

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16279

研究課題名（和文）免疫抑制能を安定的に保持する制御性T細胞誘導メカニズムの解明

研究課題名（英文）A mechanism to generate the stably suppressive regulatory T cells

研究代表者

川上 竜司（Kawakami, Ryoji）

京都大学・医生物学研究所・特定助教

研究者番号：70869114

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：胸腺におけるFoxp3陽性制御性T細胞（regulatory T cell；Treg）の分化機構を、マウス胸腺を用いて探索した。主な成果として、クロマチン免疫沈降、トランスポザーゼクロマチン解析等を組み合わせ、X染色体上の200塩基と700塩基長からなる非コードDNA領域によるTreg特異的なエンハンサー制御が胸腺におけるTreg分化と免疫寛容の成立に不可欠であることを証明した。また、胸腺Treg分化の前駆細胞を新たに同定し、特定のサイトカインの相乗効果による新たな分化経路の存在も示した。これらは、自己免疫疾患、がんやアレルギーの制御法の改良・開発に寄与している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

制御性T細胞は自己免疫疾患、がん、アレルギーの制御に中心的な役割を果たすヘルパーT細胞サブセットである。これら疾患の多くは難治性ないし指定難病であり、免疫寛容誘導の生理学的メカニズムに基づく疾患病態の理解と治療法開発は急務である。今回新たに制御性T細胞分化メカニズムに寄与するDNA領域を明らかとし、未知のTreg前駆細胞集団をセルソータを用いて単離する技術を開発したことは、制御性T細胞分化の分子メカニズム研究を大いに進展させ、それを標的とした薬剤や治療法の開発につながるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The differentiation mechanism of Foxp3-positive regulatory T cells (Treg) in the thymus was explored using mouse thymus. By combining chromatin immunoprecipitation, transposase-chromatin analysis and CRISPR/Cas9 system, we demonstrated a contribution of evolutionally-conserved non-coding DNA sequences (CNSs) on the X chromosome consisting of 200 and 700 nucleotides in length is indispensable for thymic Treg differentiation and establishment of immune tolerance. We also identified new progenitor cells for thymic Treg differentiation and demonstrated the existence of a new differentiation pathway mediated by synergistic effects of specific cytokines. These findings may contribute to the improvement and development of control methods for autoimmune diseases, cancer and allergies.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫寛容 制御性T細胞 Treg エンハンサー CRISPR/Cas9

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Foxp3 陽性制御性 T 細胞(Regulatory T cell; Treg)は、免疫抑制能に特化した CD4 陽性 T 細胞サブセットで、生体内の免疫恒常性の維持に必須である。生体内の Treg は、Foxp3 等の Treg の免疫抑制能に重要な遺伝子座において、non-Treg 細胞と比較して特異的な CpG-DNA メチル化やエンハンサー活性化などのエピジェネティック状態を獲得している。そのため Treg はエフェクター T 細胞(Effector T cell; Teff)とは独立した lineage であると考えられている。

ナイーブ T 細胞から Teff/Treg への分化は、ともに抗原-TCR 刺激による T 細胞活性化で駆動される。TCR 刺激に応答したナイーブ CD4 陽性 T 細胞が、エフェクター T 細胞または制御性 T 細胞への分化を選択するメカニズムは、炎症性 (IL-12, IL-4, IL-6 等) または抑制性のサイトカイン (TGF-beta) 環境で説明されることが多い。しかし、TGF-beta 応答領域を含む非コード DNA 領域欠損マウスでは、末梢において Treg 分化が障害されるものの、正常に胸腺 Treg が分化するなど、胸腺内で Treg 分化誘導においては TGF-beta の必要性が低いとされており、胸腺内での Treg 分化メカニズムは完全に解明されていなかった。特に、胸腺 Treg 分化における非コード DNA エンハンサーの重要性も不明であった。

### 2. 研究の目的

胸腺 Treg 分化メカニズムを詳細に調べるため、(1) 胸腺 Treg 分化における非コード DNA 領域の意義の解明と、(2) Treg 分化関連非コード DNA 領域に繋がる上流シグナルの解明に照点を当て、研究を進めた。

