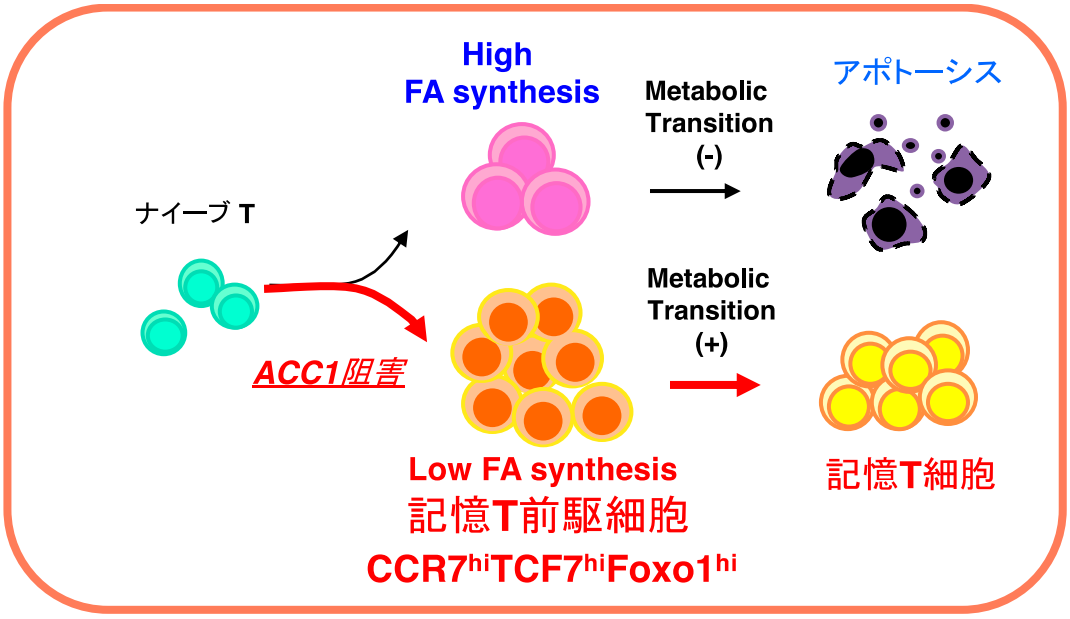
22　記憶T前駆細胞分化を司る脂肪酸代謝checkpointの解明	遠藤　裕介

【目的】ジェンナーが行った人類初のワクチンは、現在、感染症の予防や治療法として普及しているが、これは我々脊椎動物の持つ免疫システムの中枢である「免疫記憶」の原理を利用している。生体内で長期間生存する抗原特異的記憶 T 細胞は免疫記憶の司令塔としての役割を担っているが、どのような特徴を示す細胞が、いかなるメカニズムで記憶 T 細胞になり、生体内で長期間生存するのか？未だ不明な点が多い。記憶 T 細胞は静止期の細胞で、活性化したエフェクターT 細胞の一部から生まれる。活性化した細胞（ATP の消費による Anabolic な代謝中心）からどのように静止期（ATP を産生する Catabolic な代謝中心）の記憶 T 細胞が生み出されるのか？もしかしたら、代謝経路をコントロールすることで記憶 T 細胞の産生を制御できないか？という挑戦的な疑問に対して答えを出すべく、「免疫記憶を代謝で制御する」ことを目指す。

【方法】本研究では T 細胞の脂肪酸代謝不均一性に焦点をあて、記憶 T 前駆細胞の遺伝子発現プロファイルの解明を行うため、グローバルな single-cell RNA 解析を行った。また、記憶 T 前駆細胞を特徴付ける遺伝子群を明らかにするため、ハイスループットな Cas9 システムを用いてメカニズム解析を推進した。さらに、記憶 T 前駆細胞がどのような環境シグナルを介して誘導されるのか？様々なサイトカインによる脂肪酸代謝、および記憶 T 前駆細胞分化への影響について解析を行った。

