

令和 5 年 4 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03666

研究課題名(和文) T細胞特異的micro RNAの機能解析から迫る炎症性腸疾患新規治療法の開発

研究課題名(英文) Gene regulation in the gut T cells and IBD

研究代表者

三上 洋平 (Mikami, Yohei)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：80528662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患(IBD)の病態には、T helper (Th)細胞の中でも特にIL-17サイトカインを高産生するTh17細胞の重要性が報告されてきた。申請者は血球系細胞におけるマイクロRNAの網羅的発現解析を行い、腸炎に關するTh1細胞やTh17細胞で高発現し、Naive T細胞や制御性T細胞など炎症に關与しない細胞で発現が乏しいmiRNA-221/2を同定し、その遺伝子の発現制御機構と腸炎における生物学的意義を報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性腸疾患(IBD)は、難治性の慢性腸管炎症性疾患である。依然として根治術は存在せず、多くの分子標的療法が臨床応用されているものの、不十分な効果や、感染症をはじめとした副作用が依然として大きな問題である。本研究は、多数の分子を標的として細胞内シグナルを調整するmiRNAに着目し、腸管炎症T細胞特異的なmiRNA-221/2の発現制御機構と腸炎病態および腸管粘膜免疫における生物学的意義を明らかとするともに、Th細胞サブセットの垣根を超えた炎症惹起性Th細胞全体を標的とする全く新しい治療アプローチの開発の基盤となりうる知見を報告した。

研究成果の概要(英文)： Th17 cell, which is defined as the IL-17 producing T helper cell, has been reported to contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD). Comprehensive analyses of global microRNA expression in haematopoietic cells identified miRNA-221/2, which is highly expressed in Th1 and Th17 cells involved in intestinal inflammation and poorly expressed in cells not involved in inflammation such as Naive T cells and regulatory T cells. In addition, we reported the regulatory mechanism of gene expression of miRNA-221/2 and their biological significance in intestinal inflammation.

研究分野：消化器内科学

キーワード：炎症性腸疾患 潰瘍性大腸炎 クロウン病 Th17細胞 マイクロRNA ChIP-seq シングルセルRNA-seq 粘膜免疫

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患(IBD)の病態には、T helper (Th)細胞の中でも特に IFN- γ 産生性 Th1 細胞および IL-17 産生性 Th17 細胞の関与が報告されてきたが、これまでの IFN- γ や IL-17 を標的とした生物学的製剤の効果は期待通りの効果に乏しく、IBD の治療には単一のエフェクターサイトカインや T 細胞サブセットではなく、Th 細胞サブセットの垣根を超えた炎症惹起性シグナルを標的とする全く新しい治療アプローチの開発が必要である。

2. 研究の目的

MicroRNA(miRNA)は標的 messenger RNA (mRNA)の分解あるいは翻訳抑制を介して遺伝子の転写後制御を行う small non-coding RNA である。成熟 miRNA 生成に必要な Dicer、Drosha を欠損した CD4+T 細胞では生存や分裂能が障害されるという報告以降¹、CD4+T 細胞での T 細胞の活性化やサイトカイン産生能に関する miRNA の重要性が示唆されている^{2,3}。しかし、腸管免疫難病である炎症性腸疾患(IBD)に關与する Th 細胞分化における特定の miRNA の役割については十分な報告がない。申請者は、血球系細胞および体細胞における miRNA の網羅的発現データ解析より、腸炎に關与する免疫細胞に選択的に発現する miRNA を同定し、機能解析を行うことにより、T 細胞分化における新たな制御機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

血球系細胞および体細胞における miRNA の網羅的発現データ解析を行い、腸炎に關与する可能性のある miRNA を絞り込む。次に、ChIP-seq を用いてこれらの miRNA の発現制御機構を明らかとするとともに、シグナル伝達パスウェイに重要な因子の遺伝子欠損マウスを用いてこれを検証する。さらに、腸炎に關与する miRNA の遺伝子欠損マウスを新規樹立し、1 細胞遺伝子発現解析、腸炎モデルを用いて、炎症に關与する免疫細胞および腸炎への表現型を解析する。

4. 研究成果

(1) CD4+T 細胞における miR-221/222 の転写制御について

腸炎状態における、miRNA の細胞種特異的な機能解析を行うために、網羅的 miRNA 発現プロファイルのデータ⁴を再解析したところ、miR-221/222 が Th 細胞サブセットごとに特異的な発現様式を示し、Th 細胞のサブセットの中では、Th1、Th17、Tfh 細胞では発現が高く、Th2 と Treg では発現が低かった。このことから、miR-221/222 の発現は、Th 細胞サブセットの分化誘導の際の多様なサイトカインシグナルによって異なる制御を受けている可能性が示唆された。