### 3. 研究の方法

胸腺 Treg の分化メカニズムを明らかとするため、最初に Treg 分化に重要な非コード DNA エンハンサー領域の絞り込みを、クロマチン免疫沈降 DNA シークエンス(ChIP-seq)、トランスポザーゼオープンクロマチン解析(ATAC-seq)により行う。そこで明らかとなった候補領域について、CRISPR/Cas9 による KO マウスを作成し、生物学的重要性の証明を行う。また、各種 in vitro Treg 分化誘導実験等により、免疫学的な証明を行う。その DNA 領域 (単独または複数) を標的とする転写因子の探索を ChIP-seq 等により実施し、抗原刺激・サイトカイン刺激等の上流シグナルを考察する。それらの細胞内シグナルを生み出す胸腺内環境と T 細胞の相互作用について仮説を立て、介入実験により重要性を証明する。

### 4. 研究成果

#### (1) 胸腺 Treg 分化における非コード DNA 領域の意義の解明

胸腺 Treg の分化メカニズムを明らかとするため、最初に Treg 分化に重要な非コード DNA エンハンサー領域の絞り込みを行った。胸腺 T 細胞分化の各ステージにおいて、エピジェネティック DNA 領域のエンハンサー活性と相関のあるヒストン修飾 (H3K4me1, H3K27ac 等) と、クロマチン免疫沈降 DNA シークエンス(ChIP-seq)とトランスポザーゼオープンクロマチン解析(ATAC-seq)により、Treg マスター転写因子 *Foxp3* 周辺や、Treg 関連遺伝子群 (*Ctla4*, *Ikzf2* 遺伝子等) の周辺に、ダブルネガティブ胸腺細胞において H3K4me1 修飾された DNA 領域が発見された。これらの DNA 配列は、哺乳類/脊椎動物の間で高度に保存されており、機能的に重要であることが示唆された。また、これらのエピジェネティック活性化は T 細胞応答を欠損する Rag2 欠損マウスでも認められたことから、胸腺 Treg 分化の途上で TCR 非依存的なエピジェネティック活性化が最初に起こることが証明された。胸腺 Treg 分化におけるこれら非コード DNA 領域の重要性を証明するため、初期活性化ヒストン修飾シグナルの認められた *Foxp3* 遺伝子プロモーター上流ならびに exon1-exon2 間の intron 領域に存在するそれぞれ 700 塩基長、200 塩基長の DNA 領域 CNS0, CNS3 に着目した。CRISPR/Cas9 による DNA 欠損マウスを作成したところ、CNS0 または CNS3 を単独欠損するマウスはわずかな胸腺 Treg 分化の障害が見られるもののマウスは正常に発育した。一方、CNS0 と CNS3 領域を両欠損するマウスは胸腺 Treg が完全に消失し、致死的な全身性自己免疫疾患症状を呈した。これらは Treg 欠損マウス (Scurfy 系統) 等と一致する表現型であり、非コード DNA/CNS 領域の胸腺 Treg における意義が証明された (Kawakami et al. Immunity 2021)。

## (2) Treg 分化関連非コード DNA 領域に繋がる上流シグナルの解明

次に、胸腺 Treg 分化過程での Treg-type エピゲノム形成と、そのメカニズムを探索するため、ATAC-seq によりオープンクロマチン領域解析を実施した。CD24 陽性細胞に TCR 刺激、IL-2 刺激をそれぞれ、あるいは組み合わせて行った場合、TCR 刺激のみでも Foxp3 誘導や Treg-エピゲノム形成が促進されるが、IL-2 によりさらに相乗的に促進されることが分かった。一方で、IL-2 のみでは Foxp3 誘導や Treg-エピゲノム形成は促進されなかったことから、胸腺 Treg エピゲノム形成には TCR 刺激が主要な役割を果たすことが示唆された。この検討の過程で、胸腺内の CD4 陽性 T 細胞は当初 Treg 分化能を持つが、T 細胞の成熟に伴い徐々に Treg 分化能を減弱し、ヘルパー T 細胞分化能を高めることが示唆されていた。フローサイトメトリーによる解析により、CD24、Qa-2、CD73 等の表面マーカーで、Treg 分化能が高い集団を濃縮することが可能であることも明らかとした。胸腺 Treg 分化能がこの集団で高いメカニズムを明らかとするため、Infinity flow (Becht, Sci Advances 2021) による機械学習アプローチによる表面マーカーに基づくスクリーニングを実施し、胸腺 Treg 分化能をもつ胸腺未熟 CD4 シングルポジティブ細胞は、さらに数個の亜集団に分類でき、異なる Treg 分化ポテンシャルを有することを発見した (Kawakami et al. Manuscript in preparation)。

