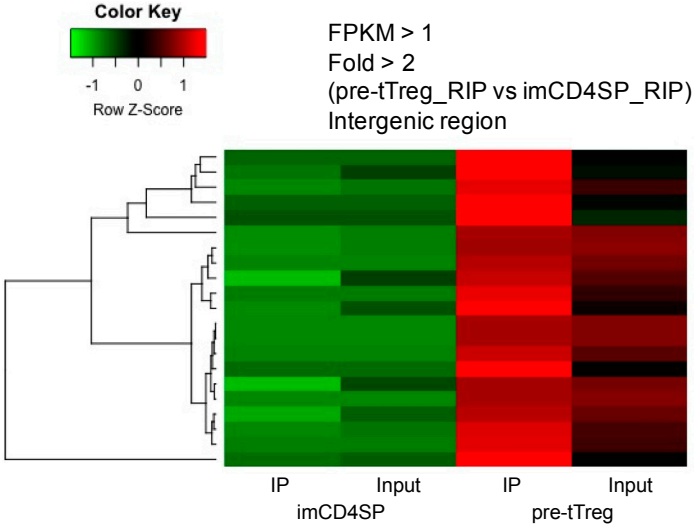
118　制御性T細胞の発生における長鎖非翻訳RNAの役割解明	市山　健司

【目的】制御性T細胞（Treg）は免疫自己寛容の確立・維持において重要な役割を担うことが知られており、その発生機構の解明が現在免疫学の重要研究課題のひとつとされている。これまでにTregの正常発生には胸腺Treg前駆細胞（pre-tTreg）におけるクロマチンリモデリング因子SATB1を介したTreg特異的なエピゲノム形成が必須であることが明らかとなっているが、そのエピゲノム形成においてSATB1がどのようにしてTreg特異性を獲得するのかその詳細な分子機構に関してはまだよく分かっていない。近年、長鎖非翻訳RNA（LncRNA）がクロマチンリモデリング因子のリクルート等の様々な作用機序を介して標的遺伝子の発現を制御することが明らかとなってきた。このことから、胸腺のpre-tTreg細胞において特異的に発現するLncRNAがSATB1を介したTreg特異的なエピゲノムの形成を制御する可能性が考えられる。そこで、本研究ではTregの胸腺における発生を制御する新規LncRNAの探索・同定およびその機能解明を目的とする。

【方法】pre-tTregで特異的に高発現し、かつ転写因子SATB1と結合するLncRNAを網羅的に探索するために次世代シークエンサーを用いてRNAシークエンスおよびRIPシークエンスを行い、候補因子を選出した。さらに、SATB1によるTreg特異的なエピゲノム形成に関与する共同因子を同定するため、既知のクロマチン再構成複合体の構成因子に焦点を絞り共免疫沈降法によりSATB1と相互作用する因子の探索を行った。

【結果】次世代シークエンサーを用いた網羅的な解析により、21個の新規LncRNAsをpre-tTreg特異的な機能性LncRNAの候補因子として選出した。さらに、胸腺細胞においてSATB1の結合因子として転写因子Xを新たに同定した。興味深いことに、RNase A処理をすることでSATB1と転写因子Xの結合が消失することからこれら因子の結合にはRNAが必須であることが明らかとなった。LncRNAはタンパク質複合体のスキャホールド因子として作用することが知られており、このことからSATB1は胸腺においてLncRNAを介して転写因子Xと複合体を形成する可能性が示唆された。

Treg 前駆細胞で発現が高く、SATB1 と結合する新規 LncRNAs のヒートマップ



118. 制御性 T 細胞の発生における長鎖非翻訳 RNA の役割解明

市山　健司

大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 実験免疫学

Key words：制御性 T 細胞，長鎖非翻訳 RNA，エピジェネティクス，転写因子，SATB1

緒　言

制御性T細胞（Treg）は免疫自己寛容の確立・維持において重要な役割を担うことが知られており、その発生機構および免疫抑制機構の解明が現在免疫学の重要研究課題のひとつとされている。

筆者らはこれまで転写因子Foxp3がTregのマスター制御遺伝子であること［1］、転写因子AML1/Runx1がFoxp3と転写複合体を形成し、Tregによる免疫抑制機構に重要な役割を担っていることなどを報告し［2］、この分野の開拓者として世界のTreg研究を先導してきた。特に最近ではTreg発生におけるエピジェネティクス制御機構に注目して精力的に研究を展開しており、胸腺におけるTregの正常発生にはクロマチンリモデリングタンパク質SATB1を介したTreg特異的なエピゲノム形成が必須であることを見出し、報告している［3］。しかしながらSATB1は様々な細胞でユビキタスに発現しているためどのようにしてTreg特異性を獲得するのかその詳細な分子機構に関してはまだ未知の部分が多く存在している。

