

論文の内容の要旨

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

【研究の意義と目的】

転写因子 **Foxp3** を発現する制御性 T 細胞(**Foxp3⁺ Treg**)は過剰な免疫応答を抑えることで生体の恒常性を維持する。**Foxp3** 欠損マウスが抑制能をもつ **Treg** を欠くために致命的な自己免疫疾患を発症することから、**Foxp3** による **Treg** の発生・分化と機能の制御が生体恒常性維持に重要であることが明らかにされてきた。

近年、**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し、非リンパ組織における **Treg** の恒常性破綻が組織炎症の発症と関連していることが示唆されている。しかしながら、非リンパ組織に存在する **Treg** の恒常性維持機構には未だ不明な点が多く、これを解明することは組織の恒常性維持機構及び恒常性破綻によって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。

私が本研究を行った研究室では、**Foxp3** によって転写が正に制御される AP-1 ファミリーに属する転写因子 **BATF** を同定し、また、*Batf* 遺伝子欠損(-/-) **Foxp3⁺ Treg** が野生型(WT) **Foxp3⁺ Treg** と比べ非リンパ組織において大きく数を減じることから、**BATF** が **Treg** の非リンパ組織における恒常性(数)を制御していることを明らかにしてきた。しかしながら、**BATF** が **Treg** の非リンパ組織における恒常性を制御する分子機構は不明であった。

以上を踏まえ、私は **BATF** 欠損が **Treg** の表現型にどのような影響を与えるかについて解析することで、**Treg** の非リンパ組織における恒常性維持機構を解明するべく研究を行った。

【方法と結果】

第二章では、**BATF** が **Treg** の抑制能を制御するかについて個体レベルで明らかにするため、**Treg** 特異的 **BATF** 欠損マウスを作製し解析した。その結果、このマウスは皮膚炎、肺炎を中心とした致命的な自己免疫疾患様症状を呈することを示した。このことから、**BATF** は **Treg** による生体の恒常性維持に必須であることが明らかとなった。

第三章では、**BATF** が **Treg** の表現型にどのように影響するかを検証した。

RNA-seqによる網羅的トランスクリプトーム解析、フローサイトメトリー解析の結果、*Batf*^{-/-} *Foxp3*⁺ Treg では WT *Foxp3*⁺ Treg と比べ、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(通常型 T 細胞(Tconv)と比べ Treg で発現が高い分子)CCR4、E-selectin ligand、P-selectin ligand、Integrinβ1 及びそれらの機能的発現制御に関わる遺伝子 *Ccr4*、*Gcnt1*、*Itgb1* の発現が低いことを示した。このことから、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-selectin ligand、P-selectin ligand、Integrinβ1 の発現を亢進することが明らかとなった。

第四章では、BATF が CCR4、E-selectin ligand、P-selectin ligand、Integrinβ1 などの Treg 特徴的高発現分子及びそれらの機能的発現制御に関わる遺伝子 *Ccr4*、*Gcnt1*、*Itgb1* の発現を亢進する分子基盤を探るため、Treg 特徴的な BATF のゲノム結合パターンを ChIP-seq により網羅的に解析した。その結果、*Ccr4*、*Gcnt1*、*Itgb1* 遺伝子座周囲に Tconv と比べ Treg において有意に高い BATF 結合ピークがみられる領域(Treg 選択的 BATF 結合領域)を見だし、その領域に *Foxp3* も結合していることを見いだした。また、*Foxp3* の DNA 結合活性を障害する R397W 変異を導入したノックインマウスから単離した変異型 *Foxp3*⁺ T 細胞ではこの Treg 選択的 BATF 結合は見られなかったことから、BATF は *Foxp3* 依存的にこれらの領域に結合していると考えられた。一方、これら *Ccr4*、*Gcnt1*、*Itgb1* 周囲の Treg 選択的 BATF 結合領域における *Foxp3* の結合は *Batf*^{-/-}マウスから単離した Treg では見られなかったことから、*Foxp3* は BATF 依存的にこれらの領域に結合していると考えられた。さらに、これら *Ccr4*、*Gcnt1*、*Itgb1* 周囲に存在する *Foxp3* 及び BATF が相互依存的に結合する領域はエンハンサー領域と相関するとされる細胞特異的 DNaseI 高感受性領域(Treg 特異的 DNaseI 高感受性領域)、p300 結合領域と重複していた。以上の結果から、*Foxp3* 及び BATF が協調して Treg 特徴的高発現遺伝子である *Ccr4*、*Gcnt1*、*Itgb1* の転写を促進し、それら遺伝子によって発現制御される CCR4、E-selectin ligand、P-selectin ligand、Integrinβ1 の発現を制御する可能性が考えられた。

第五章では、*Foxp3* と BATF が協調して、CCR4、E-selectin ligand、P-selectin ligand、Integrinβ1 の発現を亢進するかを検証した。*Foxp3*-CD44^{low}CD62L^{high} ナイーブ T 細胞に *Foxp3* 単独、BATF 単独、*Foxp3* と BATF の両者をレトロウイルスにより強制発現させ、これらを放射線照射したマウスに移入した後、ドナーレトロウイルス強制発現 T 細胞の表現型を解析した。その結果、*Foxp3* と

BATF の両者を強制発現した群では対照群及び各因子単独強制発現群と比較して CCR4、E-selectin ligand、P-selectin ligand、Integrin β 1 の発現亢進がみられることを示した。このことから、Foxp3 と BATF が協調して CCR4、E-selectin ligand、P-selectin ligand、Integrin β 1 の発現上昇を誘導することが明らかとなった。

【総括と展望】

本研究では、Treg の非リンパ組織における恒常性維持機構として Foxp3 と BATF が協調して非リンパ組織への細胞移動に関わる Treg 特徴的高発現分子を亢進することを明らかにした。Treg が Tconv よりも非リンパ組織への細胞移動に関わる分子を高発現するという報告はこれまでにあるが、なぜ Treg がそれらの分子を高発現するかの分子基盤に迫った研究は本研究が初めてである。また、本研究では Foxp3 と BATF が協調して働く分子機構として、Foxp3 と BATF が相互依存的に転写開始点から遠位の 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た。細胞特異的 DNaseI 高感受性領域や p300 結合領域はエンハンサー領域と相関することが知られていることから、Foxp3 及び BATF が相互依存的にエンハンサー領域に結合することが示唆された。しかしながら、これらの領域が実際にエンハンサー活性を示すのかという点に関しては現時点では不明であり、今後検証すべき課題である。

本研究をもとに、Foxp3 及び BATF が協調して働く分子機構を更に解明することで、Treg の非リンパ組織における恒常性維持機構の詳細がより明らかになっていくと期待される。さらに、明らかになった知見をもとに、自己免疫疾患が生じる組織においては Treg の数を増加させることで過剰な免疫応答を抑制する、悪性腫瘍組織においては Treg の数を減少させることで腫瘍に対する免疫応答を亢進するという Treg の非リンパ組織における恒常性制御を介した疾患に対する新たな治療ストラテジーを提案できると考えている。