

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07082

研究課題名(和文) 転写時間動態解析とCRISPRによる生体内でのFoxp3発現制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Deciphering the Mechanism of Foxp3 Expression Control in Vivo Using Transcriptional Dynamics Analysis and CRISPR

研究代表者

小野 昌弘 (Ono, Masahiro)

熊本大学・ヒトレトロウイルス学共同研究センター・特任教授

研究者番号：60447951

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)：この研究では、申請者が開発したTockyという技術を用いて進められました。この技術は、蛍光Timerタンパクをレポーター遺伝子として使用し、生体内での一細胞レベルでの転写動態を解析するもので、特に免疫反応中のT細胞におけるFoxp3の転写動態に焦点を当てています。具体的には、Foxp3-TockyのCNS2配列にCRISPRを用いた欠損を行ったマウス(Foxp3-Tocky CNS2 KO)を作製し使用しました。これらのマウスを用いて、定常状態、発達、および接触過敏症を含む疾患モデルを使い研究を行い、CNS2依存型のFoxp3転写時間動態を解明しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1) この研究は、免疫細胞内の転写因子の調節の分子的複雑さを強調し、Foxp3の転写動態に関する重要な洞察を提供します。CNS2調節配列とその遺伝子発現制御の役割に焦点を当てることで、遺伝子および細胞生物学の既存概念を再定義する可能性のある遺伝子調節の基本的な側面を探求します。

2) 蛍光タイマータンパクをレポーター遺伝子として使用したTocky技術、とくにFoxp3-Tockyツールは申請者(小野昌弘)が開発した独自の革新的技術です。この技術を発展させ、生体内の一細胞レベルでの遺伝子発現変化をリアルタイムで追跡する方法は、細胞プロセスの動的な研究に新たな次元を提供します。

研究成果の概要(英文)：This study advanced the application of a technique developed by the applicant, called Tocky, which uses a fluorescent Timer protein as a reporter gene to analyze transcriptional dynamics at the single-cell level in vivo, specifically targeting Foxp3 transcription dynamics in T cells during immune responses. This research involved the generation and utilization of mice (Foxp3-Tocky CNS2 KO) with a CRISPR-edited deletion in the CNS2 sequence of Foxp3-Tocky. These mice were employed to study various T cell immune induction models, including steady-state, developmental, and disease contexts such as contact hypersensitivity. The research focused on examining how these cells establish a transcription program in response to immune challenges. Special emphasis was placed on understanding the temporal dynamics of Foxp3 transcription and the regulatory effects of CNS2 sequence deletion, particularly as cells transition into an activated state under antigen stimulation or inflammatory conditions.

研究分野：Molecular and Systems Immunology

キーワード：Transcription T cells Fluorescent Timer Tocky

1. 研究開始当初の背景

転写因子 Foxp3 は T 細胞の反応・ふるまいを調節し、「抑制活性」とされる免疫反応を抑制する活性を誘導します。Foxp3 を発現する細胞は制御性 T 細胞(Treg)と呼ばれています。しかし、Treg が生体内でどのようなタイミングで抑制活性を発揮するのか、その動的な分子メカニズムは何かについては概ね不明です。

この問題は、免疫学・細胞生物学で広く共通する時間動態解析の問題を根本としていません。これを包括的に解決するため、申請者(小野昌弘)は、蛍光 Timer タンパク(Fluorescent Timer protein)をレポーター遺伝子として用いて生体内での転写の時間動態を 1 細胞レベルで解析する技術、Tocky (Timer-of-cell-kinetics-and-activity, 「とき」)を開発しました。

申請者は Tocky を Foxp3 の転写動態解析に応用したツール、Foxp3-Tocky を開発しました(Bending et al, 2018)。そして、この Foxp3-Tocky ツールを用いて、生体内で免疫反応中の T 細胞における Foxp3 転写動態の研究を進めてきました。

(1) Foxp3 の遺伝子制御領域である、Conserved Non-coding Sequence 2 (CNS2、保存された非コード配列 2) は Treg 特異的脱メチル化領域 (TSDR) としても知られる 500 塩基程度の配列です。これまでの研究で以下のことが示されています。

CNS2 領域は、Foxp3 の安定した発現に不可欠です。研究によると、CNS2 は特に Treg がサイトカインや環境的圧力にさらされた際に Foxp3 の発現を維持するために欠かせないことが示されています。これらの条件下では、そうでなければ Foxp3 の発現とそれに伴うこれらの細胞の抑制機能が失われる可能性があります。

(2) CNS2 は、安定して機能する Treg 内で脱メチル化されたままのエピジェネティックなスイッチとして機能し、Foxp3 の継続的な発現を保証します。この脱メチル化は、細胞分裂時に Treg のアイデンティティを遺伝的に維持するために不可欠であり、これが生体内でこれらの細胞の持続的な抑制機能を保証する重要な要素です。特に重要なのは、CNS2 は複数の転写因子と相互作用しますが、その中でも Runx1 は Foxp3 に結合し、Foxp3 の活性を作用する上で必要なものです。

