

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：38005

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22547

研究課題名（和文）ナイーブT細胞の多分化能を規定する新規分子機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of molecular mechanisms required for differentiation potential of naive T cells

研究代表者

石川 裕規（Ishikawa, Hiroki）

沖縄科学技術大学院大学・免疫シグナルユニット・准教授

研究者番号：30648621

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：標的抗原の刺激を受けていないナイーブCD4+ T細胞は抗原刺激時の状況に応じて様々なTヘルパー細胞や制御性T細胞へと分化することで免疫の司令塔の役割を果たすが、ナイーブCD4+ T細胞の分化能を維持するメカニズムについてはよく分かっていない。本研究ではナイーブCD4+ T細胞において特異的に発現するJunb RNAアイソフォーム（n-Junb RNA）欠損マウスを作製し、n-Junb RNAが自己免疫疾患の原因となるTh17細胞の炎症性サイトカインの発現抑制に関わることを明らかにした。この結果はn-Junb RNAがナイーブCD4+ T細胞のTh17細胞への分化能を制御することを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CD4+ T細胞は各種自己免疫疾患において重要な役割を担うがその分化・機能を制御するメカニズムについては不明な点が多く残っている。本研究で明らかにしたn-Junb RNAによるTh17細胞の炎症性サイトカインの発現抑制は、自己免疫疾患を制御する新たなメカニズムであり、今後より詳細な解析を続けることで将来的に自己免疫疾患の新たな治療法の開発に貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Naive CD4 T cells differentiate into diverse types of T helper cells or regulatory T cells and play a major role in immune responses. However, the mechanism that regulates multipotency of naive CD4 T cell remains largely unknown. In this study, using mice deficient for Junb RNA isoform (n-Junb) that is specifically expressed in naive CD4 T cells, we found that the loss of n-Junb results in increase of IL-17A expression in Th17 cells, which suggests that n-Junb may regulate ability of naive CD4 T cells to differentiate into Th17 cells.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞 分化 転写制御 RNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

CD4+ T 細胞の種々の亜集団はそれぞれ異なるタイプの病原体の感染防御に適した免疫反応を制御するだけでなく、自己免疫疾患やアレルギーの原因となることもある。CD4+ T 細胞の分化メカニズムの解明は臨床応用につながる重要な課題であり、これまでに多くの免疫学者が CD4+ T 細胞の分化メカニズムを精力的に研究している。これらの研究は抗原刺激時からそれ以降に機能するメカニズムに焦点をあてたものであり、各 CD4+ T 細胞の系列を定義する重要転写因子およびその発現制御機構が明らかになりつつある。一方で、ナイーブ CD4+ T 細胞が抗原刺激を受けるまでにどのようにしてそのエフェクター CD4+ T 細胞分化能を維持しているかについては十分な研究がなされていない。

申請者はナイーブ CD4+ T 細胞が抗原刺激を受けた後の転写制御メカニズムに注目し Th17 細胞分化における JunB の重要な機能を明らかにしてきた。これまでに、T 細胞特異的 Junb 欠損マウスを作製し、それが Th17 細胞に依存する自己免疫疾患の誘導に耐性になることを明らかにした。また、Junb 欠損ナイーブ CD4+ T 細胞は Th17 細胞への分化能を失うことも示している。分子機能としては、JunB が Th17 細胞の系列を定義する重要転写因子 ROR $\gamma$ t をコードする DNA 領域に結合しその転写を状況に応じて促進することを明らかにしている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的はナイーブ CD4+ T 細胞における JunB の役割を明らかにすることである。申請者はこれまでに抗原刺激を受けたナイーブ CD4+ T 細胞において発現誘導される転写因子 JunB が T 細胞亜集団の分化制御に必須な役割を担うことを明らかにしてきた。例えば、Junb 欠損ナイーブ CD4+ T 細胞は自己免疫疾患の原因となる Th17 細胞へと分化する能力を失う。驚いたことに、Junb 欠損ナイーブ T 細胞の Th17 細胞への分化不全は、抗原刺激後すぐに JunB cDNA を導入しても回復しない。これらの観察から、JunB が抗原刺激前のナイーブ T 細胞において、Th17 細胞への分化能を維持するために機能する可能性を考えた。興味深いことに、ナイーブ CD4+ T 細胞において、高レベルの JunB mRNA 発現が認められた (JunB タンパク質の発現は検出できないにも関わらず)。しかも、RNA-seq 解析の結果では、ナイーブ CD4+ T 細胞において発現する JunB mRNA (n-JunB mRNA) は、分化したヘルパー T 細胞において発現するもの (Th-JunB mRNA) とは異なる RNA アイソフォームであり、3' 非翻訳領域にヒト-マウス間で保存される conserved non-coding sequence (CNS) を含むより長いものであることが示唆された (図 1)。これらの結果に基づいて、抗原刺激前に存在する n-JunB mRNA が抗原刺激時のナイーブ T 細胞の分化に重要な役割を果たす可能性を申請者は考えている。例えば、n-JunB mRNA は抗原刺激時における速やかな JunB タンパク質発現を担ったり、長鎖 non-coding RNA のように RNA 自体として機能するかもしれない。本研究では、ナイーブ CD4+ T 細胞における n-JunB mRNA の役割を解析することで、抗原刺激前のナイーブ T 細胞が多分化能を維持するメカニズムに関する先駆的な知見を得ることを目指す。

