

2008年9月8日

独立行政法人 理化学研究所

胸腺内で免疫司令塔のヘルパーT細胞が分化する仕組みを解明

- サイレンサーの働きを止めてヘルパーT細胞への分化を促進する分子機構を発見 -

ウイルスや細菌などの病原体から身を守り、がんを駆逐するなど、免疫は、私たちの身体の健康維持をつかさどる重要なシステムです。この免疫システムは、好中球、マクロファージ、樹状細胞などとともに、リンパ球が大きな役割を果たします。リンパ球には、抗体を産生する「B細胞」や免疫応答を調節する司令塔役の「T細胞」、さらに「ナチュラルキラー（NK）細胞」があります。

免疫の司令塔役のT細胞は、異物情報をほかの免疫細胞に知らせる調整役のヘルパーT細胞と、病原体に感染した細胞やがん細胞を直接攻撃するキラーT細胞に大きく分類されます。このヘルパーT細胞とキラーT細胞は、いずれも胸腔内の胸腺という器官で共通の前駆細胞から作られます。これまでの研究で、前駆細胞からキラーT細胞にならずにヘルパーT細胞に分化するためには、ヘルパーT細胞へ分化誘導するマスター因子「Th-POKタンパク質」の発現が必須で、糖タンパク質のCD4の分子が細胞表面に存在していることが重要であるとされてきましたが、その仕組みはよくわかっていませんでした。

理研免疫・アレルギー科学総合研究センター免疫転写制御研究チームは、Th-POKタンパク質が、CD4遺伝子、Th-POK遺伝子のサイレンサーに直接結合し、Th-POK遺伝子の発現を増幅、維持すユニークな機構を明らかにしました。

