

令和 4 年 6 月 2 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：19K16684

研究課題名（和文）制御性T細胞の系列安定性を規定する細胞内代謝メカニズムの解明

研究課題名（英文）The cellular metabolism regulates the differentiation of the regulatory T cells by their epigenetic modification

研究代表者

中島 啓 (Nakajima, Akira)

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・助教

研究者番号：80771196

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Foxp3を発現した制御性T細胞(Treg)は広範な免疫抑制機能を示し、自己免疫寛容と免疫恒常性の維持に必須である。Tregが安定的なFoxp3発現を示すためには、Foxp3遺伝子座のTreg特異的DNA脱メチル化領域(TSDR)が脱メチル化を受けることが必要である。本研究はin vitroでナイーブT細胞からT細胞受容体(TCR)刺激を加えることで誘導されるiTregのTSDR脱メチル化に重要なTCRシグナルと細胞内代謝経路の同定を目指した。その結果、TCR刺激の強さ依存的に細胞内代謝に重要な役割を担っているmTORC1が活性化し、TSDR脱メチル化が亢進することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Tregは様々な免疫応答を抑制することから、アレルギー疾患や移植片拒絶反応など過剰な免疫応答を抑えるツールとして、養子移入療法への適用が期待されている。その1つとして試験管内で誘導されたiTregの利用が試みられているが、iTregはTSDRのDNA脱メチル化が不完全であり安定的なFoxp3発現を示さず、治療応用の大きな障壁となっている。したがってTSDR脱メチル化機構の解明は、iTregを用いた治療応用のために必須の課題である。

本研究結果により、Tregエピゲノム形成の分子機構解明のみならず、Tregを用いた治療応用という面からも非常に学術的・社会的に意義の深い研究になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The regulatory T (Treg) cells, which expressed transcription factor Foxp3, shows an extensive immunosuppressive functions and is essential for maintaining self-tolerance and immune homeostasis. Commitment to Treg cells lineage is prescribed integrally by not only inducing Foxp3 expression but also acquiring the demethylation of Treg cell-specific epigenetic signature genes, designated the TSDR. However, there is no fixed observation about the states of TSDR demethylation in in vitro induced Foxp3+ T (iTreg) cells. Here we have shown prolonged and strong T cell receptor (TCR) stimulation promote the TSDR demethylation in iTreg cells, which correlate well with increasing their Foxp3 stabilization and the suppressive activity. Moreover, prolonged TCR stimulation exhibit the persistent activity of the mTORC1 signaling which takes an important role on the cellular metabolism, and the inhibition of this signaling pathway decreases the degree of TSDR demethylation.

研究分野：免疫学

キーワード：制御性T細胞 系列安定性 DNA脱メチル化 細胞内代謝 TCR

1. 研究開始当初の背景

転写因子 Foxp3 を発現した制御性 T 細胞 (Treg) は広範な免疫抑制機能を示し、自己免疫寛容と免疫恒常性の維持に必須の役割を担っている。これまでに Treg への運命決定は Foxp3 発現の有無だけではなく、Foxp3 遺伝子座の Treg-specific demethylation region[TSDR]と呼ばれる発現制御領域の DNA 脱メチル化により制御されることが分かってきた。しかしながら、現時点でこのエピゲノム形成の分子基盤はほとんど明らかにされていない。そのため、例えば試験管内 (*in vitro*) でナイーブ T 細胞から T 細胞受容体 (TCR) 刺激とサイトカイン TGF- β を与えることで誘導される *in vitro* 誘導性 Treg (iTreg) の培養系において、TSDR 脱メチル化を獲得した iTreg を誘導することが出来ず、Treg を用いた細胞療法にとって大きな障害となっている。したがって、Treg 系列安定性を規定する制御システムを解明することは、変動する環境下においても適切に機能して自己寛容と免疫恒常性を維持している Treg という細胞系列がどのようにして作られているのか、という本質的な問いに答えることのみならず、さまざまな疾患の治療に用いることのできる抗原特異的 Treg を *in vitro* で安定的に誘導・制御する方法の開発に繋がることが期待される重要な研究課題と考えられる。

