

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2016～2019

課題番号：16KT0114

研究課題名(和文)新規レポーターシステムを用いて解き明かす炎症性疾患の発症と寛解のメカニズム

研究課題名(英文)Analysis of autoimmune diseases pathogenesis with a novel reporter system

研究代表者

関谷 高史 (Sekiya, Takashi)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・免疫応答修飾研究室長

研究者番号：80519207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：誤った免疫応答を防ぎ、抗原の種類に応じた正しい免疫応答を作動させるうえで重要な役割を担うのが、ヘルパーT細胞(Th)と、制御性T細胞(Treg)である。分化初期段階のThやTregの研究は遅れていたと言えるが、その主な理由の一つとして、分化初期段階にあるThやTregをin vivoで検出できる強力なシステムが確立されていないことが考えられた。そこで本研究は、分化段階のThやTregをin vivoで低侵襲的にモニターでき、かつ生細胞として単離・解析できる新規レポーターシステムを構築し、ヒト多発性硬化症マウスモデルEAEの発症過程における免疫応答の活性化を捉えることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分化初期段階のThやTregの研究は遅れていたと言えるが、本研究により、分化初期段階にあるThやTregをin vitro, in vivoの両方で検出できる強力な実験システムを構築することに成功した。このレポーターマウスは将来的に多くの研究組織にdistributeされ、様々な疾患を対象に解析されることで、炎症性疾患のみならず、多くの疾患の発症機構の解明、ひいては新規治療法の開発に寄与されると期待される。さらに本研究は、ヒト多発性硬化症マウスモデルEAEの解析により、既知の免疫応答のみならず、腸管や口腔など、解析の進んでいない部位からの免疫応答を検出しており、今後の研究展開に期待が持たれる。

研究成果の概要(英文)：Helper T cells (Th) and regulatory T cells (Treg) play important roles in preventing false immune responses and activating the correct immune response depending on the type of antigen. It can be said that research on Th and Treg in the early stage of differentiation was delayed, but one of the main reasons for this is thought to be that a powerful system for detecting Th and Treg in the early stage of differentiation in vivo has not been established. Therefore, in this study, we constructed a new reporter system that can monitor Th and Treg at the differentiation stage in vivo minimally invasively and can be isolated and analyzed as living cells, and we analyzed the pathogenesis of human multiple sclerosis mouse model EAE. By the analysis describing above, We succeeded in capturing the activation of the immune response during the course of EAE pathogenesis.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫学 制御性T細胞 生体イメージング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

免疫システムは、細菌・ウイルス・真菌など、無数に存在する病原体に対する生体防御の主要なメカニズムである。しかし、その矛先が無害な環境因子や自己分子に対して向けられると、アレルギーや自己免疫疾患の引き金を引く両刃の剣でもある。そのような誤った免疫応答を防ぎ、抗原の種類に応じた正しい免疫応答を作動させるうえで中心的な役割を担うのがCD4陽性T細胞(CD4T細胞)と呼ばれる細胞サブセットである。CD4T細胞は、免疫応答を活性化に導くヘルパーT細胞(Th)と、過剰な免疫応答を抑制する制御性T細胞(Treg)を含む。Tregは自己抗原や、花粉や腸内細菌のような無害な因子に対する免疫応答を抑制する機能を持ち、免疫系の恒常性を維持する必須の細胞サブセットである。この

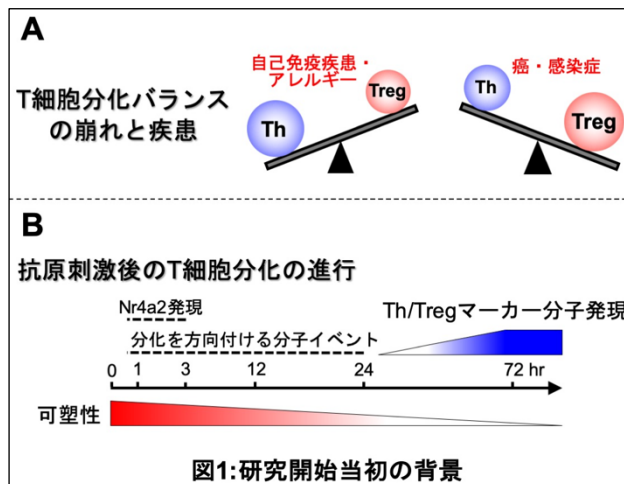


図1:研究開始当初の背景

Th/Treg 分化のバランスは重要であり、どちらが過剰になっても様々な疾患が引き起こされる(図1A)。

ThとTregの分化において、分化初期段階(抗原刺激後~12hr)では、分化を方向付ける様々な重要な分子イベントがダイナミックに進行している。さらに、この段階の細胞は分化の可塑性を少なからず有している。従って、分化初期段階にあるThやTregは重要な研究対象であり、さらに疾患治療における有力な標的であるともいえる(図1B)。しかし一方で、分化初期段階のThやTregの研究は遅れていると言える状況であった。

