

附属システム免疫学統合研究センター  
Research Center for Systems Immunology

## 情報生物学分野

### Division of Bioinformatics

教授：須山 幹太

Professor : Mikita Suyama, Ph.D.

情報生物学分野では、計算機を用いたバイオインフォマティクス解析、特に、ゲノム配列やエピゲノムについてのデータの比較解析から、遺伝子の発現制御機構やその異常による疾患発症機序を解明することを目的にして研究を進めている。具体的には、がんゲノムコンソーシアムやエピゲノムコンソーシアムの進展により蓄積している生命医科学ビッグデータを積極的に活用し、がんの予後関連因子の探索や疾患関連遺伝子の発現制御機構の解析等を行っている。また、次世代シーケンサーをはじめとするハイスループットな技術革新に伴い、生命医科学全般においてバイオインフォマティクス解析、すなわち計算機を用いた大規模なデータ解析が必須となってきている。このような現状においては、実験生物学者と情報生物学者の連携が重要であり、そのため当研究室では積極的に共同研究を行うとともに、データ解析技術の普及にも務めている。

2022年度（令和4年度）は、須山幹太（教授）、菊竹智恵（助教）、吉原美奈子（助教）、吉村香（テクニカルスタッフ）に加え、大学院生9名の体制で研究を開始した。2022年10月1日よりNegar Khaliliが研究生として加わった。2023年3月に金賢正が博士号（理学）を取得し、曲酌、羅筱儒、原野愛弓が修士号を取得した。また、邵睿祺が2023年3月をもって単位修得退学した。

#### A. スプライス部位形成変異による exon extension/shrinkage イベントの網羅的探索

遺伝性疾患の原因変異探索では、主に、アミノ酸コード領域や既存のスプライス部位を壊す変異に着目した解析が行われてきた。しかし、最近、スプライス部位形成変異 (splice-site-creating mutation: SCM) が疾患の原因となる事例が複数報告されている。これは、通常は存在しない座位にスプライス部位を新しく獲得する変異であり、異常な転写産物を生成するため、疾患原因となりうる。これまで私たちのグループでは、このような変異は疾患の有無にかかわらず、健常者においても一定数存在していることを明らかにしてきた (Sakaguchi and Suyama, *RNA Biol.* 2021)。しかし、この先行研究では、SCM がイントロン深部に生じて起きる偽エクソン活性化の場合のみ解析しており、エクソン近傍やエクソン内に存在する場合については解析していなかった。このような領域に生じた SCM は、既存のエクソンの伸長 (exon extension) や収縮 (exon shrinkage) を誘導する。そこで、健常者において、SCM による exon extension 及び

shrinkage 現象の発生頻度とその特徴を明らかにすることを旨とした研究を進めた。

本研究では、SCM による exon extension 及び exon shrinkage 現象を網羅的に探索するパイプラインを構築し、これを 1000 人ゲノムプロジェクトより得られた 235 人分のゲノムデータとトランスクリプトームデータに適用した。その結果、exon extension, exon shrinkage 現象を合わせて 371 個同定し、この数は SCM による偽エクソン活性化現象の数より約 3 倍多かった。一人あたりではそれぞれ平均 3.3 個と 11.2 個生じていた。さらに、同定した exon extension 及び exon shrinkage 現象がトランスクリプトとタンパク質ドメインに与える影響を解析した。今回の結果は、原因変異が特定されていない疾患エクソームサンプルにおいて、SCM が原因となっている可能性を考慮する必要があることを示している (Qu et al., RNA Biol. 2022)。

## B. スプライス部位変異によるスプライシングパターン変化の解析

スプライス部位やその周辺領域に変異が生じることで起こるスプライシングの異常は遺伝病と関連することが知られており、疾患の発症メカニズムの解明や治療法開発のためにスプライシング異常と疾患との関連を探索する研究が盛んに行われてきた。しかし、以前の研究ではスプライス部位変異がトランスクリプトに与える影響の網羅的な解析は行われていない。さらに、疾患患者のみではなく健常者においても、スプライス部位変異が存在している。このことは、今まで有害変異とみなされてきたスプライス部位変異が実際には有害でない可能性があり、スプライスサイト変異による影響を網羅的に解析する必要があることを示している。本研究では、健常者で見られるスプライス部位変異に着目し、近年蓄積された膨大な数の健常者由来個人ゲノムデータとそれに対応する RNA-Seq データを用いて、変異がスプライシングにどのように影響を与えるか網羅的に解析することで、各変異がどのようなスプライシングパターンをもたらすか解析することを目的とした。

はじめに、gnomAD に登録されている健常者由来変異のうち、スプライス部位とその周辺領域に生じた変異の数とその変異パターンを解析した。この結果から、スプライス部位のコンセンサス配列であるカノニカルサイトの変異数はその周辺領域の変異数から大きく減少していないことを明らかにした。また、ドナーサイトのカノニカルサイトのうち、1 つの位置の変異数はその周辺領域とほぼ同等であった。次に、1000 人ゲノムプロジェクトから得られた健常者の個人ゲノムデータを用いた解析から、1 人あたりのカノニカルサイト変異は平均 250 個であり、遺伝病の原因遺伝子内のカノニカルサイト変異に限定すると、1 人あたり平均 31 個存在することを明らかにした。さらに、カノニカルサイトに生じた変異によって、スプライシングパターンがどのように変化するかについての解析も進めている。

