

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16601

研究課題名(和文) 制御性T細胞に固有の非リンパ組織集積機構の解明

研究課題名(英文) Elucidating the mechanisms of effector differentiation and tissue accumulation of regulatory T cells

研究代表者

村上 龍一 (Murakami, Ryuichi)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・特任助教

研究者番号：60800505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子BATFとFoxp3の協調による活性化型制御性T細胞(eTreg)分化・増殖・組織集積機構の解明に取り組んだ。結果、転写因子BATFとFoxp3の協調による eTreg分化・増殖・組織集積促進にT細胞受容体(TCR)シグナルが必須であることを明らかにした。また転写因子BATFとFoxp3は協調的にeTreg選択的に発現する遺伝子、特にリソソーム関連遺伝子の発現を亢進することを示した。以上から、BATFとFoxp3はTCRシグナルの下流で協調してリソソーム活性を亢進し不要たんぱく質蓄積を抑制し細胞ストレスを緩和することで、eTreg分化・増殖・組織集積を亢進する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Foxp3が免疫抑制能を有する制御性T細胞に選択的に発現する分子であることから、我々が本研究で明らかにしたBATFとFoxp3の協調による活性化型制御性T細胞分化・増殖・組織集積促進の分子基盤を制御することで、制御性T細胞のみを選択的に活性化もしくは抑制し様々な疾患治療に役立てることができると思われる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the molecular mechanism of BATF/Foxp3-mediated effector Treg cell differentiation, proliferation and tissue accumulation. We demonstrated that T cell receptor (TCR) signal was essential for BATF/Foxp3-mediated effector Treg cell differentiation, proliferation and tissue accumulation both in vitro and in vivo. Besides, we identified BATF/Foxp3 co-target genes which were highly expressed on effector Treg cells and were associated with lysosome pathway. Thus, it was suggested that BATF cooperates with Foxp3 under TCR signal and promote effector Treg cell differentiation, proliferation and tissue accumulation presumably through activation of lysosome pathway.

研究分野：免疫学

キーワード：制御性T細胞 Foxp3 BATF T細胞受容体

1. 研究開始当初の背景

転写因子 Foxp3 を発現する制御性 T 細胞 (regulatory T cell, Treg) は過剰な免疫応答を抑制することで生体の恒常性維持に寄与する。Treg は免疫応答を亢進する通常型 T 細胞 (conventional T cell, Tconv) と同様に抗原刺激による T 細胞受容体 (T cell receptor, TCR) シグナルに応じて増殖し、2 次リンパ組織を巡回する CCR7^{high}CD44^{low} ナイブ型 Treg から非リンパ組織に主に集積する CCR7^{low}CD44^{high} エフェクター型 Treg (eTreg) に分化する。近年、この eTreg 分化・増殖や組織への集積が障害されると組織炎症や異常な組織修復、代謝異常が生じることが示され、組織に集積した eTreg は組織の恒常性維持に重要な役割を果たすことが明らかにされた (Panduro, Annu Rev Immunol, 2016)。このことから eTreg 分化・増殖・組織集積を制御することで組織に生じる様々な疾患の治療が可能になると思われる。そして、eTreg 分化・増殖・組織集積機構について精力的な研究が行われ、eTreg 分化・増殖・組織集積を制御する転写因子群 (BATF, IRF4 など) が明らかにされてきた (Hayatsu, Immunity, 2017; Sharma, Front Immunol, 2018)。しかしながら、これまで解明されてきた eTreg 分化・増殖・組織集積機構は、Treg に固有のものではなく、Tconv にも共通してみられる機構であった。炎症を亢進する Tconv と抑制する Treg の両者に共通する組織集積機構を操作することで組織の疾患治療を実現することは難しく、Treg に固有のエフェクター分化・増殖・組織集積機構の解明が強く望まれている。一方、現在でも尚、Tconv にはない Treg に固有のエフェクター分化・増殖・組織集積機構が存在するのか、存在するのであれば、それはどのようなものかは明らかでない。

