

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：82610

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19393

研究課題名（和文）ナイーブT細胞不均一性の形成メカニズムと意義の追求

研究課題名（英文）Mechanisms and meanings of phenotypic alteration of naive CD4 T cells

研究代表者

関谷 高史（Sekiya, Takashi）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・免疫応答修飾研究室長

研究者番号：80519207

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ナイーブCD4細胞（TN細胞）は生体内で、受け取るトニック刺激の強度により性質変化を受け、不均一性が形成されることが明らかとなっていたが：1.不均一性形成のメカニズム（トニック刺激以外に、他の刺激も関わるのか、など）2.不均一性形成の意義や、疾患発症の制御における重要性 3.トニック刺激による性質変化の持続性など、様々な疑問点が未解明であった。本研究は、新たに構築したNr4a1-dsGFPレポーターマウスを用いた解析を足掛かりに、それらTN細胞の不均一性に関する疑問点の解明に挑み、IL-1bが脾臓や炎症組織でTN細胞に、Treg分化能の減弱などの作用を及ぼしていることを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TN細胞の不均一性は、その重要性が証明されていないために、注目を集めていない状況にあった。しかし本研究は、疾患マウスモデルを用いた検討やヒト疾患検体データのマイニングにより、TN細胞の不均一性形成の病態生理学的意義を解明した点に、社会的意義を有する。また、免疫研究における激戦分野の一つであるヘルパーT細胞(Th)/制御性T細胞(Treg)分化の研究は急速に進められてきた一方で、TN細胞を均一な集団と捉えると説明のつかない現象も多々見だされてきていた。本研究は、TN細胞の不均一性という新たな切り口からTh/Treg分化のさらなる理解を深めた点に、一つの学術的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：Naive CD4+ T (TN) cells differentiate into helper T- or regulatory T (Treg)-cell subsets upon encountering antigens, supporting properly directed immune responses. Although all TN cells can differentiate into any Th- and Treg-cell subsets, recent studies revealed heterogeneity among TN cells. Using novel reporter mice to detect ongoing T cell receptor (TCR) signaling, we identified IL-1b signaling as a novel factor that affected TN cell characteristics, independent of tonic TCR signaling that alter TN cells. IL-1b attenuated the differentiation potential of TN cells toward Treg cells. IL-1b signaling was elevated in the splenic TN cells, attenuating their differentiation potential toward Treg cells. Aberrant elevation of IL-1b signaling augmented colitogenic activities of TN cells. Furthermore, TN cells in patients with colitis exhibited elevated IL-1b signaling. Our work revealed the phenotypic alteration of TN cells by IL-1b as a novel regulatory mechanism for immune response.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫学 CD4T細胞 制御性T細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

免疫系は様々な病原体に対峙する一方で、自己抗原や無害な環境因子に対しては寛容的に機能しなければならない。このような、抗原の種類に応じた的確な免疫応答において、中心的な役割を担っている細胞種が CD4T 細胞である。CD4T 細胞は、始めは機能を持たない「ナイーブ T 細胞 (TN 細胞)」という形で発生するが、抗原提示を受けると、その抗原の種類に応じたヘルパー T 細胞 (Th) サブセットもしくは制御性 T 細胞 (Treg) に分化し、的確な免疫応答を作動させる。しかし TN 細胞はあくまで、いずれかの Th, Treg サブセットへの分化能を持つ未感作細胞であり、不均一な細胞集団として語られることは殆ど無い。しかし TN 細胞は、生体内で維持されるために、活性化が導かれられない程度の強さの抗原刺激 (トニック刺激) を適宜受け取っており、特に、強めのトニック刺激を受け取った TN 細胞では、Treg 分化能の亢進や、疲弊化マーカー・PD-1 の発現上昇が見られることが報告されている。このように、トニック刺激が一つのメカニズムとなり、TN 細胞に、少なくとも一過的に性質変化が誘導され、TN 細胞集団に不均一性が形成されることは、申請者の先行研究でも確認されていた確かな現象であった。しかし、不均一性が形成されるメカニズムの詳細や、不均一性が形成される意義の多くが未解明であったため、大きな注目を集めていない現象に留まっていたのが研究開始当初の背景であった。

