

Foxp3 変異体の機能解析から明らかになった、 制御性T細胞における転写因子BATFの重要な役割

堀 昌平

1. はじめに

免疫系には免疫応答を抑制する機能を持った制御性T細胞 (regulatory T cell: Treg) と呼ばれるT細胞サブセットが存在し、自己免疫、炎症、アレルギーといった病的な免疫応答を負に制御して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¹⁾。2001年に *scurfy* 変異マウスおよびヒト IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) 症候群患者に発症する致死的な自己免疫疾患の原因遺伝子 *Foxp3* が同定され、フォークヘッドファミリーに属する転写因子 Foxp3 をコードすることが報告された^{2,3)}。そして、Foxp3 が Treg 選択的に発現してその発生・分化と機能を制御する“マスター転写因子”として機能すること、*scurfy* マウスに発症する致死的な自己免疫疾患は機能的な Treg の欠損に起因することが報告され^{4,5)}、永年不明であった Treg 分化と機能の分子基盤とともに、自己免疫寛容と免疫恒常性の維持における Treg の中心的な役割が明らかにされた。

Foxp3 の発見を契機として Treg 分化と機能の分子機構に関する研究が飛躍的に進んできた。そして、Foxp3 は Treg の遺伝子発現制御ネットワークにおけるハブであり、数千に及ぶゲノム領域に結合し⁶⁾、300 を超えるパートナータンパク質と複合体を形成することが明らかにされた⁷⁾。しかしながら、Foxp3 の標的遺伝子は多数あるために、どの標的遺伝子が Treg のどのような性質を制御しているのかという問題については十分に理解されてこなかった。そこで筆者らは、IPEX 症候群において同定されている Foxp3 変異のなかに特定の標的遺伝子の発現に影響を与えて Treg

の分化・機能を障害する変異があるのではないかと考え、DNA との相互作用に影響を与えると考えられる変異に着目し、それらが Treg の分化・機能に与える影響を個体レベルで解析した。本稿では、一つのユニークな変異体の解析から明らかにされた、Treg における転写因子 BATF の重要な役割について解説する⁸⁾。

2. Foxp3 変異体の機能解析

これまでに IPEX 症候群において 70 以上の Foxp3 変異体が同定され、なかでも DNA と転写因子 NFAT との相互作用を担うフォークヘッドドメインに多くのミスセンス変異が見つかった³⁾。筆者らはこれらのうち DNA との相互作用に影響を与え得る三つの変異 (Ile363 が Val に置換した Foxp3^{I363V} 変異, Ala384 が Thr に置換した Foxp3^{A384T} 変異, Arg397 が Trp に置換した Foxp3^{R397W} 変異) に着目して機能解析を進めた。Foxp3-NFAT-DNA 複合体の結晶構造解析から Arg397 と Ile363 は DNA 骨格との相互作用に関与すると考えられており⁹⁾、実際筆者らは Foxp3^{I363V} 変異と Foxp3^{R397W} 変異により Foxp3 の DNA 結合活性が塩基配列非依存的に障害されることを見いだした⁸⁾。一方、Ala384 は DNA の主溝にドッキングして塩基認識に関わる α ヘリックス上に位置することから、Foxp3 の DNA 結合特異性に関わると予想された。筆者らは、Foxp3^{A384T} 変異により Foxp3 が認識する塩基配列が変化して特定の標的遺伝子との相互作用が選択的に影響を受けるのではないかと考えた。

この仮説を検証するために、まず野生型 (WT) または変異型 Foxp3 をマウスナイーブT細胞に強制発現させ、マイクロアレイ解析により遺伝子発現プロファイルを調べた。その結果、Foxp3^{R397W} 変異体を導入した細胞は対照細胞と同一の遺伝子発現パターンを示したのに対し、Foxp3^{A384T} 変異体を導入した細胞は WT Foxp3 を導入した細胞と近い遺伝子発現を示した。しかしながら、Foxp3^{A384T} 変異により一部の Foxp3 依存的遺伝子の発現が変化していたことから、この変異は Foxp3 と特定の標的遺伝子の相互作用を変化させると考えられた。

