

令和 5 年 12 月 15 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2022

受付番号 202270020

氏 名 金丸 由美

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。
なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： ケンブリッジ大学 （国名： 英国 ）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。
BACH2 を介した制御性 T 細胞の長期維持機構の解明と治療応用の検討
3. 派遣期間： 平成・令和 4 年 4 月 1 日 ～ 令和 5 年 11 月 30 日 (609 日間)
4. 受入機関名及び部局名
受入機関名： University of Cambridge
部局名： Department of Pathology

【記載事項】

- ・ 研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等
 - ・ 新型コロナウイルス感染症の影響にかかる特例措置のうち、国内採用開始・採用期間延長・翌年度渡航のいずれかの適用を受けた場合は、当該措置の適用による影響等
- (注)「6. 研究発表」以降については様式 10—別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

【研究実施状況】

本研究の目的

申請者の研究グループでは、転写因子 Bach2 (BTB Domain And CNC Homolog 2) が Treg 細胞の活性化を抑制して quiescence (休止)を誘導し、Treg 細胞の長期維持に寄与していることを示した

(Grant, *J Exp Med* 2020, 図 1)。

本論文では、Treg 細胞の活性化に伴い Bach2 の発現が低下する

ことが示されているが、申請者は、一部の活性化 Treg 細胞が Bach2 の発現を高く (Bach2^{hi}) 保持していることを見出した。昨今 Treg 細胞の臨床応用研究が進む中、Treg 細胞の中でも長期にわたって生存可能な細胞分画を見出しその制御機構を解明することは、Treg 細胞治療の質の向上に寄与する可能性があり、臨床的意義が高いと考えられる。申請者はこの **Bach2^{hi} 活性化 Treg 細胞** 分画が長期維持に関与していると仮説を立て、研究を進めることとした。

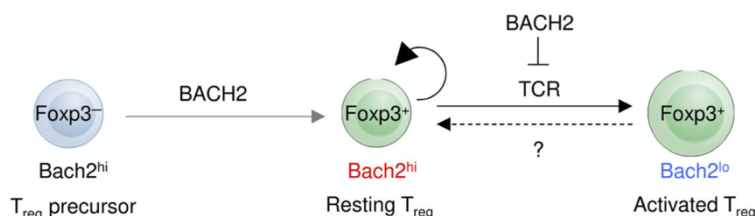


図1. Bach2とTreg細胞分化 (Grant, *J Exp Med* 2020)

Treg細胞の分化にはBach2が不可欠である (Roychoudhuri, *Nature* 0213)。Treg細胞に分化したのち、Bach2はResting Treg細胞に高発現し、活性化を抑制し、Quiescence (休止)を誘導する。Activated Treg細胞ではBach2の発現が低下する。

研究方法

本研究では、マウス個体およびマウス由来の Treg 細胞、その他の免疫細胞を用いて実験を行った。

まずマウス脾臓由来の Treg 細胞を用いて Treg 細胞の亜分画を探索した。次にマウスより二次リンパ組織および腸管から Treg 細胞を採取し、亜分画の分布を解析した。さらに、各分画の Treg 細胞の遺伝子発現を網羅的に評価するため RNA-seq を行い、遺伝子発現パターンから各分画の特性を解析した。

各分画の Treg 細胞の機能を *in vitro* および *in vivo* で評価した。*In vitro* では Treg 細胞抑制能試験および増殖試験を行った。*In vivo* では T 細胞移入腸炎モデルを用い、各分画の Treg 細胞を移入されたマウスの病態 (体重減少率) で Treg 細胞の機能を評価した。

Bach2 を利用した Treg 細胞長期維持法を確立するため、Bach2 遺伝子を Treg 細胞に導入し、その導入効率と Treg 細胞の表現系の評価を行った。

本研究の成果

1. Bach2^{hi} 活性化 Treg 細胞の同定と組織分布

フローサイトメトリー解析において、マウスの Treg 細胞を Bach2 とマーカー X で展開した結果、Bach2^{hi} マーカー X 陽性、Bach2^{hi} マーカー X 陰性、および Bach2^{lo} マーカー X 陰性の 3 分画に大別された。それぞれ分画 1、分画 2 (**Bach2^{hi} 活性化 Treg 細胞**)、および分画 3 と呼ぶこととする。二次リンパ組織である脾臓、鼠径リンパ節、腸間膜リンパ節では各分画が 10-60% 存在するのに対し、大腸及び小腸粘膜下固有層においては分画 1 がほとんど存在せず大半を分画 3 が占めていた。しかしながら大腸及び小腸粘膜下固有層においても分画 2 が 5-10% ほど存在することから、分画 2 の Treg 細胞は大腸および小腸粘膜下固有層のような