### 2. 研究の目的

上述の通り分化初期段階のThやTregの研究は遅れていると言えるが、その主な理由の一つとして、分化初期段階にあるThやTregをin vivoで検出できる強力なシステムが確立されていないことが考えられた。そこで本研究は、分化段階のThやTregをin vivoで低侵襲的にモニターでき、かつ生細胞として単離・解析できる新規レポーターシステムを構築し、この現状にブレークスルーを与えることを目的とし、開始された。この新規レポーターシステムを用い、マウス炎症性疾患モデルを、個体レベル・細胞レベル・分子レベルで、発症から寛解に至る過程を経時的に解析することで、

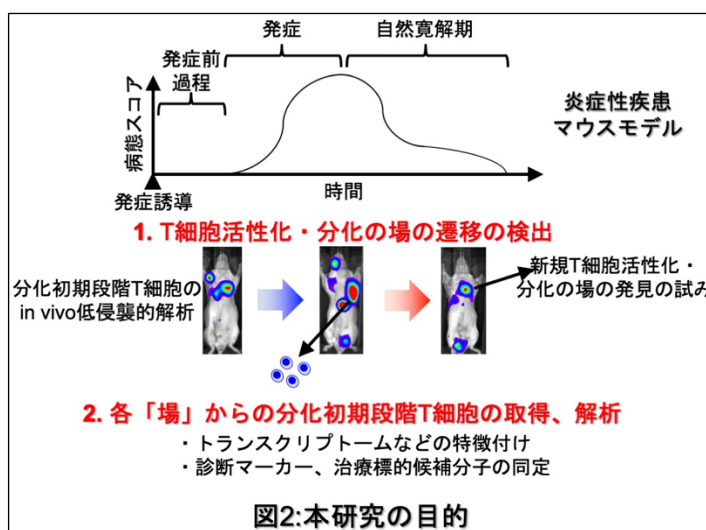


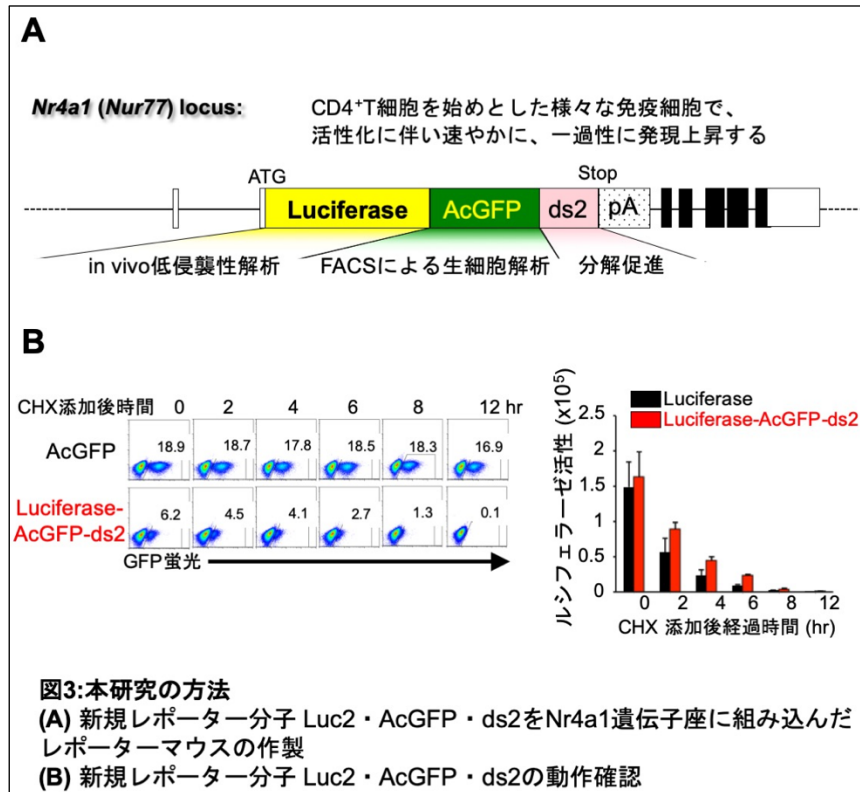
図2:本研究の目的

Th/Treg 分化の場の推移、分化制御におけるキーファクターの同定、ひいては新たな診断マーカーや治療標的の同定を目指した(図2)。

### 3. 研究の方法

本研究では、まず Nr4a1 遺伝子座にレポーター分子を組み込んだレポーターマウスの構築を行った(右図 3A)。Nr4a1 遺伝子は CD4T 細胞の活性化にともない、一過性に速やかに発現が誘導される分子であるため、このレポーターマウスは活性化した CD4T 細胞をとらえることを可能とする。さらに、レポーター分子には、研究代表者が独自に構築した、GFP と Luciferase と分解促進ドメイン(ds2)をタンデムに誘導した新規分子を用いた。この分子は、GFP による FACS での細胞レベルでの解析と Luciferase による in vivo イメージングの両方を可能にする。また、GFP は非常に安定な分子であるがゆえに活性化後の、内在性 Nr4a1 発現が消失した細胞もマーキングし続けてしまうことが懸念されるが、分解促進ドメインを融合することで、Nr4a1 を発現している細胞をリアルタイムにマーキングすることを可能にしている(右図 3B)。

続いて、構築されたレポーターマウスを用いて、マウスモデル炎症性疾患を、個体レベル・細胞レベルで発症過程を追って経時的に解析した。この解析により、発症の引き金となる Th の活性化を始め、その増幅から症状として表れるに至る一連の過程のメカニズムを解明し、ひいては新たな診断マーカーや治療標的の同定を目指した。一方、本研究で解析対象とするマウスモデル炎症性疾患は、自然寛解が高い頻度を持って確認される。治療を伴わない自然寛解は、動物実験でのみ詳しい解析が可能であると考えられ、解明の進んでいない現象である。本研究では疾患を自然寛解期まで延長して解析することで、そのメカニズムの解明を試み、ひいては予後診断マーカーや治療標的の同定を目指した。さらに本研究では、以上の in vivo 低侵襲性解析に加え、分化段階にある Th や Treg を生細胞として単離・解析することで、低侵襲性 in vivo 解析で明らかとした Th や Treg 活性化・分化の場から、それぞれの疾患ステージで、分化段階の Th や Treg を単離し、その遺伝子発現パターンを解析する。遺伝子発現の変動と病態スコアを併せて考察することで、発症前診断や予後診断に用いるマーカー候補の同定を目指した。