X 染色体上で、miR-221 と miR-222 は近接して存在し、過去の報告では悪性細胞で発現し、細胞の増殖、がんの開始、進行に關与する可能性があることから、「onco-miRNA」と呼ばれており、がんの予後不良因子としての研究が盛んに行われてきた。さらに、最近では、miR-221/222 が LPS に対するマクロファージの耐性に重要な調節役割を果たしていることが報告され、免疫細胞における機能が注目されている。

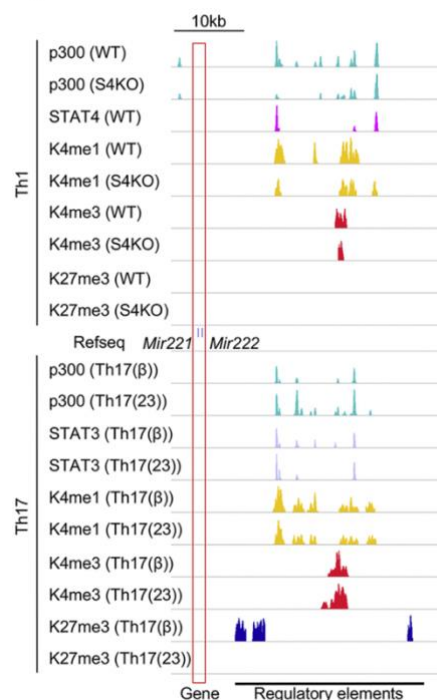
そこで、ChIP-seq 法を用いて *in vitro* で分化させた Th1 細胞と Th17 細胞を用いて、*Mir221/222* 遺伝子座におけるエピゲノム修飾を解析したところ、*Mir221/222* 遺伝子座の上流に p300、H3K4me1、H3K4me3 の複数のピークを伴うエンハンサー領域が存在し (Fig. 1)、これらの領域は、哺乳類の種を超えて高度に保存されていた。

Th1 環境下では、p300 の結合部位には、IL-12 によって優先的に活性化される主要な STAT である STAT4 の結合も認められ、一方で STAT4 欠損 Th 細胞においては p300 結合が減弱し、miR-221/222 の発現が減少したことから、Th1 細胞において IL-12/STAT4 シグナルが miR-221/222 の発現を促進する可能性が示唆された。同様に、Th17 細胞では、STAT3 の結合が p300 結合部位と重なり、STAT3 欠損 Th 細胞では、p300 の結合と miR-221/222 の発現がともに減少した。このことから、miR-221/222 の発現は、Th1 および Th17 リンパ球において、*Mir221/222* 遺伝子座の上流に存在する調節領域で、STAT により発現が正に制御されていることが示唆された。反対に、TGF- β を含んだ培養条件では、H3K27me3 の領域が大幅に促進されたことより、miR-221/222 の発現は、TGF- β により負に制御されていることが示唆された。以上のことから、miR-221/222 の発現は、炎症性サイトカインによって誘導され、TGF- β によって抑制されることが明らかになった。

(2) *Mir221/222* の欠失が T 細胞の発生と *in vitro* T ヘルパー分化に及ぼす影響

リンパ球における miR-221/222 の機能を解析するために、*Mir221* と *Mir222* の両方を欠損する *Mir221/222* ノックアウト (KO) マウスを樹立した。WT マウスおよび *Mir221/222* KO マウスより Naïve T 細胞を単離し、*in vitro* で分化した Th 細胞集団における網羅的に miRNA の発現を次世

Fig.1 T細胞の分化におけるmiRNAの関与



代シーケンサーを用いて検討したところ、WT細胞におけるmiR-221/222-3pの発現は、Th1およびIL-23で処理したTh17細胞では高く、TGF- β を分化条件に用いたTh17およびiTreg細胞では低かった。また、標的とするmiR-221/222以外のmiRNAの発現は、WTと*Mir221/222* KOマウス由来のTh細胞で変化はみとめられなかった。次に、miR-221/222 KOマウスを用いて、Th17細胞への分化におけるmiR-221/222の機能を検討したところ、Th17細胞の割合は、miR-221/222 KOの大腸粘膜固有層Th細胞および*in vitro*で分化させたTh17細胞で有意に増加をみとめ、miR-221/222の欠失によりTh17細胞への分化が亢進することが明らかになった。