## (3) Treg の安定性における非コードエンハンサー領域の寄与

最後に、上記の新規に機能を同定した Foxp3-CNS0、Foxp3-CNS3 領域が、発生した Treg の安定性に寄与するかを検討した。Foxp3-CNS0 または CNS3、あるいは双方を欠損したマウスでも、非常に効率が悪いながら Treg が発生し、それらは高度に活性化した表現型を示し、免疫抑制能に野生型と比較して劣らなかった (unpublished data, Kawakami et al. Immunity 2021)。活性化した表現型は、CNS 欠損マウスの免疫寛容メカニズムを補填するための代償的増殖・活性化と考えられた。しかし、それらを *in vitro* で持続的に TCR 刺激を受ける、あるいは *in vivo* に transfer し自己抗原刺激に曝露させると、Foxp3 発現をひどくに低下させ、Foxp3 領域の H3K27ac 修飾が低下するなど、Treg の identity を失う傾向にあった。このとき、従来 Foxp3 の発現維持を担うとされた CNS2 エンハンサー領域の活性をバイサルファイトシークエンスにより CpG DNA メチル化を指標に検討したが、こちらは変化が認められなかった。したがって、Foxp3-CNS0/CNS3 領域は、従来の CNS2 を介した Foxp3 安定化とは異なるメカニズムで Treg の安定性に寄与する可能性が高く、今後その詳細な機序解析により安定で機能的な Treg を作成する技術開発等にも役立てられると考えられた (Kawakami, manuscript in preparation)。

以上の研究結果は、これまで未知だった Treg 分化の前駆段階を明らかとし、自己免疫寛容メカニズムの理解を促進するものである。今後はこれらの Treg 分化メカニズムに関わる新規の見解を、免疫系が免疫促進 (Immunogenic) あるいは免疫寛容 (Tolerogenic) な応答を選択するメカニズム研究へと発展させ、自己免疫疾患やがん等の疾患の発症メカニズム解明や、新たな創薬標的・モダリティの創出へと繋がることを期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 0件）

1. 著者名 Kawakami Ryoji, Kitagawa Yohko, Chen Kelvin Y., Arai Masaya, Ohara Daiya, Nakamura Yamami, Yasuda Keiko, Osaki Motonao, Mikami Norihisa, Lareau Caleb A., Watanabe Hitomi, Kondoh Gen, Hirota Keiji, Ohkura Naganari, Sakaguchi Shimon	4. 巻 54
2. 論文標題 Distinct Foxp3 enhancer elements coordinate development, maintenance, and function of regulatory T cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 947 ~ 961.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2021.04.005	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 川上竜司	4. 巻 77-3
2. 論文標題 胸腺における制御性T細胞分化に不可欠な非コードエンハンサー領域	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 346-351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 川上竜司	4. 巻 280-13
2. 論文標題 Non-Coding DNA領域による制御性T細胞分化メカニズム	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	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) なし	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Ryoji Kawakami
2. 発表標題 Isolation of thymic self-reactive T cells with differentiation preference for regulatory T cells
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryoji Kawakami
2. 発表標題 Coordinated activation of enhancer elements for thymic Treg development and immunological self-tolerance
3. 学会等名 The 17th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川上竜司
2. 発表標題 Contribution of T cell receptor- and Interleukin-2-signaling to the coordination of Treg-associated enhancer landscape
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川上竜司
2. 発表標題 A crucial role of the conserved non-coding sequences Foxp3-CNS0 and -CNS3 in the lineage specification of thymic Foxp3+ regulatory T cells
3. 学会等名 The 27th East Asia Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
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			
米国	Stanford University			
ドイツ	Johannes Gutenberg University of Mainz			