

令和 6 年 4 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03465

研究課題名（和文）自己免疫寛容を司るT細胞の選別原理の解明

研究課題名（英文）Elucidation of Mechanisms of T cell Selection for Self-Tolerance

研究代表者

高場 啓之（Takaba, Hiroyuki）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・助教

研究者番号：50637444

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）：胸腺由来の制御性T細胞（Treg）は自己抗原を認識することを特徴としているが、その分化機序はよく分かっていない。転写因子Fezf2は負の選択に関わるが、Tregの分化に関わるか分かってなかった。本研究課題では、胸腺で選択されるTregに関わる機能性分子の同定を試みた。申請者はFezf2欠損マウスを解析することであるTregサブセットの発生に関わり、中枢神経組織におけるがんや自己免疫疾患に関わることを見出した。この知見は、将来的に神経系の疾患の治療法を開発する上で重要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

T細胞は、人間の免疫系において中心的な役割を果たす重要な細胞の一つである。これらの細胞は、体を侵入した病原体やがん細胞を認識し、排除することによって、私たちの健康を守る。すべてのT細胞は胸腺で生成され、成熟する過程で、自己と非自己を区別する能力を獲得する。このプロセスは極めて重要で、自己反応性のT細胞が体内に残ると、自己免疫疾患の原因となる。しかし、一部の自己応答性T細胞は免疫抑制に関わる。申請者はFezf2欠損マウスを解析することで、中枢神経組織におけるがんや自己免疫疾患に関わる自己応答性T細胞集団を見出した。本研究は今後、さまざまな神経系の疾患の治療法を開発する上で極めて重要である。

研究成果の概要（英文）：Thymus-derived regulatory T cells (Tregs) are characterized by their ability to recognize self-antigens, but the mechanism of their differentiation is not well understood. The transcription factor Fezf2 is involved in negative selection, but it was unclear whether it is involved in Treg differentiation. In this research project, we sought to identify functional molecules involved in Tregs selected in the thymus. By analyzing Fezf2-deficient mice, the applicant found that certain Treg subsets are involved in development and in cancer and autoimmune diseases in central nervous tissue. These findings are important for the development of treatments for various nervous system diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：胸腺 制御性T細胞 神経性疾患 中枢神経組織

1. 研究開始当初の背景

ヒトは生まれてから各個人で独自の免疫システムを構築する。殊に、獲得免疫システムは T 細胞が抗原受容体 (T cell receptor; TCR) を介して、自身のペプチド配列と抗原提示分子 MHC 複合体を認識することで自己免疫寛容を成立させている。すべての T 細胞は胸腺で出来上がり、抗原受容体は胸腺でのみ再構成を行う。すなわち、自己応答性 T 細胞が一定数末梢臓器に存在することで、免疫寛容をつかさどっているが、この寛容は胸腺で成立していることになる。しかし、胸腺は正の選択と負の選択で自己応答性 T 細胞は除去されている。では、自己応答性 T 細胞はどのように胸腺で生き残るのか、その分子メカニズムはよくわかっていない点が多い。胸腺での自己応答性 T 細胞は自己抗原を認識し、一定の TCR シグナルが入ると転写因子 Foxp3 が発現することで細胞死を免れる。Foxp3 陽性の CD4 陽性ヘルパー T 細胞は制御性 T 細胞と呼ばれており、免疫抑制能を持つことが知られているが、どのような抗原を認識するかよくわかっていない。胸腺で生まれる制御性 T 細胞は自己抗原を認識して分化していることが明らかであり、胸腺髄質上皮細胞 (medullary thymic epithelial cell; mTEC) で発現する核内転写制御因子 Aire が異所性に末梢組織特異的な自己遺伝子 (Tissue-restricted antigen; TRA) を発現させている。これにより、TRA を認識する自己応答性 T 細胞は制御性 T 細胞へと分化する。これまで、mTEC で Aire がすべての TRA を誘導すると信じられてきたが、実際には多くとも 40%程度であり大半の TRA がどのように誘導されているかわかっていなかった。申請者らは、Aire には制御されていない転写因子 Fezf2 を同定し、Fezf2 が Aire 非依存的な TRA (全体の 30%程度) を制御し、負の選択に寄与していることを明らかにした (Takaba et al., *Cell*, 2015)。この研究時に申請者は、mTEC 特異的に Fezf2 を欠損させたマウス (Fezf2 conditional knockout mice; cKO マウス) では胸腺内の制御性 T 細胞が減少していることに気が付いた。そこで申請者は、Fezf2 が胸腺内の負の選択のみならず、制御性 T 細胞の分化にも寄与している可能性を見出した。