上記研究課題に対して、我々の研究室では特に TCR 刺激と細胞内代謝に着目して研究を進めており、これまでに TCR 刺激依存的な細胞内代謝リプログラミングが TSDR 脱メチル化制御に寄与しているという独自の知見を得ている。

2. 研究の目的

本研究は、Treg エピゲノム形成に重要な TCR 刺激依存的な代謝経路を明らかにし、その分子メカニズムを解明することを目的とした。

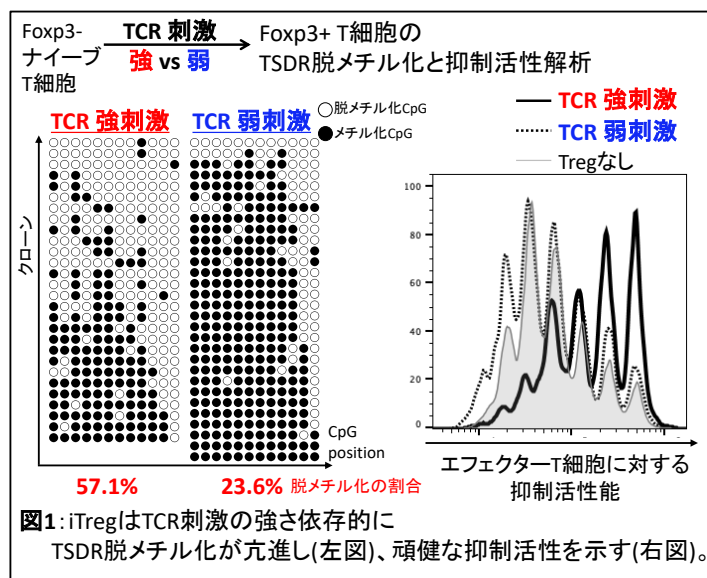
3. 研究の方法

ナイーブ T 細胞から *in vitro* で TGF- β 存在下で TCR 刺激を与えることで Foxp3 発現を誘導させる iTreg (*in vitro*-induced Treg) の培養系で、TCR 刺激の強さや持続時間、各代謝経路阻害剤などを添加した時の、Foxp3 発現誘導と TSDR 脱メチル化と Foxp3 発現の安定性を評価した。

4. 研究成果

(1) TCR 刺激の強さ及び長さ依存的に TSDR 脱メチル化と Foxp3 発現の安定性が亢進する

ナイーブ T 細胞から iTreg を分化させる際に TCR 刺激の強さと持続時間を変化させて培養した結果、Foxp3 発現誘導そのものには大きな影響は認められなかったものの、TSDR 脱メチル化とそれに伴う Foxp3 発現の安定性が TCR 刺激の強さ依存的かつ TCR 刺激の持続時間依存的に大きく亢進することが分かった (図 1)。また、その時に誘導された Foxp3 陽性細胞の *in vitro* 抑制活性を検証したところ、TSDR 脱メチル化と相関して、TCR 刺激の強さと長さ依存で頑健な抑制活性を示す Foxp3 陽性細胞が誘導されることが分かった (図 1)。



(2) TCR シグナル下流分子の mTORC1 シグナル依存的に TSDR 脱メチル化が亢進する

次に TCR 刺激依存的に TSDR 脱メチル化を担っている細胞内シグナルを同定するため、TCR 下流の各シグナル伝達経路の阻害剤を iTreg 培養系に加え、誘導された Foxp3 陽性細胞の TSDR 脱メチル化を調べた。その結果、mTORC1 選択的阻害剤であるラパマイシンの添加により TSDR 脱メチル化が大きく低下することが分かった。さらに、TCR 刺激の強さと長さ依存で、mTORC1 活性が亢進することも確かめられた。一方で、その他 TCR シグナル (MAPK や NF κ B など) 選択的阻害剤の TSDR 脱メチル化への寄与はラパマイシンよりも小さかった。