この分化制御のメカニズムは、臓器移植の拒絶反応やアレルギー、自己免疫疾患などを人為的に制御する上で重要となり、再生医療、免疫療法への活用も期待されます。

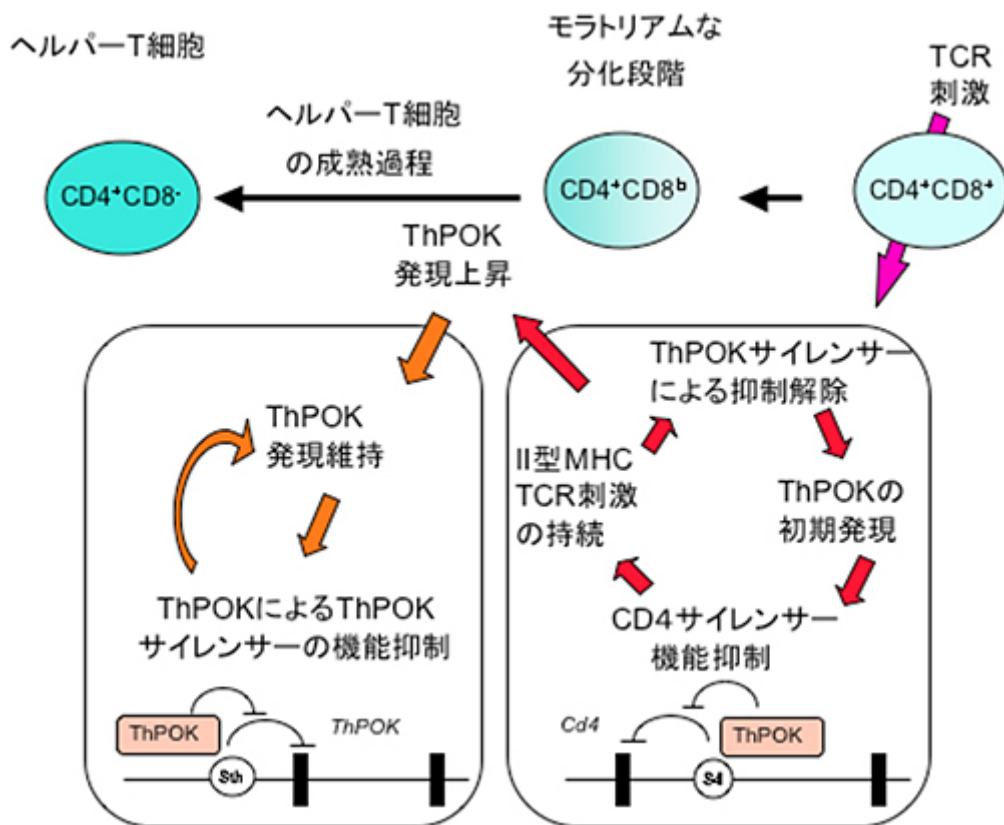


図 *Th-POK* 遺伝子の発現を制御するフィードバック制御ループ

2008年9月8日
独立行政法人 理化学研究所

胸腺内で免疫司令塔のヘルパーT細胞へ分化する仕組みを解明

- サイレンサーの働きを止めてヘルパーT細胞への分化を促進する分子機構を発見 -

◇ポイント◇

- ヘルパーT細胞への分化を促進するマスター転写因子 Th-POK の発現制御機構を解明
- Th-POK タンパク質自身が遺伝子発現抑制を阻害するユニークな機構が存在
- 再生医療や免疫療法への応用につながる、T細胞の人為的な分化に新たな道

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、免疫反応の司令塔として働くヘルパーT細胞が胸腺内で分化誘導される仕組みを解明しました。ヘルパーT細胞への分化誘導を促進するマスター転写因子^{*1}のTh-POKタンパク質が、サイレンサーに直接結合してその働きを抑制することで*Th-POK*遺伝子の発現を増幅する分子機構を明らかにしました。これは、免疫・アレルギー科学総合研究センター（谷口克センター長）、免疫転写制御研究チームの谷内一郎チームリーダーらによる研究成果です。

免疫細胞であるT細胞は、異なる機能を持つヘルパーT細胞とキラーT細胞に大きく分類できます。ヘルパーT細胞とキラーT細胞は、胸腔内の胸腺と呼ばれる臓器で共通の前駆細胞から作られます。これまで、前駆細胞がキラーT細胞にならずにヘルパーT細胞に分化するには、Th-POKタンパク質の発現が必須であり、CD4という糖タンパク質が細胞表面上に発現し続けることが重要であることがわかっていました。しかし、ヘルパーT細胞への分化過程で、どのようにしてこの2つのタンパク質の発現が調節されているのか、よくわかっていませんでした。

遺伝子の発現を調節するDNA配列には、遺伝子発現を促進するエンハンサーと、抑制するサイレンサーがあります。研究チームは、遺伝子操作を用いて*Th-POK*遺伝子のエンハンサーを欠損することで*Th-POK*遺伝子の発現が上昇しないマウスを作製しました。このマウスでは、いったんヘルパーT細胞になりかかった細胞が、キラーT細胞になることを発見しました。さらに、*Th-POK*遺伝子の発現を増幅し、上昇させるメカニズムを調べたところ、Th-POKタンパク質はCD4遺伝子と*Th-POK*遺伝子のサイレンサーに直接結合することでサイレンサーが働かないように作用し、CD4や*Th-POK*遺伝子の発現を維持してヘルパーT細胞へと分化することを突き止めました。この発見により、Th-POKタンパク質のサイレンサーに対する抑制作用が正のフィードバックとなり、*Th-POK*遺伝子の発現が増幅され、維持される機構が明らかとなりました。

この成果は、細胞分化を誘導する信号が増幅されていく仕組みを解明したものです。ヘルパーT細胞の分化制御の理解は、がん、臓器移植における拒絶反応、アレルギーや自己免疫疾患などを人為的に制御する上でも大変重要であり、人工的にヘルパーT細胞を誘導する技術の開発により、再生医療への応用も期待されます。

本研究成果は、米国の科学雑誌『*Nature Immunology*』オンライン版（9月7日付け：日本時間9月8日）に掲載されます。

1. 背景

身体に備わっている免疫系は、病原体による感染症から身を守る、がん細胞を駆逐するなど、私たちの健康の維持に重要な働きをします。この免疫反応の主役を担うリンパ球には、抗体を産生する「B細胞」と、免疫応答を調節する司令塔となる「T細胞」があります。T細胞はさらに、生体に入り込んだ異物の情報をほかの免疫細胞に知らせ免疫応答を調節する「ヘルパーT細胞」と、病原体に感染した細胞やがん細胞を直接攻撃する「キラーT細胞」に大きく分類できます。ヘルパーT細胞がないと、免疫系は正常に機能することができず免疫不全に陥ります。例えば、AIDS（エイズ）の名で知られる後天性免疫不全症は、HIV（ヒト免疫不全ウイルス）の感染によりヘルパーT細胞が死滅していくことが原因で起こる免疫不全症です。このように、ヘルパーT細胞の機能は、免疫系が正常に働き、健康を維持するために必須であり、私たちの身体の中でヘルパーT細胞ができてくる仕組みを知ることが非常に重要になります。