2. 研究の目的

胸腺内で出来上がる制御性 T 細胞は、免疫抑制能をもち末梢性の自己免疫寛容を成立させるために必須である。しかし、その分化機序や認識抗原はよくわかっていない。そこで、胸腺で自己抗原を誘導する転写因子 Fezf2 に着目し、Fezf2 依存的に発現誘導される自己抗原に应答する制御性 T 細胞が存在するかどうか、Fezf2 欠損マウスを用いることで明らかにする。制御性 T 細胞の認識する自己ペプチドと TCR の組み合わせと、末梢での機能の相関を明らかにすることで、自己免疫寛容の維持に関わる分子メカニズムを理解することを目的とした。

3 . 研究の方法

申請者はまず、野生型マウス (Fezf2 flox マウス) と Fezf2 cKO マウスを用いて制御性 T 細胞を回収し、シングルセル解析を行った。すると、4 つの大きな集団に分けられた。興味深いことに、Fezf2 欠損下は全体の制御性 T 細胞が減少しており、3 つの集団で遺伝子プロファイルが大きく変動していることが分かった。さらに、大部分の制御性 T 細胞の TCR レパトアは変化なかったが、1 つの集団で TCR レパトアが変動していることを見出した。この集団では、サイトカイン遺伝子 (Cyto) を高く発現することが特徴的であった。Cyto は機能性タンパク質として示唆されているものの、その受容体など分子メカニズムがよくわかっていない。そこで、Cyto 陽性の T 細胞集団を可視化するため、Cyto-Cre マウスを樹立し、Ai9 マウスと掛け合わせることで生理学的な条件下の Cyto 陽性 T 細胞集団の組織分布を解析した。Cyto 陽性 T 細胞は主に制御性 T 細胞集団の中に存在し、中枢神経組織移行性が高かった。そこで、Cyto Floxed マウスを CRISPR/Cas9 システムで樹立した。そして、Foxp3-Cre マウスと掛け合わせることで、制御性 T 細胞特異的 Cyto コンディショナルノックアウトマウス (Cyto conditional knockout mice; CKO マウス) を用意した。野生型と CKO マウスを用いることで、生理的解析を行った。Fate-mapping マウスを用いて、Cyto 陽性 T 細胞集団の生理的な組織分布を解析した。さらに、それぞれの病態において中枢神経組織でのシングルセル解析により制御性 T 細胞の遺伝子プロファイルを記述した。Cyto 陽性 T 細胞に関しては、標的となる細胞集団を細胞間相互作用解析アプリケーション CellPhone BD により、を同定した。さらに、自己免疫疾患モデルの多発性硬化症モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) やグリオーマモデルの GL261 細胞脳移植モデルのマウス解析を行うことで、Cyto 陽性 T 細胞の機能を明らかにした。Cyto 陽性 T 細胞と相互作用する細胞を調べるため、CellPhoneBD 解析により Cyto の標的細胞を予測した。精製した Cyto 組み換えペプチドを標的細胞へ投与した場合、細胞遊走性が見出された。その上、Bulk-RNA-seq 解析により、PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase) 経路を介した細胞活性が見出された。さらに、Cyto の受容体を同定するため、標的細胞に発現し、かつ Cyto と結合する受容体を免疫沈降 質量分析によりスクリーニングを試みた。スクリーニングの中から得られた候補 (Cyto-R) について、抗体を用意し免疫沈降法とウエスタンブロットで結合を確認した。また、機能性は発現分布パターンをフローサイトメトリーや組織免疫染色で確認した。一連のマウスモデルの結果がヒトにまで保存されているかを検証した。

4 . 研究成果

申請者は、野生型マウス (Fezf2 flox マウス) と Fezf2 cKO マウスを用いて制御性 T 細胞を回収し、シングルセル解析を行った。すると、4 つの大きな集団に分けられることが明らか

