

2008年2月8日

独立行政法人 理化学研究所

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

- 免疫司令塔のT細胞の分化を制御する転写因子ネットワークを解明 -

免疫システムは、風邪のウイルスや病原菌、がんなどの異物を見つけ出して排除して、私たちの体を病気などから守っています。この時活躍する免疫細胞には、B細胞、マクロファージ、樹状細胞等の他に、免疫の司令塔の役割を果たす「T細胞」があります。

T細胞には、体内に進入してきた異物を察知しその情報を他の免疫細胞に知らせる調整役の「ヘルパーT細胞」と、異物を攻撃する「キラーT細胞」という働きが異なる2つの細胞があります。これらは、いずれも胸腔内の「胸腺」と呼ぶ臓器で、DP胸腺細胞と呼ばれる前駆細胞から作られています。

ところがこの前駆細胞が、どのようにして異なる2種のT細胞に分かれて（分化）いくのかはわからないままで、免疫学の大きな謎となっていました。

理研免疫・アレルギー科学総合研究センターの免疫転写制御研究チームは、遺伝子の発現を調節することでT細胞の働きを制御する「Runx（ランクス）」という転写因子が、この前駆細胞の分化の運命を決定づけていることを突き止めました。具体的には、前駆細胞が「キラーT細胞」に分化するには、「ヘルパーT細胞」に分化させる働きをする「Th-POK 遺伝子」上のある領域に Runx 転写因子が結合して、Th-POK 遺伝子の発現を抑制していることを、マウスを使った実験で明らかにしました。DP胸腺細胞で Runx 転写因子の機能を破壊したマウスでは、本来「キラーT細胞」に分化するはずの細胞が「ヘルパーT細胞」に分化し、「キラーT細胞」が消失してしまうという驚くべき実験結果を得たのです。

今回得られた知見は、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ことにつながりそうです。また、人工的にヘルパーT細胞やキラーT細胞を誘導する技術を開発することで、再生医療や免疫療法へ活用されることが期待できます。

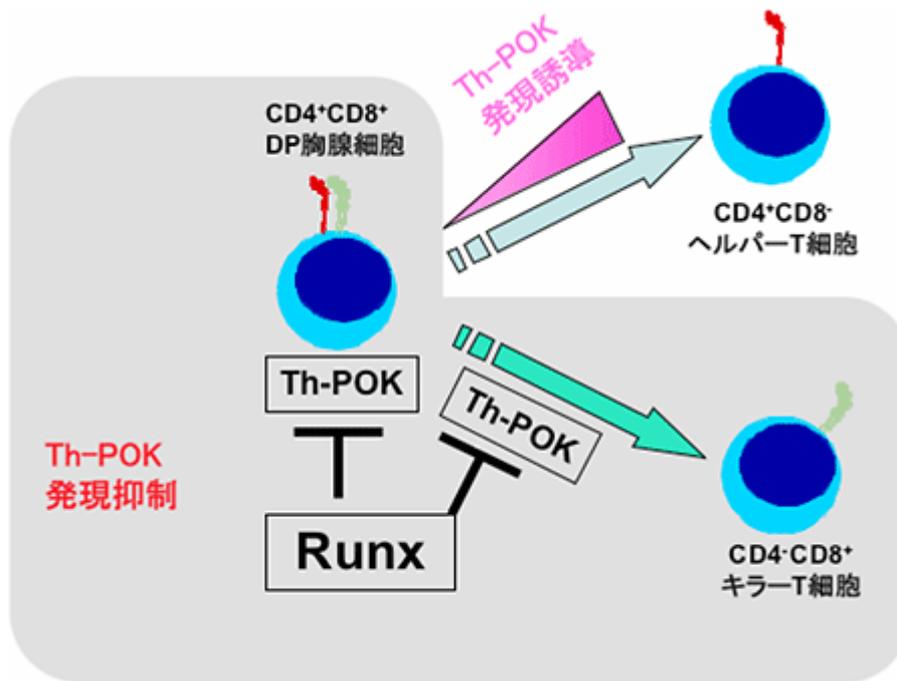


図 Runx 転写因子による Th-POK 転写因子の発現抑制
(キラーT細胞の分化に必須なメカニズム)

