

【目的】 リンパ節に代表される二次リンパ組織は、免疫応答の起点として働く重要な「場」であり、二次リンパ組織形成の破綻は生命維持に重大な支障を来す。リンパ節形成は、胎生期においてリンパ球の一種である Lymphoid Tissue Inducer (LTi) 細胞によって開始される。近年、LTi 細胞は、自然免疫様の反応様式を備え、自然免疫系と獲得免疫系の橋渡しに寄与する自然リンパ球 (Innate Lymphoid Cell : ILC) の一種であると再定義された。実際、LTi 細胞は、ILC の共通前駆細胞より出現するとともに、その発生は ILC3 と同様に転写因子 ROR γ t に依存する。しかしながら、LTi 細胞は他の ILC 細胞集団とは発生の様式や機能が異なることも明らかになっており、どのような分子機構によって LTi 細胞と ILC の分岐がもたらされ、LTi 細胞の特徴が形成されるのかその実態は未だ未解明のままである。本研究では、転写因子と DNA 上の転写調節領域 (プロモーター、エンハンサー、サイレンサー) の相互作用によって誘導されるゲノム上のエピジェネティックな変化を捉えることで、LTi 細胞の分化に関わる分子機構を明らかにすることを目的とする。

【方法】 本研究ではまず、LTi 細胞を含む転写因子 ROR γ t 陽性細胞集団に対し ATAC-seq 解析を実施し、ゲノムワイドにオープンクロマチン領域を確認した。その結果より、LTi 細胞特異的なゲノム上のオープンクロマチン領域を同定し、LTi 分化のどの段階で当該領域がオープンになるか (活性化されるか) を確認した。さらに、オープンクロマチン領域を対象とした転写因子フットプリント解析を実施し、オープンクロマチン領域を制御する転写因子の候補を抽出した。加えて、CUT&RUN 法によって候補転写因子の当該オープンクロマチン領域への結合を確認した。また、候補転写因子の発現状況を確認し、転写因子欠損マウスを利用することで当該転写因子の役割を検討した。

【結果】 ATAC-seq 法によって得られたオープンクロマチン情報に対し、主成分分析によってオープンクロマチン領域のプロファイルの細胞種間類似度を求めたところ、LTi 細胞およびその前駆細胞は他の ROR γ t 陽性細胞集団とは異なるオープンクロマチンパターンを保有することが確認された。ゲノムワイドなオープンクロマチン領域の探索によって、ROR γ t をコードする遺伝子領域 (*Rorc*) に LTi 細胞特異的なオープンクロマチン領域が見出された。この領域は ROR γ t の発現が低い LTi 前駆細胞では認められず、ROR γ t を高発現する前駆細胞以降の分化段階において確認されることから、ROR γ t の発現を高発現化するためのエンハンサー領域と考えられた。本領域の塩基配列解析によって結合転写因子を予測したところ、複数の転写因子候補が抽出された。ATAC-seq データおよび転写因子結合配列情報を統合した転写因子フットプリント解析の結果、レチノイン酸受容体 (RAR:RXR)、転写因子 RUNX、芳香族炭化水素受容体 (AhR)、および転写因子 RUNX の結合配列へのタンパク質結合が予測され、これらが ROR γ t エンハンサーを活性化する転写因子の有力候補であると考えられた。実際、CUT&RUN 法によって当該領域への転写因子の結合を確認したところ、RUNX3 の結合が確認された。RUNX3 の発現は、転写因子 ROR γ t の発現に先立つ傾向が確認されたことから、ROR γ t の発現制御を介した LTi 細胞の分化制御における RUNX3 の関与が想定された。

RUNX3 と ROR γ t の発現に注目した LTi 細胞分化系列決定モデル