(3) 1細胞遺伝子発現解析による腸管Th17細胞ないの不均一性の同定と、miR-221/222の影響

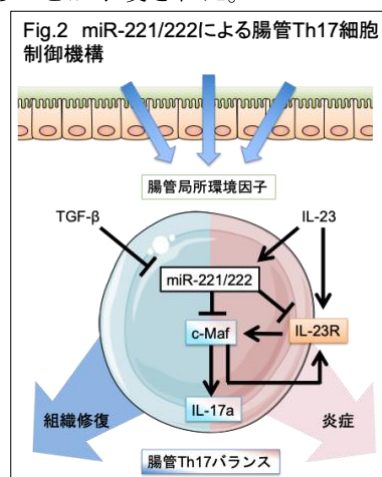
IL-17-GFPレポーターマウス(IL17-GFP/WTおよびIL17-GFP/miR-221/222-KO)を用いて、腸管よりIL-17a-*gfp*⁺ Th細胞をソーティングし、腸管Th17細胞におけるmiR-221/222の有無による変化を1細胞遺伝子発現解析(scRNA-seq)により解析したところ、腸管Th17細胞は遺伝子発現のパターンにより6個のTh17細胞クラスターに大別された。これらのクラスターは、WTとmiR-221/222-KO Th細胞間で同等であり、健常マウスでは、miR-221/222非存在下においても、腸内Th17細胞クラスターの組成が維持されており、miR-221/222は、活性化状態のTh細胞、ないし、炎症環境下など病的な細胞環境下においてTh17細胞の応答を制御している可能性が示唆された。

(4) *Maf*と*Il23r*遺伝子はmiR-221/222の直接的な標的遺伝子である

miR-221/222を欠損により、Th17細胞の分化に影響を認めたため、Th17機能に関連するmiR-221/222の標的遺伝子を探索した。miR-221/222の*in silico*予測アルゴリズムを基にした標的遺伝子の中で、Th17関連遺伝子^{5,6}である9つの標的候補のうち、Th17の機能を制御する上で重要な役割を果たしている*Maf*と*Il23r*がmiR-221/222の直接的な標的であることをLuciferase assayを用いて明らかとした。興味深いことに、定常状態では、*Maf*と*Il23r*の転写産物の発現は、WTとKOのTh17細胞間でほぼ同等であるにもかかわらず、IL-23刺激により、miR-221/222-KOマウス由来のTh17ではWTマウス由来のTh17細胞に比して、c-Maf、IL-17がタンパク質レベル増加した。以上のことから、miR-221/222は、シグナルの入口となるステップ(IL-23R)を直接抑制するとともに、下流の転写因子(c-Maf)を減少させることで、炎症性Th17シグナル回路におけるネガティブフィードバック因子として機能していることが示唆された。

(5) *Mir221/222*のKOマウスは腸炎が悪化する

miR-221/222欠損Th細胞は、TCR刺激や炎症性サイトカイン刺激などに伴い、Th17応答が増強されることから、miR-221/222は、定常状態よりも炎症環境において炎症を抑制するためには重要であると考えられた。腸管の炎症環境におけるmiR-221/222がTh細胞に与える影響を検討するために、DSS誘引大腸炎モデルを用いて解析を行ったところ、miR-221/222-KOマウスはWTマウスに比べて大腸炎の悪化を認めた。一方で、Th細胞が存在しない*Rag2-Mir221/222*ダブルKOでは対象マウスに比して腸炎の増悪は認められなかった。以上のことから、miR-221/222は、DSS誘引大腸炎モデルにおけるバリアー損傷への対応を、損傷によって誘導される炎症性Th17応答を調節することで、T細胞特異的な炎症制御機構を担っていることが明らかになった⁷(Fig. 2)。



