

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16696

研究課題名（和文）細胞内代謝調節によるT細胞分化制御機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of T cell differentiation mechanism through cellular metabolism

研究代表者

舟崎 慎太郎（Funasaki, Shintaro）

熊本大学・国際先端医学研究機構・リサーチ・スペシャリスト

研究者番号：70794452

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：抹消組織に存在するT細胞は、抗原刺激後様々な機能をもつエフェクターT細胞へ分化することで、免疫メモリーや感染排除、サイトカイン産生といった独自の役割を担う。本研究では、代謝調節分子であるFolliculin(Flcn)がT細胞分化や機能を制御するメカニズムを明らかにする目的で、Flcn欠損におけるT細胞機能や分化へ与える影響をFlcnノックアウトによって解析した。その結果、FlcnはJAK-STAT経路を介して胸腺分化に関与する可能性が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

T細胞は外来抗原に対する排除のみならず、個体内で生じた腫瘍などの異常な自己も排除する役割をもつことで、個体全体の恒常性維持に関与する。よってT細胞の分化や活性化メカニズムを理解し、その機能を調節することは、個体の健康維持の理解において重要である。Flcnは細胞内の代謝を制御する中心的分子の一つとして明らかになったユニークな分子であるが、その機能がどのように代謝制御によって様々な生命現象に関与するのか不明な点が多い。本研究では、Flcnによるシグナル伝達がT細胞分化に関与することが示された。

研究成果の概要（英文）：Folliculin (Flcn) is a novel tumor suppressor gene that helps to control growth and cellular differentiation through a coordination of cellular metabolism. In this study, the Flcn roles for the T cell function and development were analyzed using the mouse model. Our data revealed the altered JAK-STAT pathway caused by Flcn deletion, suggesting the significance of Flcn functions for the T development.

研究分野：細胞代謝

キーワード：Folliculin T細胞分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 抹消組織に存在する T 細胞は、抗原刺激後様々な機能をもつエフェクター T 細胞へ分化することで、免疫メモリーや感染排除、サイトカイン産生といった独自の役割を担う。性質の異なるエフェクター T 細胞への分化や維持には、細胞の性質に応じたエネルギー産生や代謝産物が必要となるため、異なるエフェクター T 細胞への分化はナイーブ T 細胞からの異なる代謝ネットワーク構造の変化を伴うことが注目されている。例えば、短期機動性の攻撃性 T 細胞への分化には、がん細胞などで知られるワールブルグ効果のような解糖系優位な代謝リモデリングが必要とされる。一方で、メモリー T 細胞への変化には、再び抗原に晒された時に迅速に増幅できるように核酸や細胞膜成分などのための脂質分子の貯蓄が必要となり、酸化的リン酸化 (OXPHOS) や脂肪酸酸化 (FAO) を積極的に利用する。このように、代謝リモデリングは T 細胞の分化過程や分化後の細胞性質に密接に関係していることが明らかになりつつある。

(2) 栄養関連アダプター分子である Folliculin (*Flcn*) は解糖系と酸化的リン酸化 (OXPHOS) の分岐を制御する重要な分子である。*Flcn* 遺伝子は、腎臓や心臓発生、造血幹細胞維持、脂肪細胞や B 細胞分化など様々な生命現象に対して、細胞内の代謝を調節することで関与する。*Flcn* は転写因子 *Tfe3* の核への移行を抑制することで、その下流で制御される PGC-1 の転写を負に制御する。このことから、*Flcn* の欠損による *Tfe3* の核への移行がミトコンドリア合成を促進し、酸化的リン酸化優位な代謝変化を生じることがわかっている。*Flcn* の発現は TCR 刺激後に上昇することから、*Flcn* による代謝制御は、T 細胞分化においても重要な役割を持つと考えられる。

2. 研究の目的

T 細胞分化や維持における代謝変化の役割を、*Flcn* ノックアウトマウスの T 細胞性免疫機能や分化へ与える影響から解析する。得られた知見を元に、T 細胞自身の代謝リモデリングを誘導することで、異なるエフェクター T 細胞の分化や機能を賦活化することへ繋げる。