【結果】Single-cell RNA 解析を用いて、記憶 T 前駆細胞の遺伝子プロファイルを単一細胞レベルで解析したところ、*Ltb4r1*、*Casp9*、*Prdm1*（*=Blimp1*）などエフェクター機能、細胞死、および細胞疲弊と関連の強い遺伝子群は低く、一方、*Klf2*、*Tcf7*、*Foxo1* など記憶 T 細胞の形成と関連の深い遺伝子群は高発現が認められた。これらの因子についてさらに Cas9 システムを用いて記憶 T 前駆細胞形成への作用について解析を行ったところ、*Tcf7* や *Foxo1* の遺伝子欠損により細胞生存能の低下が示された。また、IL-4、IL-12、および IL-6 などの各種 Th サブセット特異的なサイトカインの濃度依存的に脂肪酸合成酵素の発現の増強が認められ、逆に Tcf7 や Klf2 などの発現量は低下することが明らかとなった。

不均一な脂肪酸代謝による記憶 T 前駆細胞の誘導



22. 記憶 T 前駆細胞分化を司る脂肪酸代謝 checkpoint の解明

遠藤　裕介

かずさ DNA 研究所 先端研究開発部 オミックス医科学研究室

Key words：免疫記憶，脂肪酸代謝，記憶 T 前駆細胞，ACC1，CRISPR/Cas9 システム

緒　言

ジェンナーが行った人類初のワクチンは、現在、感染症の予防や治療法として普及しているが、これは我々脊椎動物の持つ免疫システムの中枢である「免疫記憶」の原理を利用している。生体内で長期間生存する抗原特異的記憶T細胞は免疫記憶の司令塔としての役割を担っているが、どのような特徴を示す細胞が、いかなるメカニズムで記憶T細胞になり、生体内で長期間生存するのか？未だ不明な点が多い。一方、ここ数年間の先行研究にて、T細胞は分化段階（ナイーブ→エフェクター→記憶T）に応じて、全く異なる代謝経路を使用していることが示され、代謝物がT細胞の活性化・機能分化に深く関与していることが推定された［1］。また、我々は脂肪酸代謝酵素の発現量および多くの脂肪酸代謝物は、ナイーブ→エフェクターの段階で上昇し、エフェクター→記憶T細胞で再度減少することを見出している［2，3］。記憶T細胞は静止期の細胞で、活性化したエフェクターT細胞の一部から生まれる。活性化した細胞（ATPの消費によるAnabolicな代謝中心）からどのように静止期（ATPを産生するCatabolicな代謝中心）の記憶T細胞が生み出されるのか？もしかしたら、代謝経路をコントロールすることで記憶T細胞の産生を制御できないか？という挑戦的な疑問に対して答えを出すべく、「免疫記憶を代謝で制御する」ことを目指し研究を推進した。