T細胞は、胸腺（Thymus）と呼ばれる臓器で発生することから、ThymusのTを取ってT細胞と呼ばれます。ヘルパーT細胞とキラーT細胞はいずれも、細胞表面に糖タンパク質CD4とCD8を共に発現しているCD4⁺CD8⁺ダブルポジティブ（DP）胸腺細胞を前駆細胞としています。CD4⁺CD8⁺ダブルポジティブ（DP）胸腺細胞は、ヘルパーT細胞に分化するとCD4だけを発現（CD4⁺CD8⁻）し、キラーT細胞に分化するとCD8だけを発現（CD4⁻CD8⁺）するようになります。したがって、これら2種類のT細胞は、CD4とCD8という細胞表面の糖タンパク質の発現パターンにより、簡単に見分けることができます。

これまでの研究から、DP胸腺細胞の分化には、自らが発現するT細胞抗原受容体（TCR）^{*2}と、抗原提示細胞^{*3}上の主要組織適合抗原（MHC）^{*4}によって提示される自己抗原との反応性が影響することがわかっていました。MHCには、I型MHCとII型MHCの2種類があり、I型MHCと反応するTCRを発現する胸腺細胞は、CD4の発現を消失してCD4⁻CD8⁺のキラーT細胞に分化し、II型MHCと反応するTCRを発現する胸腺細胞は、CD8の発現を消失してCD4⁺CD8⁻のヘルパーT細胞に分化することが知られています。このように、TCRの反応性がMHCの種類により規定されることを、MHC拘束性といいます。

DP胸腺細胞の分化決定では、CD4分子はII型MHCとTCRの反応を補助する役割を持ち、補助分子と呼ばれます。これまでに、CD4分子が一定の時間発現し続けることが、ヘルパーT細胞の分化に重要であることが示されてきました。しかし、DP胸腺細胞がどのようにして、ヘルパー/キラーへの分化決定を行っているのかは、よくわかっていませんでした。TCRのMHC拘束性による制御やCD4/CD8の発現パターンが、DP胸腺細胞の運命決定とよく相関することから、1990年代初頭にはDP胸腺細胞の運命決定を説明する2つのモデル^{*5}が提唱され、大きな議論を巻き起こしたこともあります。このように、ヘルパーT細胞とキラーT細胞への分化決定機構の解明は、免疫学の大きな課題の1つでした。

DP胸腺細胞の運命決定の研究では、2005年にヘルパーT細胞分化のマスター転写因子の同定という画期的な発見がされ、その因子は「Th-POK」と名付けられました。この発見で、Th-POKタンパク質を人為的に強制発現させたトランスジェニックマウス^{*6}では、すべてのDP胸腺細胞がヘルパーT細胞に分化すること、また逆

にTh-POKタンパク質の機能を欠損したマウスでは、すべてのDP胸腺細胞がキラーT細胞に分化することが判明しました。言い換えれば、MHC拘束性にかかわらず、*Th-POK*遺伝子が発現するかしないかで、DP胸腺細胞の運命が決定することが明らかになりました。

遺伝子の発現は、その遺伝子の近傍に存在するシス制御領域と呼ばれるDNA配列の機能が、特定の転写因子（トランス制御因子）の結合により調節されることで制御されます。遺伝子の発現を促進する（正に制御する）機能をもつ制御領域は「エンハンサー」と呼ばれ、逆に遺伝子の発現を抑制する（負に制御する）制御領域は「サイレンサー」と呼ばれます。つまり遺伝子は正（エンハンサー）と負（サイレンサー）のバランスにより、その発現が制御されると考えられます。2002年に、谷内チームリーダー（当時ニューヨーク大学）は、CD4サイレンサーに結合し、サイレンサーの機能発現に重要な転写因子として「Runx転写因子」を同定し