#### 4. 研究成果

##### 4-1. Nr4a1 新規レポーターマウス構築のための BAC (bacterial artificial chromosome) コンストラクトの構築を行った

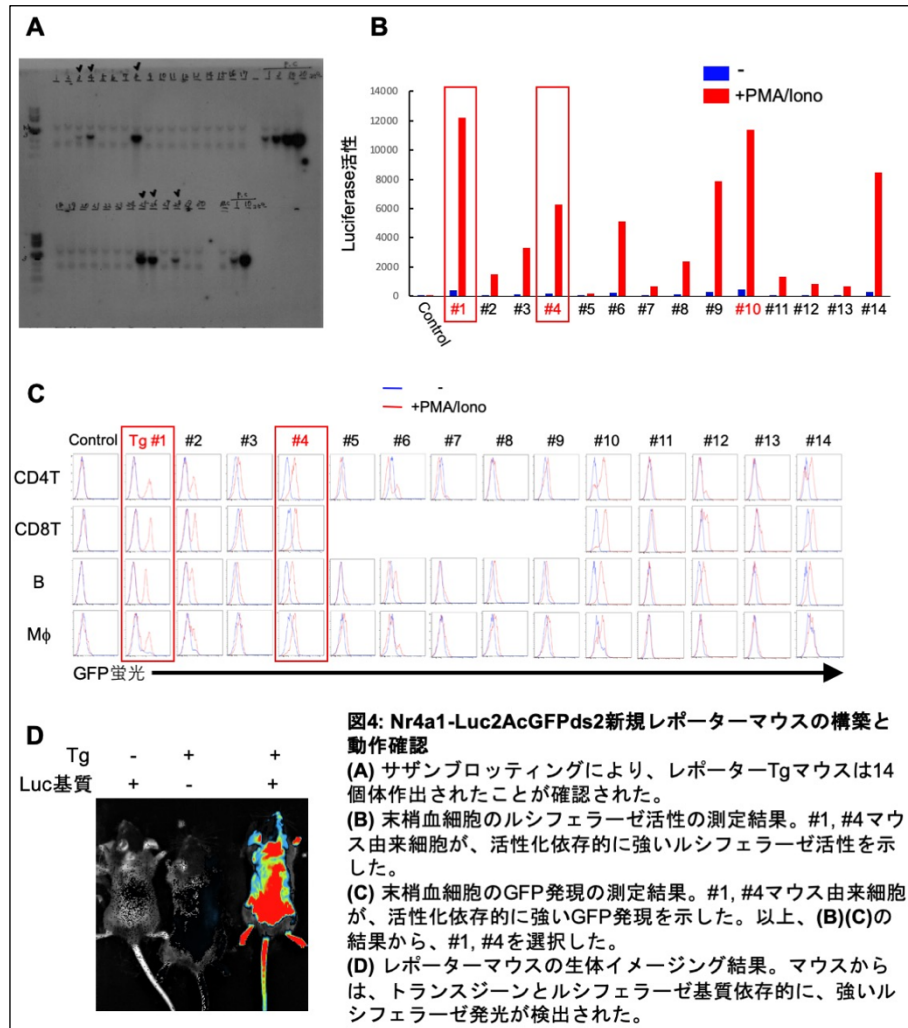
新規レポーターマウスの作製に用いるターゲティングベクターは、Nr4a1 遺伝子座を含む 200 kb 程度の遺伝子領域を含む BAC クローンに対し、Nr4a1 の 1st ATG 下流に新規レポーター分子である Luciferase・AcGFP・ds2 を挿入したものであり、Red/ET システムを用いた組み換え技術によ

り作製を行った。

#### 4-2. Nr4a1 新規レポーターマウスの構築に成功した

上述 4-1 で作製したターゲティングベクターを、体外受精により作製した C57BL/6J マウスの受

精卵にマイクロインジェクション法により注入し、2細胞期胚まで発生した胚を偽妊娠マウスに移植することでレポータートランスジェニックマウス (Nr4a1-Luc2・AcGFP・ds2-Tg マウス) の作出を行った。サザンブロッティングによる確認の結果、トランスジェン陽性の産仔は 14 個体得られた (図 4A)。続いて、これらトランスジェン陽性個体の末梢血を用い、