方法および結果

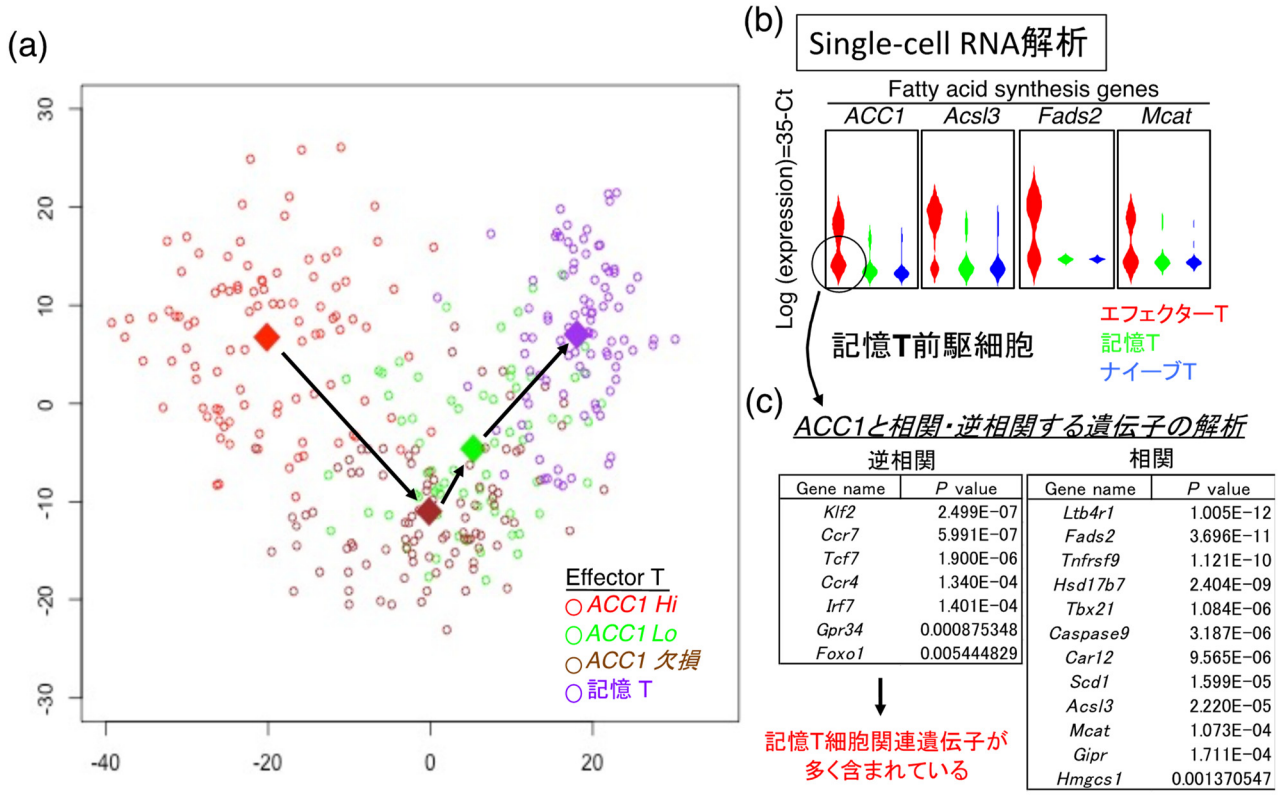
1. Single-cell RNA 解析による記憶 T 前駆細胞の遺伝子発現プロファイル

これまでの我々の研究成果により、エフェクターT 細胞の脂肪酸合成経路を抑えることで効率よく記憶 T 細胞が形成されることを明らかにしている［4］。また、脂肪酸合成の律速酵素である ACC1 の薬理阻害および遺伝子欠損によってエフェクターT 細胞でありながら、記憶 T 細胞に類似した遺伝子発現プロファイル、および代謝活性を示すことも見出している。これらの一連の結果から、エフェクター期における脂肪酸合成を抑えることで、効率よく記憶 T 細胞へと分化することが明らかとなった。また、そのメカニズムとして、脂肪酸合成を抑えた $CD4^+$T 細胞は、エフェクター細胞でありながら記憶 T 細胞に近い代謝プロファイルを示し、エフェクターから記憶 T 細胞へと移行する上での代謝適応がスムーズにいくことが一因であることが示唆された。

エフェクター$CD8^+$T 細胞は細胞表面分子の発現パターンから将来記憶 $CD8^+$ T 細胞への分化能が高い記憶 T 前駆細胞（Memory Precursor Effector Cell：MPEC）とエフェクター機能を発揮した後、アポトーシスにより死滅する終末分化 T 細胞（Short Lived Effector Cell：SLEC）に大別される［5］。これらの細胞群は、IL-7Ra や KLRG1 の発現に加え、mTORC や AMPK の活性レベルの違いにより、記憶 T 細胞への分化能の違いが規定されていると考えられている。上述の $CD4^+$T 細胞における脂肪酸合成経路の結果と総合すること、エフェクター$CD4^+$T 細胞集団の中に記憶 T 細胞へと分化しやすい記憶 T 前駆細胞が存在しており、脂肪酸合成経路を適切にコントロールすることでこの細胞集団を誘導できる可能性が示唆された。この可能性を検討するため、単一細胞の遺伝子発現プロファイルを解析できる single-cell RNA 解析を行った（図 1）。

