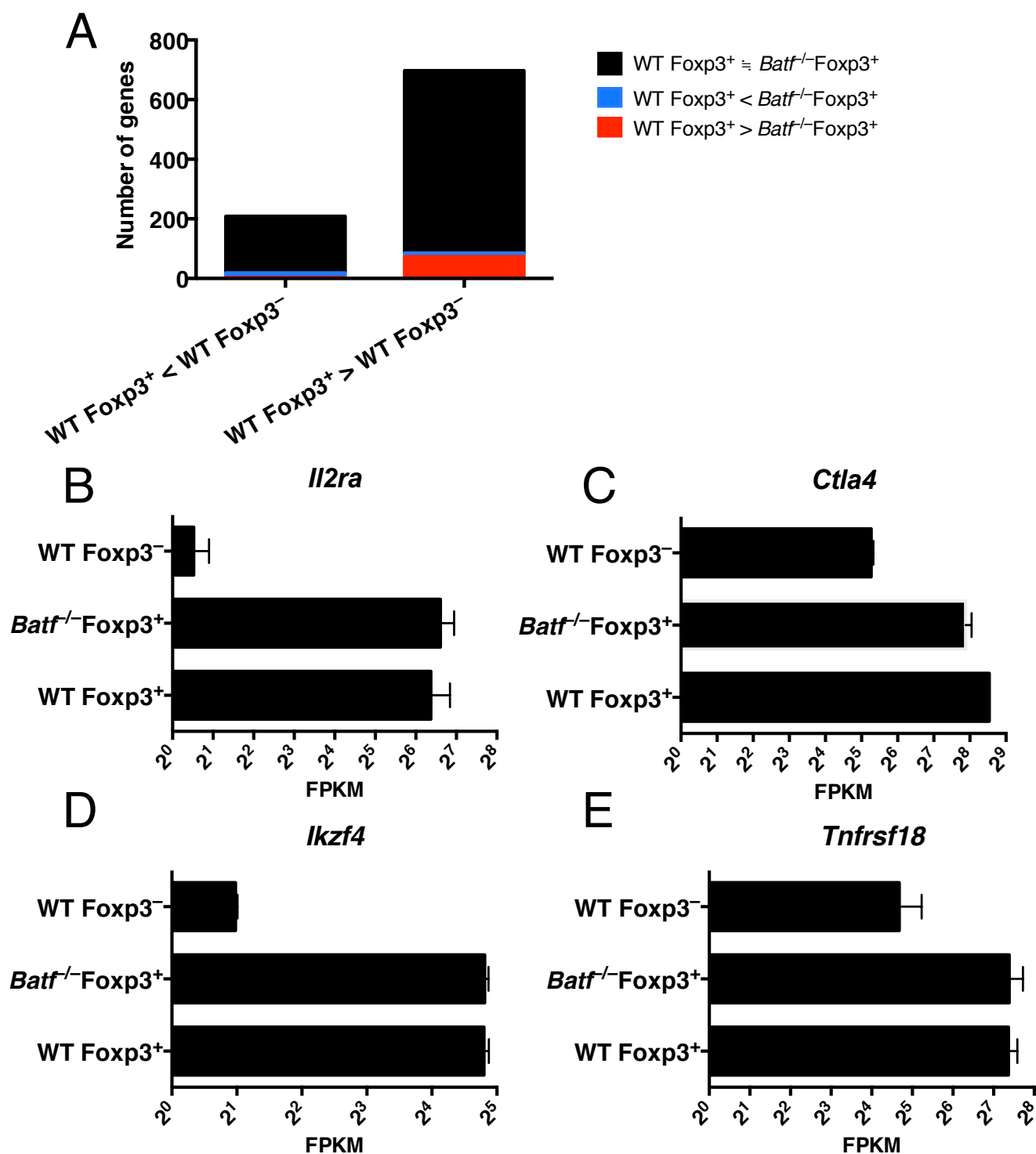


図10 *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Tregの網羅的遺伝子発現解析 その3

(A-E) WT Foxp3⁺ Treg、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg、WT Foxp3⁻ Tconv、*Batf*^{-/-} Foxp3⁻ TconvのRNA-seq解析。(A) WT Foxp3⁺ TregでWT Foxp3⁻ Tconvと比べ発現が2倍以上高いもしくは低い遺伝子群をWT Foxp3⁺ Treg、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg間の発現比で分類した。WT Foxp3⁺ Tregで*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Tregと比べ2倍以上発現が高い遺伝子(赤色)、2倍以上発現が低い遺伝子(青色)、2倍未満しか発現が変わらない遺伝子(黒色)を表示。(B) *Il2ra*、(C) *Ctla4*、(D) *Ikzf4*、(E) *Tnfrsf18*のWT Foxp3⁺ Treg、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg、WT Foxp3⁻ TconvにおけるFPKM値。平均値 \pm SDを表示。n=2。

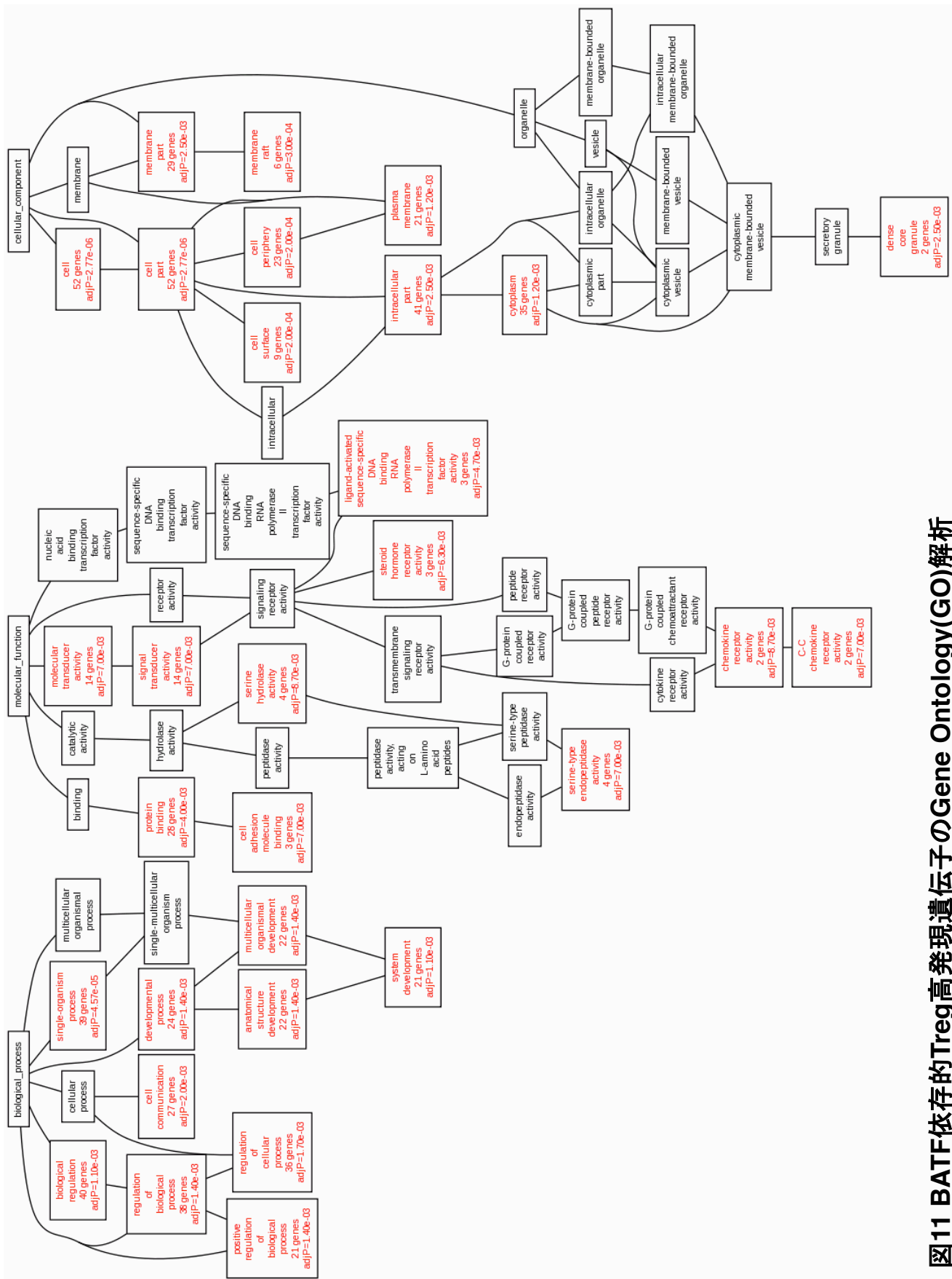
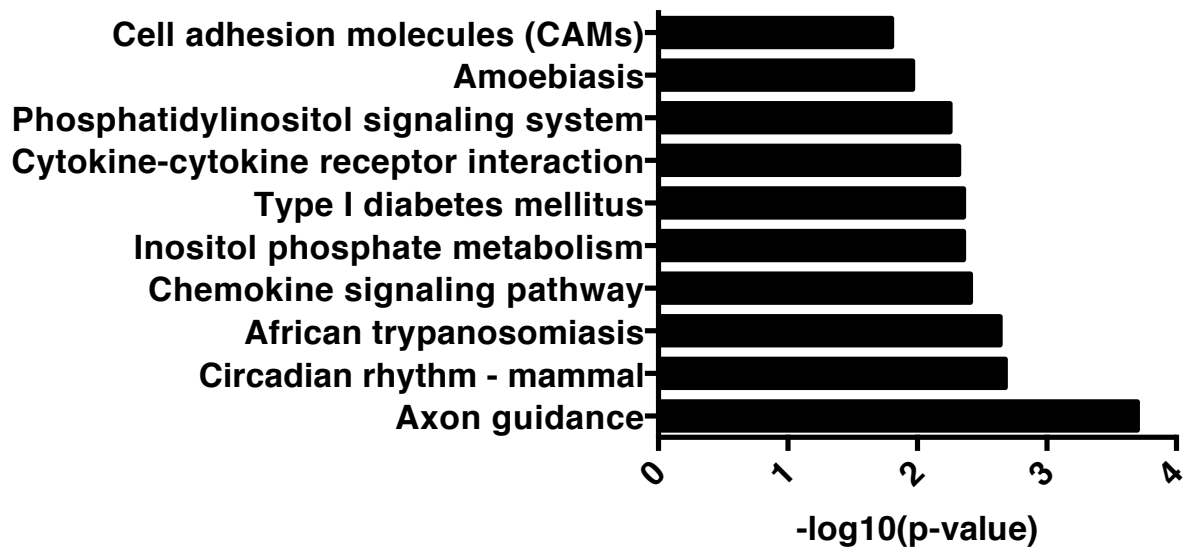


図11 BATF依存的Treg高発現遺伝子のGene Ontology(GO)解析

WT Foxp3⁺ TregでBatf^{-/-} Foxp3⁺ Tregと比べ2倍以上発現が高い、かつ WT Foxp3⁺ TregでWT Foxp3⁻ Tconvと比べ2倍以上発現が高い遺伝子群のGene Ontology (GO)解析。p<0.05(赤色)、有意差なし(黒色)。

A



B

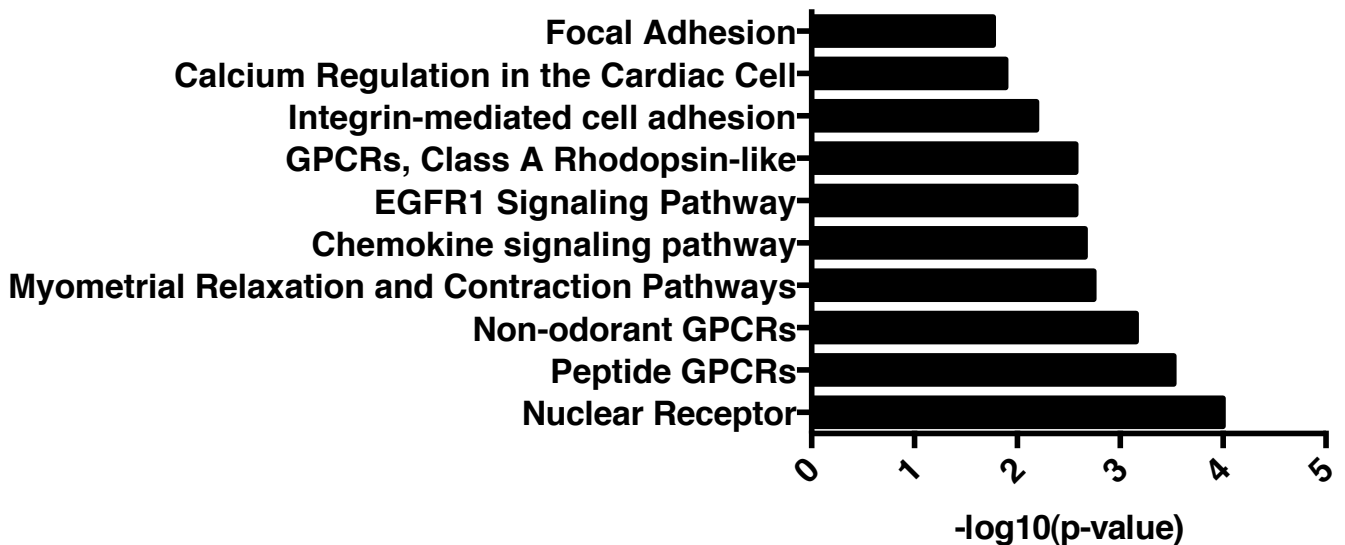


図12 BATF依存的Treg高発現遺伝子のパスウェイ解析

(A, B) WT Foxp3⁺ Tregで*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Tregと比べ2倍以上発現が高い かつ WT Foxp3⁺ TregでWT Foxp3⁻ Tconvと比べ2倍以上発現が高い遺伝子群のパスウェイ解析。
(A) KEGG pathwayを使用。(B) Wiki pathwayを使用。

WT Foxp3⁺ > WT Foxp3⁻ and WT Foxp3⁺ > Batf^{-/-}Foxp3⁺

1700001D01Rik	Gm9199	Nav2	Slc7a10	Adam8
4930558J18Rik	Gp49a	Npas4	Snord100	Cass4
Adap1	Gpr55	Nr4a2	Stom	Ccr4
AI507597	Gpr68	Nrbp2	Syng1	Ccr8
AU021063	Gsg2	Pcyt1b	Tigit	Cpe
B4galnt4	Gsta4	Plcb4	Tmem205	Gcnt1
Cd83	Gzmb	Plcd1	Tmprss3	Gpr15
Cep290	Hgfac	Prr19	Tox2	Il18
Ces2c	Hip1	Rgs16	Ttc39c	Itgae
Clip3	Ier5l	Rgs9		Itgb1
Csrp2	Krt17	Rora		Myo1f
D430019H16Rik	Lilrb4	Rorc		Nrp1
Ddx43	Miat	S100a4		Pvrl2
E130308A19Rik	Mir3061	Scgb3a1		Rhod
Galr3	Mir3960	Serpinb1a		Sema6d
Gas2l1	Mir680-2	Slc25a43		St14

図13 BATF依存的Treg高発現遺伝子の一覧

(A, B) WT Foxp3⁺ TregでBatf^{-/-} Foxp3⁺ Tregと比べ2倍以上発現が高い かつ WT Foxp3⁺ TregでWT Foxp3⁻ Tconvと比べ2倍以上発現が高い遺伝子群の一覧。緑色でマークされる遺伝子はMGIのGene Ontology (GO) classificationsにおいてCell adhesion、Cell migration、Chemokine receptorのいずれかに分類される遺伝子。

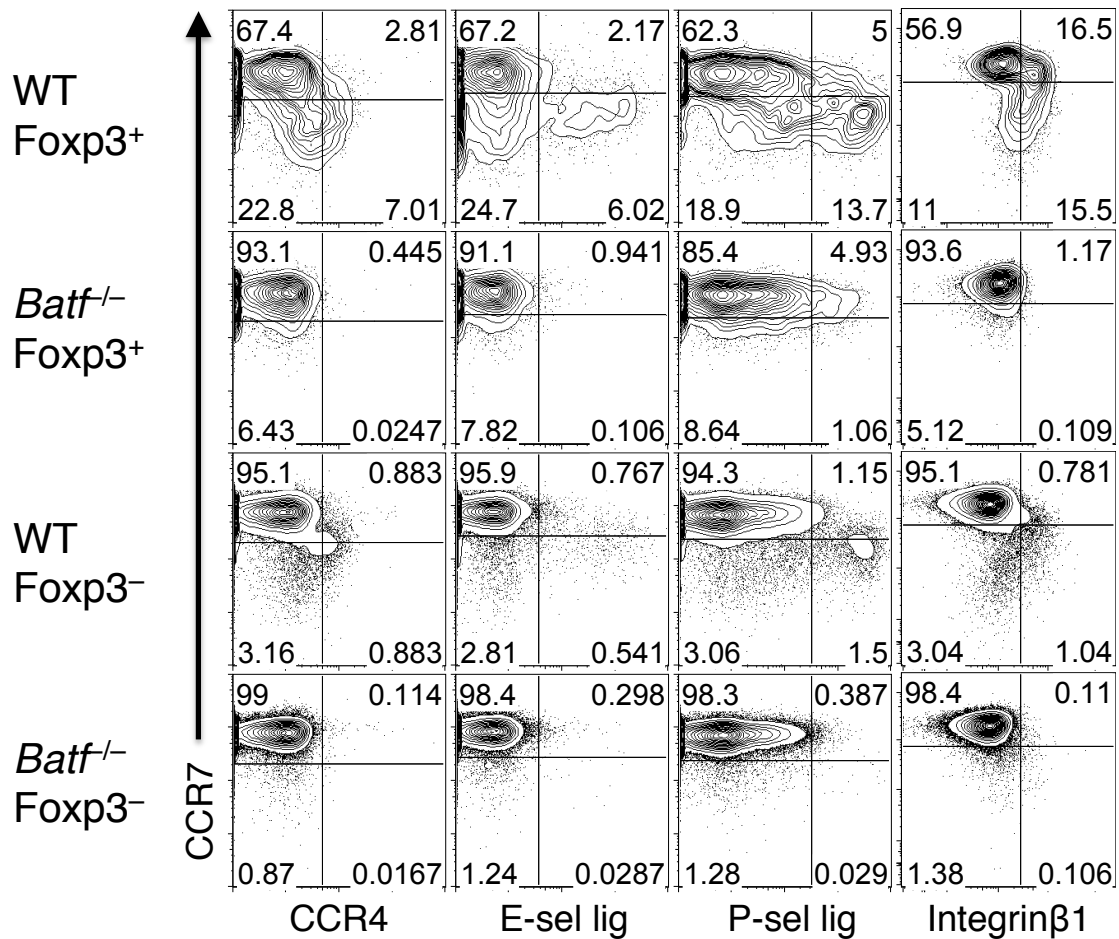


図14 *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Tregの表現型解析

WTマウス、*Batf*^{-/-}マウスの骨髓細胞を放射線照射したWTマウスに移入し、8-10週間後にドナー由来WT Foxp3⁺ Treg、WT Foxp3⁺ Tconv、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg、*Batf*^{-/-} Foxp3⁻ Tconvの表現型をFCMにて解析した。ドナー由来WT細胞、*Batf*^{-/-}細胞、宿主由来WT細胞はCongenic marker(Ly5.1⁺Ly5.2⁺、Ly5.1⁺Ly5.2⁻、Ly5.1⁻Ly5.2⁺)により判別した。FCM解析の代表例。

第四章 BATF と Foxp3 は相互依存的に転写制御領域に結合する

第一節 序

第三章までの研究から BATF は *Ccr4*、*Gcnt1*、*Itgb1* など非リンパ組織への細胞移動に関わる遺伝子を含む複数の Treg 特徴的高発現遺伝子の発現を亢進していることが明らかとなった。しかしながら、BATF がどのようにして Treg 特徴的高発現遺伝子の発現を亢進しているのか、その分子基盤は依然として不明であった。そこで私は本章において“転写因子 BATF が Treg において特徴的なゲノム結合能を獲得することで、Treg 特徴的高発現遺伝子の発現を亢進する”という仮説にたち、その仮説の検証を試みた。

第二節では、BATF の Treg 特徴的なゲノム結合領域を同定するため、Treg、Tconv において BATF 結合ゲノム領域を全ゲノムレベルで探索した。その結果、Tconv と比べて Treg において BATF がより強く結合するゲノム領域(Treg 選択的 BATF 結合領域)を同定し、さらに、その領域の 66%に Foxp3 も結合することを明らかにした。

第三節では、第二節の結果を踏まえ、転写因子 Foxp3 が Treg 選択的な BATF 結合を誘導するかどうかを検証した。その結果、Foxp3 依存的な BATF 結合領域が存在し、それらが Treg 特徴的 BATF 高結合領域の 46%を占めることを示した。このことから、Foxp3 は Treg 選択的な BATF 結合の一部を誘導していることが明らかとなった。

第四節では、第三節の結果を踏まえ、転写因子 BATF が Foxp3 のゲノム結合を誘導するかを検証した。その結果、BATF 依存的 Foxp3 結合領域が存在することを示した。また、それら BATF 依存的 Foxp3 結合領域の一部は Foxp3 依存的 BATF 結合領域と重複することを示した。すなわち、Treg には Foxp3、BATF が相互依存的に結合する領域(Foxp3-BATF 相互依存結合領域)が存在することが明らかとなった。ここまでで、Foxp3 および BATF は互いをゲノムにリクルートし合うことで、お互いに転写因子としての機能を高め合う可能性が考えられた。

第五節では、同定した Foxp3-BATF 相互依存結合領域の特性解析を行った。まず、Foxp3-BATF 相互依存的結合領域がゲノム上のどのような位置に存在するかを検証し、これらが転写開始点(TSS)から遠位の Intergenic もしくは intron に存在することを示した。そこで、これらの領域がエンハンサー領域である可能性を考え、実際に細胞特異的エンハンサー領域と相関がみられる細胞特異的

DNAaseI 高感受性領域(ここでは Treg 特異的 DNaseI 高感受性領域)、p300 結合領域と重複するかを検証した [119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130]。その結果、Foxp3-BATF 相互依存的結合領域は Treg において DNaseI 高感受性であるが Tconv では DNaseI 感受性がないもしくは低い領域(Treg 特異的 DNaseI 高感受性領域)と 84%重なること、Treg における p300 結合領域と 68%重なることを示した。さらに、これら Foxp3-BATF 相互依存結合領域の周囲に、第三章第三節において同定した非リンパ組織への細胞移動に関わる BATF 依存的 Treg 特徴的高発現遺伝子 *Ccr4*、*Gcnt1*、*Itgb1* が含まれることを明らかにした。

第二節 Treg、Tconv 間での BATF ゲノム結合パターンの比較解析

2-1. Treg 選択的 BATF 結合領域の存在

本章第一節でも述べた通り私は“転写因子 BATF が Treg において特徴的なゲノム結合能を獲得することで、Treg 特徴的高発現遺伝子の発現を亢進する”という仮説にたち、まず、転写因子 BATF が実際に Treg において特徴的なゲノム結合パターンを示すのかを調べることにした。

BATF が結合するゲノム領域、結合強度を全ゲノムレベルで同定するため、ChIP-seq 解析を用いた。ChIP-seq は、転写因子などの核内因子が結合するゲノム領域およびその因子のゲノムへの結合強度(度数)を全ゲノムレベルで明らかにする方法である[131,132,133]。具体的には、(1) 転写因子などの核内因子が結合したゲノム DNA をソニケーションし、(2) 断片化 DNA のうちある核内因子が結合する DNA 断片のみをその核内因子に対する特異的な抗体を用いることで免疫沈降し、(3) 免疫沈降した DNA 断片からライブラリーを作製し、それらの配列を次世代シーケンサーで読み、(4) 読んだ配列情報のゲノムアノテーションを行い、実際にある核内因子が結合する領域およびその結合強度(度数)をゲノム上に表示されるピークおよびピークの高さとして同定する方法である。