### 2. 研究の目的

上述の通り、TN 細胞は生体内で、受け取るトニック刺激の強度により性質変化を受け、不均一性が形成されることが明らかとなっていたが: **1.不均一性形成のメカニズム** (トニック刺激だけで形成されるのか、他の刺激も関わるのか、など) **2.不均一性形成の意義や、疾患発症の制御における重要性** **3.トニック刺激による性質変化の持続性やメモリー化の有無** など、様々な重要な疑問点が未解明であった。本研究は、それら TN 細胞の不均一性に関する疑問点の解明を目指した。TN 細胞は Th/Treg 分化の起点、すなわち免疫応答の方向性が決定されるうえでの起点に位置する。本研究は、TN 細胞の不均一性の追求という新しい切り口から、免疫システムの理解を深めることを目的とし、ひいては、免疫関連疾患の新規治療法の開発や、効果的なワクチンの開発などの応用面の進歩に対しても手掛かりを与えることを目指して遂行した。

### 3. 研究の方法

#### 1. TN 細胞不均一性の形成メカニズムの検討

上述の通り、トニック刺激は TN 細胞の性質変化を導くことが確認されている唯一のファクターであった。従来型の Nur77-GFP マウスを用いた検討では、他組織でトニック刺激を受けた TN 細胞が、GFP 蛍光の持続により、別の組織でトニック刺激陽性として検出される可能性があったため、TN 細胞不均一性の形成における組織間の違いを検討するには不向きであった。その結果、TN 細胞の性質変化に対するトニック刺激以外の関与 (サイトカイン刺激や細胞間相互作用など) の検討が大きく制限されていた。一方、Nr4a1-dsGFP を用いた申請者の先行研究では、TN 細胞を異なる 2 次リンパ組織から単離し、Treg 分化能を比較したところ、dsGFP high 画分と low 画分の差の大きさが、組織ごとに異なることを見出していた。この結果は、トニック刺激以外にも TN 細胞の不均一性に寄与するファクターが存在することを示唆していた。そこで本研究では、各組織から Nr4a1-dsGFP high 画分と low 画分の TN 細胞を取得し、ATAC-seq や RNA-seq による比較解析を行うことで、不均一性の形成に寄与するファクターの同定を試みた。

#### 2. TN 細胞不均一性形成の意義、疾患発症制御における重要性の追求

強めのトニック刺激を受けた TN 細胞には、Treg への分化能の亢進や、PD-1 などの疲弊化マーカーが誘導されるという現象は、自己への免疫反応を防ぐメカニズムの一つであると考えられていたが、推測の域を出ていなかった。そこで本研究では、関節リウマチを自然発症する SKG マウスや、炎症性腸疾患を自然発症する IL-10<sup>-/-</sup>マウスと Nr4a1-dsGFP マウスを交配し、これらのマウスで TN 細胞不均一性形成の異常を追求した。また、上述 1. の ATAC-seq 解析で見出した制御領域に対し、ヒト疾患検体のパブリックデータをマイニングすることにより、ヒト疾患と TN 細胞不均一性の関連性を追求した。