図 1 の右上に示すように、single-cell 遺伝子発現解析により、ACC1 をはじめとした脂肪酸合成酵素がエフェクター T 細胞ではきれいに 2 群に分類されることがわかった。また、ナイーブや記憶 T 細胞ではほとんど全ての細胞が低い発

現パターンを示した。また、ACC1 の発現レベルによってエフェクター細胞集団を分類し、主成分解析（PCA）を行ったところ、エフェクターT 細胞の中でも ACC1 Hi の集団と比較して ACC1 Lo の集団は *ACC1* 欠損細胞と遺伝子発現プロファイルのパターンが近く、徐々に記憶 T 細胞に近づいていくプロファイルを示した。さらに、ACC1 の発現と相関、もしくは逆相関する遺伝子について解析を進めたところ、相関する遺伝子については *Prdm1*、*Casp9*、*Ltb4r1* などをはじめとしたアポトーシス遺伝子や細胞疲弊に関する遺伝子群が多く認められた。一方、ACC1 と逆相関する遺伝子については、*Klf2*、*Ccr7*、*Tcf7* および *Foxo1* など記憶 T 細胞で発現が強く認められる遺伝子や、記憶 T 細胞形成に重要な遺伝子が多数認められた。これらの因子の記憶 T 細胞形成、および脂肪酸代謝への作用についてさらに検討するべく次項目 2 の実験を進めた。



逆相関		相関	
Gene name	P value	Gene name	P value
Klf2	2.499E−07	*Ltb4r1*	1.005E−12
Ccr7	5.991E−07	*Fads2*	3.696E−11
Tcf7	1.900E−06	*Tnfrsf9*	1.121E−10
Ccr4	1.340E−04	*Hsd17b7*	2.404E−09
Irf7	1.401E−04	*Tbx21*	1.084E−06
Gpr34	0.000875348	*Caspase9*	3.187E−06
Foxo1	0.005444829	*Car12*	9.565E−06
		Scd1	1.599E−05
		Acsl3	2.220E−05
		Mcat	1.073E−04
		Gipr	1.711E−04
		Hmgcs1	0.001370547

図 1. 不均一な脂肪酸代謝による記憶 T 前駆細胞の誘導

a) Single-cell RNA解析のデータを用いて主成分解析の結果。*ACC1* KO≒*ACC1* Lo → 記憶T細胞の順に遺伝子発現プロファイルが近接している結果が示されている。

b) 脂肪酸合成酵素の単一細胞レベルでの発現。エフェクター細胞ではこれらの酵素はHiとLoに二分されることが示されている。一方、ナイーブや記憶T細胞はほとんどすべての細胞がLoであることが示された。

c) Single-cell RNA解析のデータについてACC1の発現と相関もしくは逆相関する遺伝子についてカイジ二乗検定により解析を行った。ACC1と相関する遺伝子にはアポトーシス、エフェクター機能細胞疲弊に関連する遺伝子群が認められるのに対して、ACC1と逆相関する遺伝子については、細胞生存や記憶T細胞形成に寄与する遺伝子群の集積が認められた。

