

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：38005

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16293

研究課題名（和文）CD8T細胞の分化におけるJunBの作用機序の解明

研究課題名（英文）Mechanism of JunB function in the differentiation of CD8+ T cells.

研究代表者

平良 直幸（Taira, Naoyuki）

沖縄科学技術大学院大学・免疫シグナルユニット・ポストドクトラルスカラー

研究者番号：40813621

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：T細胞分化に関するAP-1転写因子の重要性は数多く報告されているが、その一種であるJunBのCD8T細胞分化における機能はほとんどわかっていない。そこでエフェクターCD8T細胞の分化におけるJunBの役割を解明した。JunBの発現はLM-OVA感染4日後に増加し、7日後では発現は確認できなかった。重要なことにJunBを欠損するとエフェクターCD8T細胞の蓄積が起らず、Bimタンパク質が増加しアポトーシスが誘導されていた。JunB欠損の影響を細胞培養条件下で検討したところ、PD-1やTim-3の発現亢進が見られたことから、JunBはエフェクター細胞の生存に加え疲弊化も制御する可能性を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の結果から、CD8T細胞におけるエフェクター細胞分化においてのJunBタンパク質の役割を解明できた。JunBを欠損することでエフェクターCD8T細胞の蓄積がほとんど起こらないことから、JunBの存在はCD8T細胞が活性化し、外来抗原を除去するために非常に重要であり獲得免疫システムにおいて核となるタンパク質であると考えられた。さらにPD-1やTim-3等の疲弊化マーカーの発現に関連する可能性も示唆されたことから、今後がん免疫療法で着目されているエフェクターCD8T細胞の疲弊化を解除するための研究に繋がり、効果的ながん免疫療法の発展へ期待できる。

研究成果の概要（英文）：The importance of AP-1 transcription factors in T cell differentiation has been widely reported. However, the function of JunB, a type of AP-1 transcription factor, in CD8+ T cell differentiation is largely unknown. We investigated the role of JunB in effector CD8+ T cell differentiation. We found that JunB expression occurred 4 days after infection with LM-OVA, while downregulated 7 days after infection. Importantly, the accumulation of effector CD8+ T cells did not occur with the loss of JunB. This result is attributed to the high expression of Bim and activation of caspase-3 in JunB-deficient cells. Next, Bulk RNA-seq analysis was performed to investigate the effects of JunB other than cell death under cell culture conditions. Interestingly, we found that increased expression of PD-1 and Tim-3, which are involved in exhaustion in JunB deficient cell, suggesting that JunB may regulate not only effector cell survival but also exhaustion.

研究分野：免疫学

キーワード：CD8T細胞 転写因子 JunB

1. 研究開始当初の背景

免疫記憶は一度感染した病原体の情報を長期間記憶し、再感染時に一度目の感染よりも効率的に同じ病原体の感染を防ぐ獲得免疫機構である。この免疫記憶の一端を担うのがメモリーCD8⁺T細胞である。例えばウイルス感染に応じて、抗原特異的なCD8⁺T細胞が活性化すると、エフェクターCD8⁺T細胞とメモリーCD8⁺T細胞に分化する。エフェクターCD8⁺T細胞はウイルス感染細胞を強力に排除するが短命である。一方、メモリーCD8⁺T細胞は長期間生存する。さらにメモリーCD8⁺T細胞は、同じ病原体の再感染時には素早くエフェクターCD8⁺T細胞となり、効率よくウイルス感染細胞を排除する機能を有する。この分化メカニズムを理解することで、より効果的なワクチン開発に応用できると考えられ、CD8⁺T細胞の分化メカニズムが世界中で研究されている。