#### 3. トニック刺激による TN 細胞性質変化の持続性やメモリー化の検討

従来型 Nr4a1-GFP マウスの末梢血では、Nr4a1-dsGFP マウスでは検出されない GFP<sup>hi</sup> の TN 細胞

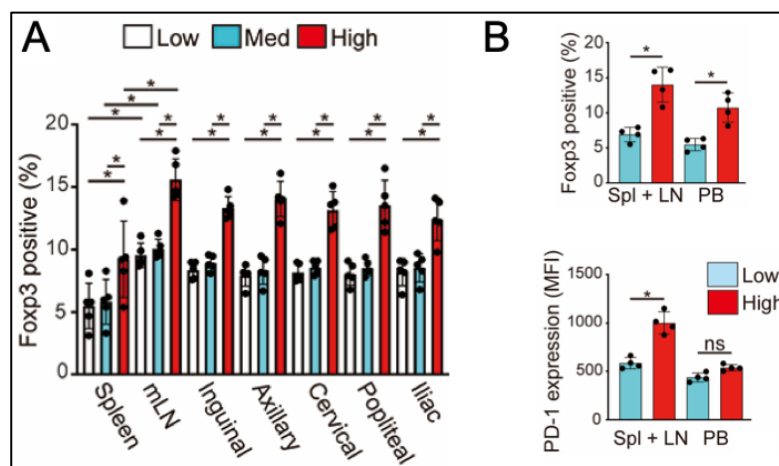
細胞が確認された。GFP と dsGFP の蛍光の持続性を考慮すると、この細胞集団は 2 次リンパ組織で強めのトニック刺激を受けた細胞が末梢血中に遊走してきたものと推定できた。そこで、この細胞集団を解析することで、トニック刺激による TN 細胞の性質変化が一過性のものなのか、メモリー化されるものなのかを検討した。

#### 4. 研究成果

1. 生体内でより強いトニック TCR 刺激を受けた TN 細胞は、Treg 分化能の亢進と疲弊化マーカー・PD-1 の発現亢進を示すことを確認し、さらにそれらのフェノタイプの持続性を明らかにした

7 種類の二次リンパ組織 (6 種類のリンパ節 (腸管膜、腸骨、膝窩、鼠径、腋窩、下顎)、および脾臓) から、異なった強度のトニック刺激を受けた TN 細胞を採取し、それらの Treg 分化能および PD-1 の発現を調べた。

その結果まず、由来組織に関係無く、強いトニック刺激を受けた TN 細胞は、Treg 分化能 (図 2A) および PD-1 発現の亢進を示した。一方、従来型 Nr4a1 レポーターマウス (Nur77-GFP マウス) の末梢血 TN 細胞における high-GFP 画分は、「以前に二次リンパ組織で強めのトニック刺激を受けていた TN 細胞」が濃縮されているものであると考えられる。従って、Nur77-GFP マウス末梢血 TN 細胞の high-GFP 画分と low-GFP 画分を比較することで、トニック刺激が TN 細胞に対して引き起



**図2: トニック刺激によるTN細胞の性質変化の解析**

**(A)** 7種類の二次リンパ組織からトニック刺激強度に応じて取得したTN細胞のTreg分化度合いの解析。**(B)** 従来型Nr4a1レポーターマウス (Nur77-GFPマウス) の二次リンパ組織(Spl+LN)と末梢血(PB)からトニック刺激強度に応じて取得したTN細胞のTreg分化度合いおよびPD-1発現量の解析。

こす変化の持続性を検討することができると考えられる。解析の結果、強いトニック刺激が引き起こした Treg 分化能の亢進は持続的な変化である一方、PD-1 発現の上昇は一過的な変化であることが明らかとなった (図 2B)。

2. 脾臓 TN 細胞は他組織 TN 細胞と比較し Treg 分化能が弱いことを見出し、さらに、その原因は脾臓 TN 細胞が受けている IL-1 $\beta$ 刺激によるものであることを明らかにした。