（Taniuchi et al. *Cell* 111, 621-633, 2002）、高等動物でのサイレンサーの機能制御に関する先駆的な研究成果を発表しました。さらに今年に入って、*Th-POK*遺伝子内に新たなサイレンサー領域（*Th-POK*サイレンサー）を同定し、このサイレンサーの機能発現にもRunx転写因子の結合が重要であることを報告しました（2008年2月8日プレス発表：ヘルパーかキラーか？Tリンパ球の分化運命決定のカギを発見 Setoguchi et al. *Science* 319, 822-825, 2008）。今回、研究チームはより詳細に*Th-POK*遺伝子の発現制御機構の解明に挑み、ヘルパーT細胞への分化過程の理解を目指しました。

2. 研究手法と成果

(1) ヘルパーT細胞への分化には、*Th-POK*遺伝子の発現上昇が必要

*Th-POK*遺伝子の発現を簡単に解析できるように、緑色蛍光タンパク質（Green Fluorescence Protein : GFP）を*Th-POK*遺伝子内の下流に組み込んだES細胞を作製しました。ES細胞からトランスジェニックマウスを作製し、胸腺内の*Th-POK*遺伝子の発現をGFPの発現量でモニターしてみると、ごく少数のCD4⁻CD8⁺胸腺細胞にもGFPの発現が認められました。GFPが比較的安定なタンパク質であることを考慮すると、この結果は、いったん*Th-POK*遺伝子を発現した細胞にもキラーT細胞への分化能が残存していることを示しています。

これまでに、CD8の発現が低下し、中程度の発現レベル（intermediateという英語からCD8^{int}と表記）を示すCD4⁺CD8^{int}胸腺細胞分画には、ヘルパーとキラー両方への分化能が認められることが知られていました。そこで、研究チームはGFPの発現レベルによって、CD4⁺CD8^{int}胸腺細胞の分画をさらに分類して培養し、それぞれの分化能を調べました。その結果、GFPを中程度に発現しているCD4⁺CD8^{int}胸腺細胞の約半数が、CD4⁻CD8⁺キラーT細胞に分化しました。このことから、*Th-POK*遺伝子を中程度に発現している細胞には、キラーT細胞への分化能が残存しており、ヘルパーT細胞へ分化するには、*Th-POK*遺伝子のさらなる発現上昇が必要であることが示されました。

(2) PEは *Th-POK* 遺伝子の発現上昇と維持に必要

研究チームは、*Th-POK* 遺伝子内で、上述の *Th-POK* サイレンサー以外に2つのエンハンサー領域を同定していました。このうち、下流にあるエンハンサー領域 (proximal enhancer : PE) は、*Th-POK* 遺伝子の発現維持に重要であると予想されていました。このPEの機能を解析する目的で、PEを欠損したマウスを作製したところ、実際にPEが *Th-POK* 遺伝子の発現上昇と維持に必要であることを証明できました。

このマウスをよく調べたところ、*Th-POK* 遺伝子の発現上昇が起こらないと、ヘルパーT細胞に分化するはずのII型MHCに拘束されたTCRを発現する胸腺細胞の一部は、その自然な分化運命をねじ曲げられて、逆のキラーT細胞に分化するという、細胞運命の転換が起こることがわかりました。さらに、詳細に調べてみると、PEを欠損したマウスでは、見かけ上はヘルパーT細胞に見えるCD4⁺CD8⁻T細胞が存在していますが、これらは正常なヘルパー機能を持たずに、一部キラーT細胞様の機能を持っていることが判明しました。同時に、このCD4⁺CD8⁻T細胞を培養あるいはマウス内に注入してやると、一部の細胞はCD4⁻CD8⁺T細胞に分化転換するという、通常ではあり得ないことが起こりました。この結果から、*Th-POK* タンパク質はヘルパーT細胞への分化を促進すると共に、キラーT細胞への分化能を消去する役割を果たしていること、*Th-POK* 遺伝子の十分な発現上昇は完全なヘルパーT細胞の分化に非常に重要であることがわかりました。

(3) *Th-POK* タンパク質による CD4 および *Th-POK* サイレンサー抑制機構

研究チームは、*Th-POK* 遺伝子の発現を上昇させるメカニズムの解明に取り組みました。研究チームのこれまでの研究から、I型MHC拘束性のキラーT細胞の分化過程では、*CD4* 遺伝子や *Th-POK* 遺伝子の発現は、サイレンサーにより抑制されていることがわかっています。一方、II型MHC拘束性のヘルパーT細胞の分化過程では、これらサイレンサーが機能していないため、*CD4* 遺伝子や *Th-POK* 遺伝子が発現できると考えられます。PEを欠損させ *Th-POK* 遺伝子の発現が低下したマウスでは、II型MHC拘束性の胸腺細胞でも *CD4* 遺伝子の発現が低下します。そこで、研究チームは *CD4* サイレンサーを欠損するマウスとPEを欠損するマウスを交配し、*Th-POK* 遺伝子の発現低下によるII型MHC拘束性の胸腺細胞でのCD4の発現低下が *CD4* サイレンサーを介しているか調べました。