私はまず、Treg、Tconv における BATF のゲノム結合パターンを全ゲノムレベルで比較するため、Foxp3⁺ Treg、Foxp3⁻ Tconv における抗 BATF 抗体を用いた ChIP-seq 解析を行った。その結果、Tconv と比べ Treg において BATF 結合ピークが有意に高いゲノム領域(Treg 選択的 BATF 結合領域)を 1626 領域、Treg と比べ Tconv において BATF 結合ピークが有意に高いゲノム領域(Tconv 選択的 BATF 結合領域)を 456 領域、Treg および Tconv で BATF 結合ピークの高さに有意な差がみられないゲノム領域(共通 BATF 結合領域)を 9733 領域同定した(図 15A)。この結果から、BATF 結合領域の多くは Treg、Tconv 間で保存されているが、BATF は一部 Treg で Tconv とは異なるゲノム結合パターンを示すことが明らかとなった。

2-2. Treg 選択的 BATF 結合領域のモチーフ解析

第一章でも述べた通り、転写因子は特徴的な DNA 配列に結合することが知られており、この DNA 配列を転写因子結合モチーフとよぶ[134,135,136]。ある転写因子が結合する領域において転写因子結合モチーフを検索することでその転写因子と協調して DNA に結合する転写因子を推測することが出来る

[134,135,136]。そこで、私は同定した Treg 選択的 BATF 結合領域、共通 BATF 結合領域、Tconv 選択的 BATF 結合領域に他にどのような転写因子が結合するかの手がかりを得るため、Regulatory Sequence Analysis Tools (RSAT)を使用してこれらの領域に有意に enrich されるモチーフ解析を行った[137,138]。その結果、Treg 選択的 BATF 結合領域に見いだされる上位 5 モチーフに BATF が他の AP-1 ファミリー転写因子とヘテロダイマーを形成して結合する AP-1 binding motif (TGACTCA) [62,63,71,139]、Treg において高発現し Treg の機能的分化を司る転写因子 Foxp3 を含む Forkhead(FKH) box protein family が結合する FKH binding motif (AAACAA) [139,140,141,142]が含まれていた(図 15B)。また、これらのモチーフは共通 BATF 結合領域の上位 5 モチーフには存在しなかった(図 15C)。このことから、BATF は Treg 選択的に AP-1 binding motif、FKH binding motif が存在するゲノム領域に結合することが示唆された。

一方で、Tconv 選択的 BATF 結合領域にも上位 5 モチーフに FKH binding motif が含まれていた(図 15D)。このことから、Tconv 選択的 BATF 結合領域にも FKH ファミリーの転写因子が結合する可能性が考えられたが、本研究では Treg において BATF がもつ機能について注目して研究を進めたため、Tconv 選択的 BATF 結合領域についてはこれ以上追求していない。また、Treg 選択的 BATF 結合領域、共通 BATF 結合領域、Tconv 選択的 BATF 結合領域には、ETS ファミリー転写因子結合モチーフ、SP/KLF ファミリー転写因子結合モチーフ、RUNX ファミリー転写因子結合モチーフなど様々なモチーフが見つかり(図 15B-D)、ETS、RUNX、SP/KLF などの転写因子も BATF 結合領域に結合する可能性が示唆された。しかしながら、本研究ではその可能性についてもこれ以上は追求していない。

2-3. Treg 選択的 BATF 結合領域への Foxp3 の結合

本章第二節 2-2.において Treg 選択的 BATF 結合領域に FKH binding motif が enrich されたことを踏まえ、Treg 選択的 BATF 結合領域に Foxp3 が結合するかを検証することとした。

この際、BATF が IRF4 と協調して AICE に結合し様々な免疫細胞の機能分化を誘導すること[63,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77]、BATF が IRF4 と協調することが Treg の機能分化においても重要であることが示唆されていたこと(第

二章、第三章)、IRF4はFoxp3と協調してTregの機能分化を誘導することが示唆されていたこと[36,78]を踏まえ、Foxp3、IRF4、BATFの三者がTregにおいて協調し、Tregの機能分化を制御する可能性を考え、まず、抗Foxp3抗体、抗IRF4抗体を用いたTreg、TconvにおけるChIP-seq解析を行い、Foxp3・IRF4・BATFの結合領域の重複を確認した。その結果、Treg、TconvどちらにおいてもBATF結合領域とIRF4結合領域は大きく重複することが示された(図16A, B)。また、TregにおいてFoxp3結合領域がIRF4結合領域と大きく重複することも示された。さらに、IRF4結合の有無に関わらず、TregにおけるBATF結合領域およびFoxp3結合領域は大きく重複することが示された(図16A)。以上の結果から、BATFはTregにおいてもIRF4と協調して働く可能性が示され、また、Foxp3がIRF4と協調するという過去の報告が支持された。さらに、BATFはTregにおいてIRF4の有無に関わらずFoxp3と協調して働く可能性が示された。

次に、Treg選択的BATF結合領域のどの程度にFoxp3が結合するかを検証した。その結果、Treg特徴的BATF高結合領域1626領域中1070領域(66%)にFoxp3が結合することが明らかとなった(図17A)。

Treg選択的BATF高結合領域をFoxp3が結合する領域(1070領域)、Foxp3が結合しない領域(556領域)に分けて、それらの領域におけるモチーフ解析を行ったところ、Foxp3が結合するTregs選択的BATF結合領域にのみ上位5モチーフにFKH binding motifが見いだされた(図17B, C)。この結果から、TregではBATFをFKH binding motifが存在するゲノム領域へリクルートする機構が存在する可能性が示された。また、Foxp3が結合する、結合しないに関わらずTregs選択的BATF結合領域には上位5モチーフにAP-1 binding domainが見いだされた(図17B, C)。BATFは単独ではなく他のAP-1ファミリー転写因子とヘテロダイマーを形成し、AP-1 binding motifに結合すること[62,63,71,139]から、TregではBATFが他のAP-1ファミリー転写因子とヘテロダイマーを形成し、AP-1 binding motifが存在するゲノム領域への結合している可能性が示された。

第三節 Treg 選択的 BATF ゲノム結合の Foxp3 依存性解析

3-1. Foxp3 依存的な BATF 結合領域の存在

本章第二節 2-3. の解析結果から、Treg では BATF を FKH binding motif が存在するゲノム領域へリクルートする機構が存在する可能性が示されたこと、Foxp3 が Treg 選択的に高発現する転写因子であり FKH binding motif に結合することを踏まえ、私は“転写因子 Foxp3 が FKH binding motif が存在するゲノム領域に BATF をリクルートすることで、Treg 選択的 BATF 結合領域の形成に関わる”という仮説を考えた。

まず、Foxp3 が Treg における BATF 結合を誘導するかを検証するため、FKH binding motif への結合能を欠損する Foxp3 変異(R397W 変異)を有する R397W Foxp3⁺ Treg[171]における BATF 結合ゲノム領域を ChIP-seq により全ゲノムレベルで同定し、WT Foxp3⁺ Treg のそれと比較した。この際、Foxp3 が X 染色体上の遺伝子であることから X-inactivation が生じることを考慮して、機能的な Treg を持たないため致死的な自己免疫疾患を呈する Foxp3^{R397W/Y}雄もしくは Foxp3^{R397W/R397W}雌マウスからではなく、WT Foxp3⁺ Treg が存在するため致死的な自己免疫疾患を発症しない Foxp3^{WT:GFP/R397W:hCD2}雌マウス(*注釈)から R397W:hCD2 Foxp3⁺ Treg を調製して用いた。これにより炎症による影響を避けて、Foxp3 の BATF ゲノム結合への寄与を検証することが出来る。

結果、WT Foxp3⁺ Treg と比べ R397W Foxp3⁺ Treg において BATF 結合ピークが有意に低下するゲノム領域(Foxp3 依存的 BATF 結合領域)を 940 領域、WT Foxp3⁺ Treg および R397W Foxp3⁺ Treg で BATF ピークの高さに有意な差がみられないゲノム領域(Foxp3 非依存的 BATF 結合領域)を 8741 領域同定した(図 18A)。一方で、WT Foxp3⁺ Treg と比べ R397W Foxp3⁺ Treg において BATF 結合ピークが有意に上昇するゲノム領域は存在しなかった(図 18A)。このことから、Foxp3 は Treg における BATF ゲノム結合の一部を誘導することが明らかとなった。

*注釈 Foxp3^{WT:GFP/R397W:hCD2}マウスは、WT Foxp3 の下流に GFP レポーターが、R397W Foxp3 の下流に hCD2 レポーターがノックインされたマウスである。

3-2. Foxp3 依存的 BATF 結合領域のモチーフ解析

Foxp3 依存的 BATF 結合領域にどのような転写因子結合モチーフが存在するかを本章第二節 2-2.と同様に RSAT を用いて解析した[137,138]。その結果、Foxp3 依存的 BATF 結合領域には上位 5 モチーフに AP-1 binding motif、FKH binding motif[62,63,71,139,140,141,142]が見いだされた(図 18B)。また、これらのモチーフは Foxp3 非依存的 BATF 結合領域の上位 5 モチーフには存在しなかった(図 18C)。このことから、BATF は Foxp3 依存的に AP-1 binding motif、FKH binding motif が存在するゲノム領域に結合することが示された。

3-3. Foxp3 依存的 BATF 結合領域への Foxp3 の結合

本章第三節 3-2.において Foxp3 依存的 BATF 結合領域に FKH binding motif が enrich されたこと、Foxp3 は FKH binding motif に結合すること[139,140,141,142]を踏まえ、Foxp3 依存的 BATF 結合領域に Foxp3 が実際に結合するかを検証した。その結果、Foxp3 依存的 BATF 結合領域 940 領域中 621 領域(66%)に Foxp3 が結合することが明らかとなった(図 19A)。また、Foxp3 依存的 BATF 結合領域を Foxp3 が結合する領域(621 領域)、Foxp3 が結合しない領域(319 領域)に分けて、それらの領域におけるモチーフ解析を行ったところ、Foxp3 が結合する Foxp3 依存的 BATF 結合領域にのみ上位 5 モチーフに FKH binding motif が見いだされた(図 19B, C)。この結果から、Foxp3 が BATF を FKH binding motif が存在するゲノム領域へリクルートする可能性が示された。また、Foxp3 が結合する、結合しないに関わらず Foxp3 依存的 BATF 結合領域には上位 5 モチーフに AP-1 binding motif が見いだされた(図 19B, C)。このことから、Foxp3 は何らかの機構で BATF の他の AP-1 family 転写因子とのヘテロダイマー形成、AP-1 binding motif が存在するゲノム領域への結合を促進している可能性が示された。

3-4. Treg 選択的 BATF 結合領域と Foxp3 依存的 BATF 結合領域の重複

Treg 選択的 BATF 結合領域が実際に Foxp3 依存的に作成されるのかを検証するため、Treg 選択的 BATF 結合領域と Foxp3 依存的 BATF 結合領域との重複を調べた。その結果、Tregs 選択的 BATF 結合領域 1626 領域中 Foxp3 依存的に BATF が結合する領域が 749 領域(46%)を占めることが明らかとなった(図 20)。この 749 領域を Treg 選択的 Foxp3 依存的 BATF 結合領域とよぶ。以上

から、Foxp3 は Treg 選択的 BATF 結合の誘導に関わることが示された。また、Tregs 選択的 BATF 結合領域 1626 領域中 877 領域(54%)は Foxp3 依存的 BATF 結合領域とは重複しなかったことから(図 20)、Treg 選択的 BATF 結合には Foxp3 非依存的に誘導されるものも存在することが示された。

第四節 Foxp3 ゲノム結合の BATF 依存性解析

4-1. BATF 依存的な Foxp3 結合領域の存在

本章第三節で Foxp3 依存的に Treg 選択的な BATF ゲノム結合の半分程度が誘導されたことを踏まえ、逆に、BATF 依存的に Foxp3 ゲノム結合が誘導されるかを検証した。そのため *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg における Foxp3 結合ゲノム領域を ChIP-seq により全ゲノムレベルで同定し、WT Foxp3⁺ Treg のそれと比較した。結果、WT Foxp3⁺ Treg と比べ *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg において Foxp3 結合ピークが有意に低下するゲノム領域(BATF 依存的 Foxp3 結合領域)を 615 領域、WT Foxp3⁺ Treg および *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg で Foxp3 結合ピークの高さに有意な差がみられないゲノム領域(BATF 非依存的 Foxp3 結合領域)を 6235 領域同定した(図 21A)。一方で、WT Foxp3⁺ Treg と比べ *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg において Foxp3 結合ピークが有意に上昇するゲノム領域は存在しなかった(図 21A)。このことから、BATF は Foxp3 ゲノム結合の一部を誘導することが明らかとなった。

4-2. BATF 依存的 Foxp3 結合領域のモチーフ解析

BATF 依存的 Foxp3 結合領域にどのような転写因子結合モチーフが存在するかを本章第二節 2-2.、第三節 3-2.と同様に RSAT を用いて解析した[137,138]。その結果、BATF 依存的 Foxp3 結合領域には上位 5 モチーフに FKH binding motif、AP-1 binding motif が含まれていた(図 21B)。また、これらのモチーフは BATF 非依存的 Foxp3 結合領域の上位 5 モチーフには存在しなかった(図 21C)。このことから、Foxp3 は BATF 依存的に AP-1 binding motif、FKH binding motif が存在するゲノム領域に結合することが示唆された。

4-3. BATF 依存的 Foxp3 結合領域への BATF の結合

本章第四節 4-2.において BATF 依存的 Foxp3 結合領域に AP-1 binding motif が enrich されたこと、BATF は他の AP-1 ファミリー転写因子とヘテロダイマーを形成し、AP-1 binding motif に結合すること[62,63,71,139]を踏まえ、BATF 依存的 Foxp3 結合領域に BATF が実際に結合するかを検証した。その結果、BATF 依存的 Foxp3 結合領域 615 領域中 479 領域(78%)に BATF が結合することが明らかとなった(図 22A)。また、BATF 依存的 Foxp3 結合領域を BATF が結合する領域(479 領域)、BATF が結合しない領域(248 領域)に分けて、それ

らの領域におけるモチーフ解析を行ったところ、BATF が結合する BATF 依存的 Foxp3 結合領域にのみ AP-1 binding motif が見いだされた(図 22B)。この結果から、BATF が Foxp3 を AP-1 binding motif が存在するゲノム領域へリクルートする可能性が示された。また、BATF が結合する、結合しないに関わらず BATF 依存的 Foxp3 結合領域には FKH binding domain が見いだされた(図 22B, C)。このことから、BATF は何らかの機構で、Foxp3 の FKH binding motif が存在するゲノム領域への結合を促進している可能性が示された。

4-4. Foxp3-BATF 相互依存的結合領域の存在

本章第三節で同定した Treg 選択的 Foxp3 依存的 BATF 結合領域と本章第四節で同定した BATF 依存的 Foxp3 結合領域が重複するかを検証した。その結果、重複する Foxp3-BATF 相互依存的結合領域が 198 領域同定された(図 23A)。これにより、Treg では BATF が Foxp3 と相互依存的に一部のゲノム領域に結合することが明らかとなった。また、Foxp3-BATF 相互依存的結合領域におけるモチーフ解析の結果、上位 5 モチーフに FKH binding motif、AP-1 binding motif がこの領域に見いだされることが示された(Data not shown)。これにより、Foxp3 および BATF はそれぞれ FKH binding motif が存在するゲノム領域、AP-1 binding motif が存在するゲノム領域に相互をリクルートし合っている可能性が示された。

第五節 Foxp3-BATF 相互依存的結合領域の特性解析

5-1. Foxp3-BATF 相互依存的結合領域の転写開始点から距離の解析

本章第二節から第四節までの結果から、BATF の Treg 特徴的なゲノム結合パターンとして、BATF が Foxp3 と相互依存的に一部のゲノム領域に結合することを見いだしてきた。本節では、同定した Foxp3-BATF 相互依存的結合領域がどのような領域なのかについて検証することとした。転写因子は転写開始点 (TSS) 上流の近接に存在するプロモーター領域および TSS から遠位に存在するエンハンサー領域に結合することで転写を促進する[123]。そこで、まず、Foxp3-BATF 相互依存的結合領域が TSS からどの程度の距離に存在するのかを Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool (GREAT) を用いて検証した[143]。その結果、Foxp3-BATF 相互依存的結合領域は、Treg において Foxp3 が結合する全領域、Treg において BATF が結合する全領域、Treg において Foxp3 および BATF が共に結合する領域いずれと比べた場合でも、TSS から ±5Kb の領域にはほとんど結合せず、TSS から ±5~500Kb の領域に多く結合することが示された(図 23B)。実際に、Foxp3-BATF 相互依存的結合領域がどのような領域に属するかを Bioconductor にて提供されている R パッケージ ChIPseeker を用いて解析した[173]。その結果、Foxp3-BATF 相互依存的結合領域は TSS から 3Kb 以上離れた Distal Intergenic region および 2nd 以降の Intron 部分に主に集積することが明らかとなった(図 23C)。以上の結果から、Foxp3-BATF 相互依存的結合領域は主に TSS から遠位の Intron、Intergenic の領域に存在することが明らかとなった。

5-2. Foxp3-BATF 相互依存的結合領域と Treg 特異的 DNaseI 高感受性領域、p300 結合領域との重複

Foxp3-BATF 相互依存的結合領域が TSS から遠位の位置に存在することが示されたため、次にこれらの領域が実際に転写を制御するエンハンサー領域である可能性を検証することとした。エンハンサー領域は、プロモーターおよびレポーター遺伝子を組み込んだベクターのどの位置に挿入してもレポーター遺伝子の転写活性をあげるゲノム領域としてレポーターアッセイにより同定されてきた[123]。一方、近年行われた網羅的なゲノム/エピゲノム解析によりエンハンサー領域はヒストン修飾 H3K4me1 がみられる領域、アセチルトランスフェラーズ p300 結合領域、細胞特異的な DNaseI 高感受性領域と相関することが明ら

かとなってきた[119,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130]。

私は Foxp3-BATF 相互依存的結合領域 198 領域が、エンハンサー領域となりうるかを検証するべく、Treg 特異的 DNaseI 高感受性領域、Treg における p300 結合ゲノム領域と Foxp3-BATF 相互依存的結合領域の重複を調べることにした。Treg 特異的 DNaseI 高感受性領域は、ENCODE に登録されている Foxp3⁺ Treg および Foxp3⁻ Tconv における DNase-seq のデータ[144,145]を基に、Foxp3⁺ Treg において Foxp3⁻ Tconv と比較して有意に DNaseI 感受性のピークが高い領域として同定した。また、Treg における p300 結合ゲノム領域は、Treg において抗 p300 抗体を用いて ChIP-seq 解析を行うことで同定した。

結果、Foxp3-BATF 相互依存的ゲノム結合領域のうち 84%が Treg 特異的 DNaseI 高感受性領域と、68%が Treg における p300 結合領域と重複することが示された(図 24A, B)。また、Foxp3-BATF 相互依存的ゲノム結合領域(198 領域)のうち、60%(118 領域)が Treg 特異的 DNaseI 高感受性領域および p300 結合領域の両方に重複することも示された(Data not shown)。以上の結果から、Foxp3 および BATF は相互依存的にエンハンサー領域複数箇所に結合していることが示唆された。

5-3. Foxp3-BATF 相互依存的結合 p300 結合 Treg 特異的 DNaseI 高感受性領域近傍に存在する遺伝子の発現解析

Foxp3-BATF 相互依存的結合領域の 60%が p300 結合 Treg 特異的 DNaseI 高感受性領域に結合することが示されたため、私は Foxp3 および BATF が相互依存的にこれらの領域に結合することで、周囲の遺伝子の転写を亢進している可能性を考えた。そこで、Foxp3-BATF 相互依存的結合領域のうち Treg で p300 が結合し、Treg 特異的 DNaseI 高感受性である領域 118 領域の周囲の遺伝子発現を WT Foxp3⁺ Treg、WT Foxp3⁻ Tconv、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg 間で比較した(図 24C, D)。その結果、近傍遺伝子中に WT Foxp3⁺ Treg において *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg よりも発現が 2 倍以上高く、かつ WT Foxp3⁺ Treg において WT Foxp3⁻ Tconv と比べて発現が 2 倍以上高い遺伝子として、既に第三章において非リンパ組織への細胞移動に関わる BATF 依存的 Treg 高発現遺伝子として同定していた *Ccr4*, *Gcnt1*, *Itgb1* が含まれることが明らかとなった(図 24C, D、図 25-図 27)。一方、第三章において BATF 非依存的 Treg 高発現遺伝子であることが明らかとなっていた *Il2ra* 遺伝子座周囲には Foxp3-BATF 相互依存的結合領

域は存在しなかった(図 28)。これらの結果から、Foxp3 および BATF が協調して *Ccr4*、*Gcnt1*、*Itgb1* の転写を促進する可能性が考えられた。さらに、*Ccr4*、*Gcnt1*、*Itgb1* 周囲に存在する Foxp3-BATF 相互依存的結合領域には IRF4 も結合していることが示された(図 25・図 27)。以上から IRF4 もこれらの分子発現に寄与する可能性が考えられたが、それについては本研究では検証していない。一方で、近傍遺伝子中には WT Foxp3⁺Treg において WT Foxp3⁻Tconv と比較し発現上昇する遺伝子がいくつか確認されたものの(図 24D)、近傍遺伝子の多くの発現は WT Foxp3⁺Treg、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺Treg 間で変わらなかった(図 24C)。このことから、BATF は Foxp3-BATF 相互依存的結合領域の近傍に存在する *Ccr4*、*Gcnt1*、*Itgb1* 以外の多くの遺伝子の発現制御には関わらないことが示された。

第六節 考察

本章において、私は BATF が非リンパ組織への細胞移動に関わる遺伝子を含む一部の Treg 特徴的高発現遺伝子の発現を促進する分子基盤を探った。

第二節では、Treg 選択的に BATF が強く結合する領域(Treg 選択的 BATF 結合領域)を 1626 領域同定し、その領域の一部に Foxp3 も結合すること、Foxp3 が結合する Treg 選択的 BATF 結合領域には FKH binding motif が有意に存在することを見いだした。

第三節では、Treg 選択的 BATF 結合領域のうち、746 領域(46%)で Foxp3 依存的に BATF 結合が亢進することを示した。また、Foxp3 依存的に BATF 結合が低下する領域は存在しなかったことから、Foxp3 は BATF ゲノム結合の一部を促進することが示された。

第四節では、BATF 依存的に Foxp3 結合が亢進する領域(BATF 依存的 Foxp3 結合領域)を 615 領域同定し、その領域の一部に BATF も結合すること、BATF が結合する BATF 依存的 Foxp3 結合領域には AP-1 binding motif が有意に存在することを見いだした。さらに、Treg 選択的 Foxp3 依存的 BATF 結合領域と BATF 依存的 Foxp3 結合領域の重複する領域(Foxp3-BATF 相互依存的結合領域)が 198 領域存在することを示した。

第五節では、Foxp3-BATF 相互依存的結合領域に着目し、これらの領域が TSS から遠位の Intergenic もしくは Intron 領域に存在することを示した。また、エンハンサー領域と重複することが報告されている、細胞特異的 DNaseI 高感受性領域(本研究では Treg 特異的 DNaseI 高感受性領域)、p300 結合領域と Foxp3-BATF 相互依存的結合領域は大きく重複することを示し、Foxp3-BATF 相互依存的結合領域の多くがエンハンサー領域である可能性を示した。さらに、p300 が結合する Treg 特異的 DNaseI 高感受性領域かつ Foxp3-BATF 相互依存的結合領域の周囲には第四章で既に表示していた BATF 依存的 Treg 高発現遺伝子である *Ccr4*、*Gcnt1*、*Itgb1* が含まれることを示した。

本章の結果から、Foxp3 が BATF の一部ゲノム領域への結合を促進することで Treg 選択的な BATF 結合領域を形成していることが示された。興味深いことに Foxp3 依存的 BATF 結合領域は Foxp3 が結合する領域、Foxp3 が結合しない領域の 2 領域に分けられ、Foxp3 が結合する領域には FKH binding motif が上位モチーフとして見いだされるものの、Foxp3 が結合しない領域には FKH binding motif が上位 5 モチーフに見いだされないことが明らかとなった。以上