## C. がんにおける有害な同義置換の探索

同義置換は、アミノ酸を変化させない変異であり、中立的なものと考えられてきた。近年、同義置換の中にも有害な変異が含まれる可能性があることが様々な研究により示されている。そこで、本研究では同義置換ががんに及ぼす影響を解明することを目的に解析を行った。

MC3 project により得られた 33 がん種由来のエクソームデータを TCGA より取得した。このデータから、同義置換を抽出し、codon optimality score を算出した。codon optimality score は、codon usage table から、変異前後のコドン頻度の差と定義した。がんの進化過程と同義置換との関係を調べると、がんの進化過程後期で発生した変異の codon optimality score が有意に上昇しており、進化過程後期における翻訳効率の向上ががんの成長や増殖に寄与している可能性が示唆された。また、最適変異を持つ遺伝子には細胞周期や細胞分裂に関与する遺伝子がエンリッチしており、非最適変異を持つ遺伝子にはアポトーシスや細胞老化に関与する遺伝子がエンリッチしていたことから、同義置換による翻訳効率の変化ががんの増殖につながる可能性があることを示している（論文投稿中）。

#### **D. がん種特異的な選択的スプライシングパターンの特定**

がんのゲノム解析では主に、正常サンプルに比べて発現差のある遺伝子やがんサンプルにおいて変異が生じている遺伝子の機能や制御機構に着目されてきた。このような遺伝子やタンパク質は有望な薬剤ターゲットであり、さまざまな治療薬が開発されてきた。最近では、トランスクリプトーム解析により、がんサンプルにおけるスプライシングパターンの異常が、がんの原因になり得ることが報告されている。また、がんにおけるスプライシングバリエントが様々ながん抗原を作り出す可能性も報告されている。このように、スプライシング異常はがんの治療薬開発における新たなターゲットとして期待されているものの、がんの抗体療法のためのターゲットの探索やその生物学的な意義については十分な検証が行われていないのが現状である。そこで、本研究では、TCGA 由来の大規模ながんゲノムデータを用いて、がん種やサブタイプごとのスプライシングパターンについて網羅的な解析を行うことで、がん種やサブタイプ特異的な選択的スプライシングパターンを明らかにし、新たながんマーカーやがん種ごとの治療法の開発に役立つ知見を得ることを目的とした。

本研究では、乳がんの 5 種類のサブタイプ、すなわち basal-like, luminal A, luminal B, HER2-enriched, normal breast-like に着目した。各サンプルにおける 5 種類の選択的スプライシングデータ、すなわち exon skipping, alternative 5' site, alternative 3' site, mutually exclusive exon, intron retention を用いて、サブタイプ特異的なスプライシングパターンについて解析を行った。興味深いことに、PSI 値を用いてクラスタリングや主成分分析を行うと、3 種類の選択的スプライシングタイプ、すなわち exon skipping, alternative 5' sites, alternative 3' sites においてサブタイプごとに特徴的なスプライシングパターンを

持つことが分かった。また、サブタイプ間で発現差はないが、PSI 値には差が見られた遺伝子を抽出すると、がん関連の遺伝子が多く存在していた。本研究の結果は、サブタイプに特徴的なスプライシングパターンに着目することで、がんの抗体療法における新たなターゲット遺伝子が同定できる可能性を示している。

## E. 膵癌術後再発患者の cfDNA を用いた膵癌マーカー変異の探索

膵癌は早期診断・早期治療が難しく、外科的切除を行っても再発症例が多い。また、他がん種に比べ全身化学療法を行っても病期進行が早く予後不良ながん種でもある。近年、予後改善を目指し遺伝子異常に基づいたゲノム医療が行われ始め、遺伝子解析の重要性が増している。がん患者における遺伝子異常探索方法の一つとしてリキッドバイオプシーがある。リキッドバイオプシーとは血液などの体液を採取し、その中に含まれる cell free DNA (cfDNA)などの物質を解析する技術である。そのため、リキッドバイオプシーは従来の原発巣での遺伝子解析に比べ、以下のようなメリットがある：低侵襲のため繰り返しサンプルを採取可能、リアルタイムな腫瘍動態を反映、解析時における腫瘍内不均一性の考慮が不要。一方で variant allele frequency (VAF)が低いため遺伝子異常検出で偽陰性が多く、臨床経過とサンプル結果の解釈が難しい、といった点は今後更に検討すべき項目である。

今回、私たちのグループは九州大学病院第3内科と共同で、膵癌術後再発患者の血漿から経時的に採取した cfDNA の whole exome sequencing (WES)を行い、膵癌マーカー変異の同定を目指した解析を行った。手術検体および術後再発後の cfDNA の遺伝子領域における変異について比較・検討した。その結果、多くの変異は経時的に大きく異なるが、一部の変異はいずれの採取時点においても共通して見られた。これらの変異は新規膵癌マーカーとなる可能性が示唆された。

## F. 一細胞 RNA-seq を用いた 2 細胞マウス胚の割球間での全能性分離の解析

全能性とは、1つの細胞から完全な個体を生み出す能力のことである。哺乳類では、通常、接合子に加えて、受精後の最初の分裂から出現する 2 細胞期胚のそれぞれの細胞が全能性細胞であると認識されている。しかし、近年、2 細胞期胚のそれぞれの細胞の個体発生能力が同一ではないことが、実験データから明らかになりつつあるが、このアンバランスについては、まだ十分に解明されていない。そこで、NCBI の SRA データベースからマウスの 2 細胞期胚の割球についての 1 細胞 RNA-seq データを収集し、割球間で発現差が見られる遺伝子を明らかにすることで、細胞の全能性に関する知見を得ることを目指した。