近年、ヒトにおいてタンパク質をコードするDNA領域の割合が全ゲノムのたった2%であることが明らかとなって以降、non-coding RNA（ncRNA）と呼ばれるタンパク質をコードしないRNAが高い注目を集めるようになり、その機能解析が世界中で精力的に行われている。なかでも、Long non-coding RNA（LncRNA）は200塩基以上のncRNAであり、転写因子やクロマチンリモデリング因子のリクルート、タンパク複合体のscaffold （足場）など様々な作用機序を介して標的遺伝子の発現を制御することで極めて広範囲の高次生命現象に関わることが明らかになりつつある［4］。さらに最近では、癌やアルツハイマー病など様々な疾患でLncRNAの異常発現が観察されており、その関連性が指摘されていることから、新たなバイオマーカーや分子標的治療薬のターゲットとしても期待されている。免疫系、特にTh細胞分化においてもここ数年でLncRNAの役割に関する報告が増えてきている［5～7］。しかしながら、Tregの発生機構におけるLncRNAの役割に関してはまだ報告が無く、未知のままである。

そこで本研究では、Treg 発生に必須である SATB1 を介した Treg 特異的なエピゲノム形成に関与する新規 LncRNA を同定し、その役割を明らかにすることで LncRNA を標的とした Treg の人為的制御による新たな免疫応答制御法の基礎を確立することを目的とする。

方法および結果

これまでに SATB1 は胸腺において Treg 前駆細胞（pre-tTreg）で Treg 特異的なエピゲノムを形成することが明らかとなっている［3］。そこで、Treg 発生を制御する新規 LncRNA の同定およびその機能解明を目的として、まず pre-tTreg を含む各 Treg 分化過程における LncRNA の発現を次世代シークエンサーにより網羅的に解析した。具体的には、我々が独自に作製した Foxp3-GFP レポーターマウスを用いてその胸腺から $CD4^+CD8^+$（DP）細胞、$CD3e^+CD4^+CD8^-CD24^+CD25^-GFP^-$（imCD4SP）細胞、$CD3e^+CD4^+CD8^-CD24^+CD25^+GITR^+GFP^-$（pre-tTreg）細胞、$CD3e^+CD4^+CD8^-CD25^+GFP^+$（tTreg）細胞をそれぞれ 2×10^5 個まで FACS ソーティングで精製・回収した。その後、それぞれのサンプルから total RNA をカラムで抽出し、cDNA ライブラリーを作製後、次世代シークエンサーに供した。シークエンス後は、FDR が 0.05 以下、FPKM が 1 以上、ゲノム領域が intergenic、コントロールである DP 細胞および imCD4SP 細胞と比較して発現が 2 倍以上、の 4 条件でデータ解析を行った結果、pre-tTreg 細胞で高発現する LncRNA として 108 個の LncRNA を候補因子として選出した（図 1）。

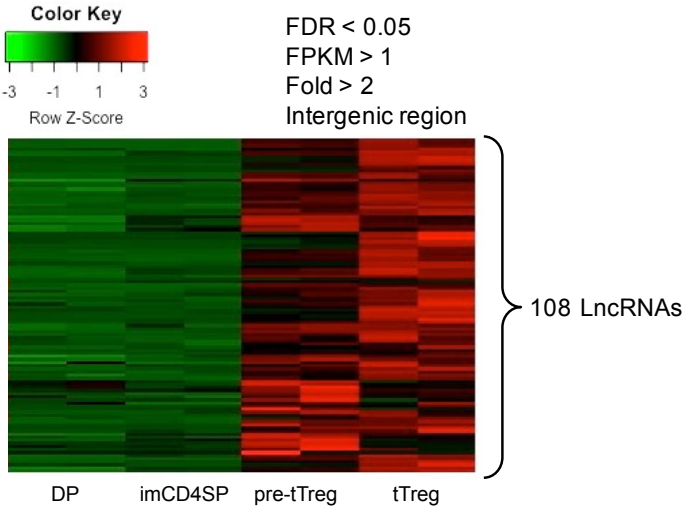


図 1. pre-tTreg で発現が高い新規 LncRNAs のヒートマップ
胸腺における各分化過程の細胞を用いて RNA シークエンスを行った。その後、①FDR が 0.05 以下、②FPKM が 1 以上、③ゲノム領域が intergenic 領域、④コントロールである DP および imCD4SP と比較して発現が 2 倍以上、の 4 条件で解析を行い、pre-tTreg で発現の高い 108 個の新規 LncRNAs を選出した。

