

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401
研究種目：若手研究
研究期間：2022～2023
課題番号：22K15493
研究課題名（和文）マルチオミクスによるヒト制御性T細胞分化に関するシグナル伝達ネットワークの解明

研究課題名（英文）Elucidation of Signaling Mechanisms Involved in Human Regulatory T Cell Differentiation by Multi-omics Analysis

研究代表者
竹島 雄介（Takeshima, Yusuke）
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教

研究者番号：70893288
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：制御性T細胞(Treg)は免疫抑制機能に特化したT細胞集団である。ヒトCD4陽性T細胞は強いT細胞受容体刺激を受けるとFOXP3を一時的に発現するが安定せず、機能的に安定なTregの効率的な誘導が課題である。本研究ではCRISPR-Cas9による目標遺伝子のノックアウトの影響に関して、単一細胞レベルでゲノムワイドなオープンクロマチン解析、網羅的遺伝子発現解析、細胞表面・細胞内タンパク質の定量を組み合わせた大規模スクリーニングを独自に開発した。in silico解析によりTreg分化誘導の際に生じる生物学的応答シグナル伝達ネットワークを解明し、分化誘導における制御因子の候補の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、多岐にわたるCRISPR screenを事前に選択肢を狭めることなく一括で行うことができるとともに、既存の手法で解析可能な影響因子の同定だけにとどまらず、アンバイアスにゲノムワイドな探索が可能となることを期待され、影響因子の探索過程ならびにネットワークの詳述において大幅な技術革新がもたらされうると考える。また、誘導に対して正の制御を行うことで安定して効率的な誘導性Tregを分化させることができ、自己由来の末梢性T細胞から誘導Tregを産生することで自己免疫疾患に臨床応用することが可能となる。逆に、負の制御を行うことで自己免疫寛容を抑制し悪性腫瘍に対する治療応用が可能となる。

研究成果の概要（英文）：Regulatory T cells (Tregs) are a population of T cells that specialize in immunosuppressive functions. Although human CD4-positive T cells transiently express FOXP3 upon strong T cell receptor stimulation, FOXP3 expression is not stable. Therefore, it remains difficult to efficiently induce functionally stable Tregs. In this study, we developed a large-scale screen for the effects of target gene knockout using CRISPR-Cas9 by combining genome-wide open chromatin analysis, transcriptome analysis and quantification of cell surface and intracellular proteins at the single cell level. We revealed the biological response signalling network that occurs during Treg differentiation induction and successfully identified candidate regulators of differentiation.

研究分野：免疫学

キーワード：マルチオミクス解析 シングルセル解析 制御性T細胞 免疫学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

制御性 T 細胞(Treg)は免疫抑制機能に特化した T 細胞集団で、末梢 CD4 陽性 T 細胞の 10%を占め、異常・過剰な免疫応答を抑制し、免疫寛容、免疫恒常性の維持に重要な役割を果たし、その異常は様々な免疫疾患の原因となる。申請者の研究室では、1995 年に Treg の細胞表面マーカーとして CD25、2003 年にはマスター転写因子として Foxp3 を同定した。Treg は自己免疫や炎症性疾患の抑制だけでなく、臓器移植による拒絶拒否にも重要で、逆に Treg 機能の減弱によりがん免疫の強化が可能である。

Treg の大部分は胸腺で産生されるが、一部は末梢で通常 T 細胞から分化される。これらの内在性 Treg に加え、試験管内でも Treg を誘導 (誘導性 Treg) できる。内在性 Treg と異なり、誘導性 Treg は Foxp3 の発現が不安定であり、人工的に誘導性 Treg を作成する上で問題となっていた。申請者の研究室では、Foxp3 の安定した発現にエピジェネティックな制御として Treg 特異的な脱メチル化が重要であることを示した。ヒト CD4 陽性 T 細胞は強い T 細胞受容体 (TCR) 刺激を受けると FOXP3 を一時的に発現するが、Treg 特異的な脱メチル化領域が脱メチル化されておらず、FOXP3 の発現は安定せず、機能的に安定な Treg の効率的な誘導が課題である。