の結果から、Foxp3 が結合する Foxp3 依存的 BATF 結合領域では FKH binding motif が存在する領域に Foxp3 が BATF をリクルートしている可能性が考えられた。

では、Foxp3 が結合しない Foxp3 依存的 BATF 結合領域はどのようにして形成されるのであろうか？ Serine43 のリン酸化を欠く BATF は JUN とヘテロダイマーを形成するが、AP-1 binding motif に結合出来ないこと[146]、本研究により Foxp3 が結合しない Foxp3 依存的 BATF 結合領域に AP-1 binding motif が上位モチーフとして見いだされることを考慮すると、Foxp3 は何かしらの機構で BATF のリン酸化を誘導し、BATF の AP-1 binding motif へ結合を促進している可能性が考えられる。

また、BATF が Foxp3 の一部ゲノム領域への結合を促進することも示された。興味深いことに BATF 依存的 Foxp3 結合領域は BATF が結合する領域、BATF が結合しない領域の 2 領域に分けられ、BATF が結合する領域には AP-1 binding motif が上位モチーフとして見いだされるものの、BATF が結合しない領域には AP-1 binding motif が上位 5 モチーフに見いだされないことが明らかとなった。以上の結果から、BATF が結合する BATF 依存的 Foxp3 結合領域では AP-1 binding motif が存在する領域に BATF が Foxp3 をリクルートしている可能性が考えられた。では、BATF が結合しない BATF 依存的 Foxp3 結合領域はどのようにして形成されるのであろうか？ Foxp3 はリン酸化、アセチル化、ユビキチン化など様々な翻訳後修飾を受けることが知られており[147]、リン酸化およびアセチル化により Foxp3 のゲノム結合が促進されることが示唆されている[147,148,149,150]。この報告と BATF が結合しない BATF 依存的 Foxp3 結合領域に FKH binding motif が上位モチーフとして多数見いだされることを考慮すると、BATF は何かしらの機構で Foxp3 のリン酸化もしくはアセチル化を誘導し、Foxp3 の FKH binding motif へ結合を促進している可能性が考えられる。

Foxp3 のアセチル化には TIP60、p300、SIRT1、HDAC6 などが関わるということが知られているが、Foxp3 のリン酸化を誘導する因子は同定されておらず[147]、また、BATF のリン酸化を誘導する因子も同定されていない[146]。今後、R397W Foxp3⁺ Treg における BATF のリン酸化解析、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg における Foxp3 のアセチル化、リン酸化解析を行い、また、Foxp3、BATF の翻訳後修飾に関わる因子を同定することで、Foxp3 および BATF の相互依存的な DNA 結合の詳細な機構が明らかになっていくと期待される。

本章において、Foxp3-BATF 相互依存的結合領域は、エンハンサー領域と重複することが報告されている細胞特異的DNaseI 高感受性領域(本研究ではTreg 特異的 DNaseI 高感受性領域)、p300 結合領域と大きく重複することを示した。しかしながら、Foxp3-BATF 相互依存的結合領域がエンハンサー活性を有するかの検証は十分ではない。周囲に *Ccr4*、*Gcnt1*、*Itgb1* など既に BATF 依存的に発現亢進されることが知られている遺伝子が存在する Foxp3-BATF 相互依存的結合領域に関しては、レポーターアッセイを行い、これら遺伝子のプロモーター領域と共に転写活性をあげるかについて検証することで、実際に Foxp3-BATF 相互依存的結合領域がエンハンサー領域かを検証出来る。

予想と反し *Ccr4*、*Gcnt1*、*Itgb1* 遺伝子以外の Foxp3-BATF 相互依存的結合領域の周囲に存在するほとんどの遺伝子発現は WT Foxp3⁺ Treg、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg 間で変わらなかった。しかしながら、エンハンサー領域は TSS から Megabase 以上離れた領域に存在することも知られている[121,151]ため、Foxp3-BATF 相互依存的結合領域が隣接する遺伝子ではなくより離れた遺伝子の発現を制御するエンハンサーである可能性は残る。

本章において Foxp3 と BATF が相互依存的にゲノムに結合する領域が存在することは示されたが、Foxp3 および BATF が直接複合体を形成しゲノムに結合するかは依然として明らかでない。私が本研究を行った研究室では HEK293 細胞に Foxp3 および BATF を強制発現して、抗 Foxp3 抗体で免疫沈降(IP)した場合、BATF が IP されてこないという結果を得ている。このことから少なくとも Foxp3 および BATF は修飾なしに直接複合体を形成するのではなく、何かしらの翻訳後修飾もしくは第三者を介して結合する可能性が示唆されている。

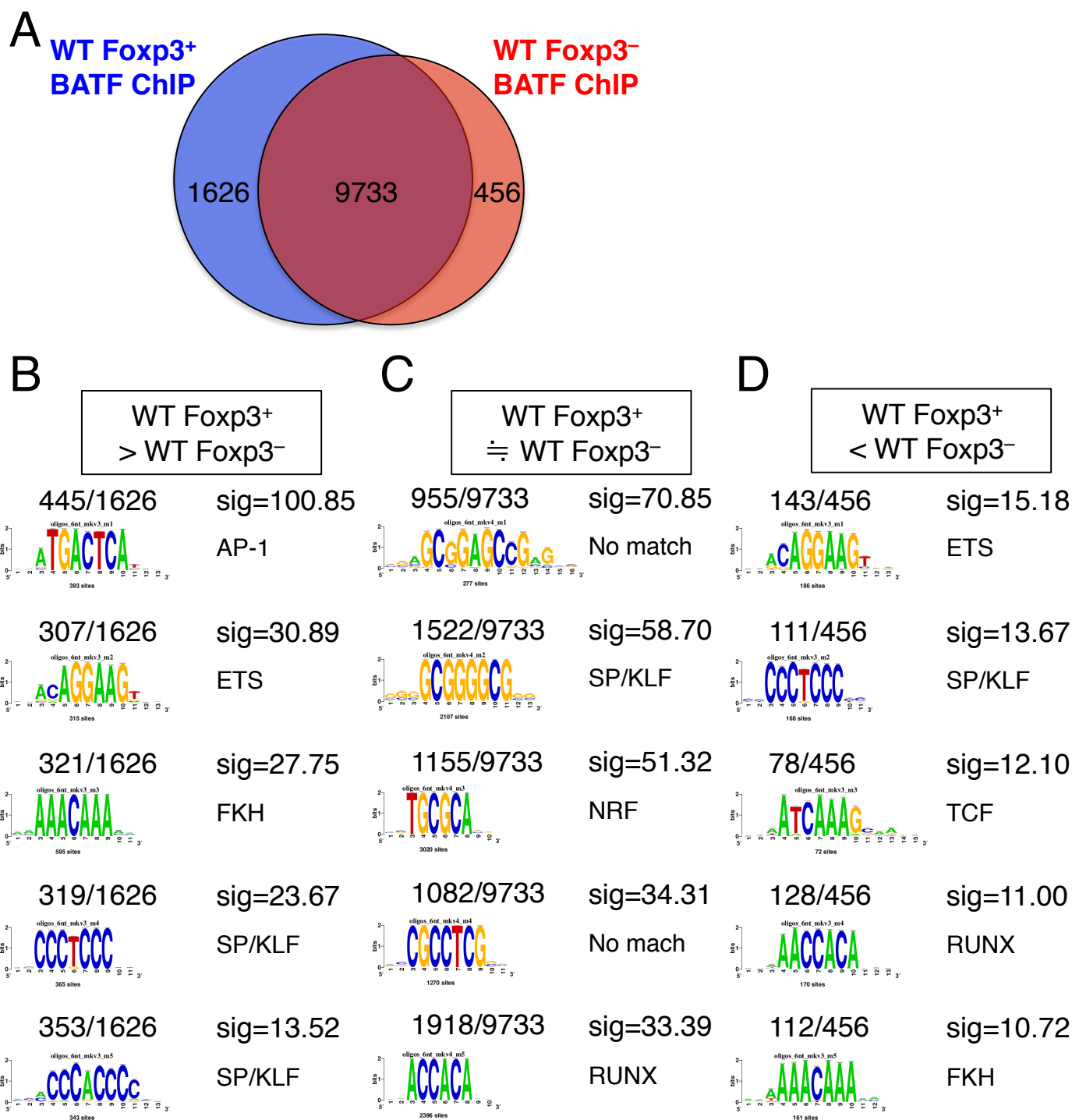
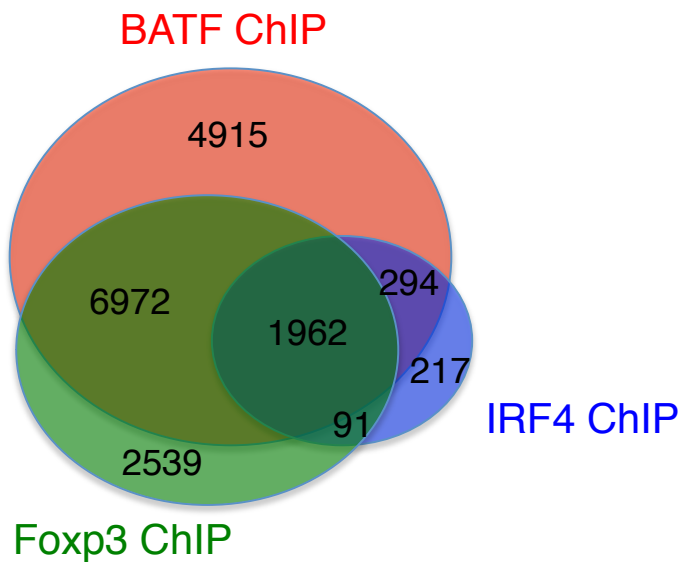


図15 WT Foxp3⁺ Treg、WT Foxp3⁻ TconvにおけるBATFのゲノム結合パターン比較
 (A) WT Foxp3⁺ TregにおいてWT Foxp3⁻ Tconvよりも有意に($p < 1e^{-6}$)BATF結合ピークが高い領域(Treg選択的BATF結合領域:1626領域)、有意に($p < 1e^{-6}$)BATF結合ピークが低い領域(Tconv選択的BATF結合領域:456領域)、両者でBATF結合ピークに有意な差がみられない領域(共通BATF結合領域:9733領域)。(B) Treg選択的BATF結合領域におけるモチーフ解析。(C) 共通BATF結合領域におけるモチーフ解析。(D) Tconv選択的BATF結合領域におけるモチーフ解析。(B-D) 上位5モチーフ、モチーフが含まれる領域数、モチーフに結合する転写因子群名、sig: $-\log_{10}(p\text{-value} \times \text{number of computed false positives})$ を表示。

A



B

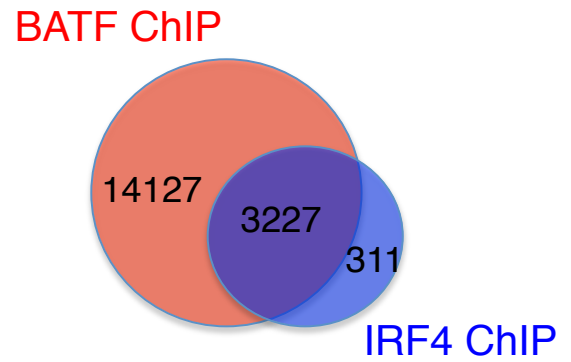
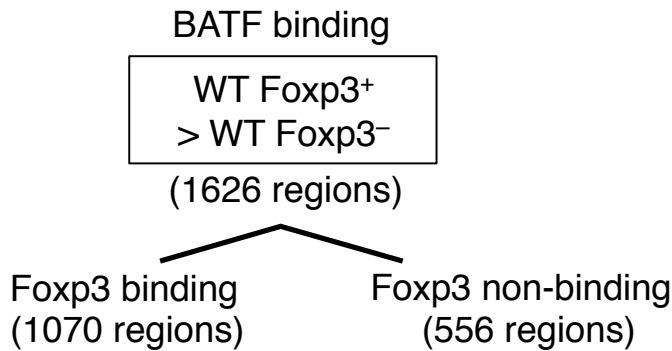


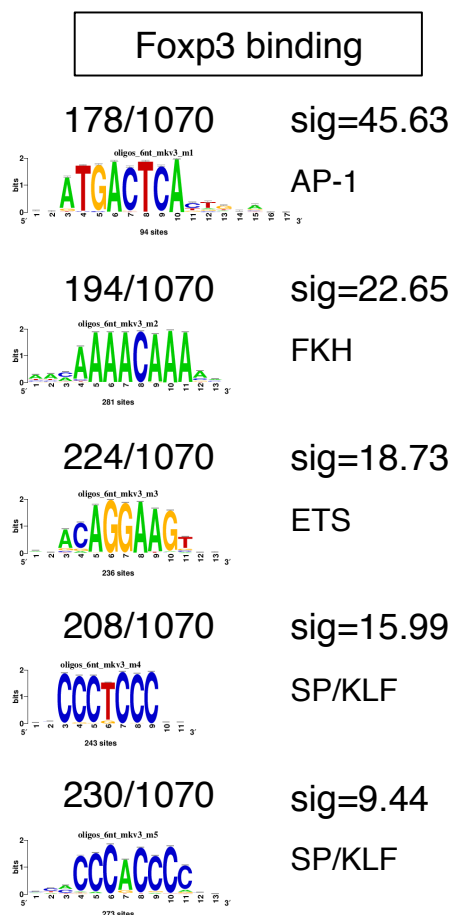
図16 WT Foxp3⁺ Treg、WT Foxp3⁻ TconvにおけるBATF、IRF4、Foxp3結合領域の重複

(A) BATF ChIP-seq、IRF4 ChIP-seq、Foxp3 ChIP-seq解析により同定されたWT Foxp3⁺ TregにおけるBATF、IRF4、Foxp3結合領域の重複。(B) BATF ChIP-seq、IRF4-ChIP-seqにより同定されたWT Foxp3⁻ TconvにおけるBATF、IRF4結合領域の重複。

A



B



C

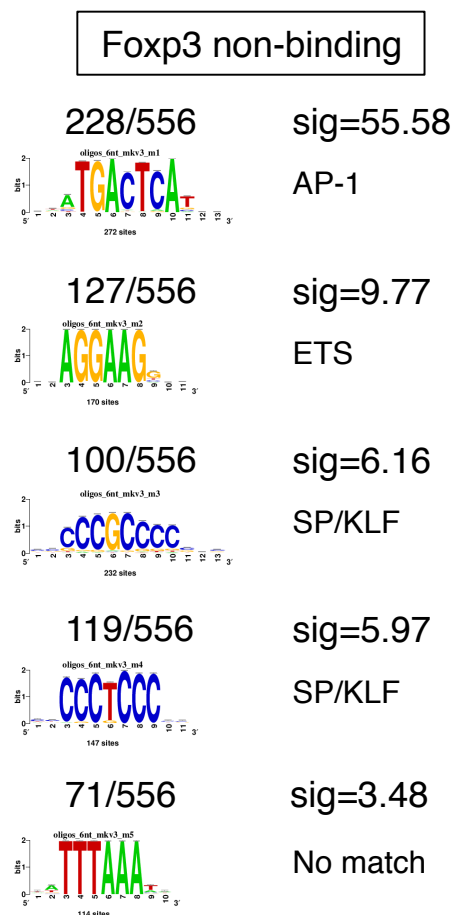


図17 Treg選択的BATF結合領域とFoxp3結合領域の重複

(A) Treg選択的BATF結合領域(1626領域)とFoxp3結合領域との重複(1070領域)。
 (B) Foxp3結合Treg選択的BATF結合領域におけるモチーフ解析。(C) Foxp3非結合
 Treg選択的BATF結合領域におけるモチーフ解析。(B,C) 上位5モチーフを表示。

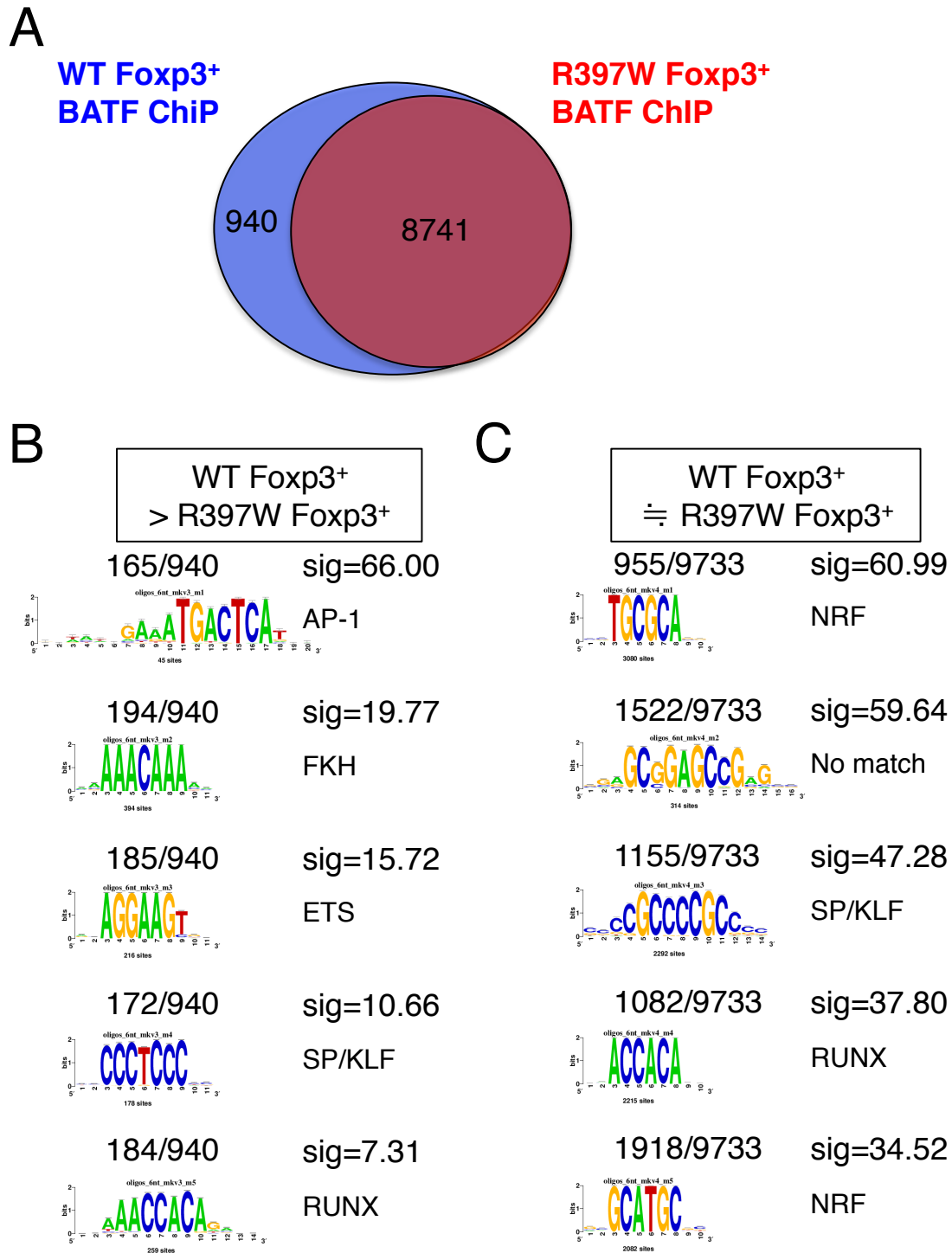
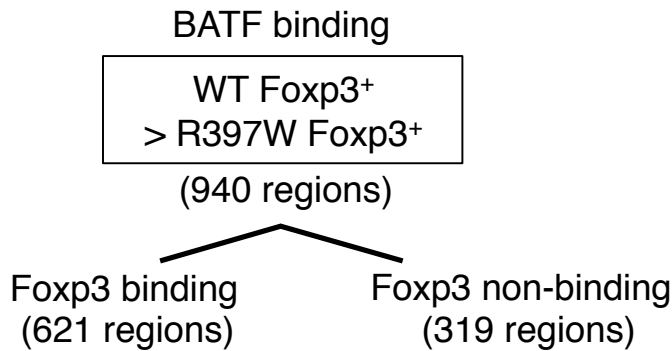
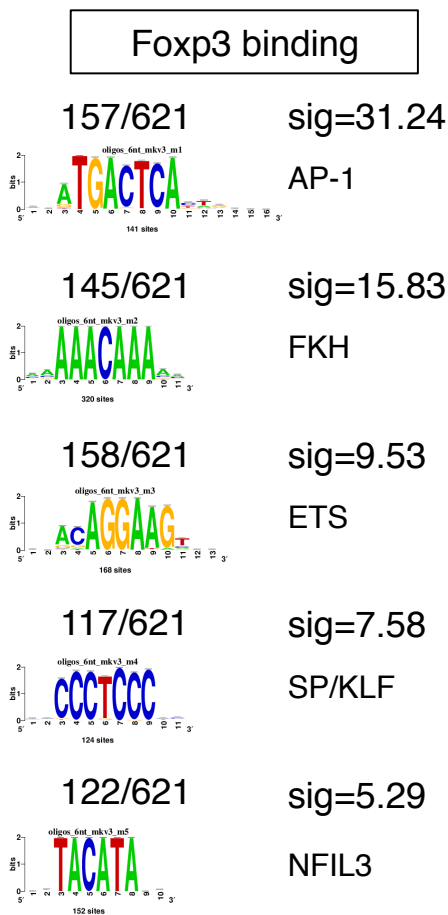


図18 WT Foxp3⁺ Treg、R397W Foxp3⁺ TregにおけるBATFのゲノム結合パターン比較
 (A) WT Foxp3⁺ TregにおいてR397W Foxp3⁺ Tregよりも有意に($p < 1e^{-6}$)BATF結合ピークが高い領域(Foxp3依存的BATF結合領域:940領域)、両者でBATF結合ピークに有意な差がみられない領域(Foxp3非依存的BATF結合領域:8741領域)。(B) Foxp3依存的BATF結合領域におけるモチーフ解析。(C) Foxp3非依存的BATF結合領域におけるモチーフ解析。(B,C) 上位5モチーフを表示。

A



B



C

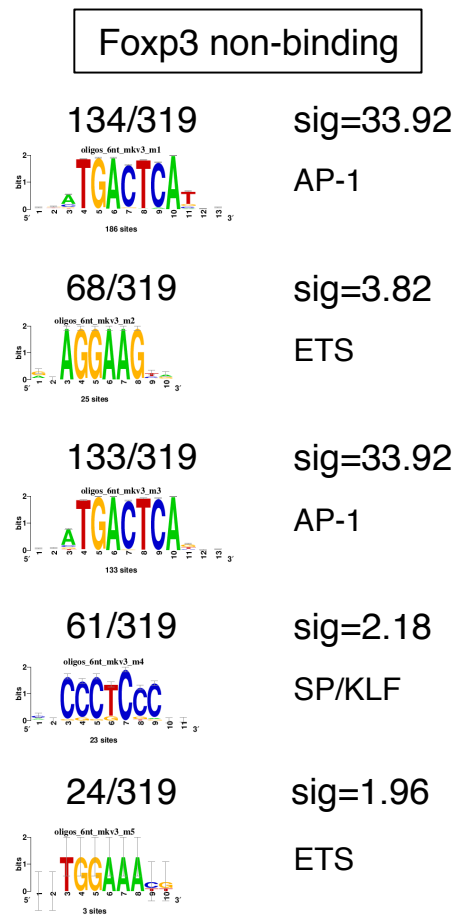


図19 Foxp3依存的BATF結合領域とFoxp3結合領域の重複

(A) Foxp3依存的BATF結合領域(940領域)とFoxp3結合領域との重複(621領域)

(B) Foxp3結合Foxp3依存的BATF結合領域におけるモチーフ解析。(C) Foxp3非結合Foxp3依存的BATF結合領域におけるモチーフ解析。(B,C) 上位5モチーフを表示。