次に、SATB1 を介した Treg 特異的なエピゲノム形成に関与する LncRNA をさらに絞り込むため、SATB1 を標的とした RIP（RNA immunoprecipitation）シークエンスを行うことで pre-tTreg 細胞で SATB1 と結合している LncRNA を網羅的に解析した。具体的には、Foxp3-GFP レポーターマウスの胸腺から pre-tTreg 細胞および imCD4SP 細胞を FACS ソーティングで精製・回収し、細胞を溶解した。その後、抗 IgG 抗体もしくは抗 SATB1 抗体で免疫沈降を行い、Trizol によって SATB1 と共に沈降してきた RNA を抽出することで SATB1 に結合する RNA を回収した。そして、cDNA ライブラリーを作製して次世代シークエンサーに供した。シークエンス後は、FPKM が 1 以上、ゲノム領域が intergenic 領域、コントロールである imCD4SP 細胞と比較して pre-tTreg 細胞の IP 後のサンプルで発現が 2 倍以上、RNA シークエンスで選出した pre-tTreg で発現が高い 108 個の LncRNAs に含まれる、の 4 条件でデータ解析を行った結果、興味深いことに 21 個の新規 LncRNAs を機能性の pre-tTreg 特異的 LncRNA の候補因子として選出した（図 2）。

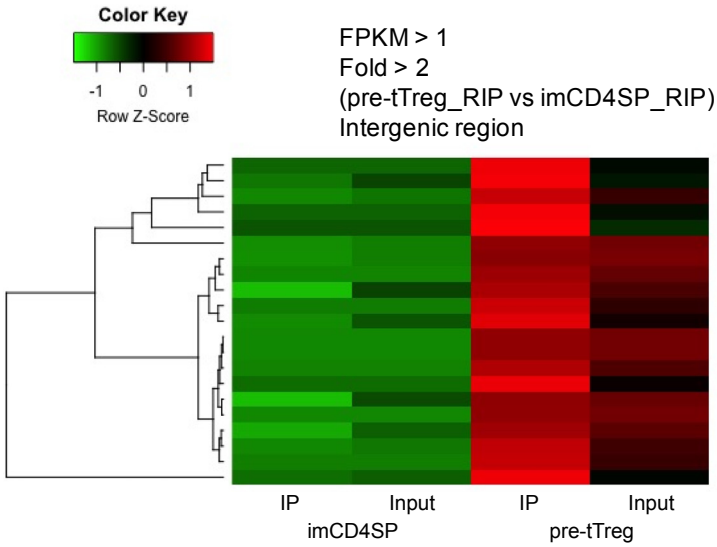


図 2. pre-tTreg で発現が高く、SATB1 と結合する新規 LncRNAs のヒートマップ

pre-tTreg 細胞および imCD4SP 細胞を用いて SATB1 を標的とした RIP シークエンスを行った。①FPKM が 1 以上、②ゲノム領域が intergenic 領域、③コントロールである imCD4SP 細胞と比較して pre-tTreg 細胞の IP 後のサンプルで発現が 2 倍以上、④RNA シークエンスで選出した pre-tTreg で発現が高い 108 個の LncRNAs に含まれる、の 4 条件で解析を行い、pre-tTreg で発現が高く、かつ SATB1 と結合する 21 個の新規 LncRNAs を選出した。

転写因子や修飾酵素など多くのタンパク質は他のタンパク質と相互作用し、複合体を形成することでその機能を果たすことが知られている。そこで、SATB1 による Treg 特異的なエピゲノム形成に関与する共同因子の同定を目的として既知のクロマチン再構成複合体の構成因子に焦点を絞り共免疫沈降法により SATB1 と相互作用する因子の探索を網羅的に行った。その結果、転写因子 X が SATB1 と CD4 陽性胸腺細胞において結合することを見出した（図 3）。さらに興味深いことに、RNase A 処理を行うことで SATB1 と転写因子 X の結合が消失することから、SATB1 は RNA を介して転写因子 X と複合体を形成することが示唆された（図 3）。