その結果、*CD4* サイレンサーの欠損が加わることにより、PEの欠損による *Th-POK* 遺伝子の発現低下が起きても *CD4* 遺伝子の発現低下は見られなくなり、*Th-POK* タンパク質が *CD4* サイレンサーの機能を抑制することで、II型MHC拘束性の胸腺細胞ではCD4の発現が維持されることがわかりました。同様の研究手法により、II型MHC拘束性胸腺細胞の *Th-POK* 遺伝子の発現維持には、*Th-POK* タンパク質が自分自身の遺伝子内にある *Th-POK* サイレンサーの機能を抑制することが重要であることがわかりました。

では、*Th-POK* タンパク質はどのようにして *CD4* サイレンサーや *Th-POK* サイレンサーの機能を抑制するのでしょうか？この疑問に答えるため、研究チーム

は、Th-POKタンパク質がこれらサイレンサーに直接結合するか調べることにしました。核タンパク質とDNAとの結合はクロマチン免疫沈降法（ChIP）^{*7}を用いて調べることができますが、この研究手法には、免疫沈降に使用することができる特異性の高い抗Th-POK抗体が必要です。しかし、現時点でよい抗Th-POK抗体は存在しません。そこで研究チームは、遺伝子操作により、エピトープ配列（Flag-HA配列）を挿入することで、N末端に抗体が認識するFlag-HA配列が挿入されたFH-Th-POKタンパク質を発現するトランスジェニックマウスを作製しました。このマウス由来の細胞を用いて、ChIP法とDNA chip^{*8}を組み合わせた「ChIP on chip法^{*8}」を実施した結果、Th-POKタンパク質はCD4サイレンサーやTh-POKサイレンサーと直接結合することがわかりました。さらに、レポーター遺伝子^{*9}の導入による実験などから、Th-POKタンパク質はCD4サイレンサーの機能を非常に強く抑制することが判明し、Th-POKタンパク質の発現の有無がCD4サイレンサーの機能を制御するスイッチとして働くことが解明できました。一方、Th-POKタンパク質の発現だけではTh-POKサイレンサーの機能を完全に抑制することはできず、Th-POKタンパク質はTh-POKサイレンサーの機能制御機構の一部として働くことがわかりました。

これらの実験結果から、Th-POK遺伝子の発現が上昇することがヘルパーT細胞の分化に重要で、Th-POKタンパク質がキラーT細胞の分化プログラムを抑制する作用があることが明らかになりました。また、Th-POKタンパク質自身が、CD4サイレンサーとTh-POKサイレンサーの機能を抑制することによりフィードバック制御ループを形成し、Th-POK遺伝子の発現を増幅、維持していると考えられました。すなわち、ヘルパーT細胞の分化の初期シグナルによりTh-POK遺伝子の発現が誘導されると、Th-POKタンパク質がCD4分子の発現を維持するように働くことで外部刺激（II型MHC拘束性TCRからのシグナル）を維持し、その信号はTh-POKサイレンサーの機能抑制につながり、Th-POK遺伝子の発現が増強し、蓄積したTh-POKタンパク質は自分自身のサイレンサーに結合することで自分自身の発現を維持すると考えられます（図）。この段階になると、外部刺激がなくてもTh-POKタンパク質自身の結合によりTh-POKサイレンサーの機能抑制が持続し、ヘルパーT細胞は胸腺から全身に出ていった後もTh-POK遺伝子の発現を維持し、ヘルパーT細胞がヘルパーT細胞であり続けることができると考えられます。

3.今後の期待

今回の研究は、いくつもの遺伝子操作マウスの作製・解析により、ヘルパーT細胞分化過程でのTh-POKタンパク質の機能とTh-POK遺伝子の発現制御機構を明らかにしたものです。多細胞生物の分化では、特定の系列の細胞分化過程で中心的な役割を果たすマスター転写因子の発現がどのように制御されているかは、根本的な問題です。今回の研究成果によって、ヘルパーT細胞分化過程では、Th-POKタンパク質が異なるサイレンサーの機能を抑制することで、巧妙に細胞外刺激の情報を操作し、また、それを感知して自分自身の発現を増幅、維持していく機構が明らかになりました。サイレンサーの機能抑制によるフィードバック制御ループはほか