まず、クロスバッチデータにおいて、同一性が入れ替わった細胞のペアを比較するという課題を扱うためのデータ処理パイプラインを構築した。それをデータベースから収集した 51 組の姉妹割球の 1 細胞 RNA-seq データに適用することで、姉妹割球間

で安定した差異を示す遺伝子を複数同定した。

## 業績目録

### 原著論文

1. Kobayashi N., Okae H., Hiura H., Kubota N., Kobayashi E.H., Shibata S., Oike A., Hori T., Kikutake C., Hamada H., Kaji H., Suyama M., Bortolin-Cavaillé M.L., Cavaillé J., Arima T. (Jun 2022)  
The microRNA cluster C19MC confers differentiation potential into trophoblast lineages upon human pluripotent stem cells.  
**Nat Commun.** 13:3071.
2. Yamamoto S., Matsui A., Ohyagi M., Kikutake C., Harada Y., Iizuka-Koga M., Suyama M., Yoshimura A., Ito M. (Jul 2022)  
In Vitro Generation of Brain Regulatory T Cells by Co-culturing With Astrocytes.  
**Front Immunol.** 13:960036.
3. Masuda T., Haji S., Nakashima Y., Tsuda M., Kimura D., Takamatsu A., Iwahashi N., Umakoshi H., Shiratsuchi M., Kikutake C., Suyama M., Ohkawa Y., Ogawa Y. (Jul 2022)  
Identification of a drug-response gene in multiple myeloma through longitudinal single-cell transcriptome sequencing.  
**iScience** 25:104781.
4. Kubota N., Suyama M. (Aug 2022)  
Mapping of promoter usage QTL using RNA-seq data reveals their contributions to complex traits.  
**PLoS Comput Biol.** 18:31010436.
5. Inoue M., Baba T., Takahashi F., Terao M., Yanai S., Shima Y., Saito D., Sugihara K., Miura T., Takada S., Suyama M., Ohkawa Y., Morohashi K.I. (Sep 2022)  
Tmsb10 triggers fetal Leydig differentiation by suppressing the RAS/ERK pathway.  
**Commun Biol.** 5:974.
6. Kikutake C., Suyama M. (Oct 2022)  
Pan-cancer analysis of mutations in open chromatin regions and their possible association with cancer pathogenesis.  
**Cancer Med.** 11:3902-3916.
7. Yoshioka Y., Anzai K., Kowada R., Hiratsuka K., Hirayabu T., Yasuda M., Ohkawa Y., Sato T., Suyama M., Yoshida H., Yamaguchi M. (Nov 2022)  
Drosophila transcription factor NF-Y suppresses transcription of the lipase 4 gene, a key gene for lipid storage.

- Exp Cell Res.** 420:113307.
8. Qu Z., Sakaguchi N., Kikutake C., Suyama M. (Nov 2022)  
Genome-wide identification of exon extension/shrinkage events induced by splice-site-creating mutations.  
**RNA Biol.** 19:1143-1152.
  9. Fleming T., Kikuchi Y., Nakajo M., Tachizawa M., Inazumi T., Tsuchiya S., Sugimoto Y., Saito D., Suyama M., Ohkawa Y., Baba T., Morohashi K.I., Okubo K. (Nov 2022)  
Prostaglandin E2 receptor Ptger4b regulates female-specific peptidergic neurons and female sexual receptivity in medaka.  
**Commun Biol.** 5:1215.
  10. Kaneko R., Matsui A., Watanabe M., Harada Y., Kanamori M., Awata N., Kawazoe M., Takao T., Kobayashi Y., Kikutake C., Suyama M., Saito T., Saido T.C., Ito M. (Mar 2023)  
Increased neutrophils in inflammatory bowel disease accelerate the accumulation of amyloid plaques in the mouse model of Alzheimer's disease.  
**Inflamm Regen.** 43:20.
  11. Kim H., Suyama M. (Mar 2023)  
Genome-wide identification of copy neutral loss of heterozygosity reveals its possible association with spatial positioning of chromosomes.  
**Hum Mol Genet.** 32:1175-1183.

## 学会発表

1. Mikita Suyama. (9/1-2, 2022)  
Searching for causative mutations of genetic disorders focusing on splice-site-creating mutations.  
International Symposium for Rare Diseases 2022, Ritumeikan University, Shiga.
2. Hyoenjeong Kim, Mikita Suyama. (11/16-17, 2022)  
Direct detection of loss of heterozygosity using the genome sequencing data of three-generation human families.  
The 31th Hot Spring Harbor International Symposium, オンライン.
3. 金 賢正, 須山 幹太. (11/30-12/2, 2022)  
三世代のゲノムデータを用いた loss of heterozygosity の探索.  
第 45 回日本分子生物学会年会, 幕張.
4. 曲 酌, 坂口 愛美, 菊竹 智恵, 須山 幹太. (11/30-12/2, 2022)  
スプライス部位形成変異による exon extension/shrinkage イベントの網羅的探索.  
第 45 回日本分子生物学会年会, 幕張.