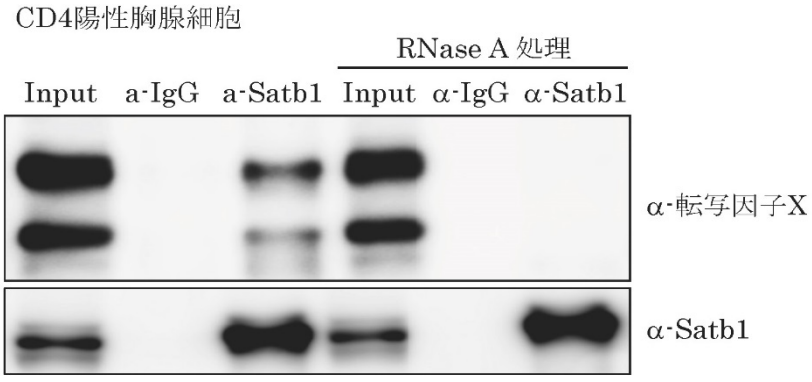


図 3. SATB1 は CD4 陽性胸腺細胞において RNA を介して転写因子 X と結合する

CD4 陽性胸腺細胞由来の細胞溶解液を RNase A 処理もしくはそのまま用いて SATB1 を標的とした免疫沈降を行い、その後に転写因子 X で検出を行なった。

考　察

本研究により pre-tTreg 細胞で発現が高く、かつ転写因子 SATB1 と結合する 21 個の新規 LncRNAs を Treg の発生機構に関与する機能的な LncRNA の候補因子として選出できた。さらに、胸腺細胞における SATB1 の結合因子としてクロマチン再構成複合体の構成因子の一つである転写因子 X を新たに同定し、その結合には RNA が必須であることが明らかとなった。LncRNA はタンパク質複合体のスキャホールド因子として作用することが知られているため、これまでの結果から SATB1 は pre-tTreg 細胞において LncRNA を介して転写因子 X とクロマチン再構成複合体を形成している可能性が示唆された。今後は、今回選出した 21 個全ての LncRNA に関してアンチセンスオリゴを用いたノックダウン実験を行うことで SATB1 と転写因子 X の結合に関与する LncRNA の同定を試み、さらには Treg の発生に及ぼすその役割についても検討を進めたいと考えている。

共同研究者

本研究は大阪大学免疫学フロンティア研究センター実験免疫学の坂口志文特任教授とともに行った研究である。

文　献

1) Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science. 2003 Feb 14;299(5609):1057-61. Epub 2003 Jan 9. DOI: 10.1126/science.1079490.
2) Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, Kitabayashi I, Nagamura Y, Nomura T, Miyachi Y, Tsukada T, Sakaguchi S. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. Nature. 2007 Apr 5;446(7136):685-9. Epub 2007 Mar 21. DOI: 10.1038/nature05673.
3) Kitagawa Y, Ohkura N, Kidani Y, Vandenbon A, Hirota K, Kawakami R, Yasuda K, Motooka D, Nakamura S, Kondo M, Taniuchi I, Kohwi-Shigematsu T, Sakaguchi S. Guidance of regulatory T cell development by Satb1-dependent super-enhancer establishment. Nat Immunol. 2017 Feb;18(2):173-183. doi: 10.1038/ni.3646. Epub 2016 Dec 19. Erratum in: Nat Immunol. 2017 Oct 18;18(11):1270. Erratum in: Nat Immunol. 2017 Mar 22;18(4):474.
4) Fatica A, Bozzoni I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. Nat Rev Genet. 2014 Jan;15(1):7-21. doi: 10.1038/nrg3606. Epub 2013 Dec 3. Review.
5) Collier SP, Collins PL, Williams CL, Boothby MR, Aune TM. Cutting edge: influence of Tmevpg1, a long intergenic noncoding RNA, on the expression of Ifng by Th1 cells. J Immunol. 2012 Sep 1;189(5):2084-8. doi: 10.4049/jimmunol.1200774. Epub 2012 Jul 30.
6) Huang W, Thomas B, Flynn RA, Gavzy SJ, Wu L, Kim SV, Hall JA, Miraldi ER, Ng CP, Rigo F, Meadows S, Montoya NR, Herrera NG, Domingos AI, Rastinejad F, Myers RM, Fuller-Pace FV, Bonneau R, Chang HY, Acuto O, Littman DR. DDX5 and its associated lncRNA Rmrp modulate TH17 cell effector functions. Nature. 2015 Dec 24;528(7583):517-22. doi: 10.1038/nature16193. Epub 2015 Dec 16. Erratum in: Nature. 2016 May 5;533(7601):130. Rigo, Frank W [Corrected to Rigo, Frank].
7) Ranzani V, Rossetti G, Panzeri I, Arrigoni A, Bonnal RJ, Curti S, Gruarin P, Provasi E, Sugliano E, Marconi M, De Francesco R, Geginat J, Bodega B, Abrignani S, Pagani M. The long intergenic noncoding RNA landscape of human lymphocytes highlights the regulation of T cell differentiation by linc-MAF-4. Nat Immunol. 2015 Mar;16(3):318-325. doi: 10.1038/ni.3093. Epub 2015 Jan 26.