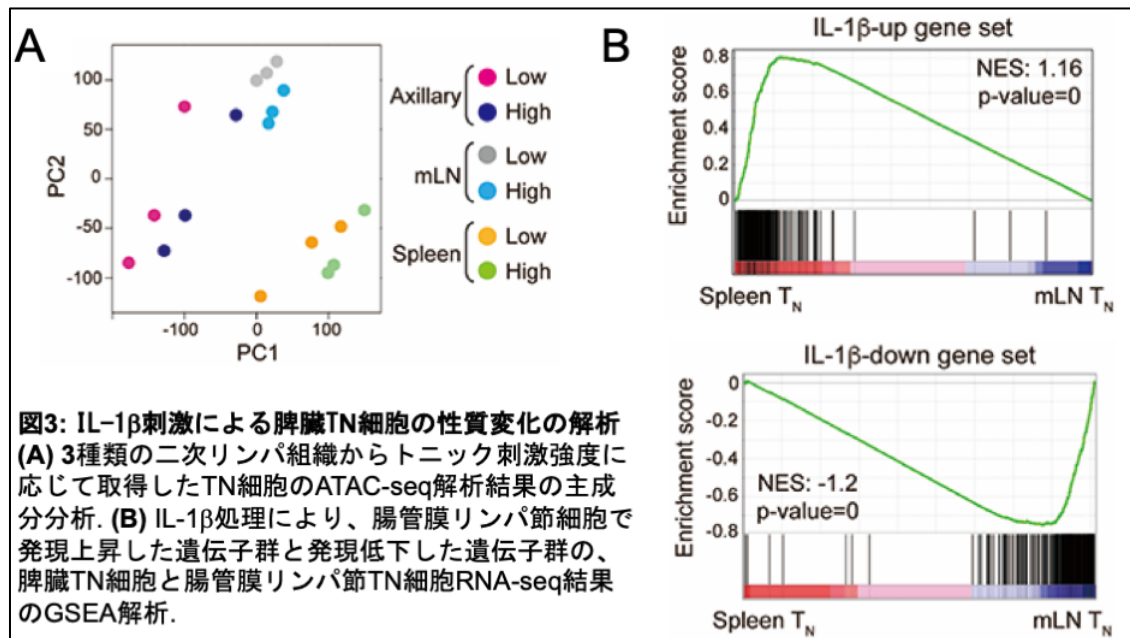
図 2A の結果は、トニック刺激の TN 細胞に対する影響は組織に依存しないことを示しているうえ、脾臓 TN 細胞はトニック刺激強度非依存的に Treg 分化能が減弱していることも示している。また、脾臓、腸管膜リンパ節、腋窩リンパ節からトニック刺激強・弱に応じて取得した TN 細胞に対して ATAC-seq を行い、エピジェネティック状態の網羅的解析を行ったところ、主成分分析の結果から、トニック刺激の強弱よりも由来組織の違いの方が、よりサンプル間の結果の差異に寄与していることが確認された (図 3A)。以上の結果から、トニック刺激に依存しない組織特異的因子、特に脾臓において TN 細胞に影響を及ぼす因子が存在することが示唆された。

そこで、脾臓と腸管膜リンパ節の血球細胞のトランスクリプトーム解析を RNA-seq により行ったところ、脾臓細胞で炎症性サイトカイン遺伝子・IL-1 $\beta$ の発現が著明に高いことを確認した。また、脾臓血球細胞の 1 細胞 RNA-seq(scRNA-seq)結果の解析から、脾臓における IL-1 $\beta$ 発現細胞は好中球と推測され、実際に Ly6G 抗体を用いた好中球の除去により脾臓の IL-1 $\beta$ 濃度は著明に減少することが確認され、脾臓における IL-1 $\beta$ の主要な産生細胞は好中球であることが確認された。

IL-1 $\beta$ の TN 細胞に対する作用を調べるため、IL-1 $\beta$ 存在下、非存在下で培養した腸管膜リンパ節 TN 細胞の RNA-seq を行った結果、IL-1 $\beta$ によって誘導される遺伝子、抑制される遺伝子をそれぞれ 1000 種類以上見出しそれぞれ IL-1 $\beta$ -up 遺伝子群、IL-1 $\beta$ -down 遺伝子群と命名した。これら IL-1 $\beta$ 標的遺伝子群と、脾臓と腸管膜リンパ節 TN 細胞の RNA-seq 結果を統合的に GSEA 解析した結果、脾臓 TN 細胞では腸管膜リンパ節 TN 細胞と比較し、IL-1 $\beta$ -up 遺伝子群の発現が亢進

している一方、IL-1 $\beta$ -down 遺伝子群の発現が低いことを明らかとした。以上の結果から、脾臓 TN 細胞は生体内で、IL-1 $\beta$ の刺激を受けていることを明らかとした(図 3B)。