その研究結果の一例が、細胞分化の制御に対するAP-1転写因子の重要性である。AP-1転写因子はヘテロあるいはホモ二量体化しDNAに結合することで転写を制御し、様々な細胞の分化をコントロールする (Glover and Harrison, 1995)。AP-1転写因子のひとつであるBATFと、その相互作用因子IRF4はエフェクターCD8⁺T細胞の分化に必要である (Kurachi et al., 2014; Grusdat et al., 2014)。一方、BACH2はAP-1に属するJun転写因子JunDのDNA結合を阻害しメモリーCD8⁺T細胞への分化を促進する (Roychoudhuri et al., 2016)。また、Jun転写因子c-junはメモリーCD8⁺T細胞マーカーであるIL-7受容体発現を抑制する (Riera-Sans and Behrens, 2007)。これらのデータは、AP-1転写因子ネットワークがエフェクターおよびメモリーCD8⁺T細胞の分化に深く関わることを示唆する。しかしながら、各AP-1因子、特にJun転写因子のCD8⁺T細胞分化における機能はほとんどわかっていない。

すでに我々の研究室ではJun転写因子のひとつJunBが病原性Th17細胞の分化に必須であることを報告し (Hasan et al., 2017)、さらに近年では免疫反応の司令塔となるt-regの一種であるeffector t-regの制御にもJunBが関与していることを発見した (Koizumi et al., 2018)。Th17細胞やt-reg細胞はCD4⁺T細胞を由来とし、CD8⁺T細胞とは異なるT細胞であるが、JunBがCD4⁺T細胞由来の細胞で分化制御に重要な役割を果たす結果から、申請者はJunBがCD8⁺T細胞の分化にも関わる可能性があるかと推察し、T細胞特異的にJunBが欠損しているノックアウトマウスを用いて予備試験を行った(第4回デザイン生命工学研究会 早稲田大学 2019)。JunBはエフェクターCD8⁺T細胞への分化に必須であることに加え、CD8⁺T細胞のメモリーCD8⁺T細胞への分化も制御する可能性が示唆されたものの、CD8⁺T細胞の分化においてJunBの詳細な分子メカニズムおよび実際にJunBがメモリー細胞形成に関与するのかは明らかとなっていない。

2. 研究の目的

以上の背景から、JunBとCD8⁺T細胞のエフェクターおよびメモリー細胞への分化に関する関係性に独自に着目し、JunBがエフェクター細胞やメモリー細胞の分化にどのように関わり、どのようなメカニズムでそれらを制御しているのかを明らかにすることを目的とした。ここで得られるデータは、JunBがエフェクター細胞への分化に関わるという重要な知見、さらにメモリーCD8⁺T細胞への分化制御に関する新たな発見をもたらすと考えられた。加えて未解明のAP-1転写因子であるJunBがCD8⁺T細胞の分化を制御するという新規のメカニズムは、免疫記憶の形成、特に感染症に対する効果的なワクチン開発や新たながん治療への足掛かりになり得ることが期待される。

3. 研究の方法

生体内におけるCD8⁺T細胞のJunBの役割を明らかにするために、まずJunBがどのように発現するのかをOVA(鶏卵白構成タンパク質 Ovalbumine:OVA)抗原発現リステリア (*Listeria monocytogenes*: LM-OVA)感染モデルを用いてナイーブCD8⁺T細胞をエフェクターCD8⁺T細胞に分化誘導することで検証した。OT-1細胞(OVA抗原を特異的に認識できるCD8⁺T細胞)の養子移入を行った後にLM-OVAの感染後、4日目と7日目でJunBやその結合パートナーと予想されるIRF4やBATFの発現解析を行った。JunB欠損の影響を明らかにするために、JunB欠損OT-1細胞の養子移入を行い、LM-OVA感染モデルにおいてエフェクターCD8⁺T細胞やメモリーCD8⁺T細胞の挙動がどのように変化するのかをFACSやシングルセルRNA-seq解析を行った。次に網羅的にJunB欠損の影響を明らかにするためにin vitroでナイーブCD8⁺T細胞を活性化しbulk RNA-seqを行うことで、野生型の細胞との違いを検出した。最後にその違いが見られた分子の制御メカニズムをATAC-seqでJunBが関与する遺伝子群のクロマチン構造の変化、Chip-seqを行うことでJunB欠失によって変化する遺伝子群へのクロマチン結合の可能性を探索した。