2. CRISPR/Cas9 システムによる記憶 T 前駆細胞への運命決定を制御する遺伝子の同定

1 で得られた記憶 T 前駆細胞を誘導しうる候補因子についてプライマリーT 細胞においても高効率で遺伝子欠損を誘導できる CRISPR/Cas9 システムを用いて検討を行った。CRISPR/Cas9 システムについては脾臓より回収したナイーブ $CD4^{+}$T 細胞を抗 TCRb 抗体で 20 時間刺激を行い、刺激後の細胞を PBS で 2 回洗浄を行った。1×10^{6}個の細胞あたりに標的となる遺伝子に対する sgRNA と Cas9 タンパク複合体を 1.5 mg の割合で添加し、Neon Transfection

system を用いてエレクトロポレーションにより細胞導入を行った。エレクトロポレーションによる細胞導入 24 時間後に細胞の passage を行い、合計 96 時間培養の後、細胞の解析を行った。標的遺伝子については項目 1 で得られた結果をもとに *Tcf7* と *Foxo1* を選別した。理由として、これらの因子は記憶 T 細胞で高発現していること、および記憶 T 細胞形成にも深く関与していることが挙げられる。特に、Foxo1 については脂質代謝とのクロストークについても報告されており、$CD4^+$T 細胞においても脂肪酸代謝制御によって巧みに制御がなされているのではないかと考えられる。実際に、これらの因子について CRISPR/Cas9 システムを用いて記憶 T 前駆細胞形成への作用について解析を行ったところ、*Tcf7* や *Foxo1* の遺伝子欠損により細胞生存能の顕著な低下が示された（図 2）。また、CCR7 の発現をはじめとした記憶 T 前駆細胞を特徴づける細胞表面マーカーの発現について FACS 解析を行ったが、細胞生存能の結果と同様に、*Tcf7* や *Foxo1* 遺伝子欠損によりその発現レベルの低下が認められた。

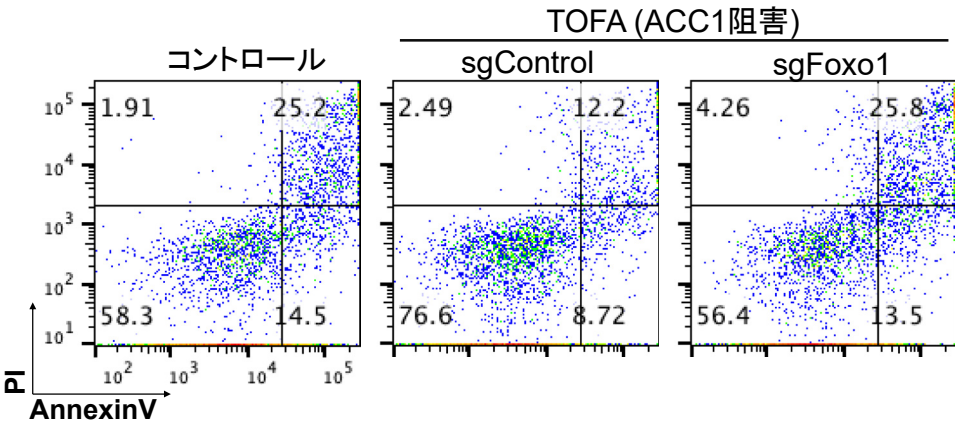


図 2. *Foxo1* 遺伝子欠損による細胞生存能の低下

コントロールの細胞と比べて TOFA (ACC1 阻害) 群ではアポトーシス (PI+AnnexinV+) の抑制が認められた。さらに TOFA 群の Foxo1 を CRISPR/Cas9 システムを用いて遺伝子欠損を誘導するとアポトーシスがコントロール群と同程度まで上昇することが示された。

3. 不均一な脂肪酸代謝にフォーカスした記憶 T 前駆細胞を誘導するシグナルの解明

次に、エフェクターT 細胞における不均一な脂肪酸合成がどのようにして誘導されるか検討を行った。はじめに *de novo* 脂肪酸合成を高感度で定量可能なハイスループットなスクリーニングシステムの確立を行った。Bodipy 493/503 プローブを用いて細胞内の脂肪滴をモニタリングすることが可能である。このシステムを用いて細胞内脂肪酸合成の脂肪滴への寄与について解析したところ、*ACC1* 欠損細胞ではほぼ完全にシグナルが消失した（図 3a）。これは細胞内の脂肪滴の形成は *de novo* 脂肪酸合成に完全に依存していることを意味している。