2. 研究の目的

申請者はこれまで転写因子 BATF が eTreg 分化・増殖・組織集積に必須であることを明らかにしてきた (Hayatsu, Immunity, 2017)。さらに、Treg における BATF の機能解析の過程で、BATF が Treg 固有の転写因子 Foxp3 と機能的に協調し eTreg 分化・増殖・組織集積を促進することを明らかにした。Foxp3 が Treg 固有の転写因子であることから、この BATF と Foxp3 の協調による eTreg 分化・増殖・組織集積促進機構はこれまで明らかでなかった Treg に固有のエフェクター分化・増殖・組織集積機構であることが強く示唆される。この機構の解明は、Treg 選択的な組織集積制御による様々な組織疾患治療に繋がる重要な課題である。そのため、本研究では、BATF と Foxp3 の協調による eTreg 分化・増殖・組織集積促進機構の詳細の解明を目指した。具体的には、(1) BATF と Foxp3 が協調して eTreg 分化・増殖・組織集積を促進するために必要な生体内の環境要因の同定、(2) eTreg 分化・増殖・組織集積に寄与しうる BATF と Foxp3 の標的遺伝子群の同定とその機能推定、(3) BATF と Foxp3 の標的遺伝子群の発現制御機構の解明に取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) BATF と Foxp3 が協調して eTreg 分化・増殖・組織集積を促進するために必要な生体内の環境要因の同定

これまで eTreg 分化に TCR シグナルが重要であること、転写因子 BATF は TCR シグナルの下流で活性化し働くことが知られていた (Levine, Nat Immunol, 2014; Iwata, Nat Immunol, 2017)。このことから BATF と Foxp3 の協調による eTreg 分化・増殖・組織集積促進に TCR シグナルが必要である可能性を考え、これを *in vivo* で検証した。具体的には、卵白アルブミン (OVA) 特異的な TCR を有する OTHI トランスジェニック Rag1 欠損マウスと BATF 欠損マウスを掛け合わせたマウスから取得した Foxp3 陰性ナイブ型 Tconv に BATF と Foxp3 の両方もしくは単独をレトロウイルスにより導入し、congenic マウスに移入した。そして、ホストマウスに OVA を経鼻投与する・しない群を作製し、OVA 投与群 (TCR シグナル存在下) で BATF と Foxp3 の協調による eTreg 分化・増殖・組織集積促進が見えるか、OVA 非投与群 (TCR シグナル非存在下) で BATF と Foxp3 の協調による eTreg 分化・増殖・組織集積が見えないかを検証した。

また、*in vitro* においても BATF と Foxp3 が協調して eTreg 分化・増殖を促進するために、TCR シグナルが重要であるか検証した。具体的には、BATF 欠損マウスから取得した Foxp3 陰性ナイブ型 Tconv に BATF と Foxp3 の両方もしくは単独をレトロウイルスにより導入し、抗 CD3 抗体で TCR 刺激を行う・行わないの 2 条件で培養し、TCR 刺激存在下のみで BATF と Foxp3 の両者を導入した群における eTreg 選択的な分子や細胞増殖が促進されるかを検証した。

(2) eTreg 分化・増殖・組織集積に寄与しうる BATF と Foxp3 の標的遺伝子群の同定とその機能推定

BATF と Foxp3 の標的遺伝子を同定するため、(1) で構築した TCR 刺激存在下で BATF・Foxp3 の共導入により eTreg 特徴的な分子の発現・増殖が亢進する *in vitro* 実験系において、TCR 刺激を与えた BATF と Foxp3 の両者、BATF 単独、Foxp3 単独、空ベクター導入

ナイーブ Tconv の RNA-seq 解析を行った。

また *in vivo* の eTreg 分化・増殖に寄与する Foxp3 の標的遺伝子を同定するため、以下の実験系でも RNA-seq 解析を行った。申請者はこれまで Foxp3 機能欠損変異体である Foxp3^{R397W} を発現する Treg に野生型 Foxp3 もしくは Foxp3^{R397W} を強制発現し、lymphopenia のマウス (6Gy の X 線を照射した congenic マウス) に移入した場合、野生型 Foxp3 導入群で Foxp3^{R397W} 導入群と比べ、eTreg 特徴的な分子発現および増殖が顕著に亢進することを明らかにしていた。この実験系において、野生型 Foxp3 導入群、Foxp3^{R397W} 導入群をホストマウスから単離し、RNA-seq 解析を行った。