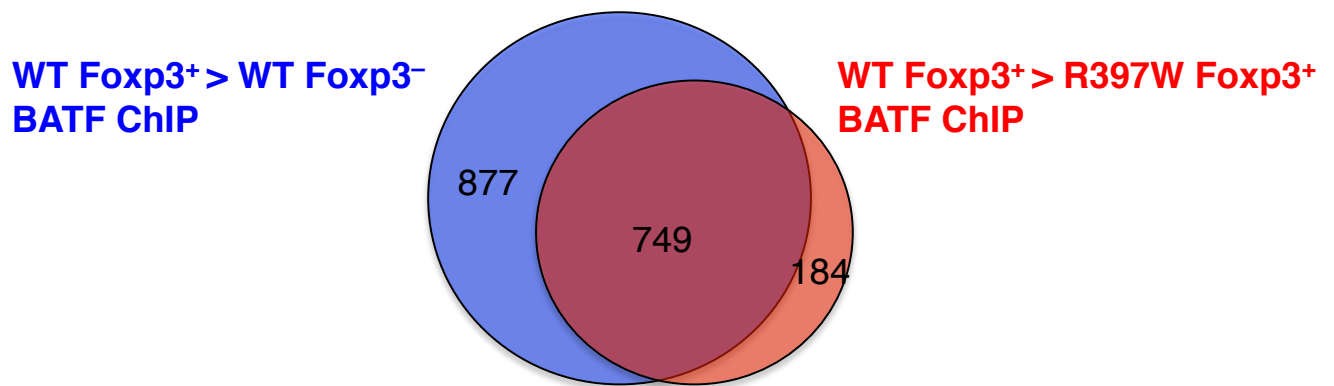


図20 Treg選択的BATF結合領域とFoxp3依存的BATF結合領域の重複
Treg選択的BATF結合領域(1626領域)とFoxp3依存的BATF結合領域(940領域)の重複
(Treg選択的Foxp3依存的BATF結合領域:749領域)。

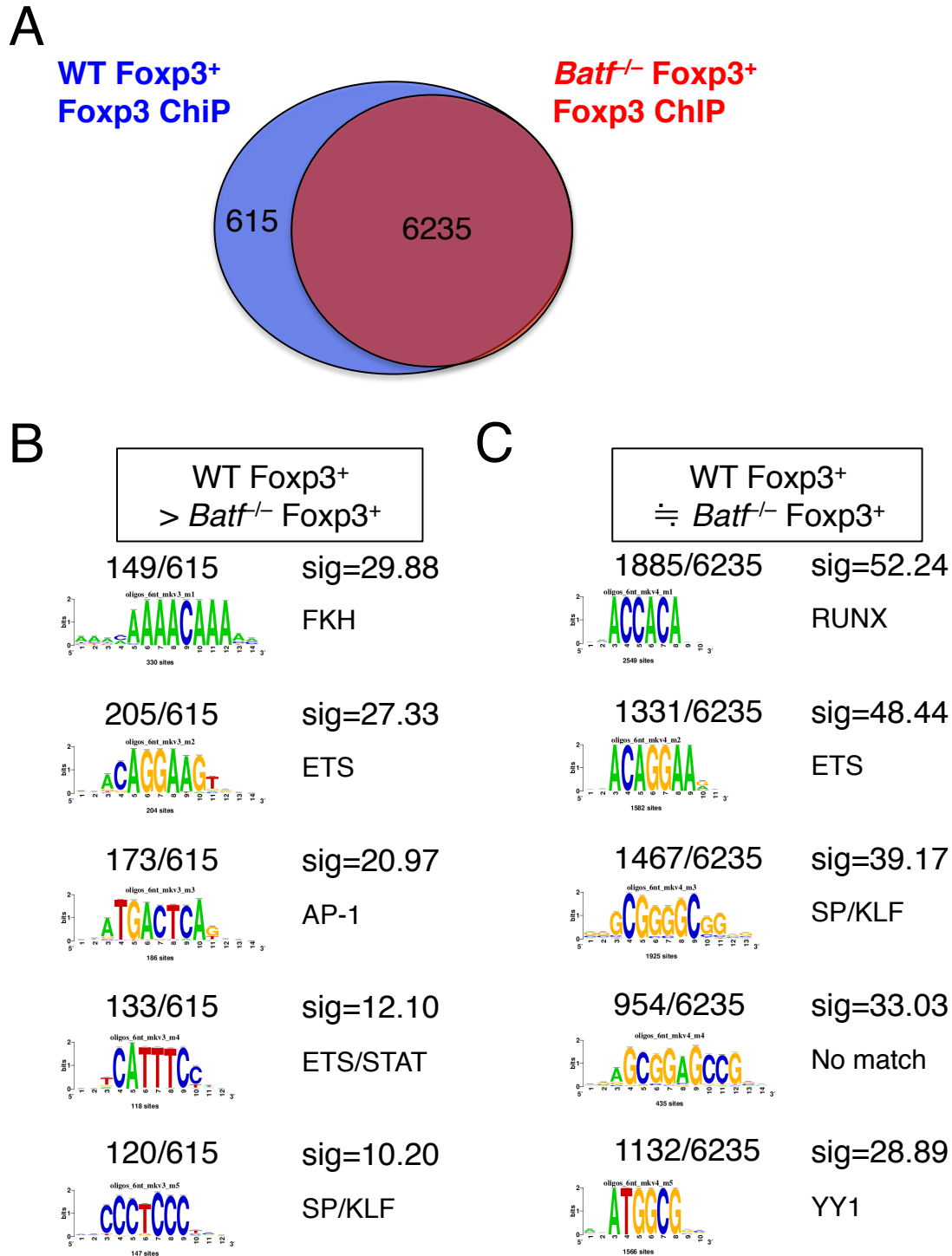
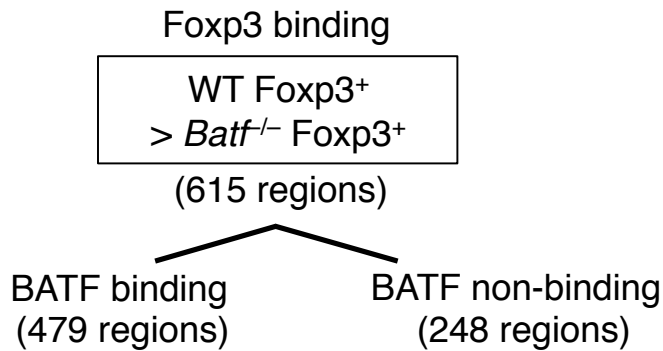
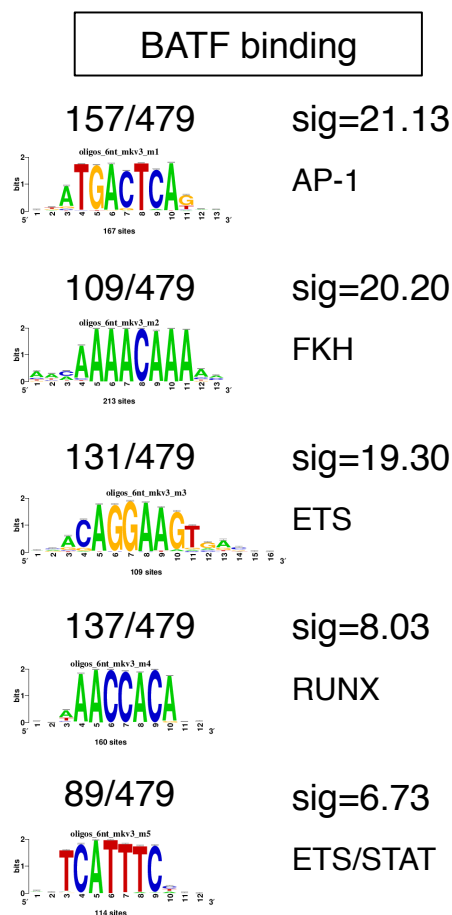


図21 WT Foxp3⁺ Treg、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ TregにおけるFoxp3のゲノム結合パターン比較
 (A) WT Foxp3⁺ Tregにおいて*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Tregよりも有意に($p < 1e^{-6}$)Foxp3結合ピークが高い領域(BATF依存的Foxp3結合領域:615領域)、両者でFoxp3結合ピークに有意な差がみられない領域(BATF非依存的Foxp3結合領域:6235領域)。(B) BATF依存的Foxp3結合領域におけるモチーフ解析。(C) BATF非依存的Foxp3結合領域におけるモチーフ解析。(B,C) 上位5モチーフを表示。

A



B



C

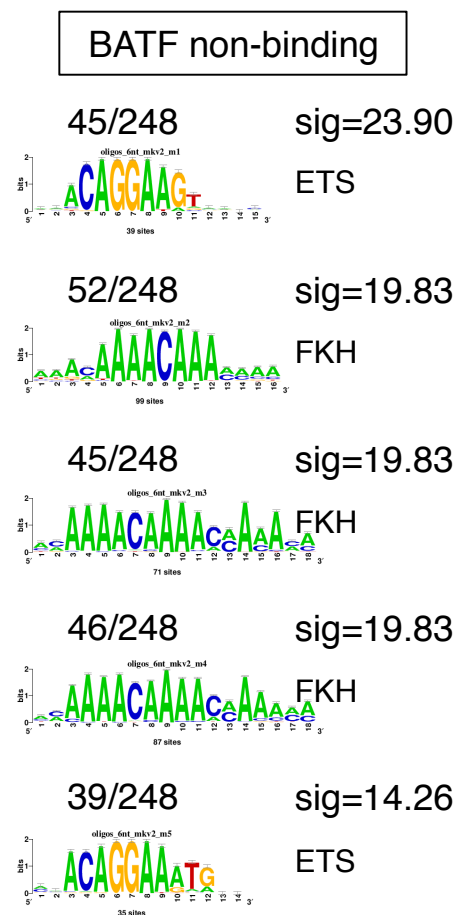


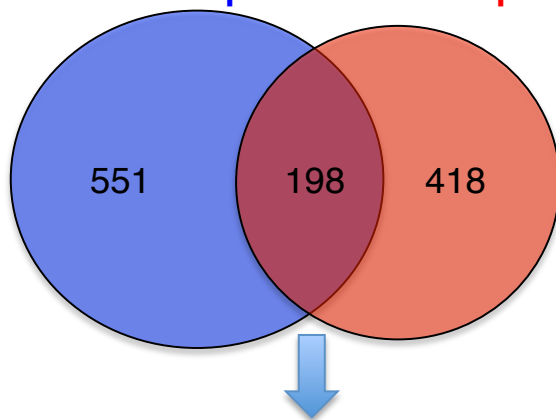
図22 BATF依存的Foxp3結合領域とBATF結合領域の重複

(A) BATF依存的Foxp3結合領域(615領域)とFoxp3結合領域との重複(479領域)。
 (B) BATF結合BATF依存的Foxp3結合領域におけるモチーフ解析。(C)BATF非結合
 BATF依存的Foxp3結合領域におけるモチーフ解析。(B,C) 上位5モチーフを表示。

A

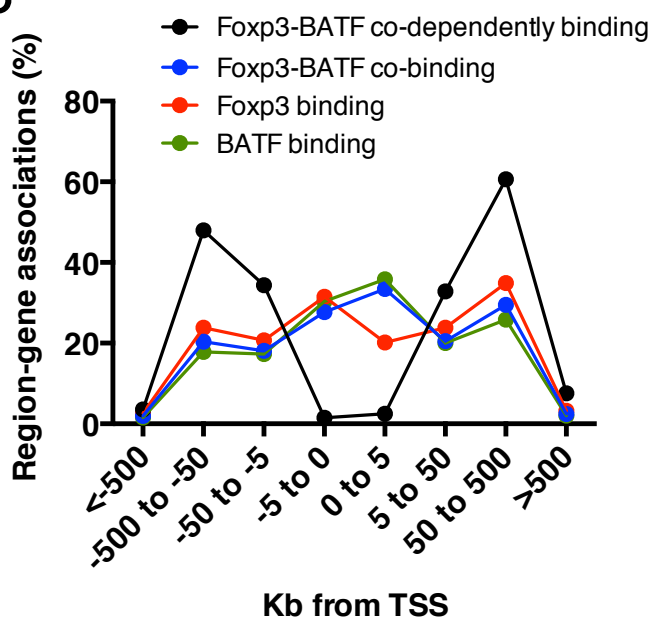
WT Foxp3⁺ > WT Foxp3⁻ &
WT Foxp3⁺ > R397W Foxp3⁺
BATF ChIP

WT Foxp3⁺ > *Batf*^{-/-} Foxp3⁺
Foxp3 ChIP



Foxp3-BATF co-dependently binding regions

B



C

Promoter (<=1kb) (1.01%)
Promoter (1-2kb) (1.52%)
Promoter (2-3kb) (1.01%)
5' UTR (1.01%)
3' UTR (1.52%)
Other Exon (6.57%)
1st Intron (7.07%)
Other Intron (30.3%)
Downstream (<=3kb) (2.53%)
Distal Intergenic (47.47%)

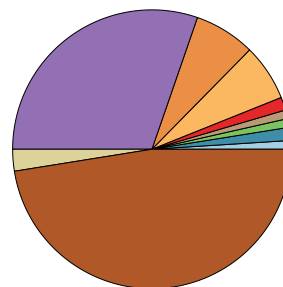


図23 Foxp3-BATF相互依存的結合領域の特性解析 その1

(A) Treg選択的Foxp3依存的BATF結合領域(749領域)とBATF依存的Foxp3結合領域(615領域)の重複(Foxp3-BATF相互依存的結合領域:198領域)。(B) TregにおけるFoxp3-BATF相互依存的結合領域(Foxp3-BATF co-dependently binding)、Foxp3結合領域、BATF結合領域、Foxp3・BATF両者が結合する領域(Foxp3-BATF co-binding)の転写開始点(TSS)からの距離(Kb)。縦軸はTSSからある距離に存在する転写因子結合領域の割合を示す。(C) Foxp3-BATF相互依存的結合領域のゲノム上の位置情報。<=は0~を意味する。Distal Intergenicは遺伝子領域から遺伝子外に3Kb以上離れた領域を示す。

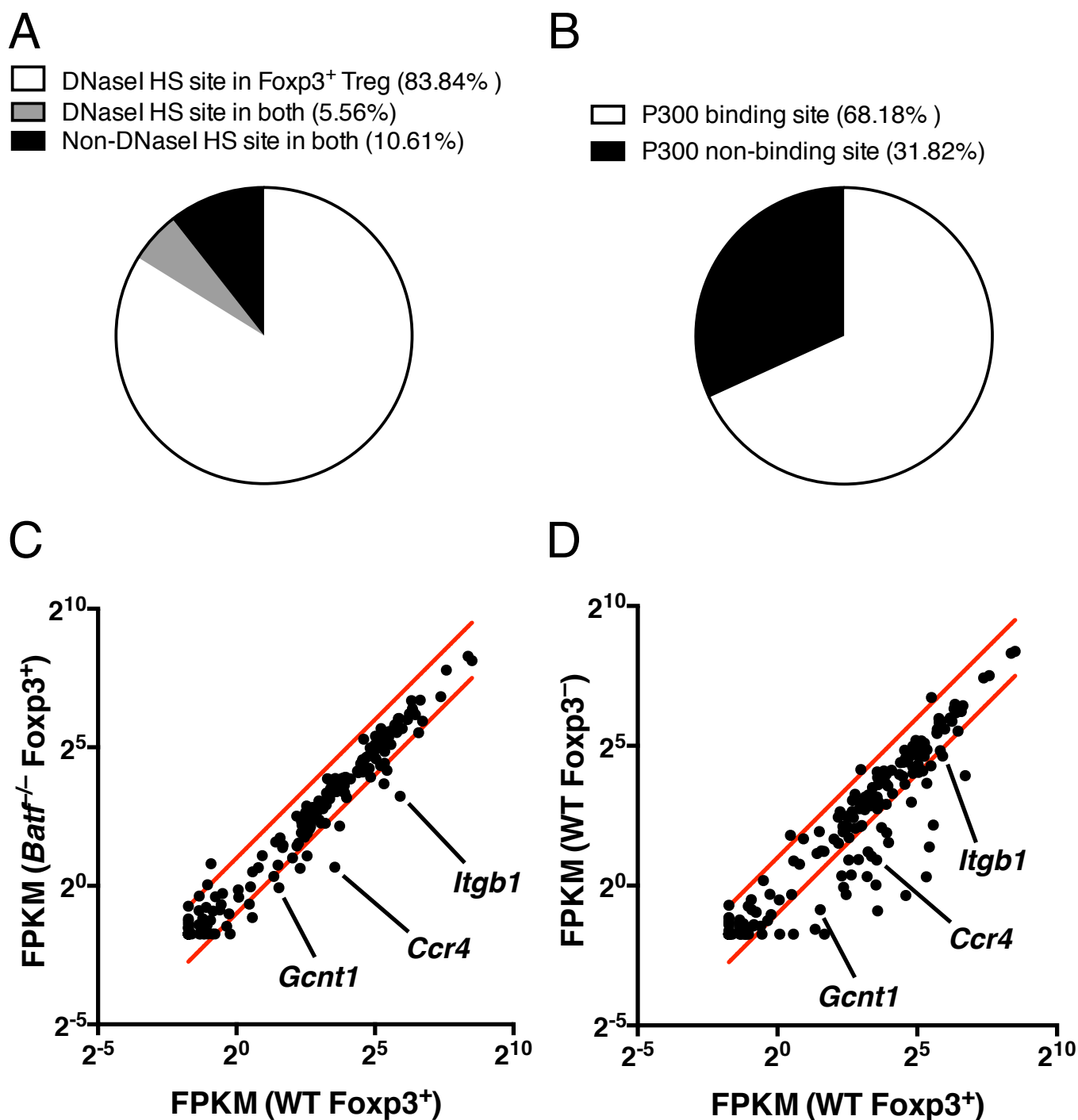


図24 Foxp3-BATF相互依存的結合領域の特性解析 その2

(A) Foxp3-BATF相互依存的結合領域中のTreg特異的DNaseI高感受性領域(DNaseI HS site in *Foxp3*⁺ Treg)、Treg・Tconvで共通にみられるDNaseI高感受性領域(DNaseI HS site in both)、Treg・Tconvで共にDNaseI非感受性の領域 (Non-DNaseI HS site in both)の割合。(B) Foxp3-BATF相互依存的結合領域中のTregにおけるp300結合領域、p300非結合領域の割合。(C, D) Treg特異的DNaseI高感受性かつp300が結合するFoxp3-BATF相互依存的結合領域近傍遺伝子のFPKM値比較。赤線は $y=2x$ および $y=0.5x$ の直線。(C) WT *Foxp3*⁺ Tregと*Batf*^{-/-} *Foxp3*⁺ Treg間での比較。(D) WT *Foxp3*⁺ TregとWT *Foxp3*⁻ Tconv間での比較。

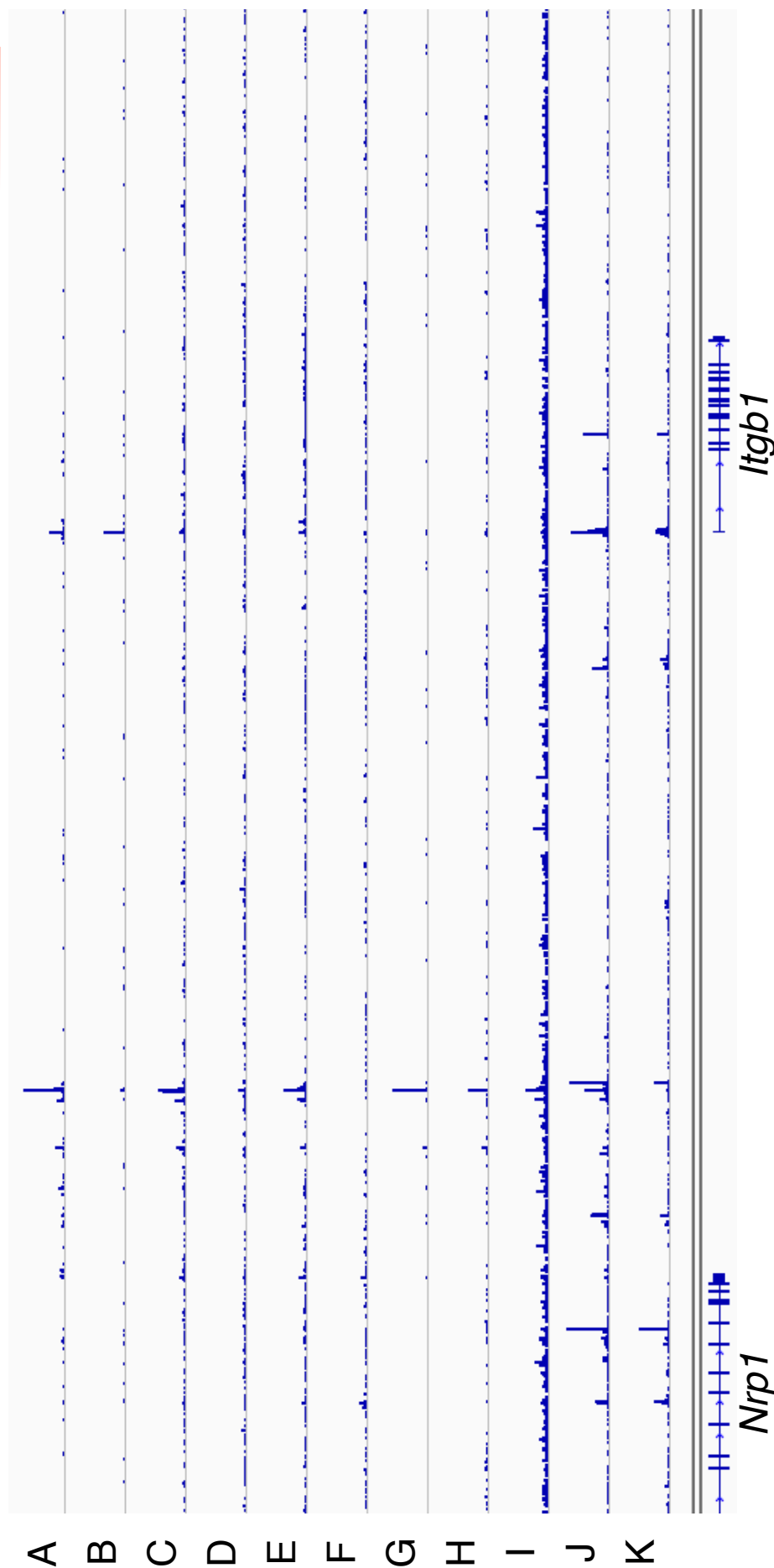


図25 *Itgb1*遺伝子座におけるChIP-seq、DNase-seqのパターン

(A-B) Treg、Tconv間でのBATF結合ピークの比較。(A) Foxp3⁺ TregにおけるBATF ChIP-seq。(B) Foxp3⁻ TconvにおけるBATF ChIP-seq。(C-D) WT Foxp3⁺ Treg、R397W Foxp3⁺ Treg間でのBATF結合ピークの比較。(C) WT Foxp3⁺ TregにおけるBATF ChIP-seq。(D) R397W Foxp3⁺ TregにおけるBATF ChIP-seq。(E-F) WT Foxp3⁺ Treg、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg間でのFoxp3結合ピークの比較。(E) WT Foxp3⁺ TregにおけるFoxp3 ChIP-seq。(F) *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ TregにおけるFoxp3 ChIP-seq。(G-H) Treg、Tconv間でのIRF4結合ピークの比較。(G) Foxp3⁺ TregにおけるIRF4 ChIP-seq。(H) Foxp3⁻ TconvにおけるIRF4 ChIP-seq。(I) WT Foxp3⁺ TregにおけるP300 ChIP-seq。(J-K) Treg、Tconv間でのDNaseI HS siteの比較。(J) Foxp3⁺ TregにおけるDNase-seq。(K) Foxp3⁻ TconvにおけるDNase-seq。▼ Foxp3-BATF相互依存的結合領域。(A-K) Bigwigファイルを表示。

