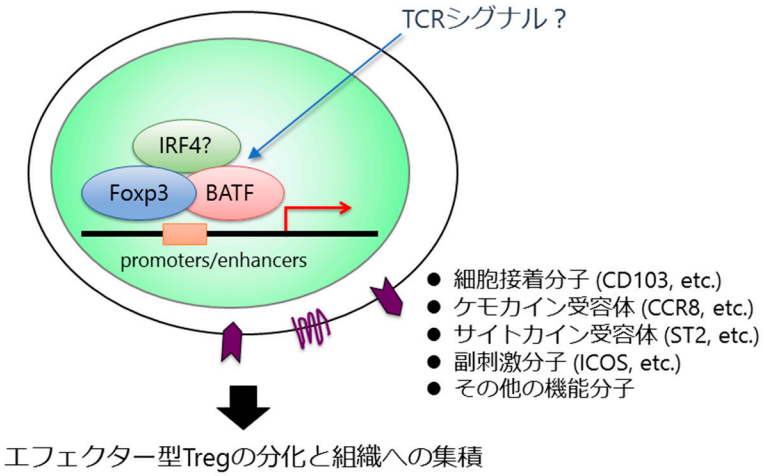
65　制御性T細胞による免疫恒常性維持機構の解明	堀　昌平

【目的】制御性 T 細胞（regulatory T cells : Treg）は免疫応答を抑制的に制御することで自己免疫寛容と免疫恒常性の維持に必須の役割を担っている。我々は、転写因子 Foxp3 が Treg 分化と機能を司るマスター転写因子として機能すること、転写因子 BATF が機能的に活性化した CD44^{high} CCR7^{low} エフェクター型 Treg への分化と非リンパ組織への集積に重要な役割を担うことを明らかにしてきた。本研究では、BATF による Treg 制御メカニズムの解明を目指した。
【方法】Treg における BATF の機能解析を行うために Treg 特異的 *BATF* 欠損マウスを作出し、病理組織学的解析、様々な組織から単離した CD4^{+}T 細胞サブセットの flow cytometory 解析、RNA-seq 法による遺伝子発現解析を行った。ゲノム上の BATF および Foxp3 結合領域は ChIP-seq 解析により同定した。Foxp3 と BATF の機能的協調を調べるために、*Batf* と *Foxp3* の二重変異マウスから単離した Treg にレトロウイルスベクターを用いて BATF、Foxp3 それぞれ単独または両者を遺伝子導入した。そして、遺伝子導入した細胞を放射線照射した Ly5.1 コンジェニックマウスに移入し、各組織への集積と表現型を flow cytometry により解析した。
【結果】Treg 特異的 *BATF* 欠損マウスは様々な臓器に激しい炎症を呈し、組織中 CD4^{+}T 細胞におけるエフェクター型 Treg の割合が著しく減少したことから、BATF はエフェクター型 Treg の分化と組織集積、Treg の炎症抑制機能に必須であることがわかった。BATF は Foxp3 と機能的に協調することで、エフェクター型 Treg 選択的に高発現する遺伝子の発現を正に制御し、エフェクター型 Treg 分化と組織集積を促進することが明らかになった。

BATF は Foxp3 と機能的に協調してエフェクター型 Treg の分化と組織への集積を制御する



65. 制御性 T 細胞による免疫恒常性維持機構の解明

堀　昌平

東京大学 大学院薬学系研究科 免疫・微生物学教室

Key words：自己免疫疾患，自己免疫寛容，制御性 T 細胞，遺伝子発現制御

緒　言

制御性 T 細胞（regulatory T cells : Treg）は免疫応答を抑制する機能に特化し、自己免疫寛容と免疫恒常性の維持に必須の役割を担っている。我々は、ヒト自己免疫疾患 IPEX 症候群の原因遺伝子として同定された転写因子 Foxp3 が Treg 選択的に発現してその発生・分化と機能を司る“マスター転写因子”として機能すること、機能的 Treg の欠損が *Foxp3* 欠損マウスに発症する致死的な自己免疫疾患の原因であることを明らかにしてきた［1, 2］。近年、Treg はリンパ節や脾臓といった 2 次リンパ組織のみならずほとんどの非リンパ組織にも存在し、組織環境に応じて遺伝子発現を変化させてその環境に適応して機能を発現することが明らかにされてきた［3］。しかしながら、Treg がどのようなメカニズムにより様々な組織環境に適応して機能するのか、その適応能力を制御する分子メカニズムは未だ不明である。

Treg は通常型 Foxp3- T 細胞（conventional T cells : Tconv）と同様に、2 次リンパ組織を巡回する $CD44^{low}CCR7^{high}$ ナイーブ型サブセットと、抗原刺激を受けて活性化した $CD44^{high}CCR7^{low}$ エフェクター型サブセットに大別され、非リンパ組織の Treg は専らエフェクター型 Treg によって構成されている。我々は、IPEX 患者において同定されている Foxp3 変異体を導入したノックインマウスを作製・解析する過程で、フォークヘッドドメインに見つかっている $Foxp3^{A384T}$ 変異（Ala384 の Thr への置換）が DNA 結合特異性を拡げる機能獲得型変異であり、エフェクター型 Treg の分化と非リンパ組織への集積が障害することで自己免疫疾患を惹起することを明らかにした。そして、このエフェクター型 Treg の障害の一因は $Foxp3^{A384T}$ 変異体による転写因子 BATF の発現抑制であることを明らかにした［4］。本研究は、この知見にたち、Treg における BATF の機能を明らかにし、BATF によるエフェクター型 Treg の分化と組織集積メカニズムを解明することを目指した。

方法および結果

1. Treg 特異的 *BATF* 欠損マウスはエフェクター型 Treg を欠き致死的な自己免疫疾患を発症する

Treg における BATF の役割を検討するために、Treg 特異的 *BATF* 欠損マウス（$Foxp3^{YFPCre/Y}.Batf^{flox}$ マウス、以下 cKO マウス）を作出した。cKO マウスは生後 8 週齢までに約半数が死亡し（図 1a）、皮膚、肺、肝臓、大腸などの組織において炎症細胞の浸潤を伴う激しい炎症を呈した（図 1b）。このとき各組織の $CD4^{+}$T 細胞中の $CCR7^{low}$ $Foxp3^{+}$エフェクター型 Treg、$CCR7^{low}$ $Foxp3^{-}$ エフェクター型 Tconv の割合を検討したところ、前者が著しく減少していたのに対し、後者は逆に顕著に増加していた（図 1c）。このことから BATF はエフェクター型 Treg への分化と組織への集積に重要な役割を担っており、生体内における Treg の炎症抑制機能に必須であることがわかった。

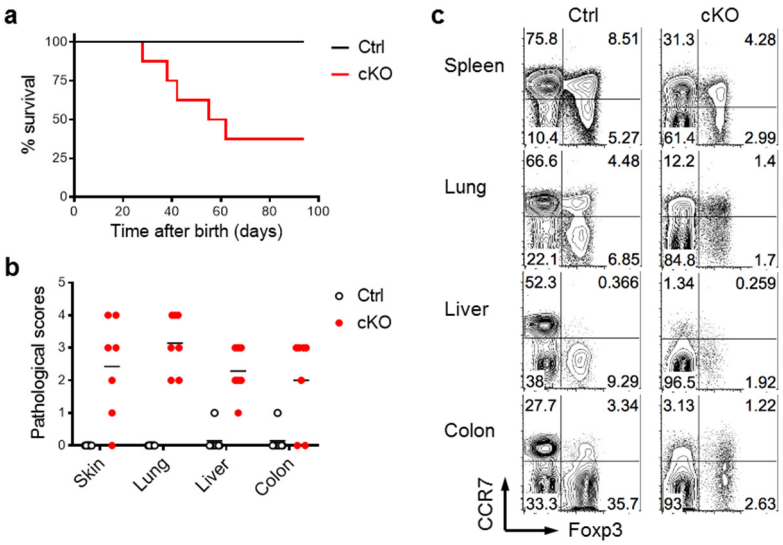


図 1. Treg 特異的 *BATF* 欠損マウスにおける自己免疫疾患の発症とエフェクター型 Treg の欠損

a）Treg 特異的 *BATF* 欠損マウス（cKO）及び野生型マウス（Ctrl）の生存曲線

b）皮膚、肺、肝臓、大腸の病理組織学的解析

c）脾臓、肺、肝臓、大腸 $CD4^+$ T 細胞における Foxp3 と CCR7 の発現

2. BATF はエフェクター型 Treg 選択的に高発現する遺伝子の発現を正に制御する

Treg において BATF がどのようにエフェクター型 Treg の分化と組織集積を制御するのかを明らかにするために、*Foxp3*$^{YFPCre/hCD2}$. *Batf*$^{flox/flox}$ マウスおよび *Foxp3*$^{YFPCre/hCD2}$. *Batf*$^{+/+}$マウスを交配により作出した。これら雌性の *Foxp3*$^{YFPCre/hCD2}$ マウスにおいては X 染色体不活化のために *Foxp3*^{YFPCre} アレルを発現する YFP^+ Treg と *Foxp3*^{hCD2} アレルを発現する $hCD2^+$ Treg の 2 つの Treg サブセットが共存し、*Foxp3*$^{YFPCre/hCD2}$. *Batf*^{flox} マウスにおいては BATF を欠損していない $hCD2^+$ Treg が存在するために自己免疫疾患を発症しない。これらのマウスから 4 つの Treg サブセットを単離し、RNA-seq 解析により網羅的遺伝子発現解析を行った（図 2a、b）。その結果、*BATF* 欠損（cKO）reg において 245 遺伝子の発現が低下し、29 遺伝子の発現が上昇していた。前者の 65.3%は Tconv と比べて Treg 選択的に高発現し、ほとんどがナイーブ型 Treg と比較してエフェクター型 Treg 選択的に高発現する遺伝子であった。これらはエフェクター型 Tconv においても高発現していたが、約半数はエフェクター型 Tconv よりもエフェクター型 Treg においてより発現が高かった。以上の結果から、BATF はエフェクター型 Treg とエフェクター型 Tconv 両者に共通して高発現する“エフェクター遺伝子”のみならず、エフェクター型 Treg 選択的に高発現する遺伝子の発現を正に制御することが示唆された。これら BATF によって制御されるエフェクター型 Treg 選択的遺伝子の中には、*Itgae*（細胞接着分子 CD103 をコード）、*Ccr8*（ケモカイン受容体 CCR8）、*Il1rl1*（サイトカイン受容体 ST2／IL33Ra）、*Icos*（副刺激分子 ICOS）、*Klrg1*（抑制性受容体 KLRG1）などが含まれていた。

次に、Treg および Tconv において BATF の ChIP-seq 解析を行い、ゲノム上の BATF 結合領域を比較した。その結果、全 BATF 結合領域のうち 18.6%が Treg 選択的に結合する領域であった（図 3a）。そしてこれら Treg 選択的 BATF 結合領域近傍に存在する遺伝子の Gene Ontology 解析を行ったところ、Foxp3 の標的遺伝子が多く含まれることが分かった。実際、Treg 選択的 BATF 結合領域の約半数に Foxp3 も結合していた（図 3b）。これら Treg 選択的 BATF 結合領域の近傍にはエフェクター型 Treg 選択的に高発現する遺伝子（*Ccr8* など）が多く含まれており、それらの遺伝子近傍の Treg 選択的 BATF 結合領域には、特にエフェクター型 Treg 選択的に Foxp3 が結合していた（図 3c）。以上の結果から、BATF は Foxp3 と機能的に協調することによりエフェクター型 Treg 選択的遺伝子の発現を制御する可能性が考えられた。

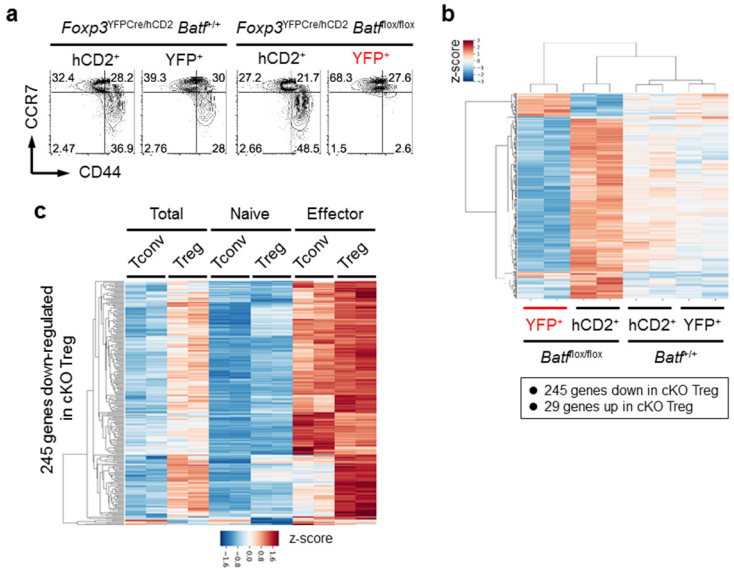


図 2. *BATF* 欠損 Treg の遺伝子発現解析

a) *Foxp3* $^{YFPCre/hCD2}$. *Batf* $^{flox/flox}$ マウス及び *Foxp3* $^{YFPCre/hCD2}$. *Batf* $^{+/+}$ マウス脾臓 CD4$^+$ T 細胞中の YFP$^+$および hCD2$^+$ Treg サブセットにおける CD44 と CCR7 の発現。*Foxp3* $^{YFPCre/hCD2}$. *Batf* $^{flox/flox}$ マウスの YFP$^+$ Treg（すなわち *BATF* 欠損 Treg：cKO Treg）は CD44^{high} CCR7^{low} エフェクター型 Treg を欠くことがわかる。

b) Treg サブセットの RNA-seq 解析。4 つの Treg サブセット間で発現差のある遺伝子について階層的クラスタリングを行った。

c) cKO Treg で発現が低下する 249 遺伝子について、Tconv、Treg、naïve Tconv、naïve Treg,、effector Tconv、effector Treg における発現レベルをヒートマップで表示した。

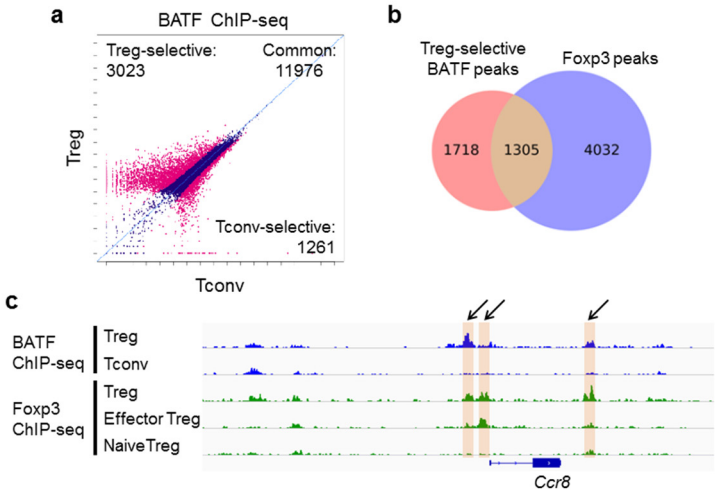


図 3. Treg 選択的 BATF 結合領域への Foxp3 の結合

a) Treg および Tconv における BATF の ChIP-seq 解析。両者で同程度に BATF が結合する領域（“common”）に加え、Treg 選択的（“Treg-selective”）および Tconv 選択的（“Tconv-selective”）に BATF が結合する領域が存在する。

b) Treg 選択的 BATF 結合領域と Foxp3 結合領域の重なり。

c) *Ccr8* 遺伝子における BATF と Foxp3 の共局在。Treg 選択的 BATF 結合領域を矢印で示す。特にエフェクター型 Treg において、この領域に Foxp3 も結合していることがわかる。

3. BATF は Foxp3 と機能的に協調してエフェクター型 Treg 分化と組織集積を促進する

以上の結果から、BATF のみならず Foxp3 もエフェクター型 Treg の分化と組織への集積に重要である可能性が考えられた。この可能性を検証するために、Foxp3 の DNA 結合活性を欠失させる amorphic 変異である Foxp3^{R397W} 変異を導入したノックインマウスを解析したところ、この Foxp3 変異マウスもエフェクター型 Treg を欠いていた（図 4a）。

最後に、BATF が Foxp3 と機能的に協調してエフェクター型 Treg 分化や組織への集積を制御する可能性を検証した。このために *Foxp3*^{R397W}. *Batf*$^{-/-}$マウスを交配により作出し、その Treg にレトロウイルスベクターを用いて BATF と Foxp3 それぞれ単独あるいは両者を導入後、Ly5.1 コンジェニックマウスに移入した（図 4b）。Foxp3 のみの導入では各臓器におけるドナーCD4^{+}T 細胞の割合は変化しないものの、BATF の導入によりその割合が増加すること、Foxp3 と BATF 両者の導入によりさらに増加することがわかった（図 4c）。そして、ドナーCD4^{+}T 細胞の増加と相関して、BATF 導入により細胞増殖を伴う CCR7^{low} エフェクター型 Treg の割合が増加し、Foxp3 と BATF 両者の導入によりさらにその割合が増加した（図 4d）。またこのとき、Foxp3 と BATF 両者の導入により CCR8、ST2、ICOS などエフェクター型 Treg 選択的に高発現する分子の発現が誘導された。以上の結果から、BATF は Foxp3 と機能的に協調することでエフェクター型 Treg の分化と組織集積を促進することが明らかになった。

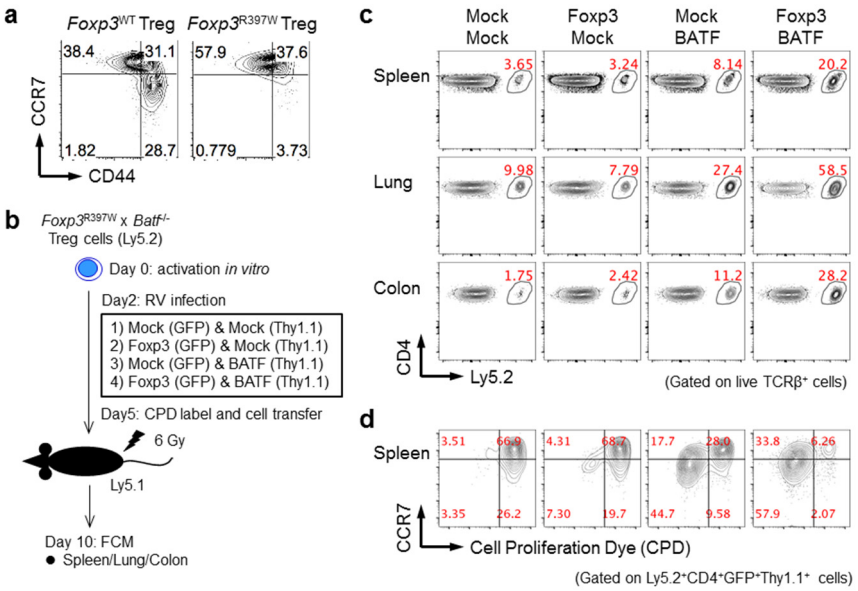


図 4. BATF は Foxp3 と協調的にエフェクター型 Treg の分化と組織への集積を制御する

a）Foxp3^{R397W} 変異体を発現する Treg は CD44^{high} CCR7^{low} エフェクター型 Treg を欠く。

b）c、d に結果を示す実験の概略図：*Foxp3*^{R397W} x *Batf*$^{-/-}$（Ly5.2）マウスから単離した Treg に Foxp3 または BATF をそれぞれ単独もしくは両者を強制発現させた。Foxp3 は GFP をレポーターとして発現するレトロウイルスベクター、BATF は Thy1.1 をレポーターとして発現するレトロウイルスベクターで発現させた。対照群としてレポーターのみを発現するウイルスを感染させた細胞を用いた（Mock／Mock）。細胞増殖色素（Cell Proliferation Dye：CPD）で標識した後、X 線照射（6 Gy）した Ly5.1 マウスに細胞を移入し、5 日後に脾臓、肺、大腸から細胞を単離して flow cytometry（FCM）解析を行って Ly5.2 ドナーCD4^{+}T 細胞の割合と表現型を解析した。

c）脾臓、肺、大腸における Ly5.2 ドナーCD4^{+}T 細胞の割合。対照群（Mock／Mock）と比較して、Foxp3 単独導入群（Foxp3／Mock）ではドナーCD4^{+}T 細胞の割合が変わらないのに対し、BATF 単独導入群（Mock／BATF）ではその割合が増加し、Foxp3 と BATF 両者を発現させた群（Foxp3／BATF）ではその割合が BATF 単独群よりもさらに増加した。

d）脾臓ドナーCD4^{+}T 細胞における細胞増殖色素（CPD）の希釈と CCR7 発現。細胞が増殖すると CPD が娘細胞に分配されてゆくので蛍光強度が低くなる。BATF 単独導入により増殖した CPD^{low} CCR7^{low} エフェクター型 Treg の割合が増加し、Foxp3 と BATF 両者によりその割合がさらに増加した。

考　察

本研究により、BATF はエフェクター型 Treg への分化と組織への集積、そして生体内における Treg の炎症抑制機能に必須の役割を担っていることが明らかになった。BATF は Th サブセットや細胞障害性 T 細胞といったエフェクター T 細胞分化の制御に必須であることが明らかにされているが、Treg においては Foxp3 と機能的に協調することによりエフェクター分化と組織への集積が BATF 単独の作用よりも相乗的に促進された。このことは、BATF と Foxp3 の機能的協調により組織環境においてエフェクター型 Treg がエフェクター型 Tconv よりも競合優位性を得ており、この仕組みによりエフェクター型 Treg がエフェクター型 Tconv による炎症応答を抑制しているという可能性を示唆している。このことは、BATF と Foxp3 の機能的協調作用を人為的に強化または阻害することで、エフェクター型 Treg とエフェクター型 Tconv のバランスを操作することができる可能性を示唆している。両者の機能的協調のメカニズムの詳細を明らかにすることで、自己免疫疾患やアレルギーなどの病的免疫応答を抑制し、がん免疫を強化するための新しい治療法の開発につながることが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院薬学系研究科免疫・微生物学教室の村上龍一助教、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ユニット（研究当時）の宮尾貴久テクニカルスタッフ、早津徳人研究員である。

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. PMID: 12522256 DOI: 10.1126/science.1079490
2) Komatsu N, Hori S. Full restoration of peripheral Foxp3+ regulatory T cell pool by radioresistant host cells in scurfy bone marrow chimeras. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 May 22;104(21):8959-64. Epub 2007 May 9. PMID: 17494743 DOI: 10.1073/pnas.0702004104
3) Panduro M, Benoist C, Mathis D. Tissue Tregs. Annu Rev Immunol. 2016 May 20; 34:609-33. PMID: 27168246 DOI: 10.1146/annurev-immunol-032712-095948
4) Hayatsu N, Miyao T, Tachibana M, Murakami R, Kimura A, Kato T, Kawakami E, Endo TA, Setoguchi R, Watarai H, Nishikawa T, Yasuda T, Yoshida H, and Hori S. Analyses of a Mutant Foxp3 Allele Reveal BATF as a Critical Transcription Factor in the Differentiation and Accumulation of Tissue Regulatory T Cells. Immunity. 2017 Aug 15;47(2):268-283.e9. Epub 2017 Aug 1. PMID: 28778586 DOI: 10.1016/j.immuni.2017.07.008