また、次世代シーケンサー (NGS) の急速な技術革新により、scRNA-seq (mRNA を定量) や scATAC-seq (オープンクロマチン領域を同定) が開発された。オープンクロマチン領域の同定により、エンハンサーの同定、ヌクレオソームの配置、転写因子の結合性に関しゲノムワイドな評価が可能となった。しかし、これらの多層的な解析を個別に施行した場合は単一細胞レベルで情報を結合することが困難であった。これに対し、scRNA-seq と同時に細胞表面タンパク質を定量する CITE-seq (Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by Sequencing) が開発された。CITE-seq はオリゴ標識抗体を用いて細胞表面タンパク質マーカーを検出することで scRNA-seq のデータを補完し、mRNA だけでは識別が困難な細胞種の弁別をより頑健にした。しかし、細胞表面タンパク質と mRNA は共に転写・翻訳の最終的な産物であり、遺伝子発現の制御には言及できなかった。このため、申請者らは scATAC-seq と細胞表面タンパク質を同時測定する ASAP-seq (ATAC with Select Antigen Profiling by sequencing) ならびに、scRNA-seq と scATAC-seq と細胞表面タンパク質を同時に測定する DOGMA-seq を開発した (Mimitou EP, *et al. Nat Biotechnol* 2021)。

2. 研究の目的

本研究は、申請者のこれまでの研究成果に基づき、世界に先駆けて CRISPR-Cas9 による 900 種類もの目標遺伝子のノックアウトの影響に関して、単一細胞レベルでゲノムワイドなオープンクロマチン解析、網羅的遺伝子発現解析、約 270 種の細胞表面ならびに約 50 種の細胞内タンパク質の定量を組み合わせた大規模スクリーニングを行うことが可能であり、多層的データの統合解析により Treg 分化誘導の際に生じる生物学的応答シグナル伝達ネットワークを解明できヒトにおける Treg 分化誘導過程において重要な分子の同定を目的とする。さらに特定のエピトープを認識するオリゴ標識抗体で細胞内外のタンパク質、転写因子、リン酸化タンパク質を標識することで、タンパク質の局在・タンパク質のリン酸化や転写因子の直接定量による評価を目指す。

3. 研究の方法

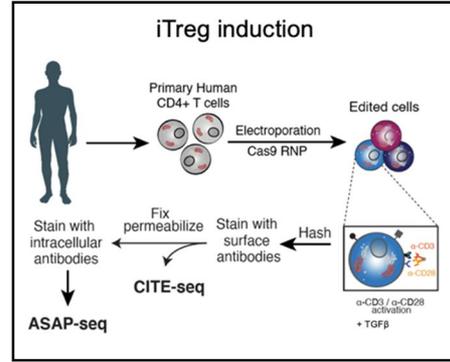
・ ヒト CD4 陽性 Naïve T 細胞の Treg 誘導における ASAP-seq および CITE-seq の施行

ヒト CD4 陽性 Naïve T 細胞に対して CRISPR-Cas9 によるノックアウトを行い、Treg 誘導刺激を加えた後に ASAP-seq と CITE-seq を同時に行う。細胞表面・細胞内染色タンパク質を検出するとともに、タンパク質のリン酸化や転写因子もオリゴ標識抗体で定量する。

・ ASAP-seq および CITE-seq の *in silico* 解析

各ノックアウト遺伝子によるコントロールに対する摂動を *in silico* で解析するパイプラインを独自に作成する。

発現変動解析・共発現解析・ネットワーク解析・クラスター解析・系統解析を epigenome・transcriptome・proteome に関して別途に行うと共に、三層を結合させて多面的にシグナル伝達機構の詳細を解明する。また、オープンクロマチン情報から各転写因子の結合性やモチーフ解析を評価し、転写因子の直接定量も併用し、目標遺伝子と転写因子との関連を評価する。これにより、Treg 誘導における正の制御因子と負の制御因子の同定ならびに Treg 誘導刺激において各因子が果たす転写・翻訳制御の役割について詳細を解明し、Treg 誘導刺激に対する生物学的応答シグナル伝達ネットワークを明らかにする。