### 3. 研究の方法

(1) ナイーブ CD4 T 細胞における Junb 欠損の影響：野生型マウスおよび Junb KO マウスより単離したナイーブ CD4 T 細胞を用いて RNA シークエンス解析および Assay for Transposase-Accessible Chromatin (ATAC) シークエンス解析を行なうことで、Junb 欠損が遺伝子発現およびクロマチンアクセシビリティへ与える影響を調べた。

(2) n-JunB mRNA に特異的な CNS 欠損マウスの作製：n-JunB mRNA に特異的にある CNS 領域を欠損した (Junb-CNS KO) マウスを CRISPR/CAS9 によるゲノム編集により作製した (図 1)。具体的には、マウス受精卵に Junb-CNS 領域をターゲットとするガイド RNA と CAS9 タンパク質をエレクトロポレーションにより導入し、Junb-CNS 領域を欠損した F0 マウスを得た。F0 マウスを野生型 C57Bl6 マウスと交配し得られた Junb-CNS ヘテロ KO マウス (F1) を交配し、Junb-CNS ホモ KO マウスを得た。

(3) Junb-CNS KO マウスの解析 (In vitro)：Junb-CNS KO マウスのリンパ節、脾臓から単離したナイーブ CD4 T 細胞を Th17 細胞分化を促進するサイトカイン (TGF- $\beta$  と IL-6) 存在かで活性化させ、JunB と IL-17 の発現誘導をフローサイトメトリーにより解析した。

(4) Junb-CNS KO マウスの解析 (In vivo)：Junb-CNS KO が Th17 細胞に依存する自己免疫疾患に影響を与えるか調べるために、Junb-CNS KO マウスに Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) を誘導し、その病態を解析した。

### 4. 研究成果

(1) Junb ナイーブ CD4 T 細胞の遺伝子発現とクロマチンアクセシビリティ：Junb KO ナイーブ CD4 T 細胞の RNA シークエンス解析の結果、Junb 欠損により約 20 の遺伝子の発現が有意に増減することが明らかになった。一方、ATAC-シークエンス解析の結果、Junb 欠損によって顕著にクロマチンアクセシビリティが変化する遺伝子領域は認められなかった。これらの結果は、Junb がナイーブ CD4 T 細胞のクロマチンアクセシビリティの制御には必要ではないが、

