

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：34414

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19687

研究課題名(和文)単細胞遺伝子発現解析による高機能な制御性T細胞の集積を誘導する皮膚炎治療薬の開発

研究課題名(英文) Establishment of skin inflammation drug to accumulate high-functional regulatory T cells by single-cell gene expression analysis

研究代表者

池淵 良洋 (Ikebuchi, Ryoyo)

大阪大谷大学・その他部局等・特別研究員PD

研究者番号：00747529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：光変換蛋白質KikGRを発現するマウスによって同定可能な炎症皮膚に「来た」「留まった」制御性T細胞(Treg)を対象に、シングルセル遺伝子・蛋白質多因子発現解析を行い、異なるTreg機能分子を発現する複数のサブセットを同定した。サブセット間を比較すると、発現する遊走関連分子も、皮膚に「留まる」性質も異なった。機能分子と遊走関連分子の多因子発現解析により、KikGR発現データを用いずに皮膚に「来た」「留まった」Tregを区別した。Tregサブセットの分化責任因子の同定及び炎症皮膚への集積法の樹立も試みた。本研究により、異なる機能分子を発現するTregは異なる炎症組織間遊走を行うことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We identified several regulatory T cell (Treg) subsets in inflamed skin tissue of mouse line expressing photoconvertible protein KikGR, by which we can distinguish skin-coming and -remaining lymphocytes, by multi-parameter single-cell gene and protein expression analysis. Each subset expressed each set of functional and migration-related molecules and showed different capabilities to remain in inflamed skin. We distinguished skin-coming and -remaining Tregs without KikGR expression data by multi-parameter single-cell expression analysis of functional and migration-related molecules. We also tried to identify master molecules of Treg subset differentiation and establish method to collect the Treg subsets. This research suggests that Tregs expressing different functional molecules showed different migration status in inflamed tissues.

研究分野：免疫学

キーワード：制御性T細胞 炎症性皮膚疾患 免疫抑制 シングルセル解析 細胞遊走 KikGRマウス 接触性皮膚炎

1. 研究開始当初の背景

(1)制御性 T 細胞の組織間移動能と免疫抑制能の関係は未解明である 現行よりも効果的な皮膚炎治療法の確立を目指し、抗原特異的に免疫反応を抑制する制御性 T 細胞 (Treg)を用いた免疫抑制法の開発が進められている [Honda et al., J Dermatol Sci, 2011]。Treg による免疫抑制機構には IL-10、CTLA-4 等十種類以上の分子が関わるが、実際の体内で「どの」分子を発現した Treg が「どこの」組織に移動して炎症反応を制御するかという情報は少ない [Campbell et al., Nat Review Immunol, 2011]。従って、組織間を「動く」Treg の機能解明が、免疫制御システムの全貌解明と免疫関連疾患に対する新規治療法の開発に繋がる。

(2)炎症組織からリンパ節に「出て行った」Treg の免疫抑制能は高い

申請者らは、接触性皮膚炎 (CHS) の皮膚から所属リンパ節に「来た」Treg は、リンパ節に「いた」Treg よりも免疫抑制能が高いことを明らかにした [Tomura et al., J Clin Invest, 2010]。さらに、シングルセル遺伝子発現解析を行った結果、皮膚から所属リンパ節に「来た」Treg は、元々リンパ節に「いた」Treg よりも *Il10* 等の機能分子発現細胞が多かったことから、炎症皮膚には高機能 Treg が多いことが示唆された。更なる統計解析及び FCM 解析を行った結果、*Il10* 発現 Treg はその大部分が $CD43^+ CCR5^+$ 細胞であった。さらに、 $CD43^+ CCR5^+$ Treg の中でも、 $CXCR3^-$ Treg に比べ $CXCR3^+$ Treg は *Il10* 発現細胞を二倍以上含んでいた。