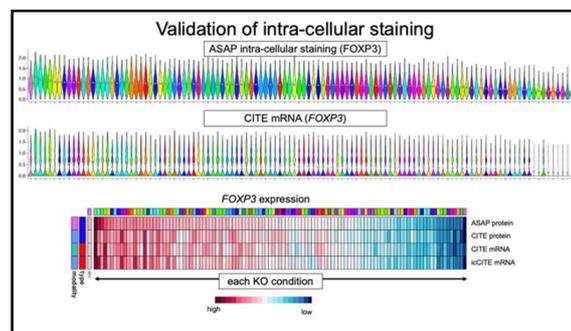
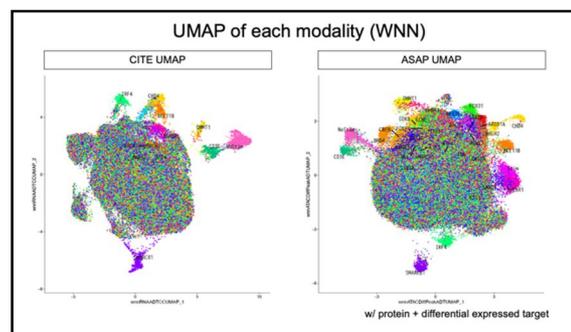
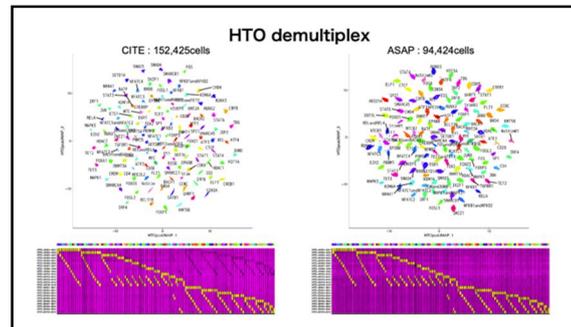


4. 研究成果

シングルセルレベルで、右に示すようにプールされた細胞から取得されたハッシュタグオリゴ(HTO)の情報を用いて良好に分けることが可能となっている。上図はHTOを用いたUMAPでの次元削減を示し、下図はHTOの発現によるheatmapを示している。

WNNを用いた多層的データを次元削減した情報からも当初から期待されていた無刺激条件やCD3KO条件がクラスターとして出現するとともに、いくつかの条件で特定の動きを示していることが検出できている。各色が各KO条件を示している。また、オープンクロマチン情報や遺伝子発現情報と共に、細胞表面蛋白だけではなく細胞内蛋白を検出することに精度よく成功している。FOXP3の変動を代表例として右図に示しているが、無刺激条件やCD3KO条件ではTreg誘導が行われていないことが担保されるとともに、細胞内蛋白と遺伝子発現の情報がよく相関していることが示されており、Treg分化に重要な遺伝子の候補を絞り込むことに成功している。

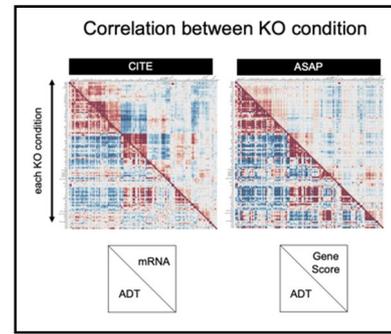
また各KO条件がCITE-seqにて遺伝子発現変化と蛋白発現変化が、ASAP-seqにてオープンクロマチン情報と蛋白発現変化がよく相関していることを確認しており、Treg分化に重要な標的遺伝子の絞りこみに成功しており、当初の予定を達成している。



この技術を最大限に活用するためにCRISPR screenを*in silico*で行うパイプラインの開発を継続している。本手法を確立することで、多岐にわたるCRISPR screenを事前に選択肢を狭めることなく一括で行うことができるとともに、既存の手法で解析可能な影響因子の同定だけでなく、トランスクリプトームレベルならびにエピゲノムレベルにどのような変化をもたらすかをアンバイアスにゲノムワイドな探索が可能となることが期待され、影響因子の探索過程ならびにネットワークの詳述において大幅な技術革新がもたらされうると考える。

また、本手法で同定したTreg分化誘導におけるネットワークのハブとなる因子の検証解析の追加を検討している。同定したTreg分化誘導における制御因子をノックアウトした細胞を用いて、エフェクターT細胞との共培養などにより抑制能に関する機能解析で検証を継続したいと考えている。