いくつかの遺伝子発現に関与することを示唆している。

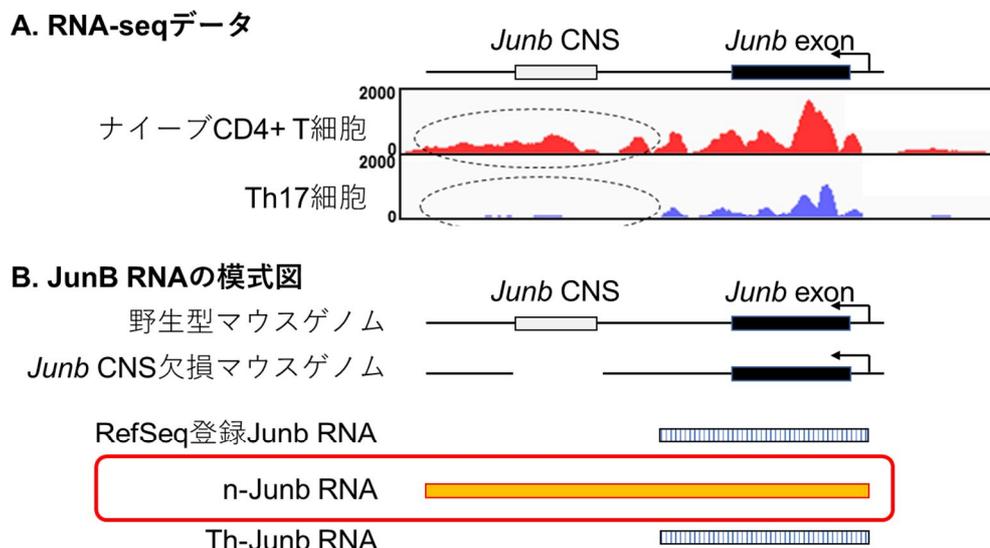


図1: ナীবCD4+ T細胞に発現するn-Junb RNA とTh17細胞に発現するTh-Junb RNA

(2) 作製した Junb-CNS KO マウスから単離したナীব CD4 T細胞を Th17 細胞誘導条件で培養し、まず JunB の発現誘導を調べた。Junb-CNS 欠損は Th17 細胞で誘導される JunB の発現レベルにほとんど影響を与えなかった (約 20% の MFI の減少)。次に IL-17A の発現を調べた結果、Junb-CNS 欠損により IL-17A 発現細胞が著しく増加した (図 2)。これらの結果は、Junb-CNS は JunB の発現誘導には必須ではないが、Th17 細胞における IL-17A の発現を負に制御する可能性が示唆された。

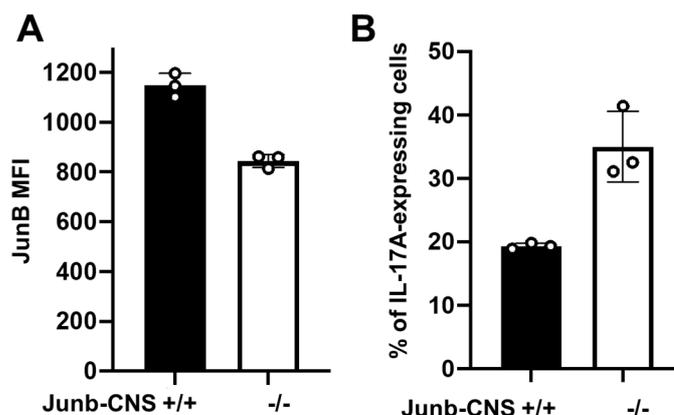


図2. Junb-CNS KO CD4 T細胞におけるJunBとIL-17A発現

(3) Junb-CNS の役割を理解するために、Junb-CNS KO マウスに EAE を誘導したところ、野生型マウスの場合と同様に EAE を発症し、その症状スコアに違いは認められず、Junb-CNS が EAE の制御に関与しないことが明らかになった (図 3)。

本研究では、Junb-CNS が *in vitro* で誘導される Th17 細胞の IL-17A 発現の抑制に関与することが示された。今後は、Junb-CNS が IL-17A 発現を制御するメカニズムの解析だけでなく、Junb-CNS による Th17 細胞の機能制御が生体内においてどのような役割を担うのかを明らかにするために、Junb-CNS が Th17 細胞による腸の恒常性の維持への関与するかどうか調べる予定である。

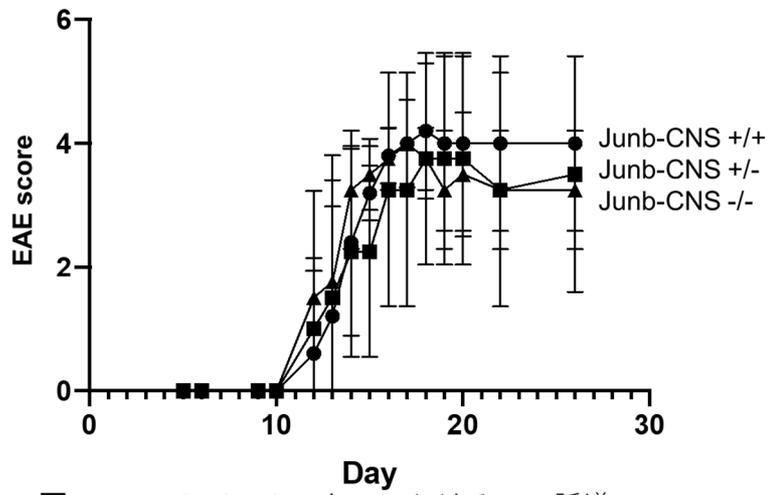


図3. Junb-CNS KOマウスにおけるEAE誘導

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 2件）

1. 著者名 Koizumi S and Ishikawa H	4. 巻 8
2. 論文標題 Transcriptional Regulation of Differentiation and Functions of Effector T Regulatory Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 939
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells8080939.	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 Taku Ito-Kureha 1, Takahisa Miyao, Saori Nishijima, Toru Suzuki, Shin-Ichi Koizumi, Alejandro Villar-Briones, Akinori Takahashi, Nobuko Akiyama, Masahiro Morita, Isao Naguro, Hiroki Ishikawa, Hidenori Ichijo, Taishin Akiyama, Tadashi Yamamoto	4. 巻 11
2. 論文標題 The CCR4-NOT deadenylase complex safeguards thymic positive selection by down-regulating aberrant pro-apoptotic gene expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6169
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-19975-4.	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
---------	---------