脾臓 TN 細胞が示した Treg 分化能の減弱が IL-1 $\beta$ 刺激によるものなのかを調べるため、まず、IL-1 $\beta$ 阻害剤を投与したマウスから取得した脾臓 TN 細胞の解析を行った結果、IL-1 $\beta$ 阻害剤は脾臓 TN 細胞の Treg 分化能を亢進させることが明らかとなった。一方、組み換え IL-1 $\beta$ タンパク質で処理した腸管膜リンパ節 TN 細胞は Treg 分化能の減弱を示した。以上の結果から、脾臓の TN 細胞は IL-1 $\beta$ 刺激を受けており、他二次リンパ組織 TN 細胞と比較し、Treg 分化能が減弱していることを明らかとした。

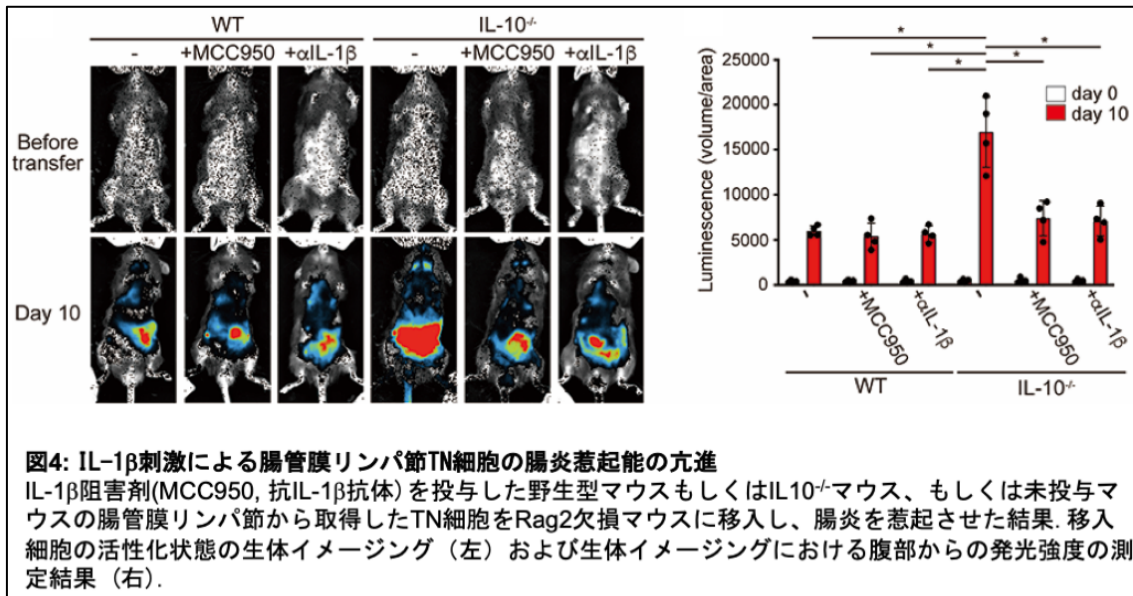


### 3. IL-1 $\beta$ は mTOR の活性を亢進させることで脾臓 TN 細胞の Treg 分化能の減弱を導いていることを見出した

次に、上記の研究で見出した、IL-1 $\beta$ による脾臓 TN 細胞の Treg 分化能の減弱を導く分子メカニズムの解明を試みた。この点に関し、CD4T 細胞における IL-1 $\beta$ の主要な下流のシグナル経路の一つとして mTOR 経路が知られていたうえ、mTOR の活性化は Treg 分化を減弱させることも報告されていた。さらに、上述の IL-1 $\beta$ -up 標的遺伝子群はタンパク質合成の促進に関与する遺伝子を多く含む一方、mTOR の主要な作用はタンパク質合成の亢進であるため、IL-1 $\beta$ は mTOR 活性の亢進を介して脾臓 TN 細胞の Treg 分化能の減弱を引き起こしていると推測された。そこでまず、脾臓 TN 細胞および腸管膜リンパ節 TN 細胞における mTOR のリン酸化状態を解析したところ、脾臓 TN 細胞では mTOR のリン酸化がより高く、活性が亢進していることが確認された。また、mTOR 阻害剤のラパマイシンを投与したマウスから取得した脾臓 TN 細胞に対して RNA-seq を行い、GSEA 解析した結果、ラパマイシンによって発現が上昇した遺伝子、抑制された遺伝子は、腸管膜リンパ節 TN 細胞と比較し、それぞれ脾臓 TN 細胞で発現が抑制、亢進されていることを明らかとした。さらに、ラパマイシンを投与したマウスから取得した脾臓 TN 細胞は Treg 分化能の亢進を示した。以上の結果から、IL-1 $\beta$ が TN 細胞に及ぼす作用における主要な下流エフェクターは mTOR であることを明らかとした。