2. 研究の目的

実際に皮膚炎を抑制する Treg サブセットの同定及びその遊走を制御する方法の樹立は、Treg を利用した次世代皮膚炎治療法の確立に不可欠である。そのために本研究では、Treg が皮膚炎症の抑制に必要な機能分子発現及び組織間の「動き」の解明、皮膚炎抑制 Treg サブセットの分化機構の解明、組織間の「動き」の制御法の樹立を目的とした。

3. 研究の方法

(1)皮膚への Treg 移入 炎症皮膚の所属リンパ節から Treg サブセットをセルソーターにて分取した。細胞を炎症惹起直前の皮膚に皮内投与し、皮膚の肥厚を経時測定した。

(2)実験動物 $KikGR/Foxp3^{hCD2/hCD52}$ マウスを用いた。 $KikGR$ マウスは、特定の組織に紫光を照射して細胞を赤色にマークすることで細胞の組織間移動を検出できる [Tomura et al., Sci Rep, 2014]。炎症惹起後 2.5 日目の皮膚に紫光を照射し、半日後各解析に用いた。 $Foxp3^{hCD2/hCD52}$ マウスは、ヒト CD2 の細胞表面染色によって、 $Foxp3$ 発現細胞、つまり Treg を検出できる。

(3)シングルセル発現解析

①遺伝子発現解析 C1 と Biomark (Fluidigm 社)を用いて、数百個の Treg 単細胞に対してシングルセルリアルタイム PCR アレイ (scqPCR)を行った。既知の Treg の機能分子及び遊走関連因子等の 96 種類の遺伝子発現を測定した。

②タンパク質発現解析 上記の遺伝子発現で検出された約 15 種類のシングルセルタンパク質発現をスペクトル型サイトメーター SP6800 (SONY 社)を用いたフローサイトメトリー法 (FCM) で測定した。

③データ解析 上記の遺伝子・タンパク質発現解析の多次元データの Visualization と統計解析は、統計ソフトウェア R で行った。また、上流因子解析はデータベース KeyMolnet (KM データ社)によって行った。

(4)皮膚へのケモカイン投与 親水性パッチに CCL4 等のケモカインを含ませ、炎症惹起直後の皮膚に 12 時間貼付けて、ケモカインを経皮投与した。

4. 研究成果

(1)皮膚炎抑制 Treg サブセットの同定

Treg は所属リンパ節から炎症皮膚に遊走することから [Tomura et al., J Clin Invest, 2010]、*Il10* 遺伝子発現が高い $CD43^+ CCR5^+ CXCR3^+$ または $CXCR3^-$ Treg を (図 1a) 炎症皮膚に細胞移入して、*in vivo* における炎症抑制能を検討した。その結果、 $CXCR3^-$ Treg のみ顕著に炎症を抑制した (図 1b)。 $CXCR3$ がケモカイン受容体であることより、異なる炎症抑制能の原因は炎症皮膚における遊走能が異なるため、という仮説を立てた。FCM 解析の結果、 $CXCR3^+$ Treg と比較して、 $CXCR3^-$ Treg の方が皮膚向性のケモカイン受容体である $CCR4$ と $CCR8$ の発現が高く、炎症皮膚に「留まった」細胞が多かった (図 1c)。これらの結果は、せつかくの「機能」を持つ Treg (ここでは $CD43^+ CCR5^+ CXCR3^+$ Treg) も炎症局所での抑制機能発現には、「動き」の概念、「留まる」ことが重要であることが示唆された。