3. 研究の方法

マウス個体での T 細胞免疫システムに関する *Flcn* の役割を調べる。そのために、*Flcn*^{fl/fl}; Cre-ERT2 マウスと交配し、Tamoxifen 投与によって *Flcn* を欠損させたのちその個体での T 細胞への影響を解析する。さらに、*Flcn* が下流で負に制御している *Tfe3* の活性化によって生じる様々な機能との関連を明らかにするために、異常がみられた T 細胞分画に関する *Flcn* の有無によって生じる遺伝子発現プロファイルの違いを明らかにする。

4. 研究成果

(1) *Flcn* 欠損による胸腺 T 細胞分化の異常

CreERT2, *Flcn*^{fl/fl} マウスに Tamoxifen を投与して *Flcn* を欠損させることで、T 細胞に与える影響を評価した。その結果、*Flcn* 欠損後のマウスでは抹消及び胸腺での顕著な T 細胞数の減少、と胸腺自体の萎縮が見られた。よって抹消での T 細胞の減少は胸腺での分化異常に伴うものである可能性が示唆されたため、続いて胸腺 T 細胞について詳細に確認を行った。*Flcn* 欠損後のマウス由来の胸腺 T 細胞を用いて、DN から DP 細胞への分化過程に関して解析を行ったところ特に胸腺 T 細胞分化後半 (ISP, DP) での顕著な細胞数の減少が見られた (図 1)。

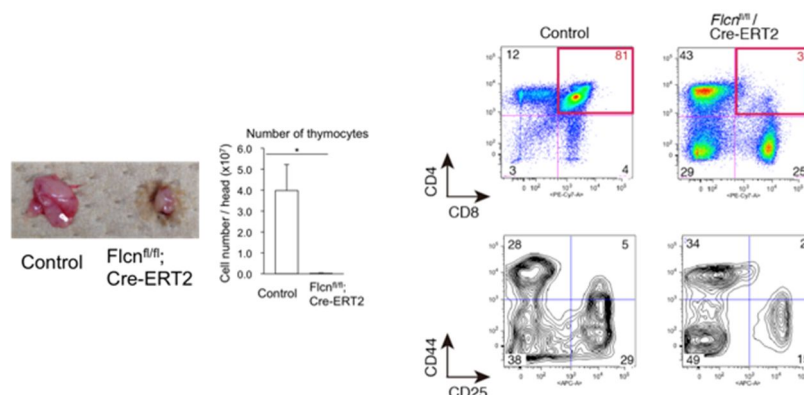


図 1 *Flcn* 欠損による T 細胞分化異常

(2) *Flcn* 欠損後の胸腺各分化段階での遺伝子発現プロファイルの取得

Flcn 欠損後は各分化段階の胸腺 T 細胞数が大きく減少するため、超微量 RNA からの完全長 cDNA 合成を可能とする RamDA-seq 法でライブラリーを作製し、次世代シーケンス (RNAseq) 解析を行った (図 2)。RNAseq データによると、*Flcn* の欠損によって生じた胸腺 T 細胞では全体として、Cell cycle や DNA replication に関する遺伝子群の発現が減少し、逆に Cell adhesion, や Viral protein interaction に関わる遺伝子群の発現上昇が見られる傾向にあることが分かった。この影響は DN3 から DP へと進む分画に行くほどより顕著に見られ、この結果は *Flcn* 欠損による細胞数減少と相関して強くなっていることがわかった。

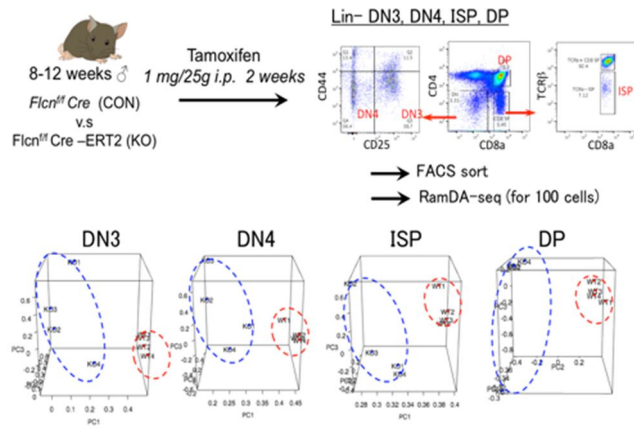


図 2 RamDA-seq 法を用いた胸腺 T 細胞による遺伝子発現データ取得 (*Flcn*^{fl/fl} (WT) vs *CreERT2 Flcn*^{fl/fl} (KO))

