

## CD4T 細胞の分化初期段階を制御する転写因子の同定

関谷高史

国立国際医療研究センター 免疫制御研究部

### 【研究の背景】

ヘルパーT細胞(Th)と制御性T細胞(Treg)は、それぞれ免疫応答の正の制御、負の制御のエフェクターとして機能する、CD4T細胞系列に属する細胞サブセットである。Th/Tregの機能のバランスは重要であり、どちらが勝りすぎても様々な疾患の引き金となる。従って、ThとTregの分化メカニズムの詳細な理解は、免疫疾患の発症メカニズムの解明、ひいては新規治療標的の同定に繋がると期待される。我々の研究グループは先行研究で、Th/Treg運命決定に機能する重要な転写因子として、「Nr4aファミリー核内受容体」を見出している<sup>1,2)</sup>。Nr4aファミリーはNr4a1, a2, a3の3分子から構成されており、胸腺でのTregの発分化で必須の役割を担っている。T細胞特異的にNr4aファミリー分子全てを欠損させたトリプルノックアウトマウス(Nr4a-TKOマウス)では、Tregは全く分化しない。Th1やTh2タイプのヘルパーT細胞活性の著明な亢進が起こり、マウスは生後早期に重篤な自己免疫疾患を発症し死亡する。このように、Nr4aはTh/Treg分化制御で必須の役割を担っており、炎症性疾患の治療標的として大きな期待が持たれる分子である。

### 【目 的】

上述の通り、胸腺でのTregの発分化においてNr4aが必須の役割を担っていることは明らかとされてきたが、様々な未解明な疑問点：①Nr4aはどのような分子機序でTreg分化を促進するか ②Tregの分化に寄与する分子イベントの中で、Nr4aに担われるもの、担われないものは、それぞれ何か ③Nr4aを欠損し、Tregへの分化を完了できなかった細胞はどのような運命を辿るかが残されている。これらの疑問点の追求は、炎症性疾患の発症機序や寛容誘導メカニズムなどの理解を深めるのみならず、炎症性疾患の新規治療法の開発につながると期待される。そこで本研究では、胸腺から取得したTreg前駆細胞(Treg precursor cell; preTreg)の解析を中心に、これらの疑問点の解明を試みた。

### 【方 法】

マウス胸腺からNr4a-TKO preTreg, 野生型 preTreg, Treg, non-Treg細胞を取得し、実験に供した。さらに、それらに加え、Nr4aの誘導標的でありTregの主要転写因子として知られるFoxp3を欠損したpreTreg(Foxp3-KO preTreg)も取得し、実験に供した。主に以上の細胞を用い ①マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析 ②バイサルファイトシーケンシングによるCpGメチル化解析 ③T細胞欠損マウスへの移入後のin vivo解析等の実験を行い、Nr4aの胸腺Treg発分化における役割と分子機序の検討を行った。

### 【結 果】

Nr4a-TKO preTreg, Foxp3-KO preTreg, 野生型 Treg, 野生型 non-Tregのマイクロアレイ解析結果のクラスタリングにより、Treg分化過程で発現変動する遺伝子を ①Nr4a, Foxp3両方に依存しないもの ②Nr4aにexclusiveに依存するもの ③Foxp3にexclusiveに依存するもの ④Nr4aとFoxp3の両方に依存するものに分類した。その結果、Nr4aにexclusiveに発現制御を受ける遺伝子として、Tregの主要遺伝子の一つEosをコードする*Ikzf4*の誘導、*Il4*, *Il21*等のTh2やTfh型のヘルパーT細胞のサイトカイン遺伝子の抑制が見出された。また、CpGメチル化解析の結果から、Nr4aは*Ikzf4*遺伝子座の脱メ

チル化に必須の役割を担っていることが明らかとなった。

Treg は胸腺での発生分化過程において、胸腺樹状細胞や胸腺上皮細胞に提示される自己抗原に対して高い親和性を示したクローンから主に分化する。このことは、Treg への正常な分化を遂げられなかった細胞が生き残り、末梢に遊走すると、自己免疫を引き起こす可能性を孕んでいる。一方、Nr4a-TKO マウスは Foxp3-KO マウスと比較しても寿命の短い重篤な自己免疫疾患を発症することが確認されているため、Nr4a は Treg の誘導以外にも T 細胞で何らかの寛容誘導メカニズムを担っていると推測できる。そこで、Nr4a-TKO preTreg, Foxp3-KO preTreg, 野生型 preTreg を autologous mixed lymphoid reaction (MLR) を用いた in vitro 解析、および T 細胞欠損マウスへの移入による in vivo 解析により検討した。その結果、autologous MLR では野生型 preTreg, Foxp3 preTreg 共におびただしいアポトーシスを示した一方で、Nr4a-TKO preTreg は生存し、自己抗原に反応して増殖することも明らかとなった。また、WT preTreg や Foxp3-KO preTreg では Nr4a1 や Bim の発現の亢進が確認され、アポトーシス誘導に機能していることが示唆された。さらに、野生型 preTreg, Foxp3 preTreg 共に、移入後の T 細胞欠損マウスではアポトーシスが誘導され病原性を示さなかった一方で、Nr4a-TKO preTreg は生存し、様々な臓器で炎症を引き起こすことが確認された。以上の研究成果は Cell Reports 誌で発表を行った<sup>3)</sup>。

## 【考 察】

まず、Nr4a に exclusive に誘導または抑制を受ける遺伝子の数はそれぞれ 213 種類と 83 種類であったのに対し、Foxp3 と Nr4a の両者に依存せず発現誘導または抑制を受ける遺伝子の数はそれぞれ 730 種類と 776 種類と、多数であった。また、*Foxp3* 遺伝子の発現も、Nr4a-TKO preTreg で、量は低い誘導されることが確認された。Treg 分化において Foxp3 が exclusive に寄与するイベントはそれほど多くは無いことは知られていたが、以上の結果から、Nr4a が exclusive に制御するイベントも一部に留まると推測される。しかし、Eos の発現制御、Th2 や Tfh サイトカイン発現の抑制は Treg の正常な分化に必須であるため、Nr4a の機能は Treg 分化の重要な一翼を担っていることが明らかとなったと言える。

さらに、Nr4a-TKO preTreg は移入後のレシピエントマウスで炎症反応を惹起したが、これは、Treg 前駆細胞から自己免疫性細胞が生じたことを初めて示した例である。Nr4a が Treg 前駆細胞において分化の促進のみならず、分化を完了できなかった細胞にアポトーシスを誘導し、除去する機能も持つことを強く示唆しており、胸腺での中枢性トレランスを担う重要なメカニズムの一つを明らかにしたと言える。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

Nr4a ファミリー転写因子は、ヒト・マウスの種間を問わず高度に保存された分子であり、ヒト CD4T 細胞制御でも重要な役割を担っていることが推測される。本研究成果は、自己免疫疾患の発症機序の理解を深めるのみならず、Nr4a を標的とした新規治療薬の開発に重要な指針を与えると期待される。

## 【参考・引用文献】

- 1) Sekiya, T. et al. The nuclear orphan receptor Nr4a2 induces Foxp3 and regulates differentiation of CD4+ T cells. Nat Commun 2011;2, 269.
- 2) Sekiya, T. et al. Nr4a receptors are essential for thymic regulatory T cell development and immune homeostasis. Nat Immunol 2013;14, 230-237.
- 3) Sekiya, T. et al. Nr4a Receptors Regulate Development and Death of Labile Treg Precursors to Prevent Generation of Pathogenic Self-Reactive Cells. Cell Rep 2018;24, 1627-1638 e1626.