(3) BATF と Foxp3 の標的遺伝子群の発現制御機構の解明

これまで BATF はクロマチン状態を変化させることで遺伝子発現を調節している可能性が示唆されている (Pham, Cell Rep, 2019)。また、Foxp3 はひらいたクロマチン領域に結合し機能することが示唆されている (Samstein, Cell, 2012)。このことから、BATF が eTreg 特徴的なオープンクロマチン領域を形成し、そこに Foxp3 が結合することで BATF と Foxp3 は協調して eTreg 特徴的に発現する標的遺伝子を制御しているのではないかと考え、これを検証した。まず、eTreg 特徴的な遺伝子 (eTreg で他の T 細胞サブセットと比べ発現が高い遺伝子) が eTreg 選択的なオープンクロマチン領域 (eTreg で他の T 細胞サブセットと比べより accessible な領域) と関連するかについて、eTreg、ナイーブ型 Treg、エフェクター型 Tconv (Teff)、ナイーブ型 Tconv の 4 者の RNA-seq・ATAC-seq データを解析することで検証した。次に、BATF 依存的な eTreg 特徴的な遺伝子近傍の eTreg 特徴的なオープンクロマチン領域に BATF が結合し、それらをひらくかについて野生型 Treg、BATF 欠損 Treg の RNA-seq・ATAC-seq・BATF ChIP-seq データを解析することで検証した。さらに、BATF 依存的な eTreg 特徴的なオープンクロマチン領域に Foxp3 が結合しているかを検証するため、野生型 Treg、eTreg、ナイーブ型 Treg における Foxp3 ChIP-seq データを解析した。

4. 研究成果

(1) BATF と Foxp3 が協調して eTreg 分化・増殖・組織集積を促進するために必要な生体内の環境要因の同定

BATF と Foxp3 の協調による eTreg 分化・増殖・組織集積促進に TCR シグナルが必要かについて検証するため、BATF 欠損 OTII トランスジェニック Rag1 欠損マウスより取得した Foxp3 陰性ナイーブ型 Tconv に BATF と Foxp3 の両方もしくは単独をレトロウイルスにより導入し、cell proliferation dye でラベルした後、congenic マウスに移入した。そして OVA もしくは PBS をホストマウスに経鼻投与し 5 日後に肺のドナー T 細胞の表現型を解析した。その結果、OVA を投与したマウスにおいて、BATF 単独導入群では対照群 (空ベクターのみ導入群) と比べてドナー T 細胞の有意な細胞数増加、eTreg 特徴的な分子である CCR8 や ST2 を発現する分裂したドナー T 細胞の増加傾向が見られた。また、BATF と Foxp3 の共導入群では BATF 単独導入群と比べてこれらの指標がさらに有意に亢進した。一方、Foxp3 単独導入群におけるこれらの指標は対照群と同程度であった。また、OVA を投与していないマウスにおいては、この Foxp3 と BATF の協調による細胞増加、eTreg 特徴的な分子の発現亢進は観察されなかった。以上の結果から、*in vivo* において BATF と Foxp3 が協調して eTreg 分化・増殖・組織集積を促進するためには TCR シグナルが必要であることが示唆された。

次に、*in vitro* においても、BATF と Foxp3 が協調して eTreg 分化・増殖を促進するために TCR シグナルが必要かを検証した。具体的には、BATF 欠損マウスから取得した Foxp3 陰性ナイーブ型 Tconv に BATF と Foxp3 の両方もしくは単独をレトロウイルスにより導入し、固相化抗 CD3 抗体存在もしくは非存在下で 5 日間培養し、継時的にレトロウイルス導入 T 細胞数の変化を調べた。結果、固相化抗 CD3 抗体存在下で培養した場合、BATF と Foxp3 の両者を導入したナイーブ Tconv は TCR 刺激 1 日後に減少した後培養 5 日目まで継時的に増える一方、BATF と Foxp3 のどちらか片方を導入したナイーブ Tconv および対照群 (空ベクターのみ導入群) は TCR 刺激 1 日後に減少した後培養 5 日目まで継時的にほとんど増えなかった。さらに、TCR 刺激 5 日後の BATF・Foxp3 共導入群では他の群と比べて CD103、ST2 などの eTreg 特徴的な分子の発現が上昇していることが示された。一方、固相化 CD3 非存在下で培養した場合、BATF と Foxp3 の両者を導入した群、単独で導入した群、対照群全てで培養 5 日後でも細胞数は減少したままであり、eTreg 特徴的な分子の発現はほとんど見られなかった。以上の結果から、*in vitro* において BATF と Foxp3 が協調して eTreg 分化・増殖を亢進するためには TCR シグナルが必要である可能性が示された。