活性化 CD4T 細胞の GFP 発現とルシフェラーゼ活性を測定した結果、2 個体が活性化依存的に、特に強いレポーター分子の発現を示したため、これら 2 個体を選択し、その後の実験に用いることとした (図 4B, C)。

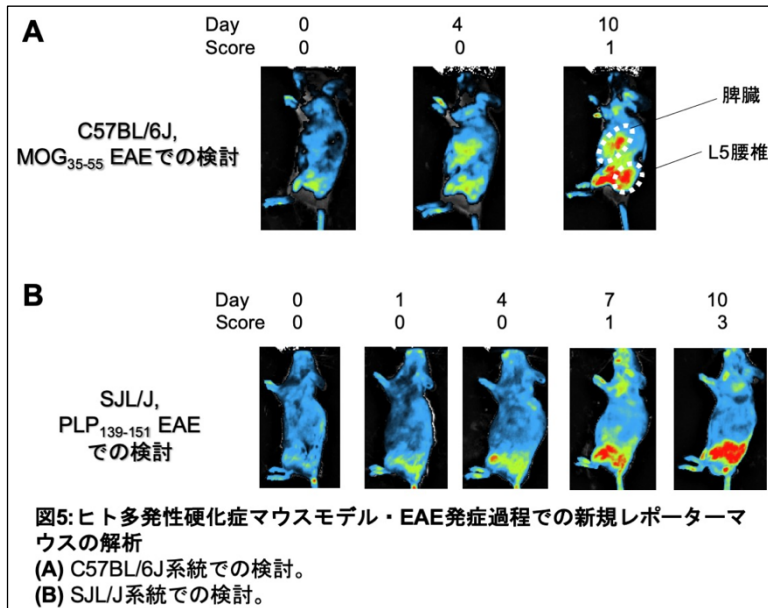
構築された Nr4a1-Luc2・AcGFP・ds2-Tg マウスから単離したプライマリ CD4T 細胞を解析した結果、これらの細胞では活性化にともなって速やかに GFP やルシフェラーゼ発現が見られ、さらに、誘導の半日後にはそれらの発現は消失することも確認された。これらの検討により、Nr4a1-Luc2・AcGFP・ds2-Tg マウスが目的どおりの動作をすることは細胞レベルで示されたため、続いて、ルシフェラーゼ基質をマウスに導入し、生体イメージングを行った。その結果、ルシフェラーゼ発光は予想どおり、トランスジェンとルシフェラーゼ基質依存的に検出されたため、Luc2・AcGFP・ds2-Tg マウスは in vivo でも目的通りの動作をすることが確認された。