2008年2月8日
独立行政法人 理化学研究所

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

- 免疫司令塔のT細胞の分化を制御する転写因子ネットワークを解明 -

◇ポイント◇

- ヘルパーT細胞分化のマスター転写因子 Th-POK の発現を Runx 転写因子が抑制
- Th-POK 遺伝子内に新たなサイレンサー領域を発見
- T細胞を人工的に分化制御し、再生医療や免疫療法の応用へ新たな道

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、体内に入り込んでくる異物を排除する免疫反応の司令塔である Tリンパ球が、胸腺内で分化する過程を制御する核内転写因子ネットワークを解明しました。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。

Tリンパ球は、免疫反応の司令塔ともいえるべき細胞集団で、異物の侵入を察知すると、直接外敵を攻撃したり、他の細胞に異物の情報を知らせる分子を放出したりするようになります。異物の情報を他の免疫細胞に知らせ、免疫応答を調節する Tリンパ球は「ヘルパーT細胞」、病原体に感染した細胞やがん細胞を直接攻撃する Tリンパ球は「キラー（細胞傷害性）T細胞」と呼ばれます。このような働きが異なる2種の Tリンパ球、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。しかし、前駆細胞の分化運命（ヘルパーになるのかキラーになるのか）を決定するメカニズムは長らく不明でした。

研究チームは、遺伝子の発現を制御し、Tリンパ球の働きを調節することが知られていた「Runx（ランクス）」という転写因子が、胸腺での前駆細胞の運命決定も制御していることを発見しました。前駆細胞がキラーT細胞に分化するには、ヘルパーT細胞へ分化させる働きをする Th-POK 遺伝子上のある領域に Runx が結合して、Th-POK 遺伝子の発現を抑制していることをマウスの実験で突き止めました。

胸腺細胞で Runx 転写因子の機能を破壊したマウスでは、本来ならばキラーT細胞に分化するはずの細胞がヘルパーT細胞に分化するという運命転換が起こり、キラーT細胞が消失してしまいました。また、Th-POK 遺伝子上の Runx が結合する領域（Th-POK サイレンサー）を欠損したマウスでも、同様にキラーT細胞が消失したことから、Runx による Th-POK 遺伝子の発現制御の重要性を証明したこともなりました。

この成果は、免疫学の大きな謎であった胸腺細胞の分化運命を決定する核内メカニズムを初めて解明したものです。異なる役割を持つ2種類の Tリンパ球へ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す。また、人工的にヘルパーT細胞やキラーT細胞を誘導する技術の開発により、再生医療や免疫療法への応用も期待されます。

本研究成果は、米国の科学雑誌『*Science*』（2月8日号）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り、がん細胞を駆逐するなど、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リンパ球」と免疫応答を調節する司令塔となる「Tリンパ球」があり、Tリンパ球は胸腺（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リンパ球と呼ばれます。Tリンパ球は、異なる機能を持ついくつかの細胞に分類されますが、大きくは「ヘルパーT細胞」と「キラー（細胞傷害性）T細胞」に分けられます。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。ヘルパーT細胞は、CD4だけを発現（CD4⁺CD8⁻と表記）し、キラーT細胞はCD8だけを発現（CD4⁻CD8⁺）しています。

ヘルパーT細胞とキラーT細胞の祖先は、CD4とCD8を共に発現している胸腺細胞で、CD4⁺CD8⁺ダブルポジティブ（DP）胸腺細胞と呼ばれます。これまでの研究から、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）^{*1}と、抗原提示細胞^{*2}上の主要組織適合抗原（MHC）^{*3}によって提示される自己抗原（自己の身体の成分）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、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、I型MHCと反応するTCRを発現する胸腺細胞がCD4の発現を消失してCD4⁻CD8⁺キラーT細胞に分化し、一方でII型MHCと反応するTCRを発現する胸腺細胞がCD8の発現を消失しCD4⁺CD8⁻ヘルパーT細胞に分化することが知られています（図1）。

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^{*4}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。

さて、多細胞生物では、同じ個体の体細胞は皆、「ゲノム」と称される同じ遺伝情報を有していることから、特定の細胞（例えばTリンパ球）への分化は、その分化に必要な遺伝情報を読み取ることによって制御されています。遺伝情報の読み取りとは、つまり遺伝子の発現を調節すること（転写調節とも呼ばれます）です。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は、「マスター分化制御因子」と呼ばれます。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ます。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」とも呼びます。