(2) eTreg 分化・増殖・組織集積に寄与する BATF と Foxp3 の標的遺伝子群の同定とその機能推定

BATF と Foxp3 の標的遺伝子を同定するため、(1) で構築した TCR 刺激存在下で BATF・Foxp3 の共導入により eTreg 特徴的な分子の発現・増殖が亢進する *in vitro* 実験系において、TCR 刺激を与えた BATF と Foxp3 の両者、BATF 単独、Foxp3 単独、空ベクター導入ナイーブ Tconv の RNA-seq 解析を行った。その結果、BATF と Foxp3 の両者を導入した群に

おいてのみ、他の実験群と比べて大きく発現亢進する遺伝子群が同定され、その中に *Il1rl1*、*Itgae* などの eTreg 選択的に発現する遺伝子が含まれることが明らかとなった。さらに、BATF と Foxp3 の両者を導入した群においてその他の実験群と比べて大きく発現亢進する遺伝子群について Gene Ontology 解析を行ったところ、これらの遺伝子群にリソソーム関連遺伝子が多く含まれていることも示された。以上の結果から、*in vitro* の TCR 刺激存在下で BATF と Foxp3 は協調的に eTreg 特徴的な遺伝子、特にリソソーム関連遺伝子の発現を亢進することが示唆された。

また *in vivo* の eTreg 分化・増殖に寄与する Foxp3 の標的遺伝子を同定するため、Foxp3^{R397W} を発現する Treg に野生型 Foxp3 もしくは Foxp3^{R397W} を強制発現し lymphopenia のマウスに移入し、5 日後に単離したドナー Treg の RNA-seq 解析を行った。その結果、野生型 Foxp3 を導入した群で Foxp3^{R397W} を導入した群と比べ発現亢進する遺伝子の中に *Ccr8*、*Il1rl1*、*Itgae* などの eTreg 選択的に発現する遺伝子が含まれることが明らかとなった。さらに、野生型 Foxp3 導入群で Foxp3^{R397W} 導入群と比べて有意に発現亢進する遺伝子群について Gene Ontology 解析を行ったところ、これらの遺伝子群にリソソーム関連遺伝子が多く含まれていることも示された。以上の結果から、Foxp3 は *in vivo* において eTreg 特徴的な遺伝子、特にリソソーム関連遺伝子発現を亢進することが示唆された。

(3) BATF と Foxp3 の標的遺伝子群の発現制御機構の解明

BATF が eTreg 特徴的なオープンクロマチン領域を形成し、そこに Foxp3 が結合することで BATF と Foxp3 は協調して eTreg 特徴的に発現する標的遺伝子を制御しているという仮説を検証した。まず、eTreg 特徴的な遺伝子 (eTreg で他の T 細胞サブセットと比べ発現が高い遺伝子) が eTreg 選択的なオープンクロマチン領域 (eTreg で他の T 細胞サブセットと比べより accessible な領域) と関連するかについて、eTreg、ナイーブ型 Treg、エフェクター型 Tconv (Teff)、ナイーブ型 Tconv の 4 者の RNA-seq・ATAC-seq データを解析することで検証した。結果、eTreg 特徴的な遺伝子近傍には eTreg 選択的なオープンクロマチン領域が、Teff と eTreg で共通してみられるオープンクロマチン領域や Teff 選択的なオープンクロマチン領域よりも多く存在することが明らかとなった。次に、BATF 依存的な eTreg 特徴的な遺伝子近傍の eTreg 特徴的なオープンクロマチン領域に BATF が結合し、これらの領域をよりひらくかについて野生型 Treg、BATF 欠損 Treg の RNA-seq・ATAC-seq・BATF ChIP-seq データを解析することで検証した。結果、BATF 依存的な eTreg 特徴的な遺伝子近傍の eTreg 特徴的なオープンクロマチン領域の 4 割程度に BATF が結合すること、BATF が結合する eTreg 特徴的なオープンクロマチン領域の accessibility は BATF 欠損によって有意に低下することが示された。さらに、BATF 依存のかつ eTreg 特徴的なオープンクロマチン領域に Foxp3 が結合しているかを検証するため、野生型 Treg、eTreg、ナイーブ型 Treg における Foxp3 ChIP-seq データを解析した。結果、BATF 依存のかつ eTreg 特徴的なオープンクロマチン領域には Teff と eTreg で共通してみられるオープンクロマチン領域と比べ Foxp3 の結合が多くみられること、また、この Foxp3 結合は eTreg で顕著にみられることが明らかとなった。以上の結果から、BATF は eTreg 特徴的な遺伝子近傍に存在する eTreg 選択的なオープンクロマチン領域をひらき、そこに Foxp3 が結合することが明らかとなった。