かになった。興味深いことに、Fezf2 欠損下は全体の制御性 T 細胞が減少しており、3つの集団で遺伝子プロファイルが大きく変動していることが分かった。さらに、大部分の制御性 T 細胞の TCR レパトアは変化なかったが、1つの集団で TCR レパトアが変動していることを見出した。さらに、制御性 T 細胞の TCR レパトア解析を行い、認識抗原予測から、特定の TCR と自己抗原ペプチド (Fezf2 依存的なペプチド) の紐付けを行った。中枢神経組織で高く発現する TRA (Neuronal TRA; nTRA) が Cyto 陽性の T 細胞の認識抗原であることが示唆された。次に、この手段で得られた nTRA ペプチド抗原が本当に制御性 T 細胞を活性化するかどうかを *in vitro* にて検証した。さらに、その制御性 T 細胞集団の遺伝子プロファイルを特徴づけして、高発現する機能性遺伝子を同定した。サイトカイン遺伝子 (Cyto) に着目し、その遺伝子を高く発現する制御性 T 細胞集団 (Cyto+制御性 T 細胞) を Fate-mapping マウスとして樹立した。Fate-mapping マウスを解析することで、Cyto 陽性制御性 T 細胞の組織分布を解析し、組織ごとの Cyto 陽性制御性 T 細胞の機能解析を行った。Cyto 陽性制御性 T 細胞は神経組織に浸潤することを見出し、多発性硬化症モデル EAE において慢性期の自己免疫様症状の制御に関わることが明らかになった。The Cancer Genome Atlas (TCGA) 解析を行った結果 nTRA の発現はグリオーマ患者で、生存に相関することが示唆された。マウスグリオーマモデルにおいて、Cyto 陽性制御性 T 細胞は脳腫瘍グリオーマの腫瘍巣でも機能することが明らかとなった。この結果より、Cyto 陽性制御性 T 細胞は胸腺で Fezf2 依存的に出来上がり、末梢において中枢神経組織で機能していることが示唆された。Cyto 自身の機能を明らかにするため、CKO マウスを樹立し、生理的条件下の解析を行ったが、Scurfy マウスや他のこれまでの制御性 T 細胞特異的ノックアウトマウスのように自己免疫症状は見出されなかった。そこで、野生型マウスと CKO マウスを用いて EAE モデルを行った。EAE モデルでは早期における発症具合は野生型と CKO マウスでは違いは見られなかった。しかし、慢性期において CKO マウスでは炎症が低下することが見出され、この結果は Cyto が中枢神経組織で炎症を誘導している可能性を示唆している。この結果を裏付けるように、EAE の CKO マウスでは、野生型に比べてミクログリア集団が大きく低下していた。Cyto の機能を明らかにするため、組み換え Cyto ペプチドをミクログリアへ投与した。Bulk-RNA-seq 解析の結果、ミクログリアの細胞活性、ケモタキシス関連遺伝子が大きく変動していることを見出した。実際、単球細胞への Cyto の処理で細胞遊走性の増加や P I 3 K のシグナル活性が見出された。つぎに、Cyto の機能性を確認できたので、ミクログリアに発現すると予想される受容体の同定を試みた。組み換え Cyto が結合する単球系細胞株をスクリーニングしたところ、ある単球細胞株で Cyto が再現性よく結合することが見出された。そこで、Cyto にタグをつけて免疫沈降-質量分析を行った。およそ 20 もの膜関連タンパク質が見出されたが、膜貫通ドメインをもつタンパク質は1つのみ (Rec) であった。そこで、免疫沈降により CytoR 候補との結合を、Rec 抗体を用いて WB を行ったところ Cyto との結合が確認できた。以上の結果より、Rec は CytoR であると結論付けた。興味深いことに、Rec と Cyto の結合は AlphaFold2 のタンパク質構造予測から Rec のポケット内部に収まり、極めて強い相互作用

を示すことが示された。最後に、Rec の発現をマウスで確認したところ、組織マクロファージや単球系マクロファージ系列の細胞で選択的に発現量が高いことが見出された。以上の結果から、nTRA 認識 T 細胞から産生される Cyto は単球系やミクログリアに発現する Rec のシグナル経路が獲得免疫システムの制御に関わることが分かった。今後、このシステムが進化的に保存されているかをヒト末梢血サンプルやがん患者検体を用いて検証していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Minglu Yan, Noriko Komatsu, Ryunosuke Muro, Nam Cong-Nhat Huynh, Yoshihiko Tomofuji, Yukinori Okada, Hiroshi I Suzuki, Hiroyuki Takaba, Riko Kitazawa, Sohei Kitazawa, Warunee Pluemsakunthai, Yuichi Mitsui, Takashi Satoh, Tadashi Okamura, ... Hiroshi Takayanagi	4. 巻 23
2. 論文標題 ETS1 governs pathological tissue-remodeling programs in disease-associated fibroblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature immunology	6. 最初と最後の頁 1330-1341
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41590-022-01285-0	査読の有無 無
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 Yoshihiko Tomofuji, Hiroyuki Takaba, Hiroshi I Suzuki, Rayene Benlaribi, Cristian David Pena Martinez, Yoshihiro Abe, Yasuyuki Morishita, Tadashi Okamura, Akashi Taguchi, Tatsuhiko Kodama, Hiroshi Takayanagi	4. 巻 8
2. 論文標題 Chd4 choreographs self-antigen expression for central immune tolerance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature immunology	6. 最初と最後の頁 892-901
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41590-020-0717-2	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Qiao Gou; Hiroyuki Takaba; Hiroshi Takayanagi.
2. 発表標題 The effector molecule derived from Tregs on lung cancer progression
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Qiao Gou; Hiroyuki Takaba; Hiroshi Takayanagi.
2. 発表標題 A mileue molecule from Tregs orchestrates lung cancer progression
3. 学会等名 日本炎症再生学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroyuki Takaba, Yoshihiko Tomofuji, Hiroshi Takayanagi
2. 発表標題 Promiscuous Gene Regulators for Central Immune Tolerance
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroyuki Takaba, Yoshihiko Tomofuji, Hiroshi Takayanagi
2. 発表標題 Promiscuous Gene Regulators for Central Immune Tolerance
3. 学会等名 The 42th Annual Meeting of the Japanese Society of Inflammation and Regeneration.
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