に例のないユニークなもので、大変興味深い細胞分化モデルといえます。

今後、ヘルパーT細胞の詳細な分化プログラムを明らかにすることができると、ES細胞やiPS細胞から人工的にヘルパーT細胞を誘導することや、ヘルパーT細胞とキラーT細胞の機能を併せ持つ新しいT細胞を作り出すことが可能になるかも知れません。T細胞が、免疫応答の調節の中心的な役割を果たすことを考えると、人為的なT細胞分化誘導法の開発は、免疫疾患の新たな治療法の開発につながると期待できます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

免疫・アレルギー科学総合研究センター 免疫転写研究チーム

チームリーダー 谷内 一郎 (たにうち いちろう)

Tel : 045-503-7045 / Fax : 045-503-7043

横浜研究推進部 企画課

Tel : 045-503-9117 / Fax : 045-503-9113

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

<補足説明>

※1 マスター転写因子

遺伝情報に基づく根幹的な分化プログラムのスイッチをオンにする役割を果たす分子を、「マスター分化制御因子」と呼ぶ。遺伝子の発現は、遺伝子発現制御領域である特定のDNA配列に、「転写因子」と呼ぶタンパク質が結合することで調節している。マスター分化制御因子の機能の本質は、遺伝情報の発現制御を行うことであるため、「マスター転写因子」とも呼ばれている。

※2 T細胞抗原受容体(TCR)

T細胞の表面に発現している抗原を認識する受容体。TCR β とTCR α の2本鎖から構成されており、各々のT細胞が、1つの抗原に特異的なTCRを発現する。膨大なTCRの多様性は、TCR遺伝子の再構成によって作られる。

※3 抗原提示細胞

抗原を細胞内に取り込み処理してT細胞に提示することで、T細胞を活性化させる機能を持つ細胞群で、樹状細胞やマクロファージなどが含まれる。抗原提示細胞に取り込まれた抗原は、アミノ酸数が10個程度の抗原ペプチドに分解され、自己

MHC との複合体として細胞の表面に発現することで T 細胞が認識できるような形となり、T 細胞に提示される。

※4 主要組織適合抗原(MHC)

構成される分子からクラス I (I 型) とクラス II (II 型) に分類される。TCR は MHC 上に提示される抗原を認識する。遺伝的な背景により MHC には多型性があり (ヒトでは HLA の多型性として知られている)、臓器移植の際には、MHC が異なると拒絶反応が起こることから、主要組織適合抗原と呼ばれている。

※5 DP 胸腺細胞分化の古典的モデル

1 つは DP 胸腺細胞が I 型 MHC と II 型 MHC のどちらに反応するのか感知して分化運命を決定するというモデル (インストラクティブモデル) で、もう 1 つは分化運命の決定は確立的にランダムに起こるもので、例えばヘルパー T 細胞に分化する運命決定をした細胞が運良く II 型 MHC と反応する TCR を発現した場合に細胞が生き延びるだけであるというモデル (ストカスティック/セレクトティブモデル)。

※6 トランスジェニックマウス

遺伝子操作により、目的の分子の発現を人工的に制御したマウスの総称。多くの場合、DNA 断片を受精卵にマイクロインジェクションすることで作製される。今回の研究のように、ES 細胞での相同組み替えを利用して作製される場合もあり、その場合はノックイントランスジェニックと呼ばれる。

※7 クロマチン免疫沈降法(Chromatin Immune-precipitation: ChIP)

細胞内で DNA と核内タンパク質の結合を調べる実験手法。核内タンパク質をクロマチン DNA に結合した状態で固定した後、目的の核内タンパク質に対する抗体で免疫沈降を行う。免疫沈降物に含まれる DNA 断片を解析することで、目的の核内タンパク質が結合している DNA を検出することができる。

※8 DNA chip/Chip on chip 法

スライドガラス上に、人工的に合成した DNA 断片を載せることで作成されたチップ。DNA 断片の種類を増やすことで、一度に大量の DNA を解析することが可能であり、網羅的な解析・バイオインフォマティクス解析には欠かせない研究材料。クロマチン免疫沈降法 (ChIP) と組み合わせた「ChIP on chip」と呼ばれる方法は、ある核内タンパクがどのゲノム領域と結合しているか解析するのに極めて有効である。