5. 安森 翔, 菊竹 知恵, 寺松 克人, 藤森 尚, 須山 幹太. (11/30-12/2, 2022)  
 膵癌術後再発患者の cfDNA を用いた膵癌マーカー変異の探索.  
 第 45 回日本分子生物学会年会, 幕張.
6. 羅 筱儒, 久保田 直人, 須山 幹太. (11/30-12/2, 2022)  
 アルツハイマー病に関連する機能変異の網羅的探索.  
 第 45 回日本分子生物学会年会, 幕張.
7. 原野 愛弓, 坂口 愛美, 菊竹 智恵, 須山 幹太. (11/30-12/2, 2022)  
 スプライスサイト変異によるスプライシングパターンの解析.  
 第 45 回日本分子生物学会年会, 幕張.
8. 菊竹 智恵, 須山 幹太. (11/30-12/2, 2022)  
 がんにおける"隠れた伏兵"silent mutation の意義に迫る.  
 第 45 回日本分子生物学会年会, 幕張.
9. 出口 ゆい, 菊竹 智恵, 須山 幹太. (11/30-12/2, 2022)  
 がん種特異的な選択的スプライシングパターンの特定.  
 第 45 回日本分子生物学会年会, 幕張.
10. 湯通堂 紀子, 松崎 芙美子, 宇田 新介, 和泉 自泰, 高橋 政友, 中尾 素直, 油屋 駿介,  
 馬場 健史, 菊竹 智恵, 須山 幹太, 大川 恭行, 原田 哲仁, 松本 雅記, 中山 敬一, 久  
 保田 浩行. (11/30-12/2, 2022)  
 食餌性肥満によるマウス肝臓変容の時系列トランスオミクス解析.  
 第 45 回日本分子生物学会年会, 幕張.
11. Hyoenjeong Kim, Mikita Suyama. (12/14-17, 2022)  
 Direct detection of loss of heterozygosity using the genome sequencing data of three-generation  
 human families.  
 日本人類遺伝学会第 67 回大会, 横浜.
12. Zhuo Qu, Narumi Sakaguchi, Chie Kikutake, Mikita Suyama. (12/14-17, 2022)  
 Comprehensive identification of exon extension/shrinkage events induced by splice-site-creating  
 mutations.  
 日本人類遺伝学会第 67 回大会, 横浜.
13. Hsiao-Ju Lo, Naoto Kubota, Mikita Suyama. (12/14-17, 2022)  
 Comprehensive search for functional variants related to Alzheimer's disease.  
 日本人類遺伝学会第 67 回大会, 横浜.
14. 須山 幹太. (2/28, 2023)  
 希少遺伝性疾患におけるスプライス部位変異の重要性. (特別講演)  
 第 10 回 TR 推進合同フォーラム・ライフサイエンス技術交流会, 福岡.



## 粘膜防御学分野

### Division of Mucosal Immunology

教授：澤 新一郎

Professor : Shinichiro Sawa, M.D., Ph.D.

粘膜組織は生体防御の最前線であり、感染症やアレルギーなど免疫が関与する種々の疾患の主座になりうる。当分野では、粘膜組織に局在する3型自然リンパ球 (ILC3) や機能的間葉系細胞に注目し、宿主免疫系と共生微生物との双方向性活性化機構や平衡維持を担う原理原則の解明、宿主免疫系による病原性微生物の排除機構、免疫組織形成機構の解明を目指している。現在はマウス遺伝学と網羅的遺伝子発現解析を技術的な両輪とし、粘膜関連リンパ組織における細胞—細胞間ネットワークや腸管細胞—微生物間ネットワークの解明を進めている。これらの基礎的な研究により、炎症性腸疾患や食物アレルギー、呼吸器ウイルス感染症など、ヒトの粘膜組織を主座とする様々な疾患の病態解明へとつながることを想定している。

令和4年度は科研費の基盤研究B、基盤研究C、挑戦的研究、日本医療研究開発機構AMED委託事業 (PRIME)、科学技術振興機構JST委託事業 (ムーンショット) などの研究費による支援をうけ、ILC3の分化機構および機能解明、腸管リンパ組織形成機構の解明、胎生期における骨髄形成機構の解明、腸管マクロファージニッチの同定を行うとともに、呼吸器ウイルス感染からの生体防御機構の解明を進めた。

人事面では2022年4月より渡邊美幸が学術研究員として着任した。歯学系研究院博士2年の木屋奈央子、医学系研究院修士1年の野中大地が参加し、令和4年度医学科4年次研究室配属として小林怜央が研究室に参加、令和4年度医学科3年次研究室配属として金子、前期研究室配属として生命科学科吉田、白野が参加した。2022年10月に住谷瑛理子助教、12月にテクニカルスタッフの矢野亜希子が退職した。

### A. 3型自然リンパ球による腸管粘膜制御機構の解明

#### a. 3型自然リンパ球分化における転写因子ネットワークの解明

自然リンパ球 (Innate Lymphoid Cell=ILC) はT細胞やB細胞、NK細胞とも起源を異にし、抗原受容体を有さないリンパ球群の総称である。このうち3型自然リンパ球 (ILC3) は、我々が2008年に発見し、腸管リンパ組織形成や腸管粘膜バリア機能の維持に極めて重要な役割を果たすILCである (Sato-Takayama et al., *Immunity*, 2008; Sawa et al, *Science*, 2010)。転写因子ROR $\gamma$ tはILC3の分化および成熟に必須のマスター制御因子であるが、ILC3におけるROR $\gamma$ t発現制御機構は明らかでない。そこで、過