本研究により、BATF と Foxp3 が協調的に eTreg 分化・増殖・組織集積を促進するためには TCR シグナルが必要であることが示された。また、BATF と Foxp3 は協調的に eTreg 特徴的な遺伝子、特にリソソーム関連遺伝子の発現を亢進することが示された。さらに、BATF は eTreg 選択的なオープンクロマチン領域の accessibility を亢進すること、Foxp3 はその BATF 依存のかつ eTreg 選択的なオープンクロマチン領域に結合することが明らかとなった。今後は、BATF と Foxp3 が協調的に制御する遺伝子が実際に eTreg 分化・増殖・組織集積に寄与するかについて検証を進めたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Arata Yoshiyuki, Watanabe Ayaka, Motosugi Ryo, Murakami Ryuichi, Goto Tsuyoshi, Hori Shohei, Hirayama Shoshiro, Hamazaki Jun, Murata Shigeo	4. 巻 24
2. 論文標題 Defective induction of the proteasome associated with T cell receptor signaling underlies T cell senescence	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 801 ~ 813
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12728	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hori Shohei, Murakami Ryuichi	4. 巻 33
2. 論文標題 The adaptability of regulatory T cells and Foxp3	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 803 ~ 807
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxab045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松浦 宏大, 木村 翔彦, 宮尾 貴久, 村上 龍一, 堀 昌平
2. 発表標題 転写因子BATF発現増強によりIL-18R陽性エフェクター型制御性T細胞が選択的に増加する
3. 学会等名 第20回東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川越 紗, 織田 舞桜里, 宮尾 貴久, 加藤 貴子, 村上 龍一, 堀 昌平
2. 発表標題 転写因子Foxp3変異体機能解析から制御性T細胞による炎症抑制メカニズムに迫る
3. 学会等名 第20回東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大崎 真莉菜, 船津 翔太郎, 川上 英良, 加藤 貴子, 村上 龍一, 中島 啓, 堀 昌平
2. 発表標題 転写因子Foxp3によるTSDR脱メチル化非依存的な自己転写促進
3. 学会等名 第20回東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阿曾 直文, 村上 龍一, 堀 昌平
2. 発表標題 制御性T細胞はTh2分化を段階的に制御してアレルギー性炎症を抑制する
3. 学会等名 第20回東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原 邦穂, 村上 龍一, 堀 昌平
2. 発表標題 転写因子Foxp3とBATFは協調的に制御性T細胞の活性化誘導細胞死を抑制しエフェクター分化を促進する
3. 学会等名 第20回東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryuichi Murakami, Wataru Ise, Tomohiro Kurosaki, Shohei Hori
2. 発表標題 Foxp3 promotes T cell receptor-dependent effector differentiation and tissue accumulation of Treg cells through functional cooperation with BATF
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 魏 宇熙, 船津 翔太郎, 村上 龍一, 中島 啓, 堀 昌平
2. 発表標題 Foxp3導入T細胞は生体内でTreg様のエピゲノムと遺伝子発現を獲得し、抑制機能を発現する
3. 学会等名 第30回 KTCC
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 星谷 圭徹, 村上 龍一, 堀 昌平
2. 発表標題 制御性T細胞の組織選択的なクローン欠損が自己免疫疾患の標的組織選択性を規定しうる
3. 学会等名 第30回 KTCC
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryuichi Murakami, Shohei Hori
2. 発表標題 Foxp3 changes its genomic binding sites following BATF-dependent effector differentiation of Treg cells
3. 学会等名 第50回 日本免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naofumi Aso, Ryuichi Murakami, Akira Nakajima, Shohei Hori
2. 発表標題 Regulatory T cells regulate Th2 differentiation in two steps to suppress allergic inflammation
3. 学会等名 第50回 日本免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Suzu Kawagoe, Maori Oda, Ryuichi Murakami, Shohei Hori
2. 発表標題 Foxp3A384T mutation impairs T cell receptor-stimulation dependent proliferation of regulatory T cells independently of Batf repression
3. 学会等名 第50回 日本免疫学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 村上龍一、堀昌平	4. 発行年 2019年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 7
3. 書名 臨床免疫・アレルギー科 T細胞受容体刺激によるエフェクター制御性T細胞分化・非リンパ組織への集積機構	

1. 著者名 村上 龍一, 堀 昌平	4. 発行年 2022年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 7
3. 書名 臨床免疫・アレルギー科: T細胞受容体シグナルによる制御性T細胞の分化と機能の制御	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------