“炎症環境下”における組織に存在し、エフェクターTreg 細胞の供給源となっている可能性が示唆された。

2. 各分画の特性解析

各分画の遺伝子発現を網羅的に解析するため、RNA シーケンス (RNA-seq) を行った。PCA 解析の結果、各分画は明らかに異なる遺伝子発現パターンを示した。また、K-means クラスタリングにより上位 2000 遺伝子を 3 つのクラスターに分類し、各クラスターにおける各分画の遺伝子発現量を比較した結果、いずれのクラスターにおいても各分画は有意に異なる遺伝子発現量を示した。これらの結果から、各分画の Treg 細胞はそれぞれ異なる特性を有し、機能的にも異なっていることが示唆された。

3. 各分画の機能評価(1)

各分画の Treg 細胞の機能を解析するため、*in vitro*における抑制機能の評価を行った。その結果、分画 1 と分画 3 は同等の抑制能を示したのに対し、分画 2 の抑制能はそれらに比較して有意に低いという結果を得た。一方、Treg 細胞を単独で培養した結果、分画 1 が最も増殖しており、分画 3 細胞がそれに続き、分画 2 の増殖が最も弱いという結果を得た。分画 2 の抑制能および増殖能が非常に低いことは、細胞が休止期に入っていることが示唆される。

4. 各分画の機能評価 (2)

各分画の Treg 細胞の機能を解析するため、T 細胞移入大腸炎モデルを用いて *in vivo* における抑制機能の評価を行った。その結果、分画 1 および分画 2 は大腸炎の症状を抑制するのに対し、分画 3 は大腸炎の症状を抑制することができなかった。*In vitro* において分画 2 は抑制能が低いという結果だったが、*in vivo* においては分画 2 が腸炎病態を抑制できることが示された。より生理的な条件下において分画 2 が抑制能をもつことから、*in vivo* における抗原などによる反復的な刺激が長期維持を促進している可能性が示唆された。

5. Bach2 を利用した Treg 長期維持法の確立と治療応用の検討

Bach2 は Treg 細胞の活性化を抑制し休止を誘導し、Treg 細胞の長期維持に寄与していることが明らかとなっている (Grant, *J Exp Med* 2020)。そこで申請者は Bach2 を Treg 細胞に強制発現させ、Treg 細胞を長期維持し病態を抑制する有用な Treg 細胞の確立を試みた。申請者はマウス Bach2 をマウス Treg 細胞に強制発現させ、その導入効率と効果を検証した。その結果、Bach2 およびコントロールベクターの導入効率は同等であった。さらに、Bach2 を強制発現させた細胞を CD3/CD28 ビーズと IL-2 存在下で刺激した結果、Bach2 強制発現 Treg 細胞の方が非強制発現細胞に比べて細胞数が少なかった。つまり、本実験結果は Bach2 を強制発現させたことにより、Treg 細胞の増殖が抑制されたことを示し、Bach2 強制発現による Treg 細胞への効果が認められた。

まとめと今後の展開

本研究の成果のまとめ

- 1) Treg 細胞において、Bach2 とマーカーX の発現パターンにより、分画 1、分画 2 (Bach2^{hi} 活性化 Treg 細胞)、および分画 3 を見出した。
- 2) RNA-seq 解析により、各分画の Treg 細胞がそれぞれ異なる特性を持つことを示した。
- 3) 分画 2 の *in vitro* における抑制能は分画 1 および分画 3 に比較して有意に低いが、*in vivo* においては分画 1 と同様腸炎を抑制できるという結果を得た。
- 4) Bach2 強制発現システムを樹立し、Bach2 強制発現の効果を認めた。

今後の展開

RRA 派遣期間を 24 ヶ月から 20 ヶ月に短縮したが、派遣期間終了後も同研究室で引き続き研究を行う。RRA 派遣期間の 20 ヶ月間に蓄積した実験結果をもとに、更に検証を重ね成果を出し、Treg 細胞を用いた医療の発展に貢献したい。具体的には、Treg 細胞長期維持機構の解明を分画 2 に着目しさらに進展させ、また Bach2 強制発現による Treg 細胞の機能評価を病態モデルを用いて行っていく予定である。

【研究成果の発表】

本研究の成果は学術集会および学術誌等に発表していない。現在学術誌への投稿の準備中である。

【関係学会への参加状況】

本研究のための情報収集を目的として、以下の学会に参加した。

1. NGS EXPO 2022 (2022 年 10 月 18-19 日、大阪)
2. British Society for Immunology Congress 2022 (2022 年 12 月 5-8 日、リバプール)
3. The BSI Cambridge Immunology Symposium (2023 年 4 月 14 日、ケンブリッジ)