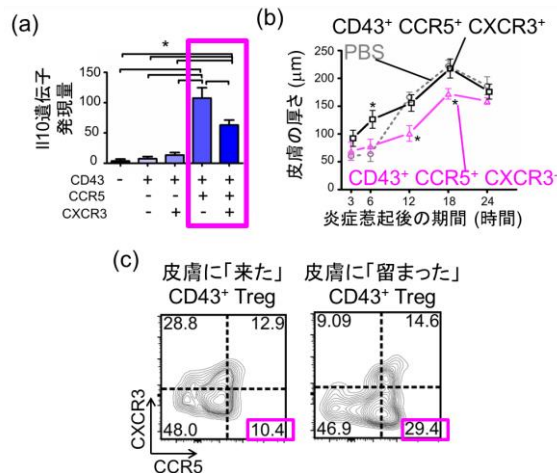


図1.皮膚炎抑制Tregサブセットの同定

(2)炎症皮膚における機能分子高発現 Treg サブセットの同定 炎症皮膚から所属リンパ節に「来た」Treg は免疫抑制能が高かったことから[Tomura et al., J Clin Invest, 2010]、炎症皮膚における高機能サブセットの同定を試みた。炎症皮膚 Treg の scqPCR 及び FCM を行った結果、機能分子 CD39 と Nrp1 との発現が逆相関を示した(図 2)。また、IL-10 や GzmB、CD25 等の機能分子発現は、CD39 と正の相関、Nrp1 と負の相関を示したことより、主に IL-10、CD39 等を発現するサブセットと neuropilin-1 (Nrp1)を発現するサブセットがあることが示唆された。

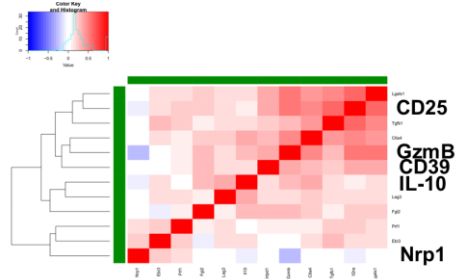


図2. 炎症皮膚Tregにおける機能分子の遺伝子発現の相関解析

(3)機能分子高発現 Treg サブセットの分化機構の解明 強力な免疫抑制サイトカインである IL-10 を発現する CD39 発現サブセットの分化責任因子の同定を試みた。scqPCR データに対して上流因子解析を行った結果、Ets1 が CD39、IL-10 等の分化責任因子の候補として挙がった。炎症皮膚 Treg における Ets1 の発現解析を行った結果、CD39 発現サブセットでの高発現及び Nrp1 発現サブセットでの低発現を確認した。その後、Ets1 発現制御による機能解析に着手したが、発現制御に必要な T 細胞活性化によって Ets1 の発現が消失すること、及び、胎生致死によって一定数の Ets1 ノックアウトマウスの入手が困難であったことより、機能解析を断念した。

(4)高機能Tregサブセットを皮膚に「留める」集積法の確立 KikGR マウスを用いた解析の結果、Nrp1 発現サブセットと比較して CD39 発現サブセットの方が炎症皮膚において少数であるものの、「留まった」細胞の割合は多かった。本データより、IL-10 を発現する CD39 発現サブセットを炎症皮膚に「留めて」皮膚炎を抑制するという Treg 集積法の樹立を試みた。まず、scqPCR 及び FCM により、遊走関連因子 CCR5 等の発現は CD39 発現に対して正の相関を、Nrp1 発現に対して負の相関を示した。次に、CCR5 のリガンドである CCL4 を炎症皮膚に投与した結果、一部の個体では炎症抑制効果が確認されたものの、一部の個体では全く効果が認められなかった。現在は、効果の安定のために、投与条件の検討を行っている。

(5)炎症皮膚に「留まった」・「来た」Treg の分離法 CCR5 の他にも scqPCR 及び FCM によって、CD39 発現または Nrp1 発現に相関する遊走関連因子が多数同定された。そこで、CD39 発現に相関する機能分子と遊走関連因子、及び、Nrp1 発現に相関する遊走関連因子のシングルセル多次元発現データによって「留まった」Treg と「来た」Treg の分離を試みた。まず、CD39、CCR5、Nrp1 等 8 種類の機能分子と遊走関連因子の多重染色 FCM データを得た。抗体に標識する蛍光色素の検討によって、各蛍光色素間で相互に漏れ込みがほばない状態のデータを得た。次に、KikGR 発現情報を抜いたデータを主成分解析した結果、炎症皮膚に「来た」及び「留まった」Treg をおおまかに分離することに成功した(図 3)。