このシステムを用いて、様々なサイトカインの影響について解析したところ、各サブセット特異的なサイトカイン（Th1 では IL-12、Th2 では IL-4、Th17 では IL-6）によって *de novo* 脂肪酸合成の強度が規定されていることがわかった。そこで、サブセット特異的なサイトカインの濃度を調節し、脂肪酸合成酵素や記憶 T 細胞形成に関与する遺伝子の発現について解析を行ったところ、脂肪滴の結果と同様に ACC1 や Scd2 の発現がサブセット特異的なサイトカインの濃度依存的に上昇することが示された（図 3b）。同様に、細胞疲弊と関連の深い Prdm1 の発現も IL-12 や IL-4 の濃度依存的な増加が認められた（図 3b）。一方、記憶 T 細胞形成に必須の転写因子 Tcf7 は IL-12 や IL-4 の濃度依存的に低下することが示された（図 3b）。これらの結果と一致して、記憶 T 前駆細胞を特徴づける細胞表面マーカーCCR7 と CD137 の発現についても FACS 解析を行ったところ、記憶 T 前駆細胞を示す CCR7hiCD137lo の細胞集団はサブセット特異的なサイトカインの濃度依存的に減少することが示された。

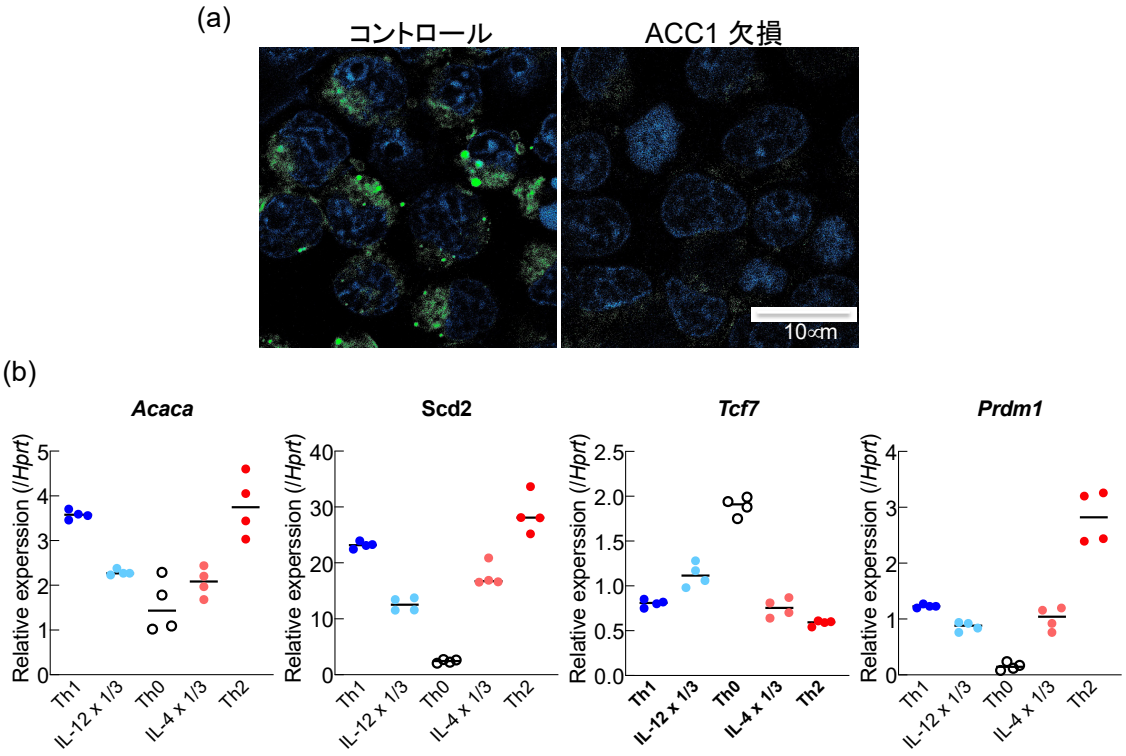


図 3. 不均一な脂肪酸代謝を制御するサイトカインシグナルの同定

a) コントロールおよび*ACC1* 欠損T細胞における細胞内脂肪滴の結果。*ACC1*欠損により脂肪滴の形成が劇的に低下していることが示された。

b) サブセット特異的なサイトカインの濃度を調節した際の脂肪酸合成酵素、*Tcf7* および*Prdm1*の遺伝子発現レベルの結果。ACC1、Scd2およびPrdm1の発現はIL-12やIL-4の濃度依存的に発現上昇するのに対して、Tcf7の発現はこれらのサイトカインの濃度依存的な発現低下が認められた。

考　察