#### 4-3. 多発性硬化症マウスモデル・EAE で既知の免疫応答、新規免疫応答の場の検出に成功した

続いて、以上構築を完了したレポーターマウスを用い、ヒト多発性硬化症マウスモデル (EAE) の発症と寛解の過程における免疫応答の活性化の場 (組織、器官) の推移の法則の検出を試みた。実験は2連で7ラウンド、計14匹の解析を行った。その結果、EAE発症の初期過程で、腰部から脊髄に沿って免疫応答の活性化が生じる現象を再現性を持って捉えることに成功している。特に、



EAE発症の初期段階では第5腰椎（L5）に病原性T細胞が集積することが明らかとされているが、本レポーターマウスでもEAEの発症にさきがけ、L5から特異的に、免疫細胞の活性化を示すルシフェラーゼ発光が検出された。従って本レポーターマウスは免疫応答の活性化部位を正確に示していることの裏付けが取れた（図5A）。さらに、これら既知の免疫応答の場に加え、口腔や腸管といったような、EAEの発症過程では解析の進んでいない部位からの免疫応答も検出しており、今後の研究展開に興味を持たれる。



#### 4-4. ヒト多発性硬化症により近いフェノタイプを示す解析系の構築を行った

4-3で解析を行ったEAEは、マウスの系統により異なった病態を示すことが知られている。特にSJL系統のマウスでのEAEは発症と寛解を繰り返すことが特徴的であることが知られており、よりヒト多発性硬化症に近いフェノタイプを示すことが確認されている。また、SJL系統のEAEは、本研究で目指す発症と寛解における免疫応答を捉える格好の研究材料となり得ると考えられた。そこで、Nr4a1-Luc2・AcGFP・ds2-TgマウスをSJL系統に戻し交配を行い、この系統のレポーターマウスでのEAEの検討を行い、発症過程における免疫応答の場を検出した（図5B）。