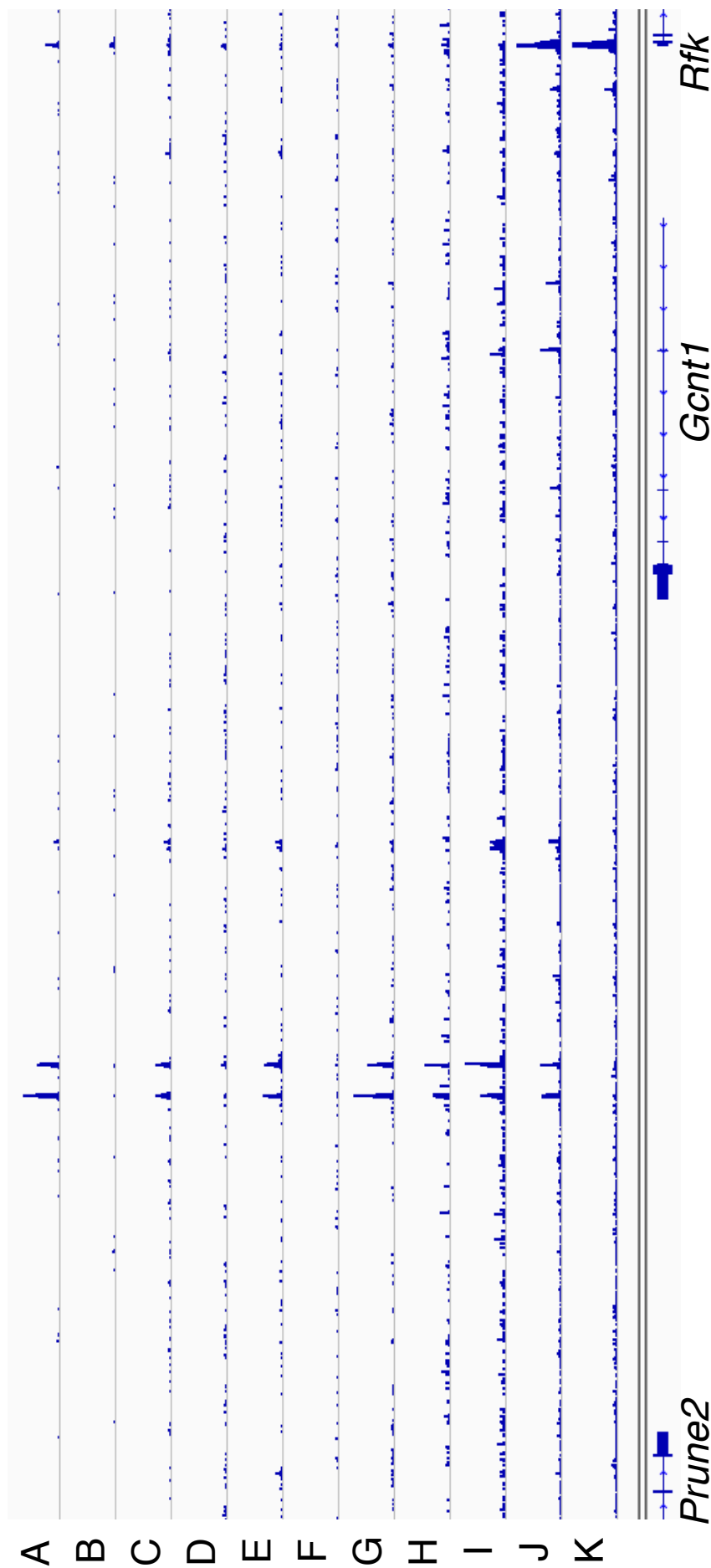


図26 *Gcnt1*遺伝子座におけるChIP-seq、DNase-seqのパターン

(A-B) Treg、Tconv間でのBATF結合ピークの比較。(A) Foxp3⁺ TregにおけるBATF ChIP-seq。(B) Foxp3⁻ TconvにおけるBATF ChIP-seq。(C-D) WT Foxp3⁺ Treg、R397W Foxp3⁺ Treg間でのBATF結合ピークの比較。(C) WT Foxp3⁺ TregにおけるBATF ChIP-seq。(D) R397W Foxp3⁺ TregにおけるBATF ChIP-seq。(E-F) WT Foxp3⁺ Treg、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg間でのFoxp3結合ピークの比較。(E) WT Foxp3⁺ TregにおけるFoxp3 ChIP-seq。(F) *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ TregにおけるFoxp3 ChIP-seq。(G-H) Treg、Tconv間でのIRF4結合ピークの比較。(G) Foxp3⁺ TregにおけるIRF4 ChIP-seq。(H) Foxp3⁻ TconvにおけるIRF4 ChIP-seq。(I) WT Foxp3⁺ TregにおけるP300 ChIP-seq。(J-K) Treg、Tconv間でのDNase-seqの比較。(J) Foxp3⁺ TregにおけるDNase-seq。(K) Foxp3⁻ TconvにおけるDNase-seq。▼Foxp3-BATF相互依存的結合領域。(A-K) Bigwigファイルを表示。

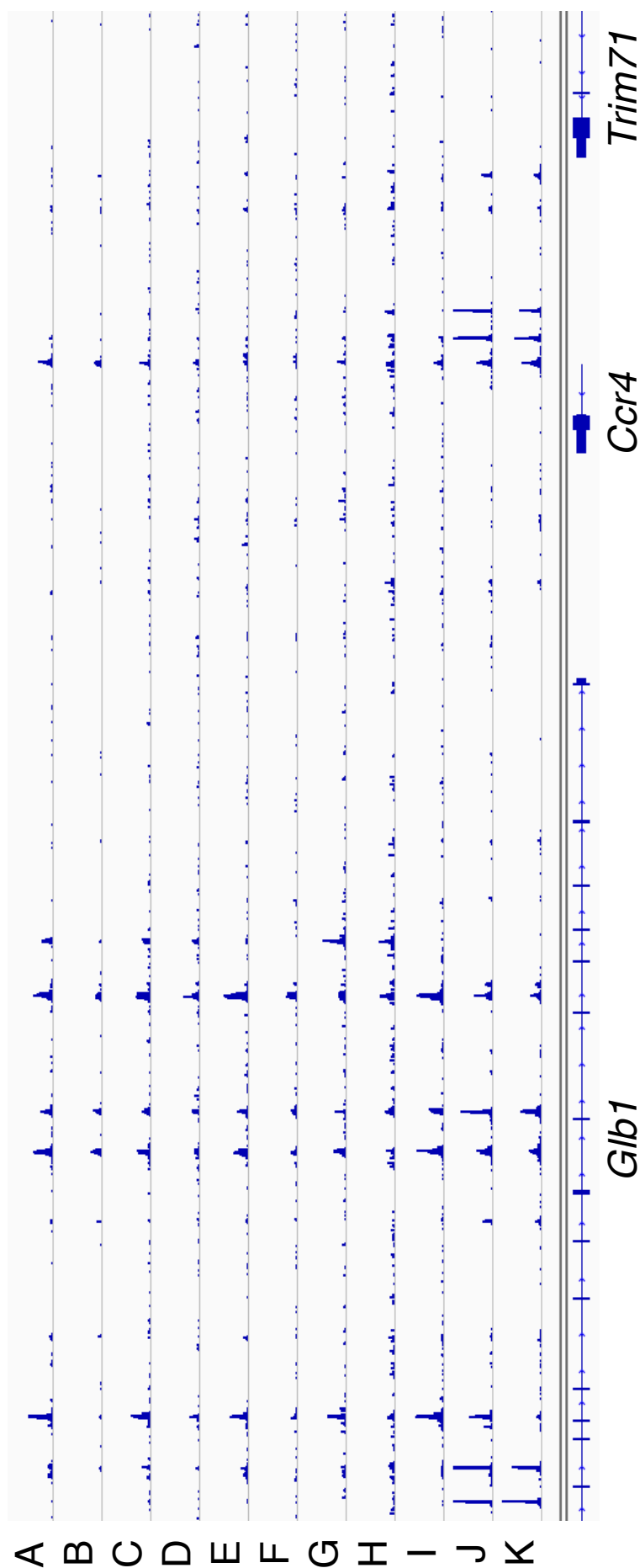


図27 *Ccr4*遺伝子座におけるChIP-seq、DNase-seqのパターン

(A-B) Treg、Tconv間でのBATF結合ピークの比較。(A) Foxp3⁺ TregにおけるBATF ChIP-seq。(B) Foxp3⁻ TconvにおけるBATF ChIP-seq。(C-D) WT Foxp3⁺ Treg、R397W Foxp3⁺ Treg間でのBATF結合ピークの比較。(C) WT Foxp3⁺ TregにおけるBATF ChIP-seq。(D) R397W Foxp3⁺ TregにおけるBATF ChIP-seq。(E-F) WT Foxp3⁺ Treg、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg間でのFoxp3結合ピークの比較。(E) WT Foxp3⁺ TregにおけるFoxp3 ChIP-seq。(F) *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ TregにおけるFoxp3 ChIP-seq。(G-H) Treg、Tconv間でのIRF4結合ピークの比較。(G) Foxp3⁺ TregにおけるIRF4 ChIP-seq。(H) Foxp3⁻ TconvにおけるIRF4 ChIP-seq。(I) WT Foxp3⁺ TregにおけるP300 ChIP-seq。(J-K) Treg、Tconv間でのDNase HS siteの比較。(J) Foxp3⁺ TregにおけるDNase-seq。(K) Foxp3⁻ TconvにおけるDNase-seq。▼Foxp3-BATF相互依存的結合領域。(A-K) Bigwigファイルを表示。

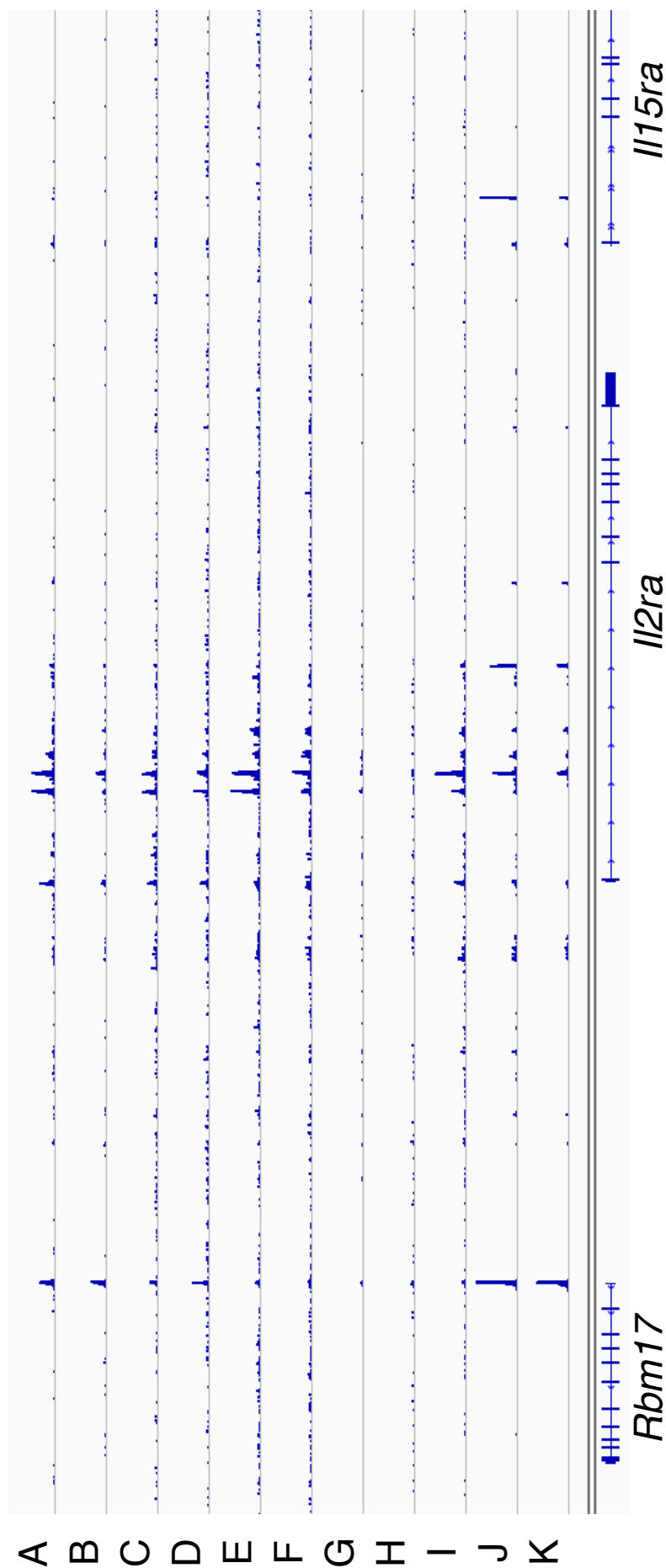


図28 *Il2ra*遺伝子座におけるChIP-seq、DNase-seqのパターン

(A-B) Treg、Tconv間でのBATF結合ピークの比較。(A) Foxp3⁺ TregにおけるBATF ChIP-seq。(B) Foxp3⁻ TconvにおけるBATF ChIP-seq。(C-D) WT Foxp3⁺ Treg、R397W Foxp3⁺ Treg間でのBATF結合ピークの比較。(C) WT Foxp3⁺ TregにおけるBATF ChIP-seq。(D) R397W Foxp3⁺ TregにおけるBATF ChIP-seq。(E-F) WT Foxp3⁺ Treg、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg間でのFoxp3結合ピークの比較。(E) WT Foxp3⁺ TregにおけるFoxp3 ChIP-seq。(F) *Batf*^{-/-} Foxp3⁺ TregにおけるFoxp3 ChIP-seq。(G-H) Treg、Tconv間でのIRF4結合ピークの比較。(G) Foxp3⁺ TregにおけるIRF4 ChIP-seq。(H) Foxp3⁻ TconvにおけるIRF4 ChIP-seq。(I) WT Foxp3⁺ TregにおけるP300 ChIP-seq。(J-K) Treg、Tconv間でのDNase-seqの比較。(J) Foxp3⁺ TregにおけるDNase-seq。(K) Foxp3⁻ TconvにおけるDNase-seq。(A-K) Bigwigファイルを表示。

第五章 BATF は Foxp3 と協調して非リンパ組織への細胞移動に関わる分子の発現を亢進する

第一節 序

第三章において、BATF は Treg において非リンパ組織への細胞移動に関わる Treg 特徴的高発現分子である CCR4、E-/P-sel lig、Integrin β 1 の発現上昇、リンパ組織への細胞移動に関わる CCR7 発現低下、増殖を亢進することが明らかとなった。また、第四章において、CCR4、Integrin β 1 をコードする遺伝子 *Ccr4*、*Itgb1*、機能的な E-/P-sel lig の発現に関わる C2 GlcNAcT をコードする遺伝子 *Gcnt1* 遺伝子座の周囲を含む複数箇所に Foxp3 および BATF が相互依存的に結合するゲノム領域が存在することが明らかとなった。以上を踏まえ、私は Foxp3 および BATF が協調して Treg におけるこれらの表現型および増殖を制御する可能性を考え、本章にて検証した。

第二節では、Foxp3 が CCR4、E-/P-sel lig、Integrin β 1 の発現上昇、CCR7 発現低下および増殖に関わるかを検証した。

第三節では、Foxp3 および BATF が協調して CCR4、E-/P-sel lig、Integrin β 1 の発現上昇、CCR7 発現低下および増殖を亢進するかどうかを検証するため、Foxp3 単独、BATF 単独もしくは Foxp3-BATF 両者を naïve T 細胞に RV を用いて強制発現し、それらを放射線照射したマウスに移入した後、移入した RV 感染細胞の表現型を解析した。

これらの解析の結果、Foxp3 および BATF は協調して Treg 特徴的高発現分子である CCR4、E-/P-sel lig、Integrin β 1 の発現上昇、CCR7 の発現低下、増殖を亢進することが明らかとなった。

第二節 R397W Foxp3⁺ Treg の表現型解析

Foxp3 が CCR4、E-/P-sel lig、Integrinβ1 発現を亢進するかを検証するため、FKH binding motif への結合能を欠損する Foxp3 変異(R397W 変異)に着目した(第四章第三節参照)。Foxp3 の R397W 変異をノックインしたマウス(Foxp3^{R397W} マウス)は Foxp3 ノックアウトマウスとほぼ同様の自己免疫疾患様症状を呈すること(141)、また、R397W Foxp3 を強制発現した T 細胞は Mock 強制発現 T 細胞とほぼ同等の遺伝子発現パターンを示すこと(141)から、R397W Foxp3⁺ Treg は Foxp3 依存的遺伝子をほとんど誘導出来ないと考えられる。そのため、R397W Foxp3⁺ Treg は Foxp3 依存的な分子を同定するのに有用である。第四章第三節でも述べた通り、炎症による効果を除き Foxp3 により制御される分子を同定するため、Foxp3^{R397W/Y} マウスや Foxp3^{R397W/R397W} マウスではなく WT Foxp3⁺ Treg が存在するため自己免疫疾患を呈さない Foxp3^{WT:GFP/R397W:hCD2} マウスを用いた。Foxp3^{WT:GFP/R397W:hCD2} マウスの R397W:hCD2 Foxp3⁺ Treg と Foxp3^{WT:GFP/WT:hCD2} マウスの WT:hCD2 Foxp3⁺ Treg との間で、CCR4、E-/P-sel lig、Integrinβ1 の発現をリンパ組織への細胞移動に関わる CCR7 とともに比較した。その結果、R397W:hCD2 Foxp3⁺ Treg では、WT:hCD2 Foxp3⁺ Treg と比べて、CCR7^{low}CCR4⁺E-sel lig⁺P-sel lig^{high}Integrinβ1^{high} の亜集団が大きく減少していることが示された(図 29A)。以上から、Foxp3 は BATF 同様に非リンパ組織への細胞移動に関わる CCR4、E-/P-sel lig、Integrinβ1 の発現上昇、CCR7 の発現低下を促進することが示された。

また、BATF が Treg の増殖を亢進していることを踏まえ、Foxp3 も Treg の増殖に寄与しうるかを検証するため、R397W Foxp3⁺ Treg と WT Foxp3⁺ Treg 間で増殖中の細胞に発現する Ki67 を発現する細胞の割合を比較した。その結果、R397W Foxp3⁺ Treg では WT Foxp3⁺ Treg と比較して Foxp3⁺ 細胞中の Ki67⁺ 細胞の割合が低いことが示された(図 29B)。以上の結果から、Foxp3 は BATF 同様に Treg の増殖を亢進することが示された。

第三節 Foxp3 と BATF による増殖、非リンパ組織恒常性に関わる分子の協調制御

第三章第三節、本章第二節にて Foxp3 および BATF は共に CCR4、E-/P-sel lig、Integrin β 1 の発現上昇、CCR7 発現低下、増殖を亢進することが明らかとなった。また、第四章にて *Ccr4*、*Gcnt1*、*Itgb1* の周囲の領域を含む複数のゲノム領域に Foxp3 と BATF が相互依存的に結合することが示されていた。以上のことから、私は Foxp3 および BATF が協調して CCR4、E-/P-sel lig、Integrin β 1 の発現上昇、CCR7 発現低下、増殖を亢進する可能性を考えた。その可能性を検証するために、Foxp3(Thy1.1 reporter)単独、BATF(VEX reporter)単独もしくは Foxp3-BATF 両者を naïve T 細胞(Ly5.2⁺)に RV を用いて強制発現し、それらを放射線照射したマウス(Ly5.1⁺)に移入した後、7 日後に移入した RV 感染 T 細胞(Thy1.1⁺VEX+Ly5.2⁺)の表現型を解析した。その結果、Foxp3-RV T 細胞では CCR4、E-/P-sel lig、Integrin β 1、CCR7 の発現、増殖がほぼ Mock-RV T 細胞と変わらない一方で、BATF-RV T 細胞では、Mock-RV T 細胞と比べて CCR4、Integrin β 1 発現、増殖が有意に上昇し、CCR7 の発現が有意に低下することが示された(図 30、図 31A-C)。また、BATF-RV T 細胞では、Mock-RV T 細胞と比べて有意ではないものの E-/P-sel lig の発現もやや上昇することが示された(図 30、図 31C)。さらに、Foxp3 & BATF-RV T 細胞では、Foxp3-RV T 細胞、BATF-RV T 細胞と比べて CCR4、E-/P-sel lig、Integrin β 1 の発現、増殖が有意に上昇し、CCR7 の発現が有意に低下することが示された(図 30、図 31A-C)。さらに、Foxp3 & BATF-RV T 細胞における CCR4、E-/P-sel lig、Integrin β 1 の発現上昇、CCR7 の発現低下は増殖に伴って生じることも示された(図 30)。以上のことから、Foxp3 および BATF は協調して CCR4、E-/P-sel lig、Integrin β 1 の発現上昇、増殖、CCR7 の発現低下を亢進することが明らかとなった。一方で、Foxp3-RV T 細胞では Mock-RV T 細胞と比べて Treg 特徴的高発現分子である CD25(コードする遺伝子は *Il2ra*)の発現が上昇するが、BATF-RV T 細胞では Mock-RV T 細胞と比べて CD25 の発現が低下しており、Foxp3 & BATF-RV T 細胞では、Foxp3-RV CD4⁺ T 細胞と BATF-RV CD4⁺ T 細胞の中間程度の CD25 を発現することが示された(図 30)。以上の結果から、Foxp3 と BATF は協調的に全てではなく一部の Treg 特徴的高発現分子のみを発現制御していることが示された。

第四節 考察

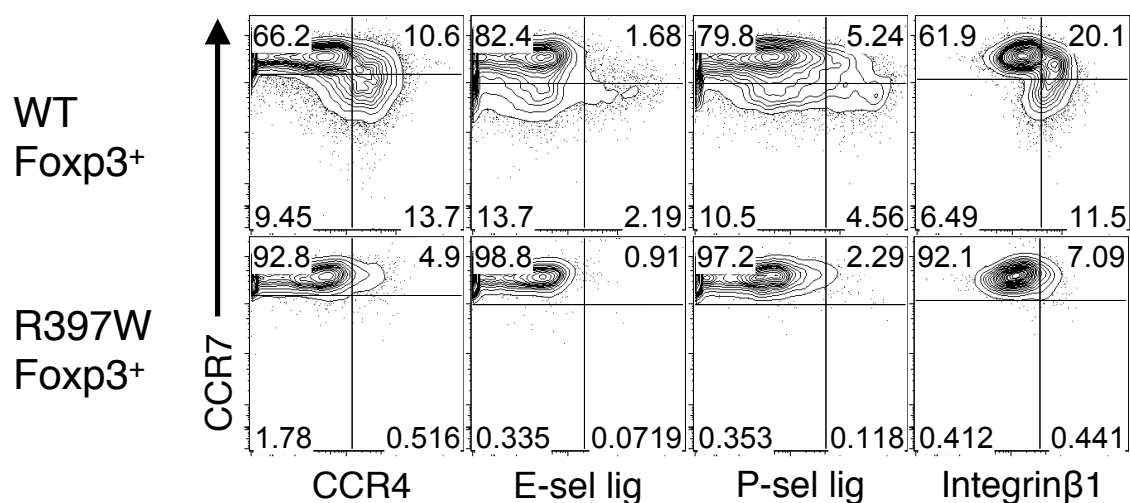
本章において、私は Foxp3 が非リンパ組織への細胞移動に関わる Treg 特徴的高発現分子 CCR4、E-/P-sel lig、Integrin β 1 の発現上昇、リンパ組織への細胞移動に関わる CCR7 の発現低下、および増殖に関わるかについて第二節で、Foxp3 と BATF が協調してこれらの機能制御を行うかについて第三節で検証した。

その結果、第二節において Foxp3 が Treg の CCR4、E-/P-sel lig、Integrin β 1 の発現上昇、CCR7 の発現低下、増殖を亢進することを示した。また、第三節において Foxp3 と BATF が協調して CCR4、E-/P-sel lig、Integrin β 1 の発現上昇、CCR7 の発現低下、増殖を亢進することを示した。