年度において ILC3 分化に伴う遺伝子発現変化およびゲノムワイドなエピゲノム解析を行うことで、ILC3 特異的な ROR $\gamma$ t エンハンサー候補領域を複数同定した。また、ILC3 分化において (1) Runx3 は ROR $\gamma$ t 発現に先立ち発現し、成熟過程で両遺伝子の発現が上昇すること、(2) ROR $\gamma$ t 遺伝子座において複数の RUNX および ROR $\gamma$ t 結合領域が存在すること、(3) Runx3 遺伝子座において ROR $\gamma$ t 結合配列が存在すること、が明らかになった。以上から、ILC3 分化において RUNX3 と ROR $\gamma$ t は互いの発現を転写レベルで正に制御するとの仮説をたて、各々の遺伝子座における RUNX3 および ROR $\gamma$ t の結合配列に変異を導入したマウスを樹立した。これらの遺伝子改変マウスを解析した結果、ROR $\gamma$ t には ILC3 特異的なプロモーター領域、ILC3 特異的なエンハンサー領域が存在し、Th17 細胞や胸腺細胞とは全く異なった発現制御機構を利用しながら分化成熟することが明らかになった。

## **b. 腸管免疫寛容の誘導に関与する ROR $\gamma$ t 陽性細胞の探索**

ヒトの新生児から乳児期は腸内細菌や食餌抗原に対する免疫寛容を成立させる重要な時期である。これまでの研究から転写因子 ROR $\gamma$ t を発現する免疫細胞には抗原提示能を有する細胞分画が存在し、腸管膜リンパ節において制御性 T 細胞の分化を誘導することで腸管免疫寛容に重要な役割を果たすことが明らかになってきた。本年度は ROR $\gamma$ t を発現する細胞群およびそれらの前駆細胞群について単一細胞遺伝子発現解析を行い、抗原提示能を有する ROR $\gamma$ t 発現細胞分画およびその前駆細胞を同定するとともに、その分化に必要な分子欠損マウスを樹立した。当該遺伝子欠損マウスでは、腸管制御性 T 細胞が減少していることから、これらの ROR $\gamma$ t 発現細胞は腸管免疫寛容の成立に必須の細胞群であると考えている。

## **B. 機能的間葉系細胞による免疫組織形成機構の解明**

### **a. 骨髓腔形成機構の解明**

野生型マウスの骨髓は出生時に形成され、造血を開始している。一方、RANKL を先天的に欠損するマウスは骨髓腔が狭小化し、骨髓外の組織で造血が行われる。新生仔期以降の微生物生着に備え、粘膜バリア機能を維持するためには、骨髓造血を正常に行い、免疫細胞を粘膜組織に恒常的に供給する必要がある。マウス的大腿骨では胎生 15 日ごろから破骨細胞の作用による骨化組織の吸収と空洞形成が開始し、血管内皮と間葉系細胞から構成される骨髓が腔内に形成される。しかし、どのような分子メカニズムで胎児期の骨髓が形成されるか明らかになっていない。我々は RANKL レポーターマウスを樹立後、胎生 15 日的大腿骨を組織学的に観察したところ、骨中央部に RANKL 陽性細胞 (E15-

RANKL 細胞) が集積することを見出した。遺伝子発現解析や細胞系譜解析の結果, E15-RANKL 細胞は成体骨組織に存在する骨芽細胞, 骨膜細胞, 骨髄ストローマ細胞の共通前駆細胞に相当する細胞であることが明らかになった。さらにシングルセルレベルの遺伝子発現解析を進めたところ, E15-RANKL 細胞にはそれらの前駆細胞のほか, 破骨細胞分化誘導能が極めて高い亜集団が含まれていることもわかった。これらの結果は, E15-RANKL 細胞が骨髄腔形成と骨髄実質構成細胞を供給する骨髄オーガナイザー細胞であることを強く示唆する。本研究内容の一部は第 51 回日本免疫学会ワークショップ発表において, ベストポスター発表賞の対象となった。

## **b. 腸管マクロファージニッチの探索**

腸管には病原性微生物からの生体防御や組織恒常性の維持を担うマクロファージが多数存在している。今年度, 我々は新規樹立した CSF-1 (M-CSF) レポーターマウスを用い, マクロファージの生存維持に重要な CSF1 発現細胞を腸管内に同定した。さらに, 血管内皮, 繊維芽細胞, リンパ管内皮特異的な CSF1 欠損マウスを樹立し, 小腸粘膜下層においては線維芽細胞が CSF1 の主要な供給源であること, 絨毛には CSF1 以外のニッチ因子が存在することを突き止めた。さらに, 腸管線維芽細胞に関する単一細胞遺伝子発現解析を行い, 絨毛内に存在する線維芽細胞サブセットに CSF1 以外のニッチ候補因子が発現することを見出した。

## **c. 呼吸器ウイルスからの生体防御における間葉系細胞の機能解明**

JST ムーンショット研究では, ウイルスと人体の相互作用ネットワークを解析することにより, 相互作用ネットワークのパターンを分類整理し, 各パターンに対して有効な検査・治療の確立の基盤を構築し, 未知のウイルスに対しても有効な検査・治療法を先制的に準備することを最終的な目標とする。この目標を達成するために, インフルエンザウイルス PR8 株がヒトの細胞に感染した場合における個体内での応答様式を免疫系, 特に間葉系細胞などの免疫支持細胞に焦点をあてて解明する。しかし, 免疫支持細胞は生体深部の臓器内部に存在するため, ヒト検体の採取は特に困難である。そこで, マウスモデルを用い, 臓器局所から採取した免疫支持細胞を対象とした遺伝子発現やタンパク発現を網羅的に解析した。

血管内皮細胞, リンパ管内皮細胞, 免疫組織における線維芽細胞 (ストローマ細胞) などの免疫支持細胞は免疫応答時のリンパ球や樹状細胞, 好中球の遊走や活性化を司る組織局在型の非血球系細胞である。ウイルス感染において, 免疫支持細胞は血球系細胞, 常在細菌と相互ネットワークを形成しつつ, 生体防御に重要な役割を果たしていると考えられるが, 免疫支持細胞は表面分子マーカーの検索が十分に進められていないため,