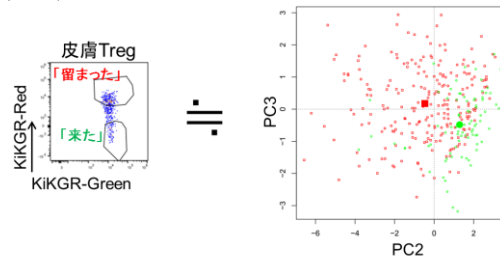


図3. 機能分子・遊走関連因子の多次元発現データによる炎症皮膚に「留まった」「来た」Tregの分離

以上の解析によって、Treg は CD39 と Nrp1 等の発現によって、異なる「機能と動き」の heterogeneity を持つことが示唆された。本研究成果は、今後の Treg 制御法開発に向けた基盤情報として貢献する。今後は、CCR5 抑制剤等による Treg の「動き」の操作によって皮膚 Treg の機能増強と炎症抑制が可能か検討していきたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① **池淵良洋**「制御性 T 細胞の機能と「動き」のシングルセル解析」、『細胞』、Volume 49 Issue6、pp50-53、2017 年、査読有り、http://www.hokuryukan-ns.co.jp/magazines/04cell/cell2017_05r.html
- ② **R. Ikebuchi**, S. Teraguchi, A. Vandenbon, T. Honda, F. H. W. Shand, Y. Nakanishi., T. Watanabe and M. Tomura. 「A rare subset of skin-tropic regulatory T cells expressing *Il10/Gzmb* inhibits the cutaneous immune response」、『Scientific Reports』、Volume 6、pp35002、2016 年、査読有り、10.1038/srep35002

[学会発表] (計 2 件)

- ① **R. Ikebuchi**, S. Teraguchi, A. Vandenbon, Y. Nakanishi., T. Moriya, H. Okuyama, Y. Kusumoto, T. Honda and M. Tomura. 「Single-cell gene & protein expression analysis revealed unique functional subsets of regulatory T cells」、『International

Conference on Single Cell Research 2016』、
2016年11月17日、東京大学(東京都・
文京区)

- ② **R. Ikebuchi**, Y. Nakanishi., T. Moriya, H. Okuyama, Y. Kusumoto, T. Honda and M. Tomura. 「Single-cell gene expression analysis revealed that CD43⁺ CCR5⁺ Treg cells are a main subset of *Il10* gene-expressing cells in contact hyper sensitivity model」、『第44回日本免疫学会学術集会』、2015年11月18日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

〔図書〕(計1件)

- ① **池淵良洋** 「フローサイトメトリー実験 Q&A100 (Q29, 31,32,42 を担当)」、『実験医学別冊』、脱稿済み編集中、2017年

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

池淵 良洋 (IKEBUCHI, Ryoyo)

大阪大谷大学・その他部局等・日本学術振興会特別研究員 PD

研究者番号：00747529

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

戸村 道夫 (TOMURA, Michio)

大阪大谷大学・薬学部・教授

研究者番号：30314321

楠本 豊 (KUSUMOTO, Yutaka)

大阪大谷大学・薬学部・准教授

研究者番号：40252689

守屋 大樹 (MORIYA, Taiki)

大阪大谷大学・薬学部・助教

研究者番号：30759759

寺口 俊介 (TERAGUCHI, Shunsuke)

東北大学・東北メディカルメガバンク機構・助教

研究者番号：00467276

Alexis Vandebon

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・助教

研究者番号：60570140

中山 隆志 (NAKAYAMA, Takashi)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：60319663

松尾 一彦 (MATSUO, Kazuhiko)

近畿大学・薬学部・講師

研究者番号：70615921