4. 研究成果

移入した JunB 野生型細胞は LM-OVA 感染後 4 日目に JunB の発現が顕著に増加し、エフェクター細胞の分化が終了し細胞数の増加がピークになる 7 日目にはナイーブ CD8⁺T 細胞レベルにまで低下していた(図 1)。この現象は JunB の結合パートナーと推察される BATF や IRF4 も同様に観察されたが、同じ Jun ファミリーである c-Jun では観察されなかった。一方で JunB 欠損 OT-1 細胞はエフェクター CD8⁺T 細胞の増殖がほとんど見られなかった(図 2)。この結果から、JunB は結合パートナーである BATF や IRF4 と共に発現が上昇しエフェクター細胞の形成に深く関与することが示唆された。そこで感染 5 日後に移入した細胞を回収し、シングルセル RNA 解析を行った。シングルセル RNA 解析の結果を元にクラスター解析を行うと大きく二つのクラスターに分かれた。野生型の細胞と JunB 欠損の細胞は明らかに異なる形質を示し、野生型の細胞ではエフェクター形質を示す細胞が大多数を示したが、JunB 欠損細胞はメモリー細胞様の形質を示した。また、アポトーシスの誘導因子である Bcl2L11 の発現増加が JunB 欠損細胞では起こっており、フローサイトメトリーを用いたタンパク質発現解析でも同様の結果となり下流のシグナルである caspase-3 の発現も亢進していた(図 3)。クラスター解析の結果から、JunB 欠損細胞はよりメモリー細胞に分化する可能性が考えられたので、エフェクター細胞がピークになる LM-OVA 感染後 7 日目とメモリー細胞が形成され始める 14 日目の細胞集団を細胞表面マーカーである KLRG1 と IL-7R の発現量を元に SLEC(KLRG1⁺IL-7R⁻)と MPEC(KLRG1⁻IL-7R⁺)を比較した。予想に反して野生型と JunB 欠損細胞間で二つの細胞集団の比率は同程度だった。これらの結果から JunB はナイーブ CD8⁺T 細胞が抗原刺激を受けエフェクター細胞へと分化を遂げる際に細胞の生存に必須であることが示唆された。次に JunB がエフェクター細胞の生存以外に関与するのかを明らかにするために *in vitro* 培養による FACS 解析を行った。培養 4 日目で JunB 欠損細胞はエフェクター細胞の分化に関わることが知られている *prdm-1* や T-bet の発現減少が観察された。この結果から JunB が他の分子の発現制御にも関わることが示唆されたので、より網羅的に調べるために bulk RNA-seq 解析を行った。その結果、興味深いことに細胞の疲弊化に関わる PD-1 や Tim-3 遺伝子の発現亢進が JunB 欠損により起こっていた。実際にタンパク質の発現レベルを確認すると JunB 欠損細胞で増加が確認され、さらに疲弊化を誘導するとされる繰り返し抗原刺激モデルで比較を行うとより顕著に PD-1 や Tim-3 の発現増加が見られた(図 4)。これらの結果から JunB は細胞の疲弊化にも関与する可能性が示唆された。上述した分子の発現メカニズムに JunB がどの様に関わっているのかを明らかにするために、クロマチン構造の変化やターゲット遺伝子に対する JunB の結合性を野生型と JunB 欠損細胞で比較した。顕著なクロマチン構造変化はどの分子においても確認されなかったが、結合性は多くの分子において BATF や IRF4 と共に確認された。まとめると JunB はすでに報告がある BATF と IRF4 共に CD8⁺T 細胞のエフェクター分化に関わる分子を制御し、特にエフェクター細胞が活発に増殖す