以上の結果から、TCR 刺激の強さ及び長さ依存的に mTORC1 活性が亢進して、TSDR 脱メチル化を促進している可能性が示唆された。

(3) mTORC1 活性に寄与するグルタミン依存的に TSDR 脱メチル化が亢進する

次に TCR 刺激依存的に TSDR 脱メチル化を担っている細胞内代謝経路を同定するため、各代謝経路選択的阻害剤を iTreg 培養系に加え、TSDR 脱メチル化への影響を調べた。その結果、mTORC1 活性を担っていることが知られているグルタミンの添加依存的に TSDR 脱メチル化が亢進することが分かった。以上の結果から、細胞内代謝という観点からも、mTORC1 が TSDR 脱メチル化に寄与していることが示唆された。

(4) iTreg の TSDR 脱メチル化は TET2/3 依存的である

TCR 刺激依存的な mTORC1 の活性化がどのように TSDR 脱メチル化を制御しているのか、その分子メカニズムの解明を目指した。まず最初に TCR 刺激依存的な TSDR 脱メチル化が DNA 脱メチル化誘導酵素 TET(Ten-eleven translocation)依存的に誘導されているのかを検証した。ROSA26<CreERT2> x TET2/3<floxed>マウス由来のナイーブ T 細胞に *in vitro* で 4-OHT (4-Hydroxytamoxifen) を添加し、TET2 と TET3 をノックアウト (KO) させた後に、TCR 刺激依存的に誘導させた iTreg の TSDR 脱メチル化を解析した。その結果、コントロール細胞と比較して、TET2/3 KO iTreg では TSDR がほとんどメチル化状態であった。すなわち、iTreg の TSDR 脱メチル化は TET2/TET3 依存的であることが確認できた。

(5) TCR 刺激の強さ、長さ依存的に TET2 タンパク質の発現が増大する

TCR 刺激がどのように TET 依存的な DNA 脱メチル化を制御しているのか、その分子メカニズム解明のため、まず iTreg 培養系において TCR 刺激依存的な TET 発現の変化を調べた。その結果、TCR 刺激の強さ、長さ依存的に Tet2/3mRNA 発現に大きな差は見られなかったが、TET2 タンパク質の発現が大きく亢進することが分かった。

(6) mTORC1 活性依存的に TET2 タンパク質の発現が増大する

そこで、mTORC1 が直接 TET2 タンパク質の発現を制御する可能性を考え、ラパマイシンを添加した時の TET 発現の変化を調べた。その結果、コントロール群と比較してラパマイシン添加群で Tet2/3mRNA 発現に大きな差は見られなかったが、TET2 タンパク質発現が大きく低下することが分かった。

本研究結果から、TCR 刺激依存的に活性化した mTORC1 が TET2 タンパク質の発現を増加させることで、TSDR 脱メチル化を亢進させている可能性が示唆された。今後は TCR 刺激の弱い群あるいはラパマイシン添加群に TET2 タンパク質を強制発現させた時に TSDR 脱メチル化が回復するのかを検証予定である。また、mTORC1 が TET タンパク質発現をどのように制御しているのか、その分子メカニズムも明らかにする予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 Tomohide Kinoshita, Akira Nakajima, Norihito Hayatsu, Reiko Onishi, Shohei Hori
2 . 発表標題 Uncovering the mechanism of epigenetic modification by T cell receptor signaling in regulatory T cells
3 . 学会等名 第19回東京大学生命科学シンポジウム
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Tomohide Kinoshita, Akira Nakajima, Norihito Hayatsu, Reiko Onishi, Shohei Hori
2 . 発表標題 Uncovering the mechanism of epigenetic modification by T cell receptor signaling in regulatory T cells
3 . 学会等名 第29回Kyoto T Cell Conference
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Tomohide Kinoshita, Akira Nakajima, Norihito Hayatsu, Reiko Onishi, Shohei Hori
2 . 発表標題 Uncovering the mechanism of epigenetic modification by T cell receptor signaling in regulatory T cells
3 . 学会等名 第92回日本生化学会大会
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Tomohide Kinoshita, Akira Nakajima, Norihito Hayatsu, Reiko Onishi, Shohei Hori
2 . 発表標題 TCRシグナルによる制御性T細胞のエピゲノム形成機構の解明
3 . 学会等名 新学術領域ネオ・セルフ第3回若手の会
4 . 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------