これらの変異が Treg 分化と機能に与える影響を個体レベルで明らかにするために、変異を *Foxp3* 遺伝子座に導入

東京大学大学院薬学系研究科免疫・微生物学教室 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

Analyses of a Foxp3 mutant reveal a critical role of the transcription factor BATF in regulatory T cell function

Shohei Hori (Laboratory of Immunology and Microbiology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900825

© 2018 公益社団法人日本生化学会

したノックインマウスを作製した。Foxp3^{I363V}変異およびFoxp3^{R397W}変異により、Tregに特徴的な遺伝子発現パターンが全体的に影響を受けて、試験管内における抑制活性やサイトカイン産生抑制などTregのさまざまな性質が障害された。一方、Foxp3^{A384T}変異はこれらTregの基本的な性質を障害せず遺伝子発現にも大きな影響を与えないものの、一部の遺伝子の発現を変化させることがわかった。以上の結果から、Foxp3^{I363V}変異とFoxp3^{R397W}変異がFoxp3の機能を全体的に障害する機能欠失型変異である一方、Foxp3^{A384T}変異は一部のFoxp3依存的遺伝子の発現を選択的に障害するユニークな変異であることがわかった。

3. Foxp3^{A384T}変異マウスにおける組織局在型Treg障害

これら3種のFoxp3変異のノックインマウスは自己免疫疾患を発症したが、Foxp3^{A384T}変異マウスは他の機能欠失型変異を持つマウスとは異なる病態を示した。機能欠失型Foxp3変異マウスは、皮膚、肺、肝臓などのさまざまな組織にTh1型およびTh2型の炎症を呈したのに対し、Foxp3^{A384T}変異マウスは皮膚、肺、大腸などの特定の組織にTh2型およびTh17型の炎症を呈し、肝炎は起こさなかった。

Foxp3^{A384T}変異はTregのどのような性質を障害することでこのような特徴的な病態を惹起するのであろうか？ Tregは通常のT細胞と同様、リンパ組織を巡回するナイーブ型と、主に非リンパ組織に局在するエフェクター型（effector Treg: eTreg）の2種類に大別され、前者が抗原刺激を受けて活性化されて後者に機能分化し、免疫応答のある非リンパ組織に移行する¹⁰⁾。これら非リンパ組織に局在するeTregは組織Tregとも呼ばれ、局所における免疫制御と組織恒常性の維持に重要である¹¹⁾。さまざまな組織でナイーブ型およびエフェクター型CD4⁺T細胞におけるTregの割合を比較したところ、Foxp3^{A384T}変異によってナイーブ型T細胞におけるTregの割合は影響を受けないものの、エフェクター型T細胞においては皮膚、肺、大腸といった炎症を起こす組織においてのみTregの割合が減少し、逆に炎症を起こすエフェクター型Foxp3⁻T細胞、すなわちヘルパーT(Th)細胞の割合が増加していた。一方、炎症が起こらない肝臓においてはこのようなeTregとTh細胞のアンバランスはみられなかった。以上の結果から、Foxp3^{A384T}変異は組織Tregの分化・集積を組織選択的に障害し、このために特定の組織において炎症を惹起すると考えられた(図1)。

ではなぜFoxp3^{A384T}変異マウスは特定の組織にTh2型とTh17型に偏った炎症を発症するのであろうか？近年、eTregはTh細胞と同様に不均一な集団であり、Tbet, GATA3, ROR γ tといったTh細胞サブセットの分化を制