これらにより、Treg誘導における正の制御因子と負の制御因子の同定ならびにTreg誘導刺激において各因子が果たす転写・翻訳制御の役割についての詳細を解明し、ヒトCD4陽性ナイーブT細胞におけるTreg誘導刺激に対する生物学的応答シグナル伝達ネットワークの全体像を明らかにしていくことが可能であると考えている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 10件）

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Sugimori Yusuke, Iwasaki Yukiko, Takeshima Yusuke, et al. | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 Transcriptome Profiling of Immune Cell Types in Peripheral Blood Reveals Common and Specific Pathways Involved in the Pathogenesis of Myositis Specific Antibody Positive Inflammatory Myopathies | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 ACR Open Rheumatology | 6. 最初と最後の頁 93 ~ 102 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/acr2.11521 | 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 - |
| 1. 著者名 Edahiro Ryuya, Shirai Yuya, Takeshima Yusuke, et al. | 4. 巻 55 |
| 2. 論文標題 Single-cell analyses and host genetics highlight the role of innate immune cells in COVID-19 severity | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Nature Genetics | 6. 最初と最後の頁 753 ~ 767 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41588-023-01375-1 | 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 - |
| 1. 著者名 Yamada Saeko, et al. | 4. 巻 82 |
| 2. 論文標題 Immunomics analysis of rheumatoid arthritis identified precursor dendritic cells as a key cell subset of treatment resistance | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Annals of the Rheumatic Diseases | 6. 最初と最後の頁 809 ~ 819 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/ard-2022-223645 | 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 該当する |
| 1. 著者名 Yasumizu Yoshiaki, Takeuchi Daiki, Morimoto Reo, Takeshima Yusuke, et al. | 4. 巻 4 |
| 2. 論文標題 Single-cell transcriptome landscape of circulating CD4+ T cell populations in autoimmune diseases | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Cell Genomics | 6. 最初と最後の頁 100473 ~ 100473 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xgen.2023.100473 | 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 該当する |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Yamaguchi Yuta, et al. | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Consecutive BNT162b2 mRNA vaccination induces short-term epigenetic memory in innate immune cells | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 JCI Insight | 6. 最初と最後の頁 e163347 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.163347 | 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 - |

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Nakano Masahiro, Ota Mineto, Takeshima Yusuke, et al. | 4. 巻 185 |
| 2. 論文標題 Distinct transcriptome architectures underlying lupus establishment and exacerbation | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cell | 6. 最初と最後の頁 3375 ~ 3389.e21 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2022.07.021 | 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 該当する |

| | |
|--|-------------------|
| 1. 著者名 Okubo Mai, Sumitomo Shuji, Tsuchida Yumi, Nagafuchi Yasuo, Takeshima Yusuke, et al. | 4. 巻 24 |
| 2. 論文標題 Transcriptome analysis of immune cells from Behcet 's syndrome patients: the importance of IL-17-producing cells and antigen-presenting cells in the pathogenesis of Behcet 's syndrome | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Arthritis Research &Therapy | 6. 最初と最後の頁 186 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-022-02867-x | 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 - |

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Yasumizu Yoshiaki, et al. | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Myasthenia gravis-specific aberrant neuromuscular gene expression by medullary thymic epithelial cells in thymoma | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Nature Communications | 6. 最初と最後の頁 4230 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-31951-8 | 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 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Iwasaki Yukiko, Takeshima Yusuke, et al. | 4. 巻 62 |
| 2. 論文標題 Combined plasma metabolomic and transcriptomic analysis identify histidine as a biomarker and potential contributor in SLE pathogenesis | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Rheumatology | 6. 最初と最後の頁 905 ~ 913 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/keac338 | 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 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Takeshima Yusuke, Iwasaki Yukiko, et al. | 4. 巻 81 |
| 2. 論文標題 Immune cell multiomics analysis reveals contribution of oxidative phosphorylation to B-cell functions and organ damage of lupus | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Annals of the Rheumatic Diseases | 6. 最初と最後の頁 845 ~ 853 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/annrheumdis-2021-221464 | 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 該当する |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Kobayashi Satomi, et al. | 4. 巻 61 |
| 2. 論文標題 Dysregulation of the gene signature of effector regulatory T cells in the early phase of systemic sclerosis | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Rheumatology | 6. 最初と最後の頁 4163 ~ 4174 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/keac031 | 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0件

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|