免疫学研究における未開拓領域になっている。また、免疫支持細胞は臓器そのものを構成する細胞であり、生検などの侵襲を伴うヒト検体の採取は倫理的観点からも困難な場合が多い。

過年度は、生体防御医学研究所のBSL2施設でインフルエンザウイルスPR8株を感染させたマウスから肺胞上皮細胞、血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞、線維芽細胞などの非血球系細胞分画を採取し、scRNA-seqを行い、経鼻感染後48時間まで（急性期）および28日まで（慢性期）の経時的な遺伝子発現変容の追跡が可能なデータセットを取得した。PR8感染48時間後に肺ウイルス量がピークとなるが、ウイルスがすべて排除された感染7日目に肺炎の重症化により50%のマウスが死亡（LD<sub>50</sub>）する。感染後6時間から線維芽細胞の一分画にIL-6の発現が誘導されはじめ、48時間にはCCL19, CXCL13, CXCL10など、各々T細胞, B細胞, 好中球の遊走に関わるケモカインを強く発現するBST2陽性線維芽細胞集団が新規に出現することがわかった。さらに、名古屋大学との共同研究により、これらの免疫支持細胞にPR8が感染することが明らかとなり、感染を契機としたケモカイン産生にインターフェロンシグナルが深く関与していることも明らかになった。以上から、ウイルス感染を契機とした「呼吸器ストローマ細胞の活性化が急性呼吸器感染症の重症度やその後の獲得免疫の誘導に重要な役割を果たす」との仮説を立てるに至った。

本年度は、インターフェロン(IFN)シグナルとケモカイン発現, 獲得免疫系の誘導と免疫記憶の成立機序の解明を目指し、各種ケモカインレポーターマウスの樹立, 細胞特異的な1型および2型IFNシグナル遮断マウスの樹立を行った。

## 業績目録

### 原著論文

1. Mine K., Tun X., Hatano S., Noguchi N., Iwakura Y., Sawa S., Nagafuchi S., Yoshikai Y. (Aug 2022)  
Dermal V $\gamma$ 6<sup>+</sup>  $\gamma$  $\delta$  T17 Cells Are Involved in Skin Pressure Ulcers in Mice.  
**J Invest Dermatol.** 142(8):2204-2297.e5.
2. Guenther C., Watanabe M., Yamasaki S. (Jan 2023)  
Immunomodulatory functions of Glycolipids from pathogens.  
**Methods Mol Biol.** 2613:23-31.
3. Watanabe M., Motooka D., Yamasaki S. (Mar 2023)  
The kinetics of signaling through the common Fc $\gamma$ R chain determine cytokine profiles in dendritic cells.  
**Sci Signal.** 16(775):eabn9909.

## 受賞

1. Sumiya Eriko. (12/9, 2022)  
Cartilage-degrading cells in the primary ossification center contributes to perinatal bone marrow development.  
第 51 回日本免疫学会学術集会, ベストポスター賞.

## 学会発表

1. 野中 大地, 住谷 瑛理子, 澤 新一郎. (5/27, 2022)  
腸管マクロファージの維持に寄与する CSF1 産生細胞の解析. (口頭発表, ポスター発表)  
第 31 回 Kyoto T Cell Conference 学術集会, オンライン開催.
2. 福井 卓磨, 香城 諭, 住谷 瑛理子, 小泉 真一, 澤 新一郎. (5/28, 2022)  
ILC3/LTi 細胞における ROR $\gamma$ t 発現制御機構の解明. (口頭発表)  
第 31 回 Kyoto T cell conference, zoom.
3. 澤 新一郎. (7/22, 2022)  
粘膜免疫研究の最前線. (招待講演, 口頭発表)  
第 42 回阿蘇シンポジウム, 熊本.
4. 澤 新一郎. (7/13, 2022)  
活性化自然リンパ球による腸管免疫寛容に関する研究. (口頭発表)  
日本医療研究開発機構「健康・医療の向上に向けた早期ライフステージにおける生命現象の解明」領域 PRIME 会議.
5. 住谷 瑛理子, 澤 新一郎. (7/23, 2022)  
一次骨化中心に出現する胎仔 RANKL 陽性細胞は骨芽細胞および骨髄ストローマ細胞へ分化することで骨の発生に寄与する. (口頭発表)  
第 40 回日本骨代謝学会学術集会, 岐阜 (Hybrid 開催) .
6. 澤 新一郎. (8/23, 2022)  
ILC3 研究のこれまでとこれから. (口頭発表)  
日本免疫学会サマースクール, 大阪.
7. 澤 新一郎. (8/31, 2022)  
免疫組織の設計図を解読する. (招待講演, 口頭発表)  
第 2 回シングルセルゲノミクス研究会, 京都.
8. 住谷 瑛理子. (8/30-31, 2022)  
骨と骨髄の発生に寄与する新規間葉系細胞集団の同定. (ポスター発表)  
第 2 回シングルセルゲノミクス研究会, 京都.
9. Shinichiro Sawa. (9/8, 2022)  
Transcriptomic landscapes of whole lung cells after influenza infection in mice. (招待講演, 口頭

発表)

The 20<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity, Osaka.