御する転写因子や、それぞれの機能に重要なサイトカイン受容体やケモカイン受容体の発現によって多様なサブセットに分けられることが明らかになってきた。そして、それらの分子を利用してTh細胞サブセットと同じ環境に集積してTh細胞の機能を抑制すると提唱されている¹²⁾。Foxp3^{A384T}変異マウスのTregにおいては、Th2細胞(GATA3, IL-33受容体, CCR4)またはTh17細胞(CCR4)選択的に発現する分子の発現が低下する一方で、Th1細胞選択的に発現するTbet, CXCR3といった分子の発現は低下していなかった。このことから、Foxp3^{A384T}変異マウスではeTregがTh2細胞とTh17細胞が働く環境に十分集積することができず、Th2型炎症とTh17型炎症の制御が選択的に破綻すると考えられた。さらに、肝臓においてはこれらTh2型またはTh17型のeTregは多臓器よりもマイナーなサブセットであり、逆にTh1型のeTregが主要なサブセットであった。したがって、肝臓ではFoxp3^{A384T}変異によるeTreg障害の影響が多臓器と比べて小さく、eTregが集積できるために炎症がほとんど起こらないと考えられた。

4. BATFによる組織Treg分化・集積制御

Foxp3^{A384T}変異によりどのような標的遺伝子の発現が障害されることで組織Tregの異常が引き起こされるのであろうか？ マイクロアレイ解析およびFoxp3のChIP-seq解析を行い、Foxp3^{A384T}変異によって発現とゲノムへの結合が変化する標的遺伝子を探索した結果、変異型Tregにおいて発現が低下してFoxp3の結合が強まる遺伝子として*Batf*が同定された。BATFはAP-1ファミリーに属する転写因子であり、さまざまなエフェクターT細胞分化と機能を制御する¹³⁾ことから、筆者らはTregにおいてもBATFがエフェクター型サブセットの分化と機能も制御するのではないかと仮説を立てた。

この仮説を検証するために、まずBATF欠損マウスを解析したところ、BATF欠損TregはFoxp3^{A384T}変異型Tregと類似した遺伝子発現パターンを示すとともに、eTregの数が選択的に減少していた。さらに、大腸炎の系を用いて生体内における免疫抑制機能を評価したところ、BATF欠損TregはFoxp3^{A384T}変異型Treg同様に腸炎抑制活性を示さなかった。逆に、レトロウイルスベクターを用いてFoxp3^{A384T}変異型TregにBATFを強制発現させたところ、大腸におけるeTregの割合が増加して大腸炎を抑制する機能を回復した。以上の結果から、Foxp3^{A384T}変異マウスにおけるTreg異常の一因はBATFの発現低下であることが明らかになった(図1)。