※9 レポーター遺伝子

遺伝子の発現を制御するシス制御領域の機能解析に用いられる実験手法に用いられる遺伝子の名称。遺伝子の発現量を解析する為に、簡便にその遺伝子産物の量を測定出来る遺伝子をレポーターとして使用することから、このような名称で呼ばれる。実際にはレポーター遺伝子の近傍に調べたいシス制御領域を挿入したレポーターコンストラクトを細胞内、マウスに導入して、レポーターの発現を調べる。

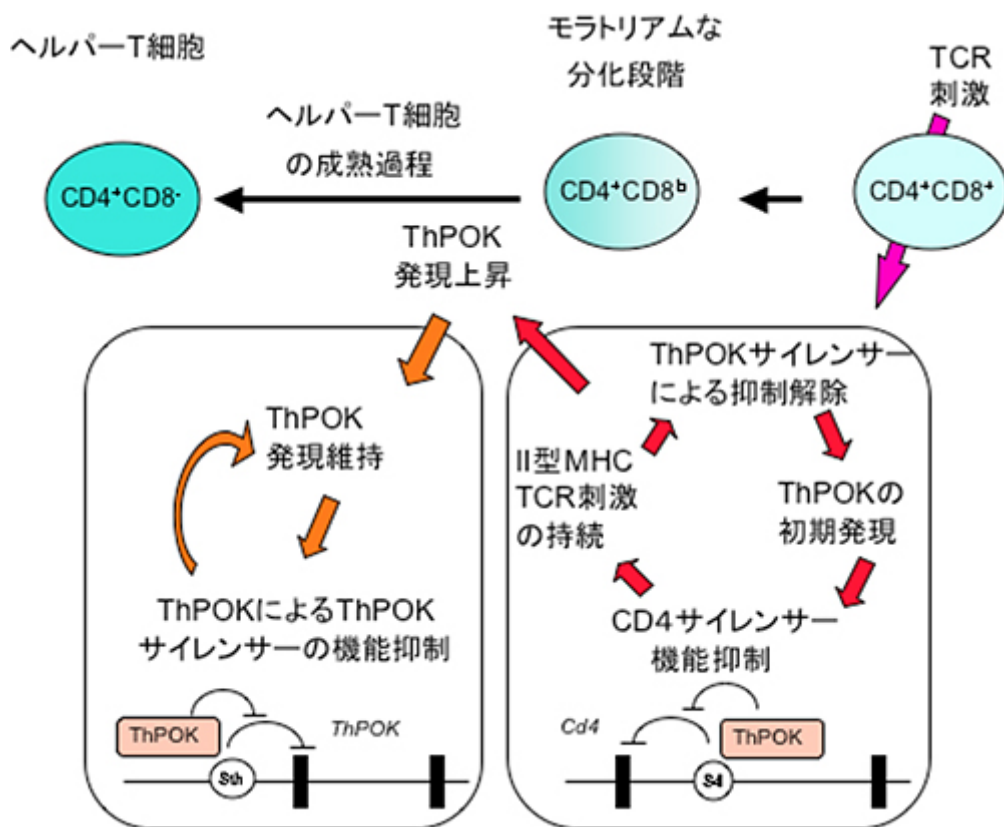


図 *Th-POK* 遺伝子の発現を制御するフィードバック制御ループ

ヘルパーT細胞分化には、*Th-POK* 遺伝子の発現上昇が必須である。TCR 刺激によって発現誘導された *Th-POK* タンパク質は、CD4 サイレンサーに結合し、その働きを抑制することで細胞表面上の CD4 の発現が維持される。その結果 TCR 刺激が持続され、*Th-POK* サイレンサーを介した *Th-POK* 遺伝子の発現抑制の解除が持続し、*Th-POK* 遺伝子の発現が上昇する。蓄積した *Th-POK* タンパク質は自らのサイレンサーに結合し、その働きを抑制し、*Th-POK* 遺伝子の発現が安定に維持される。このように、*Th-POK* タンパク質の異なるサイレンサーに対する拮抗作用によって、*Th-POK* 遺伝子の発現を増幅する正のフィードバック制御ループが形成され、*Th-POK* 遺伝子の発現が上昇し、ヘルパーT細胞へと分化する。