本研究課題では、記憶 T 前駆細胞がどのような遺伝子プロファイルを示し、またどのようなシグナルを受けて誘導されるかについて中心に取り組んだ。Single-cell RNA 解析の結果から、エフェクターT 細胞は脂肪酸合成に関連する酵素群の高い細胞集団と低い細胞集団に分類されることが示された。これまでの研究で明らかにしているエフェクター細胞の脂肪酸合成を抑制することで記憶 T 細胞の形成が促進されることを併せて考えると、エフェクター期において記憶 T 細胞へと分化するポテンシャルの高い記憶 T 前駆細胞が *de novo* 脂肪酸合成のレベルにより分類可能なことが推察された。実際に脂肪酸合成の律速酵素である ACC1 の発現を指標に相関解析を行うと、Tcf7 や Foxo1 といった記憶 T 細胞形成に必須の因子は ACC1 と逆相関し、Casp9 や Prdm1 などのアポトーシスや細胞疲弊に関連する因子は相関する結果が示された。このことからエフェクター期において、脂肪酸合成のレベルが比較的低い細胞集団は遺伝子発現レベルの観点からも記憶 T 細胞への分化ポテンシャルの高いことが示された。また、CRISPR/Cas9 システムの解析によって、Tcf7 や Foxo1 は記憶 T 前駆細胞の細胞生存能、および特徴的な細胞表面分子の発現（CCR7 Hi/CD137 Lo）に影響を与えることが明らかとなった（図 4）。このような不均一な脂肪酸代謝がどのようにして記憶 T 前駆細胞をかたちづくる遺伝子発現プロファイルに影響を与えているかは依然として不明であるが、Foxo1 は PIP2/PIP3（ホスファチジルイノシトールリン酸）-Akt 経路によって制御されていることから、脂肪酸合成経路によってつくりだされる PIP を感知し、記憶 T 前駆細胞とエフェクター細胞の振り分けを行うスイッチとして作用しているのかもしれない。

また、サブセット特異的なサイトカイン勾配がエフェクターT 細胞における不均一な脂肪酸代謝をつくりだす要因と

なっていることを見出した。今後は、*de novo* 脂肪酸合成が PIP2/PIP3 バランスに与える影響、およびサブセット特異的なサイトカインシグナルと PIP2／PIP3－Akt－Foxo1 シグナルの関連について研究を進めることで、記憶 T 前駆細胞分化における脂肪酸代謝 checkpoint の全容を明らかにしたいと考えている。