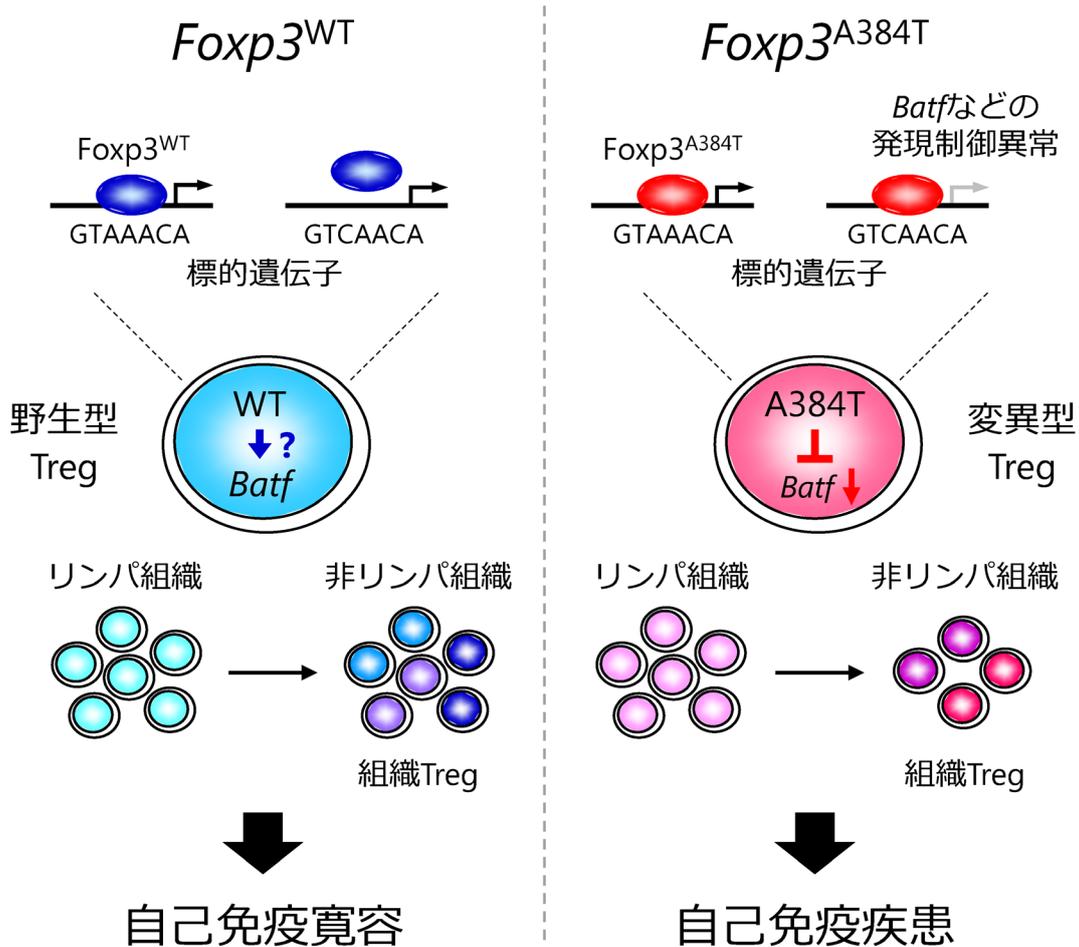


図1 Foxp3^{A384T}変異による自己免疫疾患発症機構

野生型 Foxp3 (Foxp3^{WT}) は GTAAACA などのフォークヘッド転写因子結合配列に結合するが、Foxp3^{A384T} 変異体はそれらに加えて野生型が結合できないフォークヘッド転写因子結合配列 (GTCAACA など) にも結合できるようになった機能獲得型変異である。このために Foxp3^{A384T} 変異体は *Batf* などの特定の標的遺伝子に野生型よりも強く結合し、発現制御異常を引き起こす。Foxp3^{A384T} 変異マウスでは、Treg における転写因子 BATF の発現抑制により、非リンパ組織に局在する組織 Treg の分化・集積が組織選択的に障害され、自己免疫疾患が発症する。

5. Foxp3^{A384T} 変異は DNA 結合特異性を広げる機能獲得型変異である

最後に、Foxp3^{A384T} 変異により *Batf* 発現が選択的に障害されるメカニズムを調べた。その結果、Foxp3^{A384T} 変異体は WT Foxp3 が結合するフォークヘッド転写因子結合配列のみならず、WT Foxp3 が結合できないフォークヘッド転写因子結合配列に対しても結合することを見いだした。すなわち Foxp3^{A384T} 変異は Foxp3 の DNA 結合特異性を広げる機能獲得型変異であることがわかった。そして、*Batf* プロモーターには WT Foxp3 も結合できる配列に加え、Foxp3^{A384T} 変異体のみが結合できる配列が存在し、このために Foxp3^{A384T} 変異体は WT Foxp3 よりも *Batf* プロモーターに強く結合してプロモーター活性を抑制することが明らかになった (図1)。

6. おわりに

本研究により、Foxp3^{A384T} 変異が Foxp3 の DNA 結合特異性を広げることにより *Batf* など特定の標的遺伝子の発現を乱し、その結果特定の非リンパ組織に局在する組織 Treg の分化・集積を障害して組織選択的な自己免疫疾患を惹起することが明らかになった⁸⁾ (図1)。このことは Foxp3 による遺伝子発現制御における DNA 結合特異性の重要性を明らかにするとともに、Foxp3 と DNA の相互作用を変化させるような遺伝子多型がさまざまな自己免疫疾患への疾患感受性あるいは疾患抵抗性を賦与する可能性を示唆している。