10. Takuma Fukui, Satoshi Kojo, Eriko Sumiya, Miyuki Watanabe, Shinichiro Sawa. (11/16, 2022)  
Regulatory mechanism of ROR $\gamma$ t expression in ILC3. (口頭発表)  
The 31st Hot Spring Harbor International Symposium, zoom.
11. Shin-ichi Koizumi, Eriko sumiya, Naoto Noguchi, Satoshi Kojo, Shinichiro Sawa. (12/7, 2022)  
Analysis of fibroblasts that initiate iBALT formation during influenza virus infection. (ポスター発表)  
第 51 回日本免疫学会学術集会, 熊本.
12. Takuma Fukui, Satoshi Kojo, Eriko Sumiya, Shinichi Koizumi, Shinichiro Sawa. (12/7, 2022)  
Regulatory mechanism of ROR $\gamma$ t expression in ILC3. (口頭発表, ポスター発表)  
第 51 回日本免疫学会学術集会, 熊本.
13. Naoko Kiya, Shinichiro Sawa, Miho Matsuda. (12/7, 2022)  
Prip2 is required for the formation of gut-associated lymphoid tissue. (ポスター発表)  
第 51 回日本免疫学会学術集会, 熊本.
14. Daichi Nonaka, Eriko sumiya, Shinichiro Sawa. (12/8, 2022)  
CSF1-producing cells in the intestine contributes to the maintenance of macrophages. (口頭発表, ポスター発表)  
第 51 回日本免疫学会学術集会, 熊本.
15. Sumiya Eriko, Sawa Shinichiro. (12/9, 2022)  
Cartilage-degrading cells in the primary ossification center contributes to perinatal bone marrow development. (ポスター発表)  
第 51 回日本免疫学会学術集会, 熊本 (Hybrid 開催) .
16. Miyuki Watanabe, Sho Yamasaki. (12/9, 2022)  
Kinetics of signaling via common Fc receptor  $\gamma$  (FcR $\gamma$ ) chain determine dendritic cell responses by altering chromatin status. (口頭発表)  
第 51 回日本免疫学会学術集会, 熊本.
17. 澤 新一郎. (12/19, 2022)  
免疫組織の形成を担う自己免疫疾患関連分子. (招待講演, 口頭発表)  
第 14 回大阪骨関節コロキウム, 大阪.
18. 澤 新一郎. (1/4, 2023)  
Transcriptional regulation of ROR $\gamma$ t in innate and adaptive lymphocytes. (招待講演, 口頭発表)  
北海道大学免疫学セミナー, 札幌.
19. Miyuki Watanabe, Sho Yamasaki. (1/12, 2023)  
Kinetics of signaling via common Fc receptor  $\gamma$  (FcR $\gamma$ ) chain determine dendritic cell responses by

altering chromatin status. (口頭発表)

第11回 ITAM Workshop, 東京.

20. 澤 新一郎. (3/21, 2023)

腸管マクロファージニッチ細胞の検討. (口頭発表)

第7回理論免疫学ワークショップ, 鹿児島.

## アレルギー防御学分野

Division of Allergy and Immunology

准 教 授 : 伊藤 美菜子

Associate Professor : Minako Ito, Ph.D.

当分野は、中枢神経系疾患における免疫応答制御に関する研究を進めている。多発性硬化症や抗 NMDA 受容体抗体脳炎などの自己免疫疾患だけでなく、パーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患、さらには自閉症や統合失調症のような精神疾患においても免疫系の関与が示唆されている。脳内免疫においてはこれまではミクログリアを中心とした自然免疫細胞が主な研究対象であったが、T 細胞や B 細胞などの獲得免疫細胞も脳内に浸潤して脳内細胞を制御していることが明らかになりつつある。当研究分野では、脳梗塞マウスモデルを中心に、多発性硬化症・アルツハイマー病・自閉スペクトラム症などの様々な中枢神経系疾患のマウスモデルを用いて病態の発症・収束・組織修復における免疫細胞の意義を解明することを目指している。具体的には、一細胞 RNA シークエンスや免疫染色などを用いて詳細に脳内免疫細胞の動態や意義を調べている。これらの解析を通じて脳内神経炎症にかかわる免疫系の共通原理を発見し、全く新しい治療法の開発につなげたいと考える。

### A. 中枢神経系疾患における制御性 T 細胞の意義の解析

脳梗塞急性期、亜急性期にはマクロファージを中心とした自然免疫細胞が脳内に浸潤して炎症の遷延化、神経症状の悪化を引き起こす。また、脳梗塞慢性期における獲得免疫系の意義についても解析を行い、脳梗塞発症後 2 週間以上を経過したマウスの脳内には急性期よりもはるかに多くの T 細胞が浸潤しており、特に制御性 T 細胞 (Treg) が大量に蓄積することを明らかにした。また脳 Treg は Areg や IL-33 受容体を発現するなど組織 Treg の性質も有しているが、脳特異的な性質も示していることを以前に報告している (Nature 2019)。多発性硬化症モデル (EAE) やアルツハイマーモデルマウスにおいても同様の性質を示す Treg の存在を確認することができた。EAE モデルは脊髄と脳の両方に病態を形成するが、同個体でも脊髄と脳に存在する Treg のフェノタイプは異なっており、脳に存在する Treg は脳梗塞の脳内に浸潤した Treg の特徴に近かった。これらの結果より、組織 Treg は病態よりも局在する組織の環境によって性質を獲得している可能性が示唆された。また脳 Treg の TCR レパトア解析から、脳 Treg は脳梗塞による組織障害によって放出される何らかの抗原を認識して活性化すると考えられるが、脳由来の自己抗原は未だ不明である。現在、抗原や抗原に対する抗体の同定のために、脳梗塞後における脳内免疫細胞一細胞レベルでの TCR・BCR レパトアと遺伝子発現解析を行っており、抗原によるワクチン療法や抗体療法を目指している。