第一章第一節でも述べた通り、Foxp3 は様々な転写因子と協調することで Treg の機能を制御していることが知られていたが、本研究により Foxp3 が協調する新たなパートナーとして BATF が同定された。

興味深いことに、Foxp3 および BATF を強制発現して2日後のマウスに移入前の RV 感染 T 細胞では、CCR4 の発現がわずかにしか上昇しないことが示されている(**Data not shown**)。この細胞を *In vivo* に移入して7日のうちに大きく CCR4 が発現上昇することを考慮すると、Foxp3 および BATF が協調して CCR4 発現を亢進するためには、ある程度の期間が必要かもしくは何かしらの *in vivo* の因子が必要である可能性が考えられる。Foxp3 および BATF を強制発現した T 細胞を *in vitro* で9日間培養したときに CCR4 発現がどのように変化するかを追跡することで、どちらの可能性が高いかを検証することが出来ると考えられる。仮に、*in vitro* では Foxp3 および BATF が協調して CCR4 発現を亢進出来ないという結果が得られれば、Foxp3 および BATF が協調して働くためには、*in vivo* の因子が必要であることが強く示唆され、Foxp3 および BATF の協調に必要な *in vivo* の因子のスクリーニングを行うことで、Treg の非リンパ組織における恒常性維持に関わる因子が同定出来ると期待される。

A



B

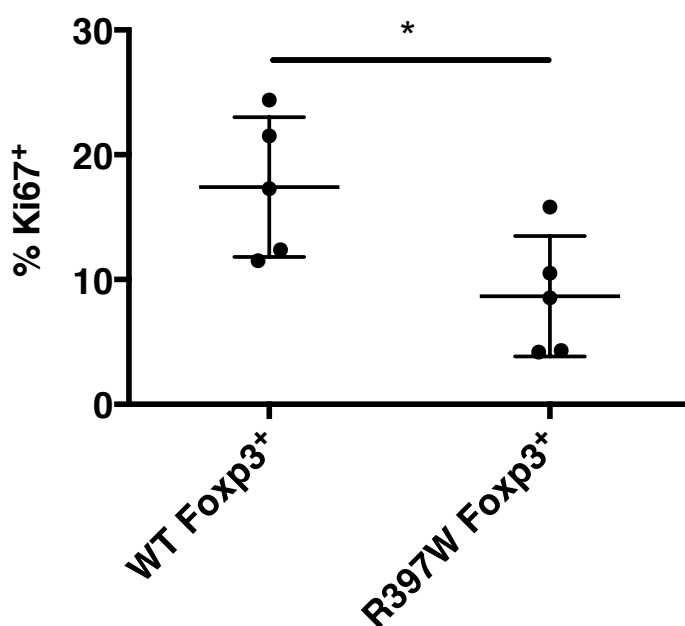


図29 R397W Foxp3⁺ Tregの表現型解析

(A, B) Foxp3^{WT:GFP/WT:hCD2}マウスにおけるWT Foxp3⁺ (hCD2⁺) Treg、Foxp3^{WT:GFP/R397W:hCD2}マウスにおけるR397W Foxp3⁺ (hCD2⁺) Tregの表現型をFCMで解析した。脾臓におけるFCM解析の代表例。(B) 脾臓WT Foxp3⁺ (hCD2⁺) Treg、R397W Foxp3⁺ (hCD2⁺) TregにおけるKi67⁺細胞の割合。n=5、各個体における割合および平均値±SDを表示。*p<0.05。TTESTによる統計解析を行った。

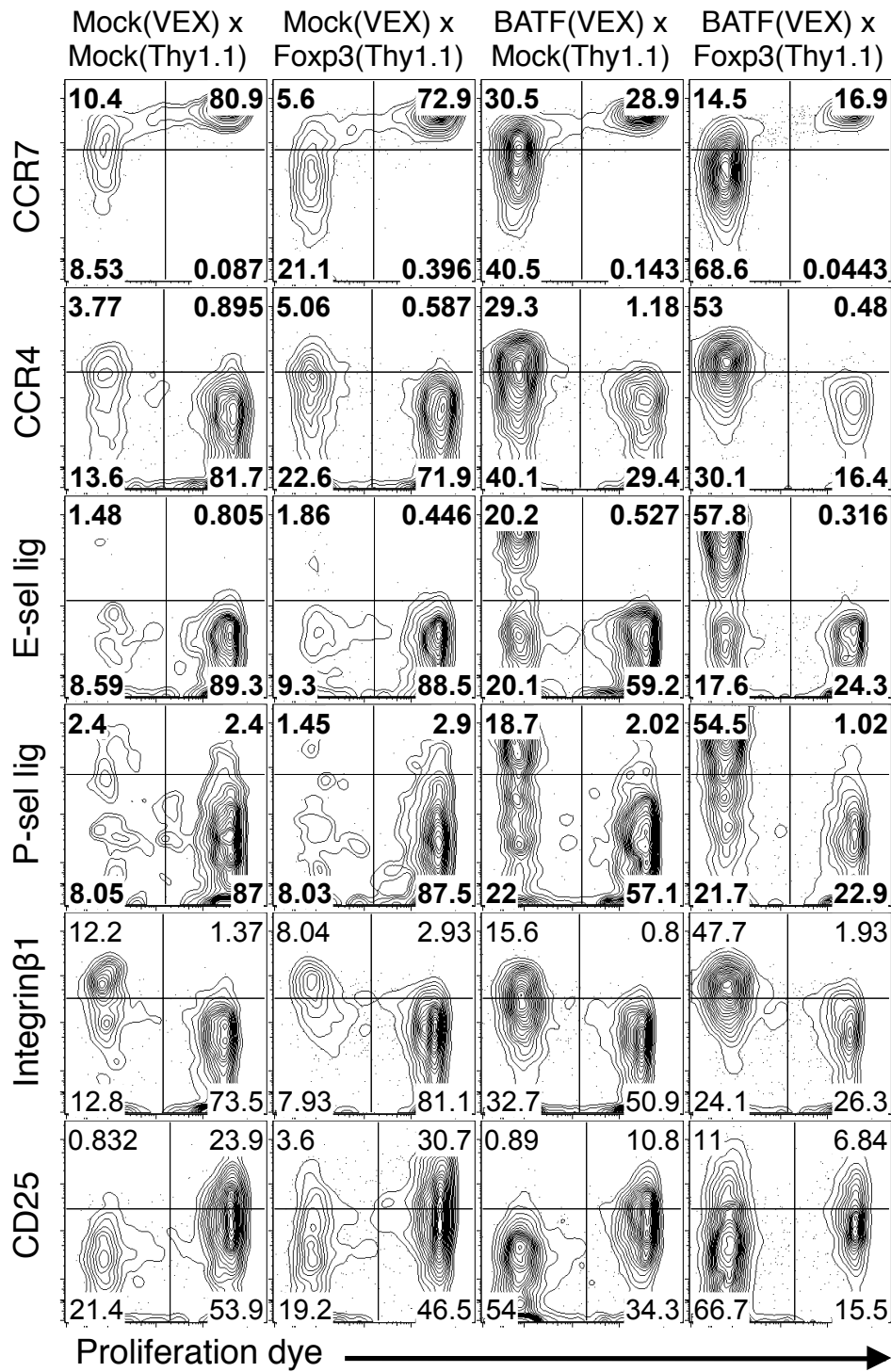


図30 Foxp3 & BATF-RV naïve T細胞の表現型解析 その1

Proliferation dyeでラベルしたMock(VEX reporter)-RV x Mock(Thy1.1 reporter)-RV WT naïve T細胞(Ly5.2⁺)、Mock(VEX)-RV x Foxp3(Thy1.1)-RV WT naïve T細胞、BATF(VEX)-RV x Mock(Thy1.1)-RV WT naïve T細胞、BATF(VEX)-RV x Foxp3(Thy1.1)-RV WT naïve T細胞を放射線照射したマウス(Ly5.1⁺)に移入し、7日後に移入したRV感染T細胞(Ly5.2⁺VEX⁺Thy1.1⁺)の表現型解析を行った。脾臓におけるドナーRV感染細胞の代表的なFCM解析例。

第六章 総括と展望

第一節 本研究の総括

制御性 T 細胞(Treg)は免疫応答を抑制する機能をもち、生体の恒常性を維持する上で必須の細胞である。Treg はリンパ組織ばかりでなく非リンパ組織においても存在することで過剰な免疫応答を抑制し、非リンパ組織の恒常性維持にも関わる。さらに Treg は非リンパ組織への移行に関わる分子を高発現していることが知られており、それにより非リンパ組織へ移行して効率的に免疫応答を抑え、非リンパ組織の恒常性維持に関わる可能性が考えられていたが、Treg がどのようにしてそれら非リンパ組織への移行に関わる分子を高発現するのかは依然として不明であった。一方、私が本研究を行った研究室では、*Batf*^{-/-}*Foxp3*⁺ Treg が末梢特に非リンパ組織における恒常性を破綻することを明らかにしていた。

以上を踏まえ、私は BATF が Treg の表現型にどのような影響を与えるかを解析することを通して、“Treg に特徴的な非リンパ組織における恒常性維持の分子機構”を解明することを最終目標として研究を行った。以下に、本研究で明らかにしたことをまとめる。

(1) 非リンパ組織において恒常性を破綻する *Batf*^{-/-}*Foxp3*⁺ Treg が *in vivo* において抑制能をもつかどうかを検証するために、Treg 特異的 BATF 欠損マウスを作製し、表現型を解析した。結果、Treg 特異的 BATF 欠損マウスは皮膚炎、肺炎などの非リンパ組織における炎症を含む致死的な自己免疫疾患様症状を発症することを示した。このことから、BATF は Treg の抑制能に必須であることが明らかとなった。Treg が非リンパ組織における炎症を抑制するためには、非リンパ組織に存在する必要があることを考慮すると、*Batf*^{-/-}*Foxp3*⁺ Treg が非リンパ組織における炎症抑制能を欠く原因のひとつは *Batf*^{-/-}*Foxp3*⁺ Treg が非リンパ組織における恒常性を破綻しているからであることが示唆された。

(2) *Batf*^{-/-}*Foxp3*⁺ Treg が非リンパ組織における恒常性を破綻する原因を探るために、WT *Foxp3*⁺ Treg、*Batf*^{-/-}*Foxp3*⁺ Treg、WT *Foxp3*⁻ Tconv、*Batf*^{-/-}*Foxp3*⁻ Tconv の網羅的トランスクリプトーム解析、FCM 解析を行った。結果、*Batf*^{-/-}*Foxp3*⁺ Treg では WT *Foxp3*⁺ Treg と比べて非リンパ組織への細胞移動に関わる Treg 特徴的高発現遺伝子である *Ccr4*、*Gcnt1*、*Itgb1* の発現が低下すること、これらの遺伝子によって発現制御される CCR4、E-/P-sel lig、Integrinβ1 の発

現が低下することを示した。また、リンパ組織への細胞移動に関わる CCR7 についても発現解析した結果、*Batf*^{-/-}Foxp3⁺ Treg は WT Foxp3⁺ Treg と比べて CCR7 の発現が高いことを示した。さらに、Treg の末梢特に非リンパ組織における恒常性に関わる細胞移動とは異なる要素として増殖に着目し、*Batf*^{-/-}Foxp3⁺ Treg は WT Foxp3⁺ Treg と比べ増殖能を欠くことを示した。以上の結果から、BATF は Treg において非リンパ組織への細胞移動に関わる Treg 特徴的高発現分子 CCR4、E-/P-sel lig、Integrinβ1 の発現上昇、リンパ組織への細胞移動に関わる CCR7 の発現低下、増殖を亢進することが明らかとなった。

(3) BATF が非リンパ組織への細胞移動に関わる *Ccr4*、*Gcnt1*、*Itgb1* を含む複数の Treg 特徴的高発現遺伝子の発現亢進に関わる分子基盤を探るため、Treg、Tconv 間で BATF のゲノム結合パターンを網羅的に比較し、Treg 選択的 BATF 結合領域を同定した。また、Treg 選択的 BATF 結合領域の 46%が Foxp3 依存的に形成されることを示し、BATF 依存的に一部の Foxp3 結合ピークが誘導されることも明らかにした。さらに、Treg 選択的 Foxp3 依存的 BATF 結合領域と BATF 依存的 Foxp3 結合領域には重複する領域つまり Foxp3-BATF 相互依存的結合領域が存在し、それらは BATF 依存的 Treg 高発現遺伝子である *Ccr4*、*Gcnt1*、*Itgb1* の周囲を含む TSS から遠位の領域に結合することを示した。TSS から遠位に存在する Foxp3-BATF 相互依存的結合領域がエンハンサー領域である可能性を考え、細胞特異的 DNaseI 高感受性領域、p300 結合領域が細胞特異的エンハンサー領域と相関するという報告をもとに、Foxp3-BATF 相互依存的結合領域と Treg 特異的 DNaseI 高感受性領域、Treg における p300 結合領域との重複を確認した。その結果、Foxp3-BATF 相互依存的結合領域は Treg 特異的 DNaseI 高感受性領域と 84%、Treg における p300 結合領域と 64%重複することを示し、Foxp3 および BATF は *Ccr4*、*Gcnt1*、*Itgb1* 周囲を含む複数のエンハンサー領域に相互依存的に結合している可能性を示した。

(4) Foxp3 および BATF が相互依存的に結合する Treg 特異的 DNaseI 高感受性かつ p300 が結合するゲノム領域が存在し、その周囲に BATF 依存的 Treg 特徴的高発現遺伝子である *Ccr4*、*Gcnt1*、*Itgb1* が含まれていたことを踏まえ、Foxp3 および BATF が協調して、これらにより発現制御される分子 CCR4、E-/P-sel lig、Integrinβ1 の発現を亢進する可能性を考え、それを検証した。その結果、Foxp3 および BATF は協調的に CCR4、E-/P-sel lig、integrinβ1 の発現を亢進することを示した。また、Foxp3 および BATF は協調して CCR7 の発

現低下、増殖も亢進することを示した。さらに、CCR4、E-/P-sel lig、Integrinβ1 の発現亢進、CCR7 発現低下は増殖と共に生じることも示した。

以上の結果により、Treg が何故非リンパ組織への細胞移動に関わる分子を高発現するのか？という長年の疑問に対して初めて答えが示された。その答えは、Foxp3 および BATF が協調して増殖に伴う非リンパ組織への細胞移動に関わる分子発現を亢進するからである。本研究成果は、Treg の数が非リンパ組織において維持されることが非リンパ組織における過剰な免疫応答の抑制、組織恒常性維持に重要であるという観点からしても、非常に重要な知見である。さらに、本研究では Foxp3 および BATF が協調して働く分子機構として、Foxp3 および BATF が相互依存的に TSS から遠位の Treg 特異的 DNaseI 高感受性領域、p300 結合ゲノム領域に結合することを明らかにしてきた。このことから、Foxp3 および BATF はお互いをエンハンサー領域にリクルートすることで、協調して非リンパ組織への移行に関わる分子発現亢進に関わる可能性が示された。

しかしながら、Foxp3 および BATF が相互依存的に結合する領域が実際にエンハンサー領域かどうかについての検証は十分でない。また、上述する通り本研究により Foxp3 および BATF が協調して増殖に伴う非リンパ組織への細胞移動に関わる分子発現の亢進を誘導することは示していたが、Foxp3 および BATF が協調して非リンパ組織における恒常性維持に寄与しているか、またそれにより効率的に過剰な免疫応答を抑制するかについても検証が十分でない。これらの課題および本研究成果から派生すると考えられる新たな研究展開について本章第二節 今後の展望にて述べる。

第二節 今後の展望

2-1. Foxp3-BATF 相互依存的結合領域が転写制御領域であるかの検証

第四章第六節、本章第一節でも述べた通り、まず、Foxp3 および BATF が相互依存的に結合する領域が転写開始点から遠位に存在する転写を促進する領域であるか、つまりエンハンサー領域であるかを検証する必要がある。

Ccr4, *Gcnt1*, *Itgb1* のように Foxp3-BATF 相互依存的結合領域周囲に Foxp3 および BATF が共に発現亢進する遺伝子が存在する場合は、レポーターアッセイによりこれらの遺伝子のプロモーター領域と Foxp3-BATF 相互依存的結合領域を共に vector に導入した場合、プロモーター領域単独を導入した場合よりも転写活性(Luciferase などのレポーター遺伝子の発現)が上昇するかを検証し、仮に転写活性が上昇した場合、Foxp3-BATF 相互依存的結合領域がエンハンサー領域であると結論出来る。

実際にエンハンサーとして働く Foxp3-BATF 相互依存的結合領域が同定された場合、Foxp3 および BATF の同領域への結合がエンハンサー活性に必要かどうかを検証する必要がある。このためには、エンハンサーとして同定された Foxp3-BATF 相互依存的結合領域およびプロモーター領域を導入した vector を WT Foxp3⁺ Tregs、WT Foxp3⁻ Tconv、R397W Foxp3⁺ Treg、*Batf*^{-/-} Foxp3⁺ Treg などに Transfection し、各細胞における転写活性を比較する方法が適切である。また、この際に Foxp3-BATF 相互依存的結合領域において Foxp3 が結合しうる FKH binding motif、BATF が結合しうる AP-1 binding motif を欠損もしくは他の塩基配列に置換させることで、エンハンサー活性が変化するかについても確認することで、Foxp3、BATF がそれぞれ FKH binding motif、AP-1 binding motif に結合することで転写活性促進に寄与しているかを検証出来ると考えられる。

Foxp3-BATF 相互依存的結合領域周囲に Foxp3 および BATF が発現亢進する遺伝子が存在しない場合は、これらの領域と直接相互作用する遺伝子をまず同定する必要がある。そのために適切な実験系は Circularized Chromosome Conformation Capture (4C)法である。4C 法は立体的に近接したゲノム領域をゲノムワイドに同定する手法である[152,153]。具体的には、転写因子などの核内因子とクロスリンクさせた DNA を制限酵素により切断し、Ligation することで、立体的に近接しかつ同核内因子に結合したゲノム領域を結合させる。その後、核内因子を除去し、再度制限酵素で切断、Self-Ligation させることで作

製した環状 DNA を鋳型にして Library を作製し、それらの配列を次世代シーケンサーにより網羅的に読んだ後、ゲノムアノテーションを行う。立体的に近接するゲノム領域は読まれたシーケンス内に近接して存在するため、この解析により、Foxp3-BATF 相互依存的結合領域が直接相互作用する領域が同定出来ると考えられる。相互作用する遺伝子を同定した後は、上述したレポーターアッセイを行うことで、Foxp3-BATF 相互依存的結合領域が相互作用する遺伝子のエンハンサー領域として働くかを検証出来る。

以上の解析から、これまで未知であった Treg 特徴的な非リンパ組織における恒常性維持に関わる新たなゲノム領域が同定されることが期待される。仮に、新たな Treg 特徴的な非リンパ組織における恒常性維持に関わるゲノム領域が同定出来た場合、これらのゲノム領域に対応するヒトのゲノム領域において疾患に関連した変異もしくは一塩基多型が存在するかを検証することで、ヒトにおける Treg の恒常性破綻と疾患の関連についても追求していきたい。

2-2. Foxp3-BATF の協調が Treg の非リンパ組織における恒常性維持、抑制能に寄与するかの検証

本章第一節において述べた通り、Foxp3 および BATF が協調して非リンパ組織における恒常性維持に関わるか、またそれにより効率的に過剰な免疫応答を抑制するかについても検証が十分でなかった。これについては、Foxp3 および BATF を RV で強制発現した naïve T 細胞、BATF のみを強制発現した naïve T 細胞、Foxp3 のみを発現した naïve T 細胞を Effector T 細胞と共に *Rag1*^{-/-}マウスに移入し、しばらく期間をおいた後、各非リンパ組織における RV 感染 T 細胞の割合、Effector T 細胞の活性化の度合い、非リンパ組織におけるヒストロジー解析を行うことで検証することが出来ると考えられる。

2-3. Treg の非リンパ組織における恒常性制御による自己免疫疾患・悪性腫瘍に対する治療の可能性

自己免疫疾患および悪性腫瘍に対する治療を考えた場合、自己免疫疾患が生じる組織においては Treg の数を増加させ過剰な免疫応答を抑制する、悪性腫瘍組織においては Treg の数を減少させ腫瘍に対する免疫応答を亢進するというアプローチが考えられる。

本研究では、Foxp3 および BATF が協調し Treg において増殖に伴う非リン

腫瘍組織への細胞に関わる分子発現亢進を誘導することを明らかにした。このことから、**Foxp3** および **BATF** の協調を強めることで、自己免疫疾患が生じる組織における **Treg** の数を増加させ過剰な免疫応答を抑制する治療に役立てること、**Foxp3** および **BATF** の協調を弱めることで、**Treg** の腫瘍組織における数を減少させ、腫瘍に対する免疫応答を亢進する治療に役立てることが出来ると考えられる。今後、**Foxp3** と **BATF** の協調を強めるもしくは弱める因子、シグナルが同定されることで、自己免疫疾患や悪性腫瘍に対する新たな治療ストラテジーを提案できると期待している。

第七章 材料と方法

遺伝子改変マウス

B6.Foxp3^{GFP}Cre マウス、*B6.Foxp3^{WT}:hCD2* マウスは、*B6.Foxp3^{A384T}:hCD2* マウス、*B6.Foxp3^{R397W}:hCD2* マウスは私が本研究を行った研究室で作製された[154]。*B6.Foxp3^{WT}:GFP* マウスは Dr. Bernard Malissen から御供与いただいた[155]。これらを掛け合わせることで、*Foxp3^{WT}:GFP/WT:hCD2* マウス、*Foxp3^{WT}:GFP/R397W:hCD2* マウスを作製し使用した。*B6.Batf^{fl}ox* マウスは大阪大学伊勢渉准教授によって作製されたものを御供与いただいた(Unpublished)。*B6.Batf^{-/-}*マウス[68]、*B6.Ly5.1 congenic* マウスは *Foxp3^{hCD2}* マウスと掛け合わせて使用した。*B6.Irf4^{fl}ox* マウス[156]、*B6.Rag1^{-/-}*マウス[157]、*B6.Cd3ε^{-/-}*マウス[158]を含め以上のマウスは SPF にて飼育後、実験に使用した。全ての実験は理化学研究所横浜事業所安全管理室によって承認を得、ガイドラインに従って行った。

組織炎症スコアの評価

バイオ病理研究所(Oita, Japan)の基準に従った。

皮膚(耳介)炎は grade 0；変化なし、grade 1；ごく軽度の炎症性細胞が真皮に浸潤する、grade 2；軽度の炎症細胞が真皮に浸潤する、grade 3；軽度から中等度の炎症性細胞が真皮に浸潤する、たびたび皮膚潰瘍がみられる、たびたび表皮の肥厚、角化促進がみられる、grade 4；高度の炎症性細胞が真皮に浸潤する。中等度の皮膚潰瘍がみられ、表皮の肥厚、角化亢進がみられる、grade 5；高度の炎症性細胞が真皮に浸潤する、高度の皮膚潰瘍がみられ、表皮の肥厚、角化亢進がみられる、という基準に基づいて評価した(図 1A)。

肺炎は grade 0；変化なし、grade 1；ごく軽度の炎症性細胞が血管周囲、細気管支周囲に浸潤する、grade 2；軽度の炎症性細胞が血管周囲、細気管支周囲に浸潤する、grade 3；軽度から中等度の炎症性細胞が血管周囲、細気管支周囲に浸潤する、grade 4；高度の炎症性細胞が血管周囲、細気管支周囲に浸潤する、という基準に基づいて評価した(図 1A)。

大腸炎は、[23]の基準に従って評価した(図 2C)。

細胞単離

脾臓、皮膚所属リンパ節(顎下、鼠径、上腕、腋窩リンパ節)、腸間膜リンパ節

を取得し、2% FBS(Hyclone)を含む Hanks' balanced salt solution (HBSS, Sigma)中でナイロンメッシュ下にてすりつぶすことで single cell suspension を得た。脾臓中の赤血球は ACK lysing buffer (Lonza)により取り除いた。