さらに本研究から、BATF が組織 Treg の分化と集積を制御する重要な役割を担っていることが明らかになった。このことは、Treg において BATF の発現または機能を強化す

ることで組織における過剰な免疫応答を抑制でき、逆にその発現・機能を阻害することで組織における免疫応答を強化できる可能性を示唆している。さまざまな自己免疫疾患、炎症性疾患、アレルギー疾患、さらにはがんの治療につながることを期待される。

文 献

- 1) Sakaguchi, S. (2004) Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, **22**, 531–562.
- 2) Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paepel, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., & Ramsdell, F. (2001) Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.*, **27**, 68–73.
- 3) Barzagli, F., Passerini, L., & Bacchetta, R. (2012) Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, x-linked syndrome: a paradigm of immunodeficiency with autoimmunity. *Front. Immunol.*, **3**, 211.
- 4) Fontenot, J.D., Gavin, M.A., & Rudensky, A.Y. (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.*, **4**, 330–336.
- 5) Hori, S., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, **299**, 1057–1061.
- 6) Samstein, R.M., Arvey, A., Josefowicz, S.Z., Peng, X., Reynolds, A., Sandstrom, R., Neph, S., Sabo, P., Kim, J.M., Liao, W., et al. (2012) Foxp3 exploits a pre-existent enhancer landscape for regulatory T cell lineage specification. *Cell*, **151**, 153–166.
- 7) Rudra, D., deRoos, P., Chaudhry, A., Niec, R.E., Arvey, A., Samstein, R.M., Leslie, C., Shaffer, S.A., Goodlett, D.R., & Rudensky, A.Y. (2012) Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network. *Nat. Immunol.*, **13**, 1010–1019.
- 8) Hayatsu, N., Miyao, T., Tachibana, M., Murakami, R., Kimura, A., Kato, T., Kawakami, E., Endo, T.A., Setoguchi, R., Watarai, H., et al. (2017) Analyses of a mutant Foxp3 allele reveal BATF as a critical transcription factor in the differentiation and accumulation of tissue regulatory T cells. *Immunity*, **47**, 268–283.e9.
- 9) Bandukwala, H.S., Wu, Y., Feuerer, M., Chen, Y., Barboza, B., Ghosh, S., Stroud, J.C., Benoist, C., Mathis, D., Rao, A., et al. (2011) Structure of a domain-swapped FOXP3 dimer on DNA and its function in regulatory T cells. *Immunity*, **34**, 479–491.
- 10) Smigielski, K.S., Richards, E., Srivastava, S., Thomas, K.R., Dudda, J.C., Klonowski, K.D., & Campbell, D.J. (2014) CCR7 provides localized access to IL-2 and defines homeostatically distinct regulatory T cell subsets. *J. Exp. Med.*, **211**, 121–136.
- 11) Burzyn, D., Benoist, C., & Mathis, D. (2013) Regulatory T cells in nonlymphoid tissues. *Nat. Immunol.*, **14**, 1007–1013.
- 12) Cretney, E., Kallies, A., & Nutt, S.L. (2013) Differentiation and function of Foxp3(+) effector regulatory T cells. *Trends Immunol.*, **34**, 74–80.
- 13) Murphy, T.L., Tussiwand, R., & Murphy, K.M. (2013) Specificity through cooperation: BATF-IRF interactions control immunoregulatory networks. *Nat. Rev. Immunol.*, **13**, 499–509.

著者寸描

●堀 昌平 (ほり しょうへい)



東京大学大学院薬学系研究科教授。博士(薬学)。

■略歴 1998年東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了。ポルトガル留学等を経て2004年理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センターユニットリーダー、13年同統合生命医学研究センターチームリーダー。16年より現職。

■研究テーマと抱負 「自己」とは何か、

免疫系をモデルとして考えて行きたい。

■ウェブサイト <http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~bisei/index.html>

■趣味 音楽鑑賞(主にクラシック)、コーヒー、山歩き、温泉。