## 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 5件/うちオープンアクセス 5件）

|  |                              |
|--|------------------------------|
| 1. 著者名<br>Takashi Sekiya, Takaki Satoshi   | 4. 巻<br>9                    |
| 2. 論文標題<br>RGMB enhances the suppressive activity of the monomeric secreted form of CTLA-4   | 5. 発行年<br>2019年              |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports   | 6. 最初と最後の頁<br>6984           |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br><a href="https://doi.org/10.1038/s41598-019-43068-y">https://doi.org/10.1038/s41598-019-43068-y</a>   | 査読の有無<br>有                   |
| オープンアクセス<br>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<br>-                    |
| 1. 著者名<br>Lyszkiewicz Marcin, Winter Samantha J., Witzlau Katrin, Fohse Lisa, Brownlie Rebecca, Puchalka Jacek, Verheyden Nikita A., Kunze-Schumacher Heike, Imelmann Esther, Blume Jonas, Raha Solaiman, Sekiya Takashi, et al. | 4. 巻<br>17                   |
| 2. 論文標題<br>miR-181a/b-1 controls thymic selection of Treg cells and tunes their suppressive capacity   | 5. 発行年<br>2019年              |
| 3. 雑誌名<br>PLOS Biology   | 6. 最初と最後の頁<br>e2006716       |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1371/journal.pbio.2006716  | 査読の有無<br>有                   |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する                 |
| 1. 著者名<br>Chen Joyce, Lopez-Moyado Isaac F., Seo Hyungseok, Lio Chan-Wang J., Hempleman Laura J., Sekiya Takashi, Yoshimura Akihiko, Scott-Browne James P., Rao Anjana   | 4. 巻<br>567                  |
| 2. 論文標題<br>NR4A transcription factors limit CAR T cell function in solid tumours   | 5. 発行年<br>2019年              |
| 3. 雑誌名<br>Nature   | 6. 最初と最後の頁<br>530 ~ 534      |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br><a href="https://doi.org/10.1038/s41586-019-0985-x">https://doi.org/10.1038/s41586-019-0985-x</a>   | 査読の有無<br>有                   |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する                 |
| 1. 著者名<br>Takashi Sekiya, Hibino Sana, Saeki Keita, Kanamori Mitsuhiro, Takaki Satoshi, Yoshimura Akihiko  | 4. 巻<br>24                   |
| 2. 論文標題<br>Nr4a Receptors Regulate Development and Death of Labile Treg Precursors to Prevent Generation of Pathogenic Self-Reactive Cells   | 5. 発行年<br>2018年              |
| 3. 雑誌名<br>Cell Reports   | 6. 最初と最後の頁<br>1627 ~ 1638.e6 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.celrep.2018.07.008  | 査読の有無<br>有                   |
| オープンアクセス<br>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<br>-                    |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Hidenori Kasahara, Taisuke Kondo, Hiroko Nakatsukasa, Shunsuke Chikuma, Minako Ito, Makoto Ando, Yutaka Kurebayashi, Takashi Sekiya, Taketo Yamada, Shinichiro Okamoto, Akihiko Yoshimura | 4. 巻<br>29            |
| 2. 論文標題<br>Generation of alloantigen-specific induced-Treg stabilized by vitamin C treatment and its application for prevention of acute graft versus host disease model                            | 5. 発行年<br>2017年       |
| 3. 雑誌名<br>International Immunology  | 6. 最初と最後の頁<br>457-469 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1093/intimm/dxx060   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する          |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Taisuke Kondo, Rimpei Morita, Yuumi Okuzono, Hiroko Nakatsukasa, Takashi Sekiya, Shunsuke Chikuma, Takashi Shichita, Mitsuhiro Kanamori, Masato Kubo, Keiko Koga, Takahiro Miyazaki, Yoshiaki Kassai, Akihiko Yoshimura | 4. 巻<br>8           |
| 2. 論文標題<br>Notch-mediated conversion of activated T cells into stem cell memory-like T cells for adoptive immunotherapy   | 5. 発行年<br>2017年     |
| 3. 雑誌名<br>Nature Communications   | 6. 最初と最後の頁<br>15338 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/ncomms15338   | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する        |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Takashi Sekiya, Hiroko Nakatsukasa, Qignjin Lu, Akihiko Yoshimura   | 4. 巻<br>18            |
| 2. 論文標題<br>Roles of transcription factors and epigenetic modifications in differentiation and maintenance of regulatory T cells | 5. 発行年<br>2016年       |
| 3. 雑誌名<br>Microbes and Infection  | 6. 最初と最後の頁<br>378-386 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.micinf.2016.02.004  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する          |

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Takashi Sekiya, Satoshi Takaki, and Akihiko Yoshimura  |
| 2. 発表標題<br>Roles of the nuclear orphan receptor Nr4a in Th/Treg differentiation and in regulation of allergic asthma pathogenesis |
| 3. 学会等名<br>日本免疫学会総会・学術集会  |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>関谷 高史                       |
| 2. 発表標題<br>Nr4aファミリー転写因子によるCD4T細胞の分化制御 |
| 3. 学会等名<br>第28回 東京免疫フォーラム(招待講演)        |
| 4. 発表年<br>2019年                        |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Takashi Sekiya and Akihiko Yoshimura  |
| 2. 発表標題<br>Nr4a receptors promote completion of Treg cell developmental program and prevent conversion of labile Treg precursors into pathogenic cells |
| 3. 学会等名<br>16th International Congress of Immunology (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2016年  |

〔図書〕 計2件

|                             |                 |
|-----------------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>関谷 高史             | 4. 発行年<br>2019年 |
| 2. 出版社<br>医歯薬出版             | 5. 総ページ数<br>6   |
| 3. 書名<br>医学のあゆみ 制御性T細胞研究の現在 |                 |

|                                      |                 |
|--------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>Takashi Sekiya             | 4. 発行年<br>2018年 |
| 2. 出版社<br>Elsevir                    | 5. 総ページ数<br>432 |
| 3. 書名<br>Epigenetics of Autoimmunity |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-



6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|