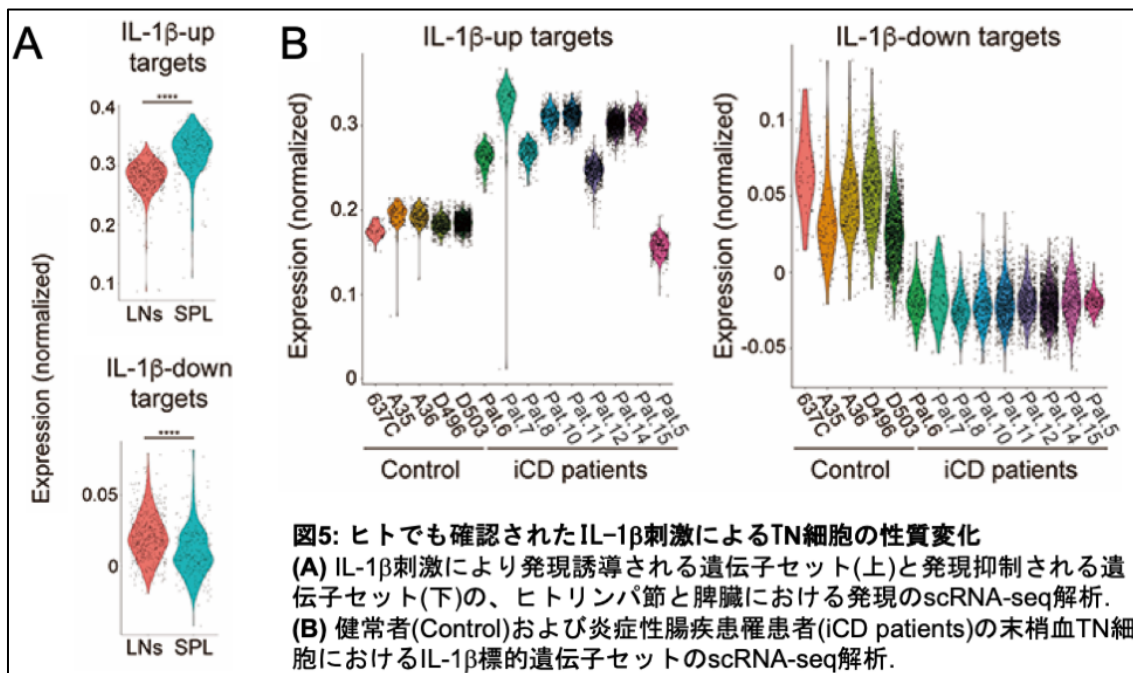
### 4. IL-1 $\beta$ は TN 細胞の腸炎惹起能を亢進させることを明らかとした

次に、IL-1 $\beta$ による TN 細胞の性質変化の病態生理学的意義を追求した。まず、抗炎症性サイトカイン IL-10 の欠損マウスは腸炎を自然発症するうえ、その腸管では、IL-1 $\beta$ の産生が亢進している事が確認されている。そこで、IL-1 $\beta$ 阻害剤を投与した IL-10<sup>-/-</sup>マウスの腸管膜リンパ節から TN 細胞を取得し、その腸炎惹起能を検討した。その結果、IL-1 $\beta$ の阻害により、IL-10<sup>-/-</sup>マウスの腸管膜リンパ節 TN 細胞は Treg 分化能の亢進を示したうえ、レシピエントの Rag2 欠損マウスにおいて腸炎を惹起する能力も減弱していることが確認された(図 4)。これらの結果から、本来は IL-1 $\beta$ 刺激を強く受けていない腸管膜リンパ節 TN 細胞における IL-1 $\beta$ 刺激の亢進は、Treg 分化能の減弱および腸炎惹起能の亢進を導くことを明らかとした。