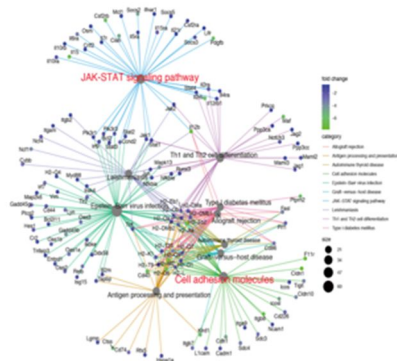
(3) *Flcn* 欠損後の発現差プロファイルの特徴

さらに、分化異常が強く見られる後期の分画 (ISP DP) において、特徴的な発現シグナチャーを明らかにするために Gene set enrichment 解析を行った。これによって、特に ISP/DP では JAK-STAT シグナル関連の遺伝子群の強い発現上昇が見られた (図 3)。現在 JAK-STAT 経路の異常な活性化との胸腺 T 細胞数減少の関連性を詳細に解析しているところである。正常な胸腺 T 細胞分化では、代謝ハブとしての *Flcn*-*Tfe3* 経路は細胞の生存や分化に関わる JAK-STAT 経路を調節することで細胞内代謝シグナルと細胞分化を繋ぐメカニズムとなる可能性が示唆された。

(4) *Flcn* 欠損細胞の異常について、T 細胞自身によることを示すために、*Flcn*^{fl/fl} Lck-Cre マウスの作製を進めている。さらに、下流の *Tfe3* の異常な活性化が T 細胞分化異常の原因であることを示すために、このマウスを *Tfe3* KO マウスとの交配することも進めている。

DP KEGG GSEA pathway enriched

Description	setSize	NES	pvalue	qvalues
Cell adhesion molecules	91	-2.183499444	8.61E-09	3.05E-07
Toll-like receptor signaling pathway	66	-2.13442776	1.01E-07	1.91E-06
JAK-STAT signaling pathway	89	-2.103364294	5.47E-08	1.38E-06
C-type lectin receptor signaling pathway	79	-2.041866841	2.04E-06	2.72E-05
Osteoclast differentiation	93	-1.968597619	2.33E-06	2.82E-05
Cytokine-cytokine receptor interaction	102	-1.964908656	2.35E-06	2.82E-05
NOD-like receptor signaling pathway	124	-1.897566498	5.41E-06	5.11E-05
TNF signaling pathway	82	-1.886632288	5.17E-05	0.000367275
Prolactin signaling pathway	53	-1.851467645	0.000336688	0.001869817
NF-kappa B signaling pathway	78	-1.808316245	0.0005728	0.002894147
RIG-I-like receptor signaling pathway	47	-1.741462112	0.002122754	0.008886245
Apoptosis	119	-1.656923557	0.001479119	0.006726099
Lysosome	116	-1.601554713	0.002190065	0.008886245
RNA transport	152	1.64112728	0.000838135	0.004054586
Cell cycle	116	1.64337535	0.001236887	0.005858939
Spliceosome	127	1.88001812	3.05E-05	0.000230965
Cysteine and methionine metabolism	37	1.909693962	0.001613171	0.007191845
Arginine and proline metabolism	31	1.91622771	0.00147123	0.006726099
Homologous recombination	36	1.966352557	0.000558394	0.002885481
DNA replication	35	2.11737574	8.14E-05	0.000528549



* *Flcn*^{fl/fl} (CON) vs *Flcn*^{fl/fl} Cre-ERT2 (KO)

図 3 胸腺 T 細胞分化後期 (DP) での JAK-STAT シグナル伝達経路に関する遺伝子群の上昇

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Tai-Nagara I, Hasumi Y, Kusumoto D, Hasumi H, Okabe K, Ando T, Matsuzaki F, Itoh F, Saya H, Liu C, Li W, Mukouyama YS, Marston Linehan W, Liu X, Hirashima M, Suzuki Y, Funasaki S, Satou Y, Furuya M, Baba M, Kubota Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Blood and lymphatic systems are segregated by the FLCN tumor suppressor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6314
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-20156-6	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

〔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
---------	---------