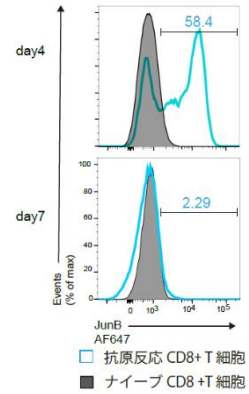


図 1 生体内における JunB の発現

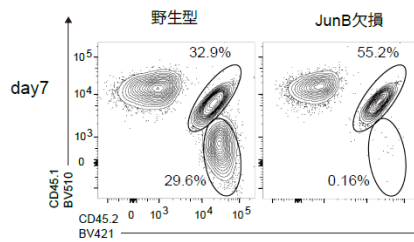


図 2 エフェクター CD8⁺T 細胞の増殖

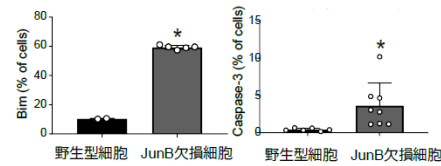


図 3 抗原反応性 CD8⁺T 細胞における細胞死関連分子の発現比較

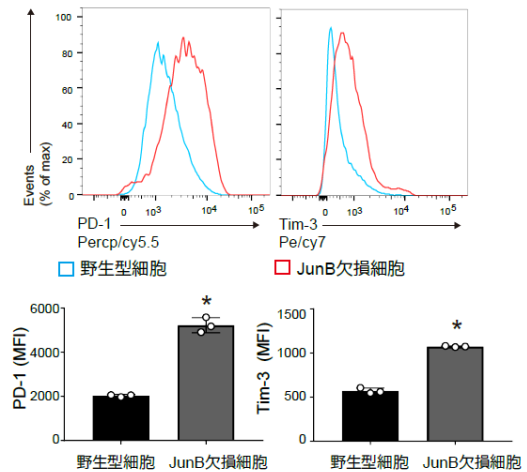


図 4 繰り返し抗原刺激による疲弊マーカーの発現比較

る初期において細胞の生存に必須の転写因子であることが明らかになった。さらに JunB が欠損すると疲弊化マーカーが亢進することから JunB は疲弊化に関与する可能性が示唆された。注目すべき点として、現在我々は JunB の発現低下が起こると特に Tim-3 の発現が増加することを、*in vivo* 腫瘍モデル内に存在している疲弊化 CD8⁺T 細胞でも確認している。今後さらなる研究を重ね JunB がどのように CD8⁺T 細胞の疲弊化に関与しているのかを明らかにしていきたい。

<参考文献>

- Glover, J.N.M., and Harrison, S.C. (1995). Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature* *373*, 257-261. 10.1038/373257a0.
- Grusdat, M., McIlwain, D.R., Xu, H.C., Pozdeev, V.I., Knievel, J., Crome, S.Q., Robert-Tissot, C., Dress, R.J., Pandyra, A.A., Speiser, D.E., et al. (2014). IRF4 and BATF are critical for CD8(+) T-cell function following infection with LCMV. *Cell Death Differ* *21*, 1050-1060. 10.1038/cdd.2014.19.
- Hasan, Z., Koizumi, S.I., Sasaki, D., Yamada, H., Arakaki, N., Fujihara, Y., Okitsu, S., Shirahata, H., and Ishikawa, H. (2017). JunB is essential for IL-23-dependent pathogenicity of Th17 cells. *Nat Commun* *8*, 15628. 10.1038/ncomms15628.
- Koizumi, S.I., Sasaki, D., Hsieh, T.H., Taira, N., Arakaki, N., Yamasaki, S., Wang, K., Sarkar, S., Shirahata, H., Miyagi, M., and Ishikawa, H. (2018). JunB regulates homeostasis and suppressive functions of effector regulatory T cells. *Nat Commun* *9*, 5344. 10.1038/s41467-018-07735-4.
- Kurachi, M., Barnitz, R.A., Yosef, N., Odorizzi, P.M., DiIorio, M.A., Lemieux, M.E., Yates, K., Godec, J., Klatt, M.G., Regev, A., et al. (2014). The transcription factor BATF operates as an essential differentiation checkpoint in early effector CD8⁺ T cells. *Nat Immunol* *15*, 373-383. 10.1038/ni.2834.
- Riera-Sans, L., and Behrens, A. (2007). Regulation of alphabeta/gammadelta T cell development by the activator protein 1 transcription factor c-Jun. *J Immunol* *178*, 5690-5700. 10.4049/jimmunol.178.9.5690.
- Roychoudhuri, R., Clever, D., Li, P., Wakabayashi, Y., Quinn, K.M., Klebanoff, C.A., Ji, Y., Sukumar, M., Eil, R.L., Yu, Z., et al. (2016). BACH2 regulates CD8(+) T cell differentiation by controlling access of AP-1 factors to enhancers. *Nat Immunol* *17*, 851-860. 10.1038/ni.3441.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------