小腸粘膜固有層から細胞を取得する場合は、まず、小腸から脂肪組織、パイエル板を除いた後、小腸を長軸方向に切り開き、PBS (Sigma)にて洗浄した。小腸を洗浄後 1cm 程度に切断し、10mM HEPES (Sigma)、5mM EDTA (Nacalai Tesque)を含む HBSS 中で 2 回 37℃にて 20 分攪拌することで上皮細胞を取り除いた。ハサミを用いて小腸を細かく切断し、100U/ml Collagenase type I (Worthington, CLS1)を含む 4% FBS 10mM HEPES 入り RPMI-1640(Nacalai Tesque)中で 2 回 37℃にて 30 分攪拌し、小腸細胞を取得した。小腸からリンパ球細胞を単離する際は、等張に調製した 40% Percoll (GE Healthcare)に小腸細胞を懸濁し、等張に調製した 80% Percoll をその下に積層した。室温で 1000xg にて 20 分遠心した後、中間層を取得した後、FCM buffer (2% Calf serum 0.02% sodium azide 入り PBS)にて洗い、これを小腸粘膜固有層リンパ球細胞として用いた。

骨髄細胞を取得する場合には、まず、脛骨、大腿骨を取得し、2% FBS を含む HBSS 中で、23G 注射針(Terumo)と 5ml シリンジ(Terumo)を用いて骨髄をおし出すことで骨髄を取得した。骨髄は 23G 注射針に通すことで骨髄細胞とした。骨髄細胞はビオチン化標識された Anti-CD3 ϵ 抗体(後述)と反応させた後、Anti-Biotin MicroBeads (Miltenyi Biotec)とインキュベートし、MS coloumn (Miltenyi Biotec)を通すことで、骨髄細胞から CD3 ϵ ⁺ 細胞の除去を行った。CD3 ϵ ⁺TCR β ⁺もしくは CD3 ϵ ⁺TCR $\gamma\delta$ ⁺細胞が 99%以上除去されていることを FCM にて確認し、これらの骨髄細胞を混合骨髄キメラ作製に用いた。

T 細胞サブセットを *Foxp3*^{hCD2} マウスから単離する場合は、まず、プールした脾臓、皮膚所属リンパ節、腸間膜リンパ節細胞から B220⁺ 細胞、CD8 α ⁺ 細胞、Gr1⁺ 細胞、CD11b⁺ 細胞をパニングにより除いた後、細胞を PE-もしくは APC-conjugated anti-hCD2 抗体(後述)及び Anti-CD4 抗体(後述)、Anti-CD8 α 抗体(後述)、Anti-CD19 抗体(後述)、その他の抗体で染色した。その後、細胞を Anti-APC もしくは Anti-PE MicroBeads (Miltenyi Biotec)とインキュベートし、LS もしくは MS coloumn (Miltenyi Biotec)を通すことで、hCD2⁺ 細胞、hCD2⁻細胞を取得した。この hCD2⁺ 細胞、hCD2⁻細胞はさらに FACS Aria Cell sorter (BD Biosciences)により、hCD2⁺CD4⁺CD8 α ⁻CD19⁻ Treg、hCD2⁻CD4⁺CD8 α ⁻

CD19⁻ Tconv、hCD2⁻CD4⁺CD8 α ⁻CD19⁻CD44^{low}CD62L^{high} naïve T 細胞、hCD2⁺CD4⁺CD8 α ⁻CD19⁻CCR7^{high} Treg などに 98%以上の純度で分離した。

細胞培養

レトロウィルスパッケージング細胞株である Plat-E は DMEM10-PS (10%FBS、100U/ml penicillin (Sigma)、100mg/ml streptomycin (Sigma))を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma))にて培養、継代した。

単離した Treg (1x10⁶ cells/ml)、naïve T 細胞 (1x10⁶ cells/ml)は Dynabeads Mouse T-Activator CD3/28 (1x10⁶ cells/ml) (Gibco)、10 または 30ng/ml rmIL-2 (R&D)を含む RPMI10-PS(10%FBS、10mM HEPES、1mM sodium pyruvate (Sigma)、50 μ M 2-ME (Gibco)、100U/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin 入り RPMI 1640 Medium, GlutaMAX (Gibco))にて 48-well flat-bottom plate (Treg)、24-well flat-bottom plate (naïve T 細胞)で培養した。

レトロウィルスベクターおよびレトロウィルス上清の作製

レトロウィルスベクターは私が本研究を行った研究室において作製された。B6 マウス由来野生型 *Batf* は MSCV-IRES-Thy1.1 ベクター [159]、pMCs-IRES-GFP ベクター [160] にクローニングされた。変異 *Batf* (E77K) は野生型 *Batf* の 77 番目のアミノ酸における一塩基置換(GAG \rightarrow AAG)、変異 *Batf* (H55Q) は野生型 *Batf* の 55 番目のアミノ酸における一塩基置換(CAC \rightarrow CAG)、変異 *Batf* (4xMut(H55Q, L56A, K63D, E77K)) は上述の二つの変異に加え、56 番目のアミノ酸における塩基置換(CTG \rightarrow GCC)、63 番目のアミノ酸における塩基置換(AAA \rightarrow GAC)により作製され、pMCs-IRES-GFP ベクター [160] にクローニングされた。

レトロウィルス上清は、パッケージング細胞株に FuGENE 6 Transfection Reagent (Promega)を用いてレトロウィルスベクターを導入した後、24 時間後に培養上清を除き新しい DMEM10-PS を加え、その 24 時間後に培養上清を回収し、これをレトロウィルス上清として使用まで-80℃にて保存した。

レトロウィルスによる T 細胞への遺伝子導入

T 細胞培養開始 2 日後の培養液から Dynabeads Mouse T-Activator CD3/28 を除いた。T 細胞懸濁液に polybrene を 12 μ g/ml になるように加え、レトロウ

ウイルス上清と 1:1 で (複数のレトロウィルスを感染させる場合はレトロウィルス上清総量と 1:1 で)混合し、32℃で 1 時間 3000rpm にて遠心した。遠心後、インキュベーターにて 5~6 時間培養し、遠心して上清を取り除いた後、10ng/ml の rmIL-2 を含む RPMI10-PS に懸濁し、24-well flat-bottom plate にて再培養した。

細胞移入

Foxp3^{hCD2} マウスに細胞移入する場合は、細胞移入当日からレシピエント *Foxp3^{hCD2}* マウスの飲料水に 0.5mg/ml neomycin sulfate (Sigma)、100U/ml Polymyxin B (Sigma)を加えた。レシピエント *Foxp3^{hCD2}* マウスを 6.0Gly の放射線照射し、Cell Proliferation Dye eFluor 450 (eBioscience)で染色したレトロウィルス感染細胞(7×10^5 cells (図 4、5)、 2×10^5 cells (図 6))を静脈投与した。細胞移入 7 日後 (図 4、5)、5 日後 (図 6)にレシピエントマウスの脾臓、皮膚所属リンパ節、腸間膜リンパ節細胞を取得し、解析した。ドナー由来の細胞、レシピエント由来の細胞は Congenic marker(Ly5.1⁺、Ly5.2⁺)で区別した。

B6.*Cd3ε*^{-/-}マウスに細胞移入する場合は、WT hCD2⁻ Tconv (1×10^6 cells)と WT もしくは *Batf*^{-/-}マウス由来 hCD2⁺CCR7^{high} Treg (2×10^5 cells)を静脈投与した。5 日後に皮膚所属リンパ節、腸間膜リンパ節細胞を取得し、解析した(図 7)。

大腸炎モデル

Rag1^{-/-}マウスに *Foxp3^{A384T:hCD2}* マウスの脾臓およびリンパ節細胞 (1×10^7 cells)を単独もしくは野生型か変異 BATF-RV A384T *Foxp3*⁺ Treg (2×10^5 cells)とともに静脈投与した。細胞移入前日、細胞移入後 1 週間おきに 5 週目まで *Rag1*^{-/-}マウスの体重を測定し、細胞移入前日の体重を 100%として測定した体重を標準化した(図 2B)。細胞移入 5 週後に、大腸を 10% Formalin Neutral Buffer Solution (Wako) にて保存し、HE 染色の後、炎症スコアを評価した(図 2C)。細胞移入 5 週後に、脾臓、腸間膜リンパ節、小腸粘膜固有層の細胞を取得し、解析した(図 3)。

混合骨髓キメラ

細胞移入当日もしくはそれ以前から、レシピエント *Foxp3^{hCD2}* マウスの飲料水に 0.5mg/ml neomycin sulfate、100U/ml Polymyxin B を加えた。レシピエ

ント *Foxp3*^{hCD2} マウスを 9.5Gly の放射線で照射し、8 時間以上経過してから CD3ε⁺ 細胞を除去した WT および *Batf*^{-/-} マウス(もしくは WT マウス)由来の骨髓細胞 (2x10⁶ cells ずつ合わせて 4x10⁶ cells) を静脈投与した。ドナー由来の二種類の細胞およびレシピエント由来の細胞を区別出来るように、Congenic marker (Ly5.1⁺Ly5.2⁺、Ly5.1⁺Ly5.2⁻、Lu5.1⁻Ly5.2⁺) を使用した。細胞移入 8~10 週間後にレシピエントマウスの脾臓、皮膚所属リンパ節、腸間膜リンパ節の細胞を取得し、解析した(図 14)。

FCM 解析

Biotin、FITC、Alexa Fluor 488、PE、APC、Alexa Fluor 647、PerCP-Cy5.5、PE-Cy7、Alexa Fluor 700、eFluor 450、V450、Brilliant Violet 421、V500、Brilliant Violet 510、Brilliant Violet 605、PE-CF594 標識された以下のモノクローナル抗体(mAbs)を BD Biosciences、eBioscience、Biolegend から購入して使用した。Anti-human CD2 (hCD2) (RPA-2.10), anti-mouse CD3ε (145-2C11), CD4 (RM4-5), CD8α (53-6.7), CD11b (M1/70), CD19 (1D3), CD25 (PC61), CD45.1 (A20), CD45.2 (104), CCR4 (2G12), CCR6 (29-2L17), CCR7 (4B12), CXCR3 (CXCR3-173), Integrinβ1 (HMβ1-1), Foxp3 (FJK-16s), Gr1 (RB6-8C5), Ki67 (B56), ST2 (DIH9), TCRβ (H57-597), Thy1.1 (OX-7)。細胞は染色前に 4℃にて 5 分 anti-FcγR mAbs (2.4G2)とインキュベートした。Biotin 標識された抗体で染色した場合は、PE⁻、APC⁻、PE-CF594⁻、Brilliant Violet 650-標識された Streptavidin (BD Biosciences、eBioscience、Biolegend)で染色した。細胞は 1μM SYTOX Blue (Invitrogen)、7-AAD (Biolegend)を含む FCM buffer に懸濁した後、FACSCanto (BD Biosciences)、FACS Aria Cell Sorter にて解析した(図 3-7、14、29-31)。

Foxp3 や Ki67 を細胞内染色する場合は、細胞表面染色を行った後、Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience)を使用して、細胞を固定し、膜透過処理を行った後、染色した(図 29)。

E-sel lig、P-sel lig を染色する場合は、細胞と Recombinant Mouse E-selectin/CD62E Fc Chimera (R&D)、Recombinant Mouse P-selectin/CD62P Fc Chimera (R&D)を反応させた後、PE もしくは APC で標識された Anti-Human IgG mAbs (Jackson ImmunoResearch)で染色した(図 14、29-31)。

RNA-seq

WT *Foxp3*^{hCD2} マウス、*Batf*^{-/-} *Foxp3*^{hCD2} マウスから単離した hCD2⁺ Treg、hCD2⁻ Tconv (5x10⁵-2x10⁶ cells) から Total RNA を Isogen (Nippon Gene) により単離した。

Total RNA を取得後すぐに、Quant-iT™ RiboGreen RNA Assay Kit (Life Technologies) を用い Fusion-α Multilabel Reader (PerkinElmer) にて定量し、Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies) を用い 2100 Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies) にて Quality Check を行った。ribosomal RNA ratio が 1.8~2.2 であること、RNA Integrity Number [161,162] が 9.0 以上であることを確認し、100 もしくは 200ng の Total RNA をスタートとして NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB) を用い RNA-seq library を作製した。RNA-seq library は KAPA SYBR FAST qPCR Kit Optimized for LightCycler 480 (Kapa Biosystems) を用いて、LightCycler 480 (Roche) にて定量し、High Sensitivity DNA Analysis Kits (Agilent Technologies) を用いて、2100 Agilent Bioanalyzer にて Library の平均鎖長を測定した。RNA-seq library を 2nM に調製した後、HiSeq 2000 (Illumina) にて SE-50 (single-ended 50 base-pair reads) の設定でシーケンスを行った。

シーケンスによる配列決定後、配列ファイル(.fastq) を Tophat 2.0.8 [163] を用いてゲノムへ mapping した。この際、Tophat では Bowtie 2.1.0 [164] を機動し使用した。その後、Cufflinks [165] を用いて各遺伝子の FPKM 値を得た。

RNA-seq データの解析

全ての FPKM 値には 0 を避けるため、0.3 をたした。n=2 の実験で共に 2 倍以上高い遺伝子を 2 倍以上発現が高い遺伝子として扱った(図 8-10)。また、n=2 の実験でどちらか一方でも 2 倍未満しか発現が変わらなかった遺伝子を 2 倍未満しか発現が変わらない遺伝子として扱った(図 8-10)。2 群で FPKM 値を比較する場合は、n=2 の FPKM 値の平均値を用いた(図 8A, B、図 9 A, B、図 10 B-E)。

ChIP-seq

WT *Foxp3*^{hCD2} マウス、*Batf*^{-/-} *Foxp3*^{hCD2} マウス、*Foxp3*^{WT:GFP/WT:hCD2} マウス、*Foxp3*^{WT:GFP/R397W:hCD2} マウスから hCD2⁺ Treg、hCD2⁻ Tconv (3x10⁶-1x10⁷

cells)を取得した。取得した細胞は 1ml 10%FBS、10mM HEPES、1mM sodium pyruvate、50 μ M 2-ME、100U/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin 入り RPMI 1640 Medium, GlutaMAX にて 37°C で 5 分 Incubate した後、37°C PBS を 9ml 添加した。PBS 添加後、Formaldehyde (Nacalai Tesque)を 1%の濃度になるように添加し、30 分室温にて細胞を固定した。1M Glycine (Wako)を 1ml 加え、固定反応を止め、細胞懸濁液を遠心した後、ペレットを氷冷した PBS で 2 回 wash した。Wash した細胞ペレットは次の作業まで-80°Cにて保存した。細胞は 5mM DTT、Protease inhibitor (cOmplete, Mini, EDTA-free) (Roche)を含む Lysis buffer 1 (50mM HEPES、140 mM sodium chloride (Wako)、1mM EDTA、10% Glycerol (Wako)、0.5% NP-40 (Nacalai Tesque)、0.25% Triton X-100 (Nacalai Tesque) in sterilized water)、Protease inhibitor を含む Lysis buffer 2 (10mM Tris-HCl (Nacalai Tesque)、200 mM sodium chloride、1mM EDTA、0.5mM EGTA (Dojindo) in sterilized water)にて処理した後、Protease inhibitor を含む Lysis buffer 3 (10mM Tris-Hcl、300 mM sodium chloride、1mM EDTA、0.5mM EGTA、0.1% sodium deoxycholate (Wako)、0.5% N-lauroylsacrosine (Sigma) in sterilized water)中で DNA 断片化のため sonication を行った。Sonication 後の細胞は 1%の濃度になるように Triton X-100 を加えた後、遠心し、上清を取得した。上清は、2 μ g BATF Rabbit mAb (Clone:D7C5、Cell Signaling)、2 μ g IRF-4 Antibody (Clone:M-17、Santa Cruz Biotech)、4 μ g polyclonal Rabbit anti-Foxp3 antibody (made in house by Dr. Hayatsu、[171])もしくは 2 μ g p300 抗体 (Clone:C-20、Santa Cruz Biotech)と 4°Cにて Overnight 反応させ、その後、使用抗体 1 μ g につき 10 μ l の Dynabeads Protein G (Life Technologies)と 4°Cにて 4 時間回転攪拌しながら反応させた。反応後、Dynabeads Protein G を Low salt buffer (0.1% SDS (Wako)、1% Triton-X、2mM EDTA、20mM Tris-HCl、150mM sodium chloride)、High salt buffer (0.1% SDS、1% Triton-X、2mM EDTA、20mM Tris-HCl、500mM sodium chloride)、RIPA buffer (50mM HEPES、500mM LiCl (Wako)、1mM EDTA、1% NP-40、0.7% sodium deoxycholate)、50mM sodium chloride を含む TE buffer (Nacalai Tesque)で wash し、Elution buffer (50mM Tris-HCl、10mM EDTA、1% SDS)を加えて 65°C で 10 分間攪拌することで IP したタンパク質-DNA 複合体を取得した。その後、65°Cにて 5 時間インキュベートすることでタンパク質と DNA のクロスリンクをほどこき、RNaseA (Nippon Gene)、

Protease K (NEB)で処理した後、IP した DNA を MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN)で精製した。精製した全量の DNA をスタートとして NEBNext ChIP-Seq Library Prep Reagent Set for Illumina (NEB)を用い ChIP-seq library を作製した。ChIP-seq library は KAPA SYBR FAST qPCR Kit Optimized for LightCycler 480 を用いて、LightCycler 480 にて定量し、High Sensitivity DNA Analysis Kits を用いて、2100 Agilent Bioanalyzer にて Library の平均鎖長を測定した。ChIP-seq library を 2nM に調製した後、HiSeq 2000 にて SE-50 の設定でシーケンスを行った。

シーケンスによる配列決定後、配列ファイル(.fastq)を Bowtie 1.0.0 [164] を用いてゲノムへ mapping し、SAM(.sam)ファイルを作製した。作製した SAM ファイルは SAMtools 0.1.19 [166]により BAM(.bam)ファイルに変換した。BAM ファイルをもとに MACS 1.4.2 [167]を用いて $p=1e^{-6}$ cut-off で peak calling を行い、ピークのゲノム上の位置情報をもつ BED(.bed)ファイルを作製した。これらの一連の作業は、SRAtailor [168]を用いて行うこともあった。SRAtailor [168]により、ピークの高さを RPM (Reads Per Million mapped reads)にノーマライズした BigWig(.bigwig)を作製し、これを IGV [169]に表示することで実際の ChIP-seq 代表データを作製した(図 25-28)。

DNase-seq

Foxp3⁺ Treg、Foxp3⁻ Tconv の DNase-seq データは ENCODE に deposit されているものを用いた[144,145]。GEO accession number は GSM1014148 (Foxp3⁺ Treg)、GSM1014192 (Foxp3⁻ Tconv)である。

ENCFF0010WB.fastq、ENCFF0010WC.fastq、ENCFF0010WD.fastq ファイルを cat コマンドにより足し合わせることで Foxp3⁺ Treg における DNase-seq データとして、ENCFF0010SU.fastq、ENCFF0010SV.fastq、ENCFF0010SW.fastq ファイルを cat コマンドにより足し合わせることで Foxp3⁻ Tconv における DNase-seq データとして用いた。

ChIP-seq データ/DNase-seq データの解析

ChIP-seq のピークの高さを 2 群で比較する場合は、MACS [167]において片方のデータを test sample とし、もう片方のデータを control sample として $p=1e^{-6}$ cut-off で peak calling することで、片方のサンプルで有意に高いピーク

を同定した。2 回の実験で共通して有意だと判定されたピーク情報を基に解析を行った(図 15-24)。複数ピークの重なりを調べる場合、Galaxy [170]を用いて、100 塩基以上重なったピークを重複するピークとして同定した(図 16、17A、19A、20、22A、23A、24A, B)。

Treg 特異的 DNaseI 高感受性領域は、MACS [167]において Foxp3⁺ Treg の DNase-seq データを test sample とし、Foxp3⁻ Tconv の DNase-seq データを control sample として $p=1e^{-6}$ cut-off で peak calling することで同定した。

モチーフ解析は RSAT [137,138]の peak-motifs を用いて行った (図 15B-C、17B-C、18B-C、19B-C、21B-C、22B-C)。モチーフを検出するピーク幅をピーク中心から±200bp に設定し、他の設定はそのまま解析した。図には Oligomer length 6 に基づく oligo-analysis の結果を表示している (図 15B-C、17B-C、18B-C、19B-C、21B-C、22B-C)。

ChIP-seq ピーク近傍遺伝子の同定、ChIP-seq ピークの TSS からの距離の解析は GREAT [143]を用いて行った(図 23B、24C, D)。

ChIP-seq ピークがみられるゲノム領域の特徴解析は R パッケージの ChIPseeker [173]を用いて行った(図 23C)。

参考文献

1. Sakaguchi (2005) Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6: 345-352.
2. Sakaguchi (2004) Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22: 531-562.
3. Kappler JW, Roehm N, Marrack P (1987) T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 49: 273-280.
4. Kisielow B, Horst S, Uwe D S et al. (1988) Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature* 333: 742-746.
5. Nitta T, Murata S, Ueno T et al. (2008) Thymic microenvironments for T-cell repertoire formation. *Adv Immunol* 99: 59-94.
6. Peterson DA, DiPaolo RJ, Kanagawa O et al. (1999) Quantitative analysis of the T cell repertoire that escapes negative selection. *Immunity* 11: 453-462.
7. Enouz S, Carrié L, Merkler D et al. (2012) Autoreactive T cells bypass negative selection and respond to self-antigen stimulation during infection. *J Exp Med* 209: 1769-1779.
8. Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K et al. (1985) Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med* 161: 72-87.
9. Sugihara S, Izumi Y, Yoshioka T et al. (1988) Autoimmune thyroiditis induced in mice depleted of particular T cell subsets. I. Requirement of Lyt-1 dull L3T4 bright normal T cells for the induction of thyroiditis. *J Immunol* 141: 105-113.
10. Sakaguchi S, Takahashi T, Nishizuka Y (1982) Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. *J Exp Med* 156: 1577-1586.

11. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M et al. (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155: 1151-1164.
12. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerriid KA et al. (2001) Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27: 68-73.
13. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J et al. (2001) X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 27: 18-20.
14. Bennett CL, Christile J, Ramsdell F et al. (2001) The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27: 20-21.
15. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299: 1057-1061.
16. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4: 330-336.
17. Chatila TA, Blaeser F, Ho N et al. (2000) JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest* 106: R75-81.
18. Khattry R, Cox T, Yasayko SA et al. (2003) An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4: 337-342.
19. von Boehmer H (2005) Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 6: 338-344.
20. Yamaguchi T, Sakaguchi S (2006) Regulatory T cells in immune surveillance and treatment of cancer. *Semin Cancer Biol* 16: 115-123.
21. Wood KJ, Sakaguchi S (2003) Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 3: 199-210.
22. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y et al. (2009) Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* 21: 1105-1111.

23. Asseman C, Mauze S, Leach MW (1999) An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 190: 995-1004.
24. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P et al. (2008) CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science* 322: 271-275.
25. Qureshi O S, Zheng Y, Nakamura K et al. (2011) Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 332: 600-603.
26. Shevach (2011) Biological functions of regulatory T cells. *Adv Immunol* 112: 137-176.
27. Shevach (2009) Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30: 636-645.
28. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD et al. (2007) Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 445: 771-775.
29. Lin W, Haribhai D, Relland LM et al. (2007) Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat Immunol* 8: 359-368.
30. Sugimoto N, Oida T, Hirota K et al. (2006) Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25⁺CD4⁺ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int Immunol* 18: 1197-1209.
31. Hill JA, Feuerer M, Tash K et al. (2007) Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity* 27: 786-800.
32. Fu W, Ergun A, Lu T et al. (2012) A multiply redundant genetic switch 'locks in' the transcriptional signature of regulatory T cells. *Nat Immunol* 13: 972-980.
33. Ono M, Yaguchi H, Ohkura N et al. (2007) Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature* 446: 685-689.
34. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V et al. (2006) FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 126: 375-387.
35. Pan F, Yu H, Dang EV et al. (2009) Eos mediates Foxp3-dependent gene silencing in CD4⁺ regulatory T cells. *Science* 325: 1142-1146.