## B. アルツハイマー病発症における免疫応答の寄与

脳と腸の相互作用による腸-脳連関が注目されており、ヒトでは炎症性腸疾患が認知症、特にアルツハイマー病のリスクに関連するということが報告されている。しかしながら、そのメカニズムは未解明で、アルツハイマー病の病態に対する腸炎の影響はほとんど明らかになっていない。アミロイドベータ ( $A\beta$ ) はアルツハイマー病患者の脳で見られる老人斑の主成分であり、 $A\beta$  の凝集と病態の進行は深い関わりを持っている。アルツハイマー病マウスモデルの1つである  $APP^{L-G-F}$  マウスは、 $A\beta$  前駆体タンパク質にヒトの家族性アルツハイマー病の変異をもつためアルツハイマー病様の症状や病理を若年で生じる。本研究では、アルツハイマー病の病態への腸管炎症の影響を調べるために、 $APP^{L-G-F}$  マウスに急性腸炎・慢性腸炎・食物アレルギーによる腸炎を誘導し、脳内における免疫細胞の変化や凝集型  $A\beta$  タンパク質の解析を行った。その結果、急性腸炎を誘導した  $APP^{L-G-F}$  マウスの脳内において、好中球の浸潤や凝集型  $A\beta$  の増加が認められた。好中球の細胞表面に発現する Ly6G に対する抗体によって好中球を除去すると、腸炎時に見られた  $A\beta$  の増加が抑制された。好中球の機能には Matrix metalloproteinase (MMP) や活性酸素種 (ROS) の産生、DNA を含む好中球細胞外トラップの放出がある。好中球が  $A\beta$  を増加させる原因を探るために、MMP9 阻害剤、ROS 阻害剤、DNA 分解酵素を投与したところ、腸炎による  $A\beta$  の増加は MMP9 阻害剤によって抑制された。以上より急性腸炎が起きることで好中球がアルツハイマー病マウスの脳に浸潤し、MMP9 を産生することが病態の進行に大きく関連していると考えられた。

## C. 脳梗塞後再発時の炎症抑制メカニズムの解明

我々は発症後2週以降の慢性期には Treg が集積しアストロサイトの過剰な活性を抑制することで神経修復に寄与することを明らかにした。脳内に浸潤した Treg は抗原特異性があり、オリゴクローナルに増殖することが分かったため、一度抗原を認識した Treg が二度目の脳梗塞に対して保護的に働きやすいのではないかと想定し、脳梗塞再発モデルを考案した。このような獲得免疫が発動後の脳梗塞慢性期のマウスの反対側に脳梗塞を作製したところ、再発時には梗塞体積の減少が認められた。この再発時の梗塞体積の減少が同一個体内だけで起こるのか、血行性に移行するのかを確かめるためにパラバイオーシス実験を行った。脳梗塞マウスと血流を共有したマウスでは、sham マウスと血流を共有したマウスに比べ梗塞体積が減少することから、血行性に移行する液性因子や血液細胞の中に抑制因子が含まれることが示唆された。そこで、血液中の液性因子と細胞とどちらが重要であるかを調べるために、脳梗塞マウスから血液を採取し、血清と PBMCs に分けて別のマウスに移入した。血清の投与では、脳梗塞急性期の1日後と慢性期の10日後の血清がレシピエントマウスの梗塞体積を減少させた。PBMCs の移入では、脳梗塞慢性期に抑制性の細胞が含まれることが分かった。そ

の抑制性細胞が Treg であると予想し, Treg を除いた PBMCs を移入したところ, 脳梗塞マウスの PBMCs による脳損傷抵抗性の効果が失われた. 以上の結果より, 脳梗塞後の血清や Treg に脳梗塞を軽減する効果があることが示唆された.

脳梗塞後の脳組織の bulk RNAseq の結果より, 我々は脳梗塞慢性期の反対側や再発時に発現の上昇する液性因子で, かつ血清や血漿中で検出可能な因子としてオキシトシンに着目した. 脳梗塞慢性期では梗塞側だけでなく反対側でも Oxt の発現が上昇することや, 再発時には Oxt と Oxt 受容体(Oxtr)の発現が上昇することが分かった. 脳組織や血漿の ELISA より, 脳梗塞慢性期には Oxt のタンパクレベルでも発現の上昇が確認された. Oxt の点鼻により梗塞体積の減少や神経症状の改善効果が認められた. さらに, 再発時に Oxtr のアンタゴニストを投与すると損傷抵抗性が失われ, 再発時の脳梗塞の軽減にはオキシトシンシグナルが重要であることが示唆された. Oxt を慢性期に投与することによって神経症状は改善し, 一方で, Oxtr アンタゴニストを投与することによって神経症状回復の遅延が認められた. 以上の結果より, 脳梗塞後には脳内や血液中でオキシトシンが上昇して組織修復に働くこと, 再発時には炎症抑制に働くことが示唆された.

## 業績目録

### 原著論文

1. Yamamoto S., Matsui A., Ohyagi M., Kikutake C., Harada Y., Iizuka-Koga M., Suyama M., Yoshimura A., Ito M. (Jun 2022)  
In vitro generation of brain regulatory T cells by co-culturing with astrocytes.  
**Front. Immunol.** 13:960036.
2. Kaneko R., