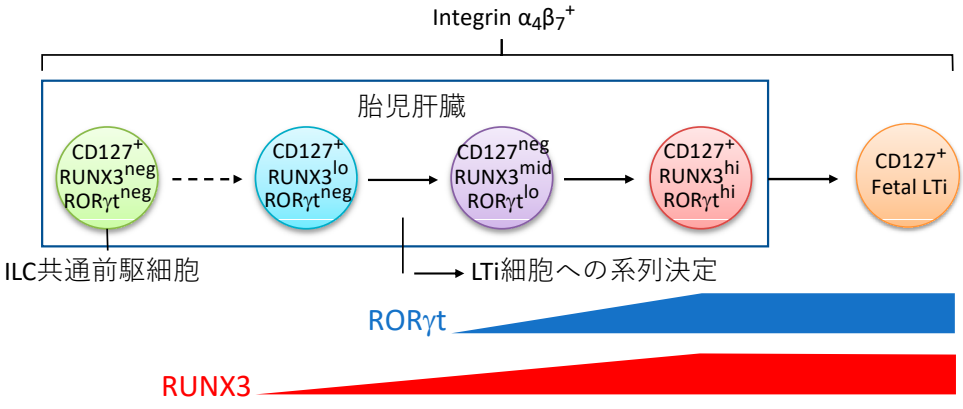
34　LTi細胞への系列決定を規定する細胞内分子機構の解明	香城　諭

【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 RORγt 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 RORγt 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 RORγt 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、RORγt 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 RORγt の発現が低い LTi 前駆細胞では認められず、RORγt 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、RORγt 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 RORγt 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 RORγt の発現に先立つ傾向が確認されたことから、RORγt 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 RORγt の発現に注目した LTi 細胞分化系列決定モデル



34. LTi 細胞への系列決定を規定する細胞内分子機構の解明

香城　諭

*九州大学 生体防御医学研究所 附属システム免疫学統合研究センター 粘膜防御学分野

Key words：LTi 細胞，ATAC-seq，転写因子フットプリント解析，エンハンサー，RUNX3

緒　言

免疫系は、自己と非自己を識別し、病原性微生物や悪性新生物より身体を守る高次の生体防御システムである。哺乳類では、分子パターンの認識を基盤とし生体防御の初期応答を担う自然免疫系に加え、抗原受容体遺伝子の再構成を伴う多様性に基づいた獲得免疫系が高度に発達しており、自然免疫系と獲得免疫系の両者の協調作用が効果的な生体防御に必要であることは広く知られている［1］。

自然免疫系と獲得免疫系の相互作用の場として、リンパ節に代表される二次リンパ組織が極めて重要であり、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。リンパ節は、胎生期のリンパ組織原基において、リンパ球の一種である Lymphoid Tissue Inducer（LTi）細胞が Lymphoid Tissue Organizer（LTo）細胞と呼ばれる間葉系ストローマ細胞に出会うことによって開始される［2］。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［3］。実際、LTi 細胞は、ILC の共通前駆細胞より出現するとともに［4］、その発生は ILC のサブタイプの一つである ILC3 と同様に転写因子 RORγt に依存する［5］。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。

転写因子は、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）との相互作用を介して遺伝子発現を制御し、細胞の分化や性質を規定する役割を担っている［6］。複数の転写因子が協調的、あるいは拮抗的に働き、最終的に遺伝子発現を通して細胞の状態を形作る。本研究では、転写因子と DNA 上の転写調節領域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主たる目的とする。

方法および結果

1. ATAC-seq による、オープンクロマチン領域プロファイル解析

LTi 細胞のオープンクロマチン領域を確認するために、胎児腸管より CD127 陽性インテグリン $\alpha_4\beta_7$ 陽性 RORγt 陽性の LTi 細胞を分離し、ATAC-seq 法にて NGS ライブラリを作製し解析した。また、RORγt-EGFP レポーターマウスを利用し解析した結果、胎児肝臓には CD127 陰性 $\text{ROR}\gamma\text{t}^{\text{lo}}$ と CD127 陽性 $\text{ROR}\gamma\text{t}^{\text{hi}}$ のポピュレーションが存在することを確認し、これらを LTi 前駆細胞と仮定し解析に供した。加えて、LTi 系列に対する比較対照細胞として、胎児肝臓内の未熟な ILC/LTi 共通前駆細胞集団である Common helper-like ILC progenitors（ChILP）（RORγt 陰性）、また LTi 以外の RORγt 陽性の細胞集団として ILC3、Th17 細胞、γδ17 細胞、胸腺 DP 細胞等も解析に供した。これらのサンプルより得られた有意 ATAC-seq ピークの集合をリファレンスとし、各々の細胞集団の持つピークプロファイルを数値化し主成分分析（Principal component analysis：PCA）を実施した。その結果、胎児期に出現する LTi 細胞は他の細胞集団とは異なる主成分を保有することが明らかとなった（図 1）。また、LTi 細胞は、成体に存在する ILC3 や LTi 様細胞（LTi-like）とも異なるオープンクロマチンプロファイルを保有することも明らかとなり、類似した

*現在の所属：金沢大学 医薬保険研究域医学系 幹細胞免疫制御学分野

細胞と考えられたこれらの細胞群とも異なる系列であることが示唆された。さらに、共通前駆細胞から RORγt^{lo}、そして RORγt^{hi} と徐々に LTi 細胞のプロファイルに近づく傾向が確認され、胎児肝臓に存在するこれらの RORγt 陽性細胞が LTi 前駆細胞である可能性は高いと考えられた。

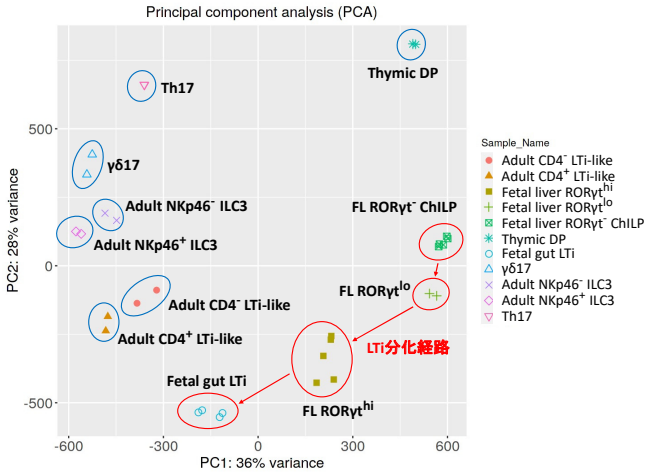


図 1. オープンクロマチンプロファイルを用いた主成分分析結果

ATAC-seq データより、各サンプルのオープンクロマチンプロファイルを算出し、主成分分析によってサンプル間の類似度を確認した。胎児期に出現する LTi 細胞は、他の細胞群とは異なる固有のオープンクロマチンプロファイルを保有することが確認された。また、共通前駆細胞（FL RORγt^{-} ChILP）から LTi 細胞へと徐々に類似度が高まることが確認され、LTi 細胞の分化経路を示していることが示唆された（赤矢印）。

2. *Rorc* 遺伝子領域に出現する LTi 細胞特異的エンハンサー

1. にて取得した ATAC-seq データより、LTi 細胞に特異的なオープンクロマチン領域を探索した。k-means 法を用いたクラスター分析によって有意な ATAC ピークを分類した結果、胎児期の LTi 系列細胞群（LTi 前駆細胞、LTi 細胞）において特異的にオープンとなる領域を確認できた（Cluster F、図 2a）。このクラスターに含まれる遺伝子領域を確認した結果、RORγt をコードする *Rorc* 遺伝子領域において、胎児肝臓の RORγt^{hi} の LTi 前駆細胞と成熟 LTi 細胞にて特異的にクロマチンがオープンとなる領域が見出された。この領域を LTi 細胞特異的な RORγt エンハンサー候補領域と考え、*Rorc* Peak1 と命名した（図 2b）。我々は既に、RORγt 発現に関与するエンハンサー領域を同定し報告している［7］。今回の ATAC-seq 解析においても本エンハンサー領域はオープンクロマチン領域として同定され、これを *Rorc* Peak2 と定義した。

3. *Rorc* Peak1 領域における結合転写因子の探索

Rorc Peak1 領域の DNA 塩基配列より、転写因子結合モチーフの探索を実施した。その結果、複数の転写因子結合モチーフが見出された。転写因子結合モチーフの存在は必ずしも転写因子の結合を規定するものではないため、当該転写因子結合モチーフへの転写因子結合を推定するために、ATAC-seq データより転写因子フットプリント解析を実施した。フットプリント解析の結果、レチノイン酸受容体（RAR:RXR）、芳香族炭化水素受容体（AhR）の核内受容体、そして転写因子 RUNX の結合配列における転写因子フットプリントの存在が確認された（図 3a）。さらに、CUT&RUN 法を用いて LTi 細胞における候補転写因子の結合を確認した結果、*Rorc* Peak 領域における RUNX3 タンパク質の結合が確認され、RORγt の発現制御における RUNX3 の関与が考えられた（図 3b）。胎児肝臓における RUNX3 と RORγt の発現をレポーターマウスにて確認すると、この二つの転写因子の発現には相関性が見出された。発現パターンを詳細に解析すると、RORγt の発現に先立ち RUNX3 が発現する傾向が確認された（図 3c）。

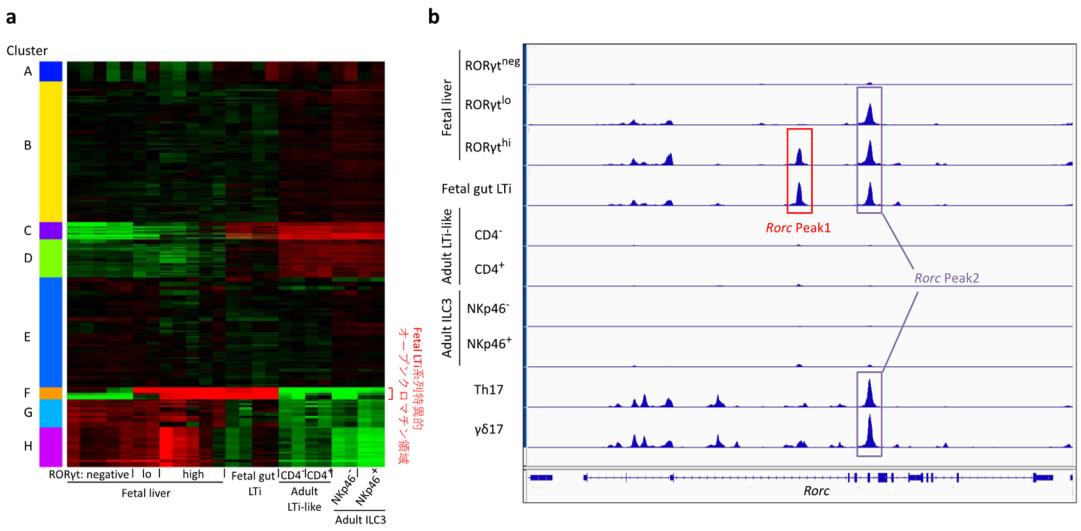


図 2. LTi 細胞特異的オープンクロマチン領域

a) k-means 法によるクラスター分析結果。クラスターF が LTi 系列細胞群において特異的にオープンとなる遺伝子領域を示す。

b) LTi 系列細胞特異的オープンクロマチン領域を含む *Rorc* 遺伝子領域の ATAC ピーク。*Rorc* Peak1 が RORγt^{hi} 以降の分化段階においてオープンとなる。

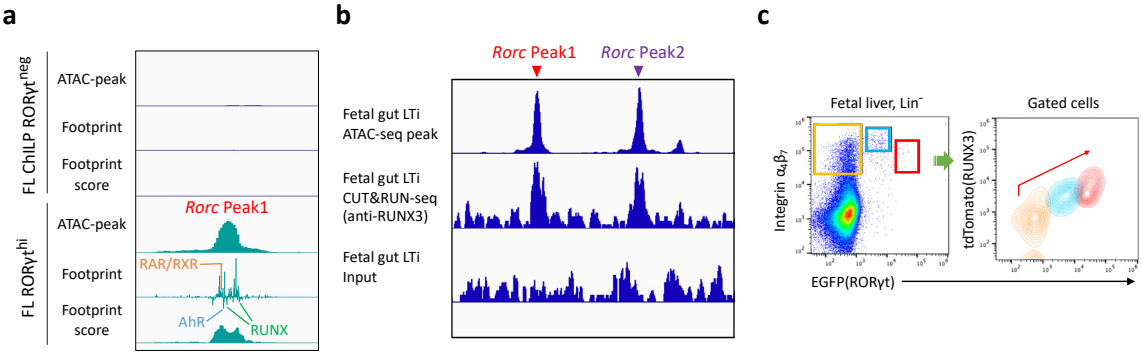


図 3. 転写因子フットプリント解析による *Rorc* Peak1 結合転写因子の探索

a) 転写因子フットプリント解析結果。フットプリントは、Tn5 トランスポザーゼによる DNA 切断効率の低い領域として示される。切断効率が低い領域は、転写因子の結合によって Tn5 による DNA 切断から保護されていたと考えられる。クロマチンアクセシビリティの程度とフットプリントの結果から、活性が高いと考えられる領域をフットプリントスコアとして示した。

b) LTi 細胞における、抗 RUNX3 抗体を用いた CUT&RUN 実施結果。ATAC-seq ピークに一致する位置に RUNX3 の結合が確認された。

c) レポーターマウスを用いた RORγt と RUNX3 の発現解析結果。RORγt と RUNX3 の発現には相関性があると考えられた。また、RORγt の発現に先立ち RUNX3 が発現する傾向が確認された。

4. RORγt 発現における RORγt の関与

3. にて実施した転写因子結合モチーフ探索およびフットプリント解析を *Rorc* Peak2 へ適用した結果、*Rorc* Peak2 内に転写因子集積を認める RORγt 結合モチーフを確認した（図 4a）。RORγt 自身が RORγt の発現を制御する可能

性を考え、RORγtを欠損するRORγtレポーターマウスを交配作製し解析した（図4b）。RORγtを欠損したマウスにおいてもRORγt-EGFP^{lo}の細胞集団は確認された。一方、RORγtの欠損によりRORγt-EGFP^{hi}の細胞集団は消失した。この結果は、RORγt^{lo}からRORγt^{hi}に移行する段階でRORγtが関与している可能性を示すと考えられた。

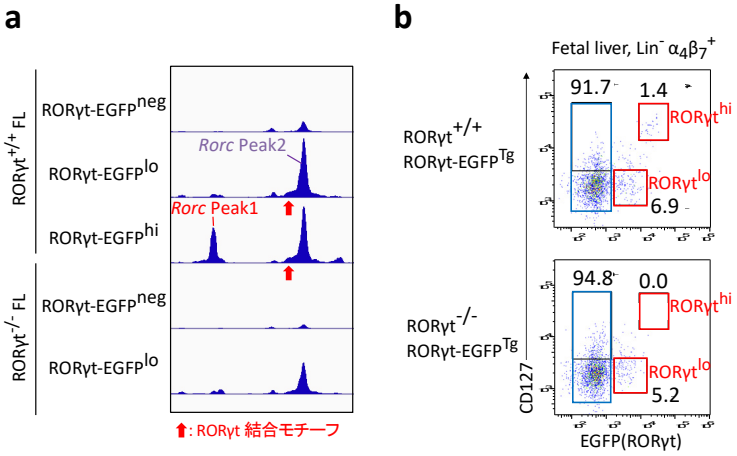


図4. RORγtによるRORγtの発現制御

a) *Rorc* Peak2における転写因子フットプリント解析結果。*Rorc* Peak2においてRORγt結合モチーフが確認され、フットプリント解析の結果当該モチーフへの転写因子結合が示唆された。

b) RORγt欠損マウスにおけるRORγtレポーターの発現確認。RORγtを欠損するマウスでは、ChILPにおいてRORγtレポーターhighのポピュレーションを欠損する。これは、RORγtによるRORγt発現上昇の機構が失われた結果を示している可能性がある。

考　察

リンパ節形成において重要な役割を果たすLTi細胞については、その分化に関わる細胞内分子機構は十分に解明されたとは言い難い状況にある。本研究では、オープンクロマチン領域を同定するATAC-seq法を基盤としてLTi細胞の分化を規定する分子機構の解明を試みた。本研究の結果、LTi細胞は他のRORγt陽性細胞集団とは異なる固有のオープンクロマチンプロファイルを保有することが明らかとなった。また、*Rorc*遺伝子領域にLTi細胞特異的エンハンサーが存在することが示唆され、エンハンサー候補領域へのRUNX3の結合も確認されたことから、RUNX3とこのエンハンサー領域の相互作用を介して転写因子RORγtの発現が制御され、その結果LTi細胞の分化が誘導される可能性がある。我々は既に、転写因子RUNXと複合体を形成するCBFβ2分子がLTi細胞の分化に関わることを報告している［7］。さらに最近、RUNX3のリプレッサー活性を高める変異を導入したマウスを作製することによってLTiが消失することを確認した（Kojo S et al., unpublished information）。これらの情報からRUNX3がLTi細胞の分化に関わっており、その機構として、LTi細胞に存在するエンハンサー領域を介してRORγtの発現制御に寄与している可能性があると考えられた。

本研究において、LTi細胞の保有するオープンクロマチンプロファイルは、類似した細胞集団と考えられる成体のILC3やLTi様細胞とは異なることが見出された。この結果は、LTi細胞が胎生期においてのみ分化誘導されるとの解釈も可能であり、胎生期、特に胎児肝臓内の環境因子がLTi細胞の分化や性質を規定するうえで重要である可能性も考えられる。現時点では、本研究で見出したエンハンサー領域・転写因子結合モチーフの重要性については依然として不明である。LTi細胞分化の更なる分子機構の解明により、転写因子活性化の上流因子としての環境因子の役割なども明

らかになる可能性がある。これらをより詳細に解明するために、まずは今後エンハンサー領域欠損・変異導入マウスの作製等による更なる詳細解析が求められる。

共同研究者・謝辞

本研究は、九州大学成体防御医学研究所粘膜防御学分野の澤新一郎教授、大学院生の福井卓磨さんのサポートのもと実施させて頂きました。また、共同研究者として、理化学研究所生命医科学研究センター免疫転写制御研究チームの谷内一郎博士にはマウスの提供など様々な形でご協力頂きました。最後に、本研究の遂行にあたり多大なご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深謝申し上げます。

文　献

1） Taniguchi M, Harada M, Kojo S, Nakayama T, Wakao H. The regulatory role of Vα14 NKT cells in innate and acquired immune response. Annu Rev Immunol. 2003;21:483-513. Epub 2001 Dec 19. PMID: 12543936 DOI: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141057

2） van de Pavert SA, Mebius RE. New insights into the development of lymphoid tissues. Nat Rev Immunol. 2010 Sep;10(9):664-74. Epub 2010 Aug 13. PMID: 20706277 DOI: 10.1038/nri2832

3） Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, Koyasu S, Locksley RM, McKenzie AN, Mebius RE, Powrie F, Vivier E. Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. Nat Rev Immunol. 2013 Feb;13(2):145-9. PMID: 23348417 DOI: 10.1038/nri3365

4） Constantinides MG, McDonald BD, Verhoef PA, Bendelac A. A committed precursor to innate lymphoid cells. Nature. 2014 Apr 17;508(7496):397-401. Epub 2014 Feb 9. PMID: 24509713 DOI: 10.1038/nature13047

5） Eberl G, Marmon S, Sunshine MJ, Rennert PD, Choi Y, Littman DR. An essential function for the nuclear receptor RORγt in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. Nat Immunol. 2004 Jan;5(1):64-73. Epub 2003 Dec 21. PMID: 14691482 DOI: 10.1038/ni1022.

6） Riethoven JJ. Regulatory regions in DNA: promoters, enhancers, silencers, and insulators. Methods Mol Biol. 2010;674:33-42. PMID: 20827584 DOI: 10.1007/978-1-60761-854-6_3

7） Tenno M, Kojo S, Lawir DF, Hess I, Shiroguchi K, Ebihara T, Endo TA, Muroi S, Satoh R, Kawamoto H, Boehm T, Taniuchi I. Cbfβ2 controls differentiation of and confers homing capacity to prethymic progenitors. J Exp Med. 2018 Feb 5;215(2):595-610. Epub 2018 Jan 17. PMID: 29343500 DOI: 10.1084/jem.20171221.