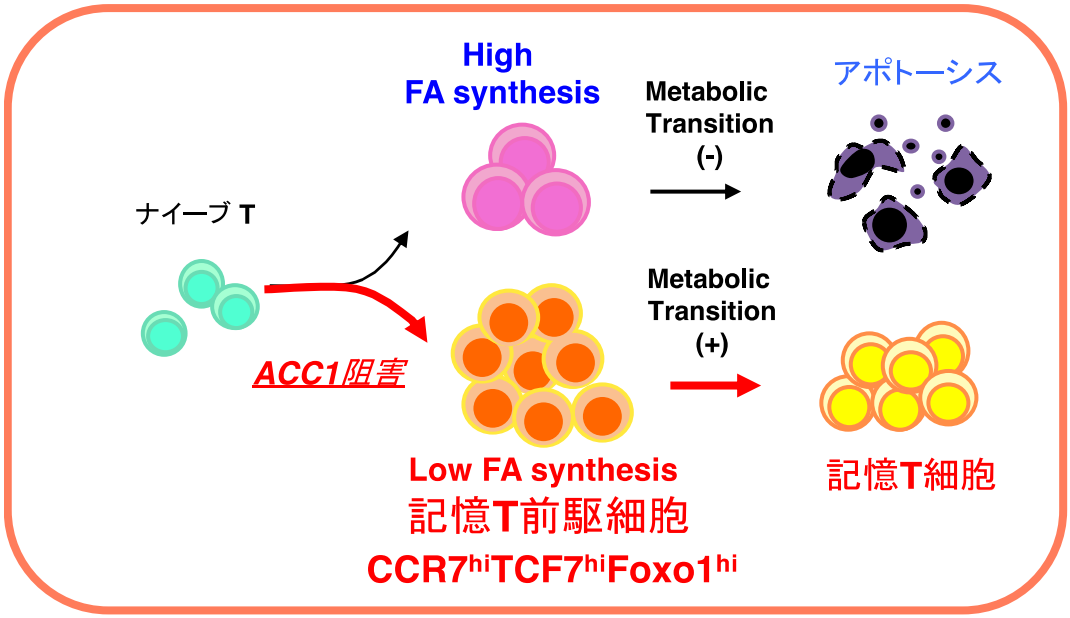


図 4.　不均一な脂肪酸代謝による記憶 T 前駆細胞の誘導

共同研究者・謝辞

本研究は、千葉大学大学院医学研究院免疫発生学教室の中山俊憲教授、かずさ DNA 研究所の小原收副所長をはじめ、オミックス医科学研究室の特別研究員である菅野敏生さん、技術員である横山覚さん、特任技術員である加藤ひかりさん、笹本茂美さん、博士課程の大学院生である中嶋隆裕さんらの支援により成し遂げることができました。そして、本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りました上原記念生命科学財団に心より深く感謝申し上げます。

文　献

1)　Pearce, E.L., and Pearce, E.J. (2013). Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. Immunity 38, 633-643 PMID: **23601682**　DOI: 10.1016/j.immuni.2013.04.005

2)　Endo, Y., Asou, H. K., Matsugae, N., Hirahara, K., Shinoda, K., Tumes, D. J., Tokuyama, H., Yokote, K., and Nakayama, T. (2015). Obesity drives Th17 cell differentiation by inducing the lipid metabolic kinase, ACC1. Cell Rep. 12, 1042-1055. PMID: **26235623** DOI: 10.1016/j.celrep.2015.07.014

3)　Angela, M., Endo, Y., Asou, H. K., Yamamoto, T., Tumes, D. J., Tokuyama, H., Yokote, K., and Nakayama, T. (2016). Fatty acid metabolic reprogramming via mTOR-mediated induction of PPARγ directs early activation of T cells. Nat. Commun. 7:13683. PMID: **27901044** DOI: 10.1038/ncomms13683

4)　Endo Y, Onodera A, Ninomiya-Obata K, Nasu R, Asou HK, Ito T, Yamamoto T, Kanno T, Nakajima T, Ishiwata K, Kanuka H, Tumes DJ, and Nakayama T. (2019) ACC1 determines memory potential of individual CD4+ T cells by regulating de novo fatty acid biosynthesis. Nat. Metabolism. 1:261-275 PMID: **32694782** DOI: 10.1038/s42255-018-0025-4

5) Nikhil S. Joshi, Weiguo Cui, Anmol Chandele, Heung Kyu Lee, David R. Urso, James Hagman, Laurent Gapin, and Susan M. Kaech (2007) Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8+ T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. Immunity, 27: 281-295 PMID: **17723218** DOI: 10.1016/j.immuni.2007.07.010