36. Zheng Y, Chaudhry A, Kas A et al. (2009) Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* 458: 351-356.
37. Zhou L, Lopes JE, Chong MM et al. (2008) TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature* 453: 236-240.
38. Beyer M, Thabet Y, Müller RU et al. (2011) Repression of the genome organizer SATB1 in regulatory T cells is required for suppressive function and inhibition of effector differentiation. *Nat Immunol* 12: 898-907.
39. Chaudhry A, Rudra D, Treuting et al. (2009) CD4⁺ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science* 326: 986-991.
40. Shi LZ, Wang R, Huang G et al. (2011) HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *J Exp Med* 208: 1367-1376.
41. Dang EV, Barbi J, Yang HY et al. (2011) Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 146: 772-784.
42. Koch MA, Tucker-Heard G, Perdue NR et al. (2009) The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol* 10: 595-602.
43. Ohkura N, Hamaguchi M, Morikawa H et al. (2012) T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. *Immunity* 37: 785-799.
44. Schwarz A, Maeda A, Wild MK et al. (2004) Ultraviolet radiation-induced regulatory T cells not only inhibit the induction but can suppress the effector phase of contact hypersensitivity. *J Immunol* 172: 1036-1043.
45. Huehn J, Hamann A (2005) Homing to suppress: address codes for Treg migration. *Trends Immunol* 26: 632-636.
46. Siegmund K, Feuerer M, Siewert C et al. (2005) Migration matters: regulatory T-cell compartmentalization determines suppressive activity in vivo. *Blood* 106: 3097-3104.

47. Sather B, Treuting P, Perdue N et al. (2007) Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. *J Exp Med* 204: 1335-1347.
48. Dudda J, Perdue N, Bachtanian E et al. (2008) Foxp3+ regulatory T cells maintain immune homeostasis in the skin. *J Exp Med* 205: 1559-1565.
49. Feuerer M, Herrero L, Ciolletta D et al. (2009) Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med* 15: 930-939.
50. Ciolletta D, Feuerer M, Li A et al. (2012) PPAR- γ is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature* 486: 549-553.
51. Samstein R, Josefowicz S, Arvey A et al. (2012) Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. *Cell* 150: 29-38.
52. Burzyn D, Kuswanto W, Kolodin D et al. (2013) A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. *Cell* 155: 1282-1295.
53. Griffith JW, Sokol CL, Luster AD (2014) Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol* 32: 659-702.
54. Hirahara K, Liu L, Clark RA et al. (2006) The majority of human peripheral blood CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ regulatory T cells bear functional skin-homing receptors. *J Immunol* 177: 4488-4494.
55. Campbell DJ, Koch MA (2011) Phenotypical and functional specialization of FOXP3⁺ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 11: 119-130.
56. Iellem A, Mariani M, Lang R et al. (2001) Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 194: 847-853.
57. Kim SV, Xiang WV, Kwak C et al. (2013) GPR15-mediated homing controls immune homeostasis in the large intestine mucosa. *Science* 340: 1456-1459.
58. Lee JH, Kang SG, Kim CH (2007) FoxP3⁺ T cells undergo conventional first switch to lymphoid tissue homing receptors in thymus but accelerated second switch to nonlymphoid tissue homing receptors in

- secondary lymphoid tissues. *J Immunol* 178: 301-311.
59. Grindebacke H, Stenstad H, Quiding-Järbrink M et al. (2009) Dynamic development of homing receptor expression and memory cell differentiation of infant CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells. *J Immunol* 183: 4360-4370.
 60. Liston A, Gray DH (2014) Homeostatic control of regulatory T cell diversity. *Nat Rev Immunol* 14: 154-165.
 61. Burzyn D, Benoist C, Mathis D (2013) Regulatory T cells in nonlymphoid tissues. *Nat Immunol* 14: 1007-1013.
 62. Dorsey MJ, Tae HJ, Sollenberger KG et al. (1995) B-ATF: a novel human bZIP protein that associates with members of the AP-1 transcription factor family. *Oncogene* 11: 2255-2265.
 63. Murphy TL, Tussiwand R, Murphy KM (2013) Specificity through cooperation: BATF-IRF interactions control immune-regulatory networks. *Nat Rev Immunol* 13: 499-509.
 64. Echlin DR, Tae HJ, Matin N et al. (2000) B-ATF functions as a negative regulator of AP-1 mediated transcription and blocks cellular transformation by Ras and Fos. *Oncogene* 19: 1752-1763.
 65. Williams KL, Nanda I, Lyons GE et al. (2001) Characterization of murine BATF: a negative regulator of activator protein-1 activity in the thymus. *Eur J Immunol* 31: 1620-1627.
 66. Aronheim A, Zandi E, Hennemann H et al. (1997) Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol Cell Biol* 17: 3094-3102.
 67. Iacobelli M, Wachsman W, MacGuire KL (2000) Repression of IL-2 promoter activity by the novel basic leucine zipper p21SNFT protein. *J Immunol* 165: 860-868.
 68. Schraml B, Hildner K, Ise W et al. (2009) The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature* 460: 405-409.
 69. Ise W, Kohyama M, Schraml B et al. (2011) The transcription factor BATF controls the global regulators of class-switch recombination in both B cells and T cells. *Nat Immunol* 12: 536-543.
 70. Betz B, Jordan-Williams K, Wang C et al. (2010) Batf coordinates

- multiple aspects of B and T cell function required for normal antibody responses. *J Exp Med* 207: 933-942.
71. Tussiwand R, Lee W, Murphy T et al. (2012) Compensatory dendritic cell development mediated by BATF-IRF interactions. *Nature*.
 72. Glasmacher E, Agrawal S, Chang A et al. (2012) A Genomic Regulatory Element That Directs Assembly and Function of Immune-Specific AP-1-IRF Complexes. *Science*.
 73. Ciofani M, Madar A, Galan C et al. (2012) A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell* 151: 289-303.
 74. Li P, Spolski R, Liao W et al. (2012) BATF-JUN is critical for IRF4-mediated transcription in T cells. *Nature*.
 75. Jabeen R, Goswami R, Awe O et al. (2013) Th9 cell development requires a BATF-regulated transcriptional network. *J Clin Invest* 123: 4641-4653.
 76. Wang C, Thangamani S, Kim M et al. (2013) BATF is required for normal expression of gut-homing receptors by T helper cells in response to retinoic acid. *J Exp Med* 210: 475-489.
 77. Kurachi B, Yosef O, DiIorio L et al. (2014) The transcription factor BATF operates as an essential differentiation checkpoint in early effector CD8+ T cells. *Nat Immunol* 15: 373-383.
 78. Darce J, Rudra D, Li L et al. (2012) An N-terminal mutation of the Foxp3 transcription factor alleviates arthritis but exacerbates diabetes. *Immunity* 36: 731-741.
 79. Levine AG, Arvey A, Jin W et al. (2014) Continuous requirement for the TCR in regulatory T cell function. *Nat Immunol* 15: 1070-1078.
 80. Cretney E, Xin A, Shi W et al. (2011) The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat Immunol* 12: 304-311.
 81. Yuan Q, Bromley SK, Means TK et al. (2007) CCR4-dependent regulatory T cell function in inflammatory bowel disease. *J Exp Med* 204: 1327-1334.
 82. Müller M, Carter SL, Hofer MJ et al. (2007) CXCR3 signaling reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis by

- controlling the parenchymal distribution of effector and regulatory T cells in the central nervous system. *J Immunol* 179: 2774-2786.
83. Erhardt A, Wegscheid C, Claass B et al. (2011) CXCR3 deficiency exacerbates liver disease and abrogates tolerance in a mouse model of immune-mediated hepatitis. *J Immunol* 186: 5284-5293.
 84. Yamazaki T, Tang XO, Chung Y et al. (2008) CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. *J Immunol* 181: 8391-8401.
 85. Kitamura K, Farber JM, Kelsall BL (2010) CCR6 marks regulatory T cells as a colon-tropic, IL-10-producing phenotype. *J Immunol* 185: 3295-3304.
 86. Ueha S, Yoneyama H, Hontsu S et al. (2007) CCR7 mediates the migration of Foxp3⁺ regulatory T cells to the paracortical areas of peripheral lymph nodes through high endothelial venules. *J Leukoc Biol* 82: 1230-1238.
 87. Smigiel KS, Richards E, Srivastava S et al. (2014) CCR7 provides localized access to IL-2 and defines homeostatically distinct regulatory T cell subsets. *J Exp Med* 211: 121-136.
 88. Schneider MA, Meingassner JG, Lipp M et al. (2007) CCR7 is required for the in vivo function of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *J Exp Med* 204: 735-745.
 89. Menning A, Höpken UE, Siegmund K et al. (2007) Distinctive role of CCR7 in migration and functional activity of naive- and effector/memory-like Treg subsets. *Eur J Immunol* 37: 1575-1583.
 90. Schiering K, Chomka Fh, Adelmann W et al. (2014) The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature* 513: 564-568.
 91. Haraldsen G, Balogh J, Pollheimer J et al. (2009) Interleukin-33 - cytokine of dual function or novel alarmin? *Trends Immunol* 30: 227-233.
 92. Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10: 57-63.
 93. Setoguchi R, Hori S, Takahashi T et al. (2005) Homeostatic maintenance

- of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med* 201: 723-735.
94. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA et al. (2005) A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 6: 1142-1151.
 95. Nishioka T, Nishida E, Iida R et al. (2008) In vivo expansion of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells mediated by GITR molecules. *Immunol Lett* 121: 97-104.
 96. Zhang B, Kirov S, Snoddy J (2005) WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res* 33: W741-748.
 97. Wang J, Duncan D, Shi Z et al. (2013) WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. *Nucleic Acids Res* 41: W77-83.
 98. Gene Ontology Consortium (2008) The Gene Ontology project in 2008. *Nucleic Acids Res* 36: D440-444.
 99. Kanehisa M, Goto S, Sato Y et al. (2014) Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res* 42: D199-205.
 100. Kanehisa M, Goto S (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 28: 27-30.
 101. Pico AR, Kelder T, van Iersel MP et al. (2008) WikiPathways: pathway editing for the people. *PLoS Biol* 6: e184.
 102. Islam SA, Chang DS, Colvin RA et al. (2011) Mouse CCL8, a CCR8 agonist, promotes atopic dermatitis by recruiting IL-5⁺ T(H)2 cells. *Nat Immunol* 12: 167-177.
 103. Agace WW, Higgins JM, Sadasivan B et al. (2000) T-lymphocyte-epithelial-cell interactions: integrin alpha(E)(CD103)beta(7), LEEP-CAM and chemokines. *Curr Opin Cell Biol* 12: 563-568.
 104. Schön MP, Arya A, Murphy EA et al. (1999) Mucosal T lymphocyte numbers are selectively reduced in integrin alpha E (CD103)-deficient mice. *J Immunol* 162: 6641-6649.

105. Suffia I, Reckling SK, Salay G (2005) A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of *Leishmania major* infection. *J Immunol* 174: 5444-5455.
106. Lefrançois L, Parker CM, Olson S et al. (1999) The role of beta7 integrins in CD8 T cell trafficking during an antiviral immune response. *J Exp Med* 189: 1631-1638.
107. Issekutz AC, Issekutz TB (2002) The role of E-selectin, P-selectin, and very late activation antigen-4 in T lymphocyte migration to dermal inflammation. *J Immunol* 168: 1934-1939.
108. Kanehiro A, Takeda K, Joetham A et al. (2000) Timing of administration of anti-VLA-4 differentiates airway hyperresponsiveness in the central and peripheral airways in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 1132-1139.
109. Kunkel EJ, Butcher EC (2002) Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity* 16: 1-4.
110. Alon R, Kassner PD, Carr MW et al. (1995) The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol* 128: 1243-1253.
111. Ellies LG, Tsuboi S, Petryniak B et al. (1998) Core 2 oligosaccharide biosynthesis distinguishes between selectin ligands essential for leukocyte homing and inflammation. *Immunity* 9: 881-890.
112. Prorok-Hamon M, Notel F, Mathieu S et al. (2005) N-glycans of core2 beta(1,6)-N-acetylglucosaminyltransferase-I (C2GnT-I) but not those of alpha(1,3)-fucosyltransferase-VII (FucT-VII) are required for the synthesis of functional P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1): effects on P-, L- and E-selectin binding. *Biochem J* 391: 491-502.
113. Ley K, Kansas GS (2004) Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Nat Rev Immunol* 4: 325-335.
114. Marth JD, Grewal PK (2008) Mammalian glycosylation in immunity. *Nat Rev Immunol* 8: 874-887.
115. Darrasse-Jèze G, Deroubaix S, Mouquet H et al. (2009) Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *J*

Exp Med 206: 1853-1862.

116. Heng TS, Painter MW; Immunological Genome Project Consortium (2008) The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells. *Nat Immunol* 9: 1091-1094.
117. Shay T, Kang J (2013) Immunological Genome Project and systems immunology. *Trends Immunol* 34:602-9.
118. Wu M, Fang H, Hwang ST (2001) Cutting edge: CCR4 mediates antigen-primed T cell binding to activated dendritic cells. *J Immunol* 167: 4791-4795.
119. Holmqvist PH, Mannervik M (2013) Genomic occupancy of the transcriptional co-activators p300 and CBP. *Transcription* 4: 18-23.
120. Chan HM, La Thangue NB (2001) p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci* 114: 2363-2373.
121. Plank JL, Dean A (2014) Enhancer function: mechanistic and genome-wide insights come together. *Mol Cell* 55: 5-14.
122. Calo E, Wysocka J (2013) Modification of enhancer chromatin: what, how, and why? *Mol Cell* 49: 825-837.
123. Bulger M, Groudine M (2010) Enhancers: the abundance and function of regulatory sequences beyond promoters. *Dev Biol* 339: 250-257.
124. ENCODE Project Consortium, Birney E, Stamatoyannopoulos JA et al. (2007) Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447: 799-816.
125. Heintzman ND, Hon GC, Hawkins RD et al. (2009) Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature* 459: 108-112.
126. Heintzman ND, Stuart RK, Hon G et al. (2007) Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet* 39: 311-318.
127. Koch CM, Andrews RM, Flicek P et al. (2007) The landscape of histone modifications across 1% of the human genome in five human cell lines. *Genome Res* 17: 691-707.
128. Visel A, Blow MJ, Li Z et al. (2009) ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers. *Nature* 457: 854-858.

129. Xi H, Shulha HP, Lin JM et al. (2007) Identification and characterization of cell type-specific and ubiquitous chromatin regulatory structures in the human genome. *PLoS Genet* 3: e136.
130. Andersson R, Gebhard C, Miguel-Escalada I et al. (2014) An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature* 507: 455-461.
131. Furey TS (2012) ChIP-seq and beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein-DNA interactions. *Nat Rev Genet* 13: 840-852.
132. Park PJ (2009) ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nat Rev Genet* 10: 669-680.
133. Northrup DL, Zhao K (2011) Application of ChIP-Seq and related techniques to the study of immune function. *Immunity* 34: 830-842.
134. D'haeseleer P (2006) What are DNA sequence motifs? *Nat Biotechnol* 24: 423-425.
135. Portales-Casamar E, Thongjuea S, Kwon AT et al. (2010) JASPAR 2010: the greatly expanded open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res* 38: D105-110.
136. Spivakov M, Akhtar J, Kheradpour P et al. (2012) Analysis of variation at transcription factor binding sites in *Drosophila* and humans. *Genome Biol* 13: R49.
137. Thomas-Chollier M, Darbo E, Herrmann C et al. (2012) A complete workflow for the analysis of full-size ChIP-seq (and similar) data sets using peak-motifs. *Nat Protoc* 7: 1551-1568.
138. Thomas-Chollier M, Herrmann C, Defrance et al. (2012) RSAT peak-motifs: motif analysis in full-size ChIP-seq datasets. *Nucleic Acids Res* 40: e31.
139. Mathelier A, Zhao X, Zhang AW et al. (2014) JASPAR 2014: an extensively expanded and updated open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res* 42: D142-147.
140. Durham SK, Suwanichkul A, Scheimann AO et al. (1999) FKHR binds the insulin response element in the insulin-like growth factor binding protein-1 promoter. *Endocrinology* 140: 3140-3146.

141. Sadlon TJ, Wilkinson BG, Pederson S et al. (2010) Genome-wide identification of human FOXP3 target genes in natural regulatory T cells. *J Immunol* 185: 1071-1081.
142. Marson A, Kretschmer K, Frampton GM et al. (2007) Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature* 445: 931-935.
143. McLean CY, Bristor D, Hiller M et al. (2010) GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. *Nat Biotechnol* 28: 495-501.
144. EOCODE Project Consortium (2012) An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489: 57-74.
145. Samstein R, Arvey A, Josefowicz S et al. (2012) Foxp3 exploits a pre-existent enhancer landscape for regulatory T cell lineage specification. *Cell* 151: 153-166.
146. Deppmann CD, Thornton TM, Utama FE et al. (2003) Phosphorylation of BATF regulates DNA binding: a novel mechanism for AP-1 (activator protein-1) regulation. *Biochem J* 374: 423-431.
147. van Loosdregt J, Coffey PJ (2014) Post-translational modification networks regulating FOXP3 function. *Trends Immunol* 35: 368-378.
148. Samanta A, Li B, Song X et al. (2008) TGF- β and IL-6 signals modulate chromatin binding and promoter occupancy by acetylated FOXP3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 14023-14027.
149. Li B, Samanta A, Song X et al. (2007) FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 4571-4576.
150. Nie H, Zheng Y, Li R et al. (2013) Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF- α in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 19: 322-328.
151. Pennacchio LA, Bickmore W, Dean A et al. (2013) Enhancers: five essential questions. *Nat Rev Genet* 14: 288-295.
152. Zhao Z, Tavoosidana G, Sjölander M et al. (2006) Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and interchromosomal interactions.

- Nat Genet 38: 1341-1347.
153. Simonis M, Klous P, Splinter E et al. (2006) Nuclear organization of active and inactive chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture-on-chip (4C). Nat Genet 38: 1348-1354.
 154. Miyao T, Floess S, Setoguchi R et al. (2012) Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells. Immunity 36: 262-275.
 155. Wang Y, Kissenpfennig A, Mingueneau M et al. (2008) Th2 lymphoproliferative disorder of LatY136F mutant mice unfolds independently of TCR-MHC engagement and is insensitive to the action of Foxp3+ regulatory T cells. J Immunol 180: 1565-1575.
 156. Klein U, Casola S, Cattoretti G et al. (2006) Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. Nat Immunol 7: 773-782.
 157. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS et al. (1992) RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. Cell 68: 869-877.
 158. Malissen M, Gillet A, Ardouin L et al. (1995) Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene. EMBO J 14: 4641-4653.
 159. Mitchell TC, Hildeman D, Kedl RM et al. (2001) Immunological adjuvants promote activated T cell survival via induction of Bcl-3. Nat Immunol 2: 397-402.
 160. Kitamura T, Koshino Y, Shibata F et al. (2003) Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. Exp Hematol 31: 1007-1014.
 161. Schroeder A, Mueller O, Stocker S et al. (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. BMC Mol Biol 7: 3.
 162. Imbeaud S, Graudens E, Bouulanger V et al. (2005) Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. Nucleic Acids Res 33: e56.
 163. Trapnell C, Pachter L, Saizberg SL (2009) TopHat: discovering splice

- junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25: 1105-1111.
164. Langmead B, Trapnell C, Pop M et al. (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 10: R25.
 165. Trapnell C, Roberts A, Goff L et al. (2012) Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc* 7: 562-578.
 166. Li H, Handsaker B, Wysoker A et al. (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25: 2078-2079.
 167. Zhang Y, Liu T, Meyer CA et al. (2008) Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* 9: R137.
 168. Oki S, Maehara K, Ohikawa Y (2014) SraTailor: graphical user interface software for processing and visualizing ChIP-seq data. *Genes Cells* 19: 919-926.
 169. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W et al. (2011) Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* 29: 24-26.
 170. Blankenberg D, Von Kuster G, Coraor N et al. (2010) Galaxy: a web-based genome analysis tool for experimentalists. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 19: Unit 19.10.11-21.
 171. Hori, Preparing manuscript.
 172. Hori, Unpublished observation.
 173. Yu G. ChIPseeker: ChIPseeker for ChIP peak Annotation, Comparison, and Visualization. R package version 1.0.11.
 174. Some Data about Gene ontology classifications for this paper were retrieved from the Mouse Genome Database (MGD), Mouse Genome Informatics, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine. World Wide Web (URL: <http://www.informatics.jax.org>).

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究当初から私に裁量をもたせ自由に研究させてくださった理化学研究所統合生命医科学研究センター免疫恒常性研究チームの堀昌平チームリーダーに感謝申し上げます。堀チームリーダーは、私が望んだ際に積極的にディスカッションをしてくださり、時にはサイエンスに対して厳しく指導してくださいました。この場をお借りして深く感謝申し上げます。同研究室にて、ChIP-seqをはじめとして様々な分子生物学的手法を教えてください、かつ、多くのディスカッションをしてくださった早津徳人研究員に感謝申し上げます。同研究室にて、細胞生物学的な手法を丁寧に教えて下さり、かつ、その正確無比な実験技術に多大なる刺激を受けた宮尾貴久技術員に感謝申し上げます。同研究室にて、一人で行うのが困難な実験に関して快くお手伝いしてくださった加藤貴子技術員に感謝申し上げます。同研究室にて、研究に関して様々なディスカッションをしていただいた大西玲子研究員、Encarnita MARIOTTI-FERRANDIZ 研究員、木村翔彦大学院生、船津翔太郎大学院生に感謝申し上げます。

Batf^{fllox} マウスをご供与していただいた大阪大学免疫学フロンティア研究センター分化制御研究室の伊勢渉准教授、黒崎知博教授に感謝申し上げます。ChIP-seq 解析など様々な Informatics 解析について教えてくださった理化学研究所統合生命医科学研究センター統合ゲノミクス研究グループの遠藤高帆上級研究員に感謝申し上げます。ChIP-seq に関する様々な実験器具をお貸しいただいた理化学研究所統合生命医科学研究センター免疫転写制御研究グループ谷内一郎グループディレクターに感謝申し上げます。FACS の整備および点検を行ってくださった理化学研究所統合生命医科学研究センターFACS ラボ青山友美技術員、與座法子技術員に感謝申し上げます。お二人のおかげで FACS を快適に使用することが出来ました。PC に不具合が生じた時ばかりでなく、Informatics 解析方法について困った際にも相談にのってくださった理化学研究所統合生命医科学研究センターIT チーム村橋保昭技師に感謝申し上げます。また、PC の不具合のメンテナンスにおいてお世話になりました同 IT チーム井澤美穂技師、小澤あおい技師に感謝申し上げます。研究におけるよきライバルであり、よき相談相手でもあった理化学研究所統合生命医科学研究センターに所属する学生の皆さんに感謝申し上げます。皆さんのおかげでモチベーションを高く保ち、研究に望むことが出来ました。

私の意志を尊重し、理化学研究所に外研に出してくださった修士課程の際のメンターである現聖路加国際大学研究センター医療イノベーション部入村達郎部長、伝田香里上級研究員に感謝申し上げます。理化学研究所にて研究するにあたり、研究室に所属させていただいた東京大学大学院薬学系研究科分子生物学教室後藤由季子教授に感謝申し上げます。薬学部教務からの連絡を含め、必要事項を丁寧に連絡してくださった同研究科ワンストップ創薬共用ファシリティーセンター東伸昭准教授に感謝申し上げます。学士の研究室の同期であり、現在博士課程に在籍する津久井達哉大学院生、高橋恵生大学院生に感謝申し上げます。二人の研究姿勢および研究結果にとっても刺激を受けました。

最後になりましたが、本研究を遂行するにあたり様々な面で支えてくださった家族、父、母、祖父、祖母および友人を含む様々な方に感謝申し上げます。