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なされ、その因子に「Th-POK転写因子」と名が付けられました。この発見で重要なことは、Th-POK転写因子を人為的に強制発現させたマウスでは、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転写因子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たことです。言い換えるならば、MHC拘束性に拘らず、

Th-POK転写因子が発現するかしないかが、DP胸腺細胞の運命を決定する重要な出来事を引き起こす鍵を握っていることが明らかになりました。そこで、次に解決すべき最も重要な問題は、「Th-POK転写因子の発現はどのようにして制御されているか」ということになり、今回の研究成果は、まさにその疑問を解明した画期的な研究成果といえます。

2. 研究手法及び研究成果

上述のように CD4 の発現消失は、キラーT 細胞の分化と関連します。このため、研究チームは、CD4 遺伝子の発現制御機構に注目して研究を行ってきました。遺伝子の発現は、ゲノム上の制御領域の機能によって調節されています。遺伝子の発現を抑制する機能を持つ制御領域は「サイレンサー」と呼ばれ、キラーT 細胞では、CD4 遺伝子上のサイレンサー（CD4 サイレンサー）の機能によって、CD4 の発現が抑制されています。2002 年に、谷内チームリーダーは、CD4 サイレンサーに結合し、そのサイレンサー機能発現に重要な転写因子として「Runx 転写因子」を同定しました（Taniuchi et al. *Cell* 111, 621-633,2002）。このことは、Runx 転写因子が DP 胸腺細胞の分化の運命決定にも何らかの役割を行う可能性を示唆していることとなります。そこで研究チームは、DP 胸腺細胞での Runx 転写因子の機能を調べる目的で、遺伝子操作技術により、DP 胸腺細胞で Runx 転写因子の機能を欠損するマウスを作製し、以下の実験を行いました。

(1) Runx 転写因子を欠損するマウスではキラーT 細胞が消失

驚いたことに、DP胸腺細胞でRunx転写因子を欠損したマウス（Runx変異マウス）では、CD8⁺キラーT細胞がほとんどなくなっていました。研究チームは、その原因を調べるために、Runx変異マウスとII型MHCを欠損するマウスを交配しました。II型MHCを欠損するマウスでは、II型MHCに拘束性を持つT細胞、すなわちヘルパーT細胞は発生せず、CD8⁺キラーT細胞ばかりが発生します。ところがII型MHCを欠損していてもRunx転写因子を欠損すると、CD8⁺キラーT細胞ではなくCD4⁺ヘルパーT細胞だけが発生してきました。このことは、本来ならばCD8⁺キラーT細胞に分化するはずのI型MHCに拘束された胸腺細胞が、その自然な分化運命をねじ曲げられて、逆のCD4⁺ヘルパーT細胞に分化するという、細胞運命の転換が起こっていることを意味します。Runx転写因子を欠損すると、なぜこのような通常ではありえない分化が起こるのでしょうか？

(2) Runx 転写因子は、Th-POK 転写因子の発現抑制に必要

遺伝子操作により Th-POK 転写因子を強制的に発現させたマウスでも、同様な I 型 MHC 拘束性細胞の運命転換が見られることから、研究チームは、Runx 転写因子を欠損しているマウスが Th-POK 転写因子の発現異常を引き起こすかどうかを調べました。Th-POK 転写因子は、通常 DP 胸腺細胞では発現しません。ところが、Runx 転写因子を欠損している DP 胸腺細胞では、40 倍以上の量の Th-POK 転写因子が発現していました。このことは、DP 胸腺細胞では、Runx 転写因子によって、Th-POK 転写因子の発現が、積極的に抑制されていることを示しています。

(3) Th-POK 遺伝子座に Runx 転写因子結合領域を同定

研究チームは次に、Runx転写因子がTh-POK転写因子の発現を抑制するメカニズムの解明に挑みました。Runx転写因子が、直接Th-POKをコードする遺伝子の制御領域に結合することでTh-POK遺伝子の発現を抑制するのでしょうか？それともTh-POK遺伝子の発現異常は、Runx転写因子欠損の2次的な影響なののでしょうか？この疑問に答えるため、研究チームは、クロマチン免疫沈降法(ChIP)^{*5}とDNA chip^{*6}を組み合わせた新たな技術である「ChIP on chip」法を実施して、Th-POK遺伝子上にRunx転写因子が結合する2ヶ所の領域を同定しました。ところが予想に反して、Th-POK遺伝子を発現しているヘルパーT細胞でも、Runx転写因子は、これらの領域に結合していました。つまり、これらの領域へのRunx転写因子の結合は、キラーT細胞に特異的なものではなく、Th-POK遺伝子の発現抑制とは相関しませんでした。そうすると、果たしてこれらのRunx転写因子結合領域はTh-POKの発現制御に本当に重要なのかという疑問が生じます。