<引用文献>

- Muljo, S. A. *et al.* Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer. *The Journal of experimental medicine* **202**, 261-269 (2005). <https://doi.org/10.1084/jem.20050678>
- Takahashi, H. *et al.* TGF- β and retinoic acid induce the microRNA miR-10a, which targets Bcl-6 and constrains the plasticity of helper T cells. *Nature Immunology* **13**, 587-595 (2012). <https://doi.org/10.1038/ni.2286>
- Ichiyama, K. *et al.* The MicroRNA-183-96-182 Cluster Promotes T Helper 17 Cell Pathogenicity by Negatively Regulating Transcription Factor Foxo1 Expression. *Immunity* **44**, 1284-1298 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.05.015>
- Kuchen, S. *et al.* Regulation of microRNA expression and abundance during lymphopoiesis. *Immunity* **32**, 828-839 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.009>
- Ciofani, M. *et al.* A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell* **151**, 289-303 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.016>
- Yosef, N. *et al.* Dynamic regulatory network controlling TH17 cell differentiation. *Nature* **496**, 461-468 (2013). <https://doi.org/10.1038/nature11981>
- Mikami, Y. *et al.* MicroRNA-221 and -222 modulate intestinal inflammatory Th17 cell response as negative feedback regulators downstream of interleukin-23. *Immunity* **54**, 514-525.e516 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.02.015>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takahashi H., Nomura H., Iriki H., Kubo A., Isami K., Mikami Y., Mukai M., Sasaki T., Yamagami J., Kudoh J., Ito H., Kamata A., Kurebayashi Y., Yoshida H., Yoshimura A., Sun H. W., Suematsu M., O' Shea J. J., Kanno Y., Amagai M.	4. 巻 6
2. 論文標題 Cholesterol 25-hydroxylase is a metabolic switch to constrain T cell mediated inflammation in the skin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciimmunol.abb6444	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 Kinouchi Kenichiro, Mikami Yohei, Kanai Takanori, Itoh Hiroshi	4. 巻 80
2. 論文標題 Circadian rhythms in the tissue-specificity from metabolism to immunity: insights from omics studies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Aspects of Medicine	6. 最初と最後の頁 100984 ~ 100984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mam.2021.100984	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 Yoshimatsu Yusuke, Mikami Yohei, Kanai Takanori	4. 巻 41
2. 論文標題 Bacteriotherapy for inflammatory bowel disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-020-00153-4	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 -

1. 著者名 Iwata Kentaro, Mikami Yohei, Kato Motohiko, Yahagi Naohisa, Kanai Takanori	4. 巻 41
2. 論文標題 Pathogenesis and management of gastrointestinal inflammation and fibrosis: from inflammatory bowel diseases to endoscopic surgery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-021-00174-7	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 Mikami Yohei, Philips Rachael L., Sciume Giuseppe, Petermann Franziska, Meylan Francoise, Nagashima Hiroyuki, Yao Chen, Davis Fred P., Brooks Stephen R., Sun Hong-Wei, Takahashi Hayato, Poholek Amanda C., Shih Han-Yu, Afzali Behdad, Muljo Stefan A., Hafner Markus, Kanno Yuka, O'Shea John J.	4. 巻 54
2. 論文標題 MicroRNA-221 and -222 modulate intestinal inflammatory Th17 cell response as negative feedback regulators downstream of interleukin-23	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 514 ~ 525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2021.02.015	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 Yoshimatsu Yusuke, Mikami Yohei, Kanai Takanori	4. 巻 41
2. 論文標題 Bacteriotherapy for inflammatory bowel disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-020-00153-4	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 Teratani Toshiaki, Mikami Yohei, Nakamoto Nobuhiro, Suzuki Takahiro, Harada Yosuke, Okabayashi Koji, ..., Suda Wataru, Hattori Masahira, Matsui Minoru, Okada Takaharu, Okano Hideyuki, Inoue Masayuki, Yada Toshihiko, Kitagawa Yuko, Yoshimura Akihiko, Tanida Mamoru, Tsuda Makoto, Iwasaki Yusaku, Kanai Takanori	4. 巻 585
2. 論文標題 The liver-brain-gut neural arc maintains the Treg cell niche in the gut	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 591 ~ 596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-020-2425-3	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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 三上洋平, 寺谷俊昭, 金井隆典
2. 発表標題 肝臓-腸 - 脳相関による新規腸管制御性T細胞の調節機構の解明
3. 学会等名 臨床免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yohei Mikami, Yuka Kanno, Takanori Kanai, John J O' Shea
2. 発表標題 MicroRNA-221/222 regulate gut homeostasis via tuning Th17 cells phenotype
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 Yohei Mikami
2. 発表標題 Omics data analysis of the intestinal mucosal immunity involved in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases
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 Yohei Mikami
2. 発表標題 Single-cell sequencing finds cell type-specific immune dysregulation in IBD
3. 学会等名 The 9th annual meeting of AOCC (AOCC 2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三上洋平, 寺谷俊昭, 金井隆典
2. 発表標題 肝臓-脳-腸管迷走神経反射による制御性 T細胞産生機構の解明
3. 学会等名 第8回JCRベーシックリサーチカンファレンス (招待講演)
4. 発表年 2021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
---------	---------