5. 脾臓 TN 細胞の IL-1 $\beta$ 刺激の亢進はヒトでも確認され、さらに炎症性腸疾患患者の TN 細胞でも IL-1 $\beta$ 刺激の亢進が確認された

上記の研究で見出された、脾臓 TN 細胞での IL-1 $\beta$ 刺激の亢進がヒトでも見られるのか、ヒトの脾臓とリンパ節の scRNA-seq パブリックデータの再解析により検討した。2種類のデータセットを解析した結果、共に脾臓 TN 細胞はリンパ節 TN 細胞と比較し、IL-1 $\beta$ -up 標的遺伝子群の発現が高い一方、IL-1 $\beta$ -down 標的遺伝子群の発現は低いことが明らかとなった(図 5A)。さらに、炎症性腸疾患罹患患者の scRNA-seq データセットを解析した結果、炎症性腸疾患罹患患者の末梢血 TN 細胞は、健常者の末梢血 TN 細胞と比較し、IL-1 $\beta$ -up 標的遺伝子群の発現亢進および IL-1 $\beta$ -down 標的遺伝子群の発現低下を示した(図 5B)。



以上、本研究は、新たに構築した Nr4a1-dsGFP マウスを用いた解析を足掛かりに、従来知られていたトニック刺激に加え、IL-1 $\beta$ 刺激が TN 細胞の性質変化に寄与していることを明らかとした。トニック刺激の作用は組織非依存的である一方、IL-1 $\beta$ 刺激の作用は組織ごとに異なっており、また、IL-1 $\beta$ による TN 細胞の性質変化は一過性ではあるが、少なくとも数日間持続するものであることも明らかとした。さらに、これまでは TN 細胞の性質変化と炎症性腸疾患との関連性は不明であったが、IL-1 $\beta$ による TN 細胞の性質変化は炎症性腸疾患の発症や増悪化を導くメカニズムの一つである可能性が示唆され、新たな治療標的としての今後の研究展開に期待が持たれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sekiya Takashi, Kasahara Hidenori, Takemura Ryo, Fujita Shinya, Kato Jun, Doki Noriko, Katayama Yuta, Ozawa Yukiyasu, Takada Satoru, Eto Tetsuya, Fukuda Takahiro, Ichinohe Tatsuo, Takanashi Minoko, Onizuka Makoto, Atsuta Yoshiko, Okamoto Shinichiro, Yoshimura Akihiko, Takaki Satoshi, Mori Takehiko	4. 巻 208
2. 論文標題 Essential Roles of the Transcription Factor NR4A1 in Regulatory T Cell Differentiation under the Influence of Immunosuppressants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 2122 ~ 2130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2100808	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 -

1. 著者名 Sekiya Takashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Comparison Between Nr4a Transcription Factor Regulation and Function in Lymphoid and Tumor Treg Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 866339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.866339	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 Sekiya Takashi, Kagawa Shizuko, Masaki Katsunori, Fukunaga Koichi, Yoshimura Akihiko, Takaki Satoshi	4. 巻 24
2. 論文標題 Regulation of peripheral Th/Treg differentiation and suppression of airway inflammation by Nr4a transcription factors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102166 ~ 102166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102166	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 関谷 高史
2. 発表標題 Tonic TCR and IL-1b signaling mediate momentary and durable phenotypic alterations in naive CD4+ 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

〔図書〕 計1件

1. 著者名 関谷 高史	4. 発行年 2021年
2. 出版社 先端医学社	5. 総ページ数 4
3. 書名 Nr4aによるTh/Tregのバランス制御と炎症性疾患	

〔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
---------	---------