(4) Runx 転写因子結合領域にサイレンサー活性を同定

そこで、研究チームは、Runx転写因子結合領域を含むレポーター遺伝子と、Runx転写因子結合領域を欠損するレポーター遺伝子のそれぞれを受精卵に導入したトランスジェニックマウス^{*7}を作製し、Th-POK遺伝子発現制御領域の機能を測定する実験を行いました。その結果、Runx転写因子結合領域を含むレポーター遺伝子は、ヘルパーT細胞だけで発現し、Runx転写因子結合領域を欠損するレポーター遺伝子は、ヘルパーT細胞と本来発現しないはずのキラーT細胞の両方で発現することが判明しました。この結果は、Runx転写因子結合領域に、キラーT細胞でレポーター遺伝子の発現を抑制するサイレンサー活性が存在していることを示します。さらに、このサイレンサーの活性は約562bpの領域に限局していることを突き止めました。研究チームは、このRunx転写因子結合領域を「Th-POKサイレンサー」と命名しました。

これらの結果は、Th-POKサイレンサーがTh-POK遺伝子の発現制御に重要であることを示す十分な証拠ですが、研究チームはこの結果に満足することなく、Th-POKサイレンサーの生理的な機能を確かめるさらなる実験を行いました。

(5) Th-POK サイレンサーはキラーT細胞の分化に必須である

遺伝子操作によって、Th-POKサイレンサーを欠損させたマウスを作製しました。期待通りに、このマウスは、キラーT細胞の欠損、DP細胞でのTh-POK遺伝子の異常発現といったRunx転写因子変異マウスと同様の異常を示しました。これらのことから、キラーT細胞の分化には、Th-POK遺伝子上にあるRunx転写因子に依存的なTh-POKサイレンサーによって、Th-POK転写因子の発現が抑制されることが必須であることを見事に証明した結果となりました。

一連の実験結果から、キラーT細胞の分化過程では、Th-POK転写因子の発現に

端を発するヘルパーT細胞分化プログラムが、積極的に抑制されていることが明確になりました。また、DP胸腺細胞の運命を決定する転写因子ネットワークが、Th-POK転写因子とRunx転写因子の相互作用によって形成されることも判明し（図2）、このことから十数年来不明であったDP胸腺細胞の運命を決定する核内プログラムの解明が飛躍的に進展していくと考えられます。

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、新たなサイレンサー領域を同定し、長らく不明であった胸腺細胞の分化を決定する核内メカニズムを解明したものです。この研究成果をもとに、さらにTリンパ球の分化プログラムを明らかにすることにより、人工的にヘルパーT細胞やキラーT細胞の分化を誘導することや、ヘルパーT細胞とキラーT細胞の機能を併せ持つT細胞を作り出すことが可能と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、免疫疾患の新たな制御法の開発につながると期待できます。

またTh-POKサイレンサーを用いることで、これまでは困難であったヘルパーT細胞特異的な遺伝子発現を誘導することも可能と考えられ、この技術は遺伝子治療といった分野に応用できます。

今後の大きな課題は、Th-POKサイレンサーの機能制御のメカニズムを解明していくことです。おそらく、Th-POKサイレンサーは、II型MHCと反応するTCRからのシグナルを感知していると予想されます。従って、今後、Th-POKサイレンサーの機能制御の分子メカニズムを解明していくことで、胸腺細胞がTCRシグナルの差異を見分けるメカニズムの解明につながることが期待されます。つまり、「自己と非自己」の認識という免疫学の根本的な謎を解くことにつながる糸口となると見込まれます。

(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 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。 $\alpha\beta$ あるいは $\gamma\delta$ 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。

※2 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10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。

※3 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。

※4 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)。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あり、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)。

※5 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、目的のタンパク質が結合しているDNAを検出することができる。

※6 DNA chip

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である。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、ある核内タンパク質がどのゲノム領域と結合しているかを解析するのに極めて有効である。

※7 トランスジェニックマウス

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遺伝子導入して作製した遺伝子操作マウス。導入するDNAにより用途は異なるが、レポーター遺伝子の導入による遺伝子発現制御領域の同定や機能解析には非常に有効な研究手法である。