2. 研究の目的

本研究では、Foxp3 の遺伝子制御領域による Foxp3 転写時間動態の制御メカニズムの解明を目指します。特に、Treg が抗原を認識すると、Treg 内の Foxp3 タンパクが Foxp3 遺伝子制御領域に結合して転写を活性化し、自己転写制御ループ (autoregulatory loop) を作動させて Treg の抑制活性を誘導するという仮説を検討します。

特に、自己転写制御ループを制御するための遺伝子制御領域として重要なものと考えられる CNS2 配列を同定し、この配列がどのようにして Foxp3 転写時間動態を形作るのかを明らかにすることを目標に設定しました。

そして、とくに発生中の T 細胞、定常状態 (ホメオスタシス) にある T 細胞、炎症反応中の T 細胞における Foxp3 の動的な転写制御を明らかにすることを目的にしました。

3. 研究の方法

Foxp3-Tocky マウスの CNS2 配列を CRISPR 編集により欠損させたマウス (Foxp3-Tocky DCNS2) を作製しました。これを使用して、以下の生理的・病理的状态を解析します：

- 1) T 細胞の胸腺における発生
- 2) T 細胞の定常状態 (ホメオスタシス)
- 3) 抗原による T 細胞免疫誘導モデル (接触性皮膚炎など)

これらのモデルの解析を通じて、生体内で発生中、ホメオスタシス中、または免疫反応中に Foxp3 がどのようにして CNS2 に依存した転写制御を行うのかを明らかにすることを目的としています。この研究は、Foxp3 の機能と制御機構の理解を深めることで、免疫調節に関連する疾患の治療法開発に貢献する可能性があります。

4 . 研究成果

Tocky を発展させた高度な実験・データ解析技術を開発することで、特定の遺伝子配列である CNS2 依存型の Foxp3 転写時間動態を解明しました。このことは、CNS2 調節配列とその遺伝子発現制御の役割に焦点を当てることで、遺伝子および細胞生物学の既存概念を再定義する可能性のある遺伝子調節の基本的な側面を探求します。

また、蛍光タイマータンパクをレポーター遺伝子として使用した Tocky 技術、とくに Foxp3-Tocky ツールは申請者（小野昌弘）が開発した独自の革新的技術です。この技術を進化させ、生体内の一細胞レベルでの遺伝子発現変化をリアルタイムで追跡する方法は、細胞プロセスの動的な研究に新たな次元を提供し、免疫学の新たな地平を開く研究につながります。

本研究により、いくつかの重要な研究論文が発表されています。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hassan Jehanne, Appleton Elizabeth, Kalfaoglu Bahire, Pedersen Malin, Almeida-Santos Jose, Kanemaru Hisashi, Irie Nobuko, Foo Shane, Reda Omnia, Tan Benjy J.Y., Okazaki II-mi, Okazaki Taku, Satou Yorifumi, Harrington Kevin, Melcher Alan, Ono Masahiro	4. 巻 0
2. 論文標題 Single-cell level temporal profiling of tumour-reactive T cells under immune checkpoint blockade	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 0-0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2022.07.19.500582	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Almeida-Santos Jose, Berkachy Rita, Tye Chanidapa Adele, Hassan Jehanne, Kalfaoglu Bahire, Selkirk Murray E., Ono Masahiro	4. 巻 0
2. 論文標題 Temporal profiling of CD4 T-cell activation and differentiation upon SARS-CoV-2 spike protein immunisation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 0-0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2022.07.21.500987	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Tan Benjy J.Y., Sugata Kenji, Reda Omnia, Matsuo Misaki, Uchiyama Kyosuke, Miyazato Paola, Hahaut Vincent, Yamagishi Makoto, Uchimaru Kaoru, Suzuki Yutaka, Ueno Takamasa, Suzushima Hitoshi, Katsuya Hiroo, Tokunaga Masahito, Uchiyama Yoshikazu, Nakamura Hideaki, et al	4. 巻 131
2. 論文標題 HTLV-1 infection promotes excessive T cell activation and transformation into adult T cell leukemia/lymphoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 0-0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI150472	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 -

1. 著者名 Ono Masahiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Unraveling T-cell dynamics using fluorescent timer: Insights from the Tocky system	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 0-0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.bppb-v21.s010	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 -

1. 著者名 Tan Benjy Jek Yang, Ono Masahiro, Satou Yorifumi	4. 巻 0
2. 論文標題 Single-Cell Transcriptome Analysis of Treg	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods In Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 259 ~ 278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2647-4_17	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		
英国	Imperial College London		