DP胸腺細胞の運命決定 ヘルパーかキラーか？

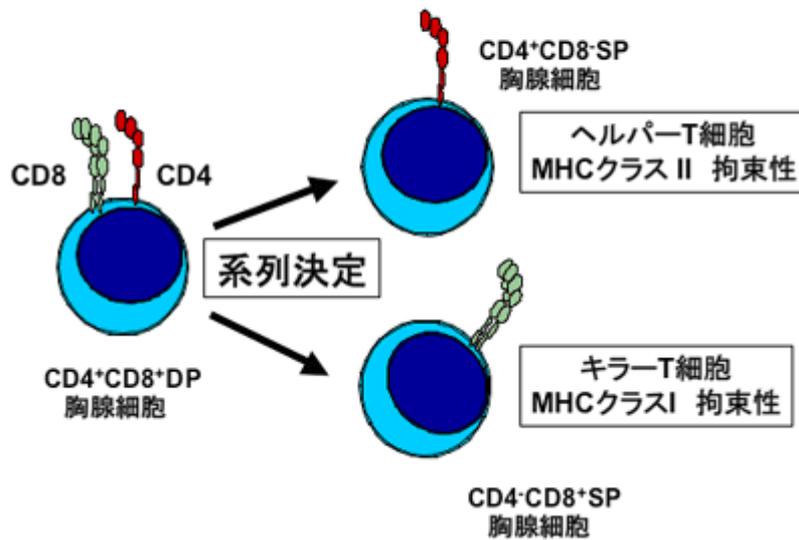


図1 胸腺内でのT細胞系列決定機構とCD4/CD8の発現パターンとMHC拘束性の関係

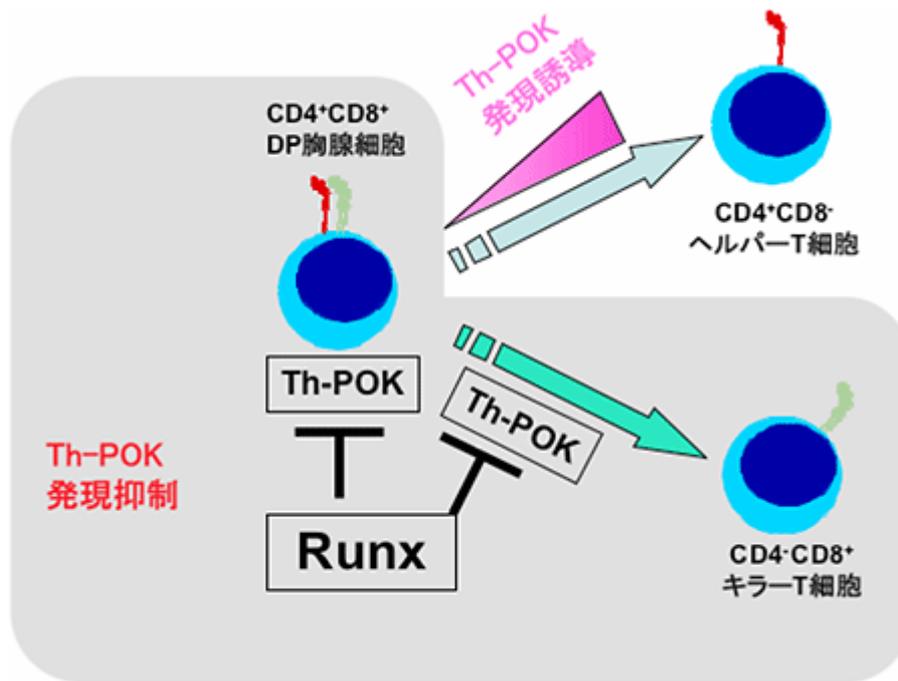


図2 Runx 転写因子による Th-POK 転写因子の発現抑制
(キラーT細胞の分化に必須なメカニズム)

「CD4+CD8+DP胸腺細胞」からキラーT細胞が分化するには、Runx転写因子の機能を介してTh-POK転写因子の発現が抑制されることが必須で、Th-POK転写因子の発現が正常に抑制されないと、キラーT細胞が分化してこない。ヘルパーT細胞が分化するには、Th-POK転写因子の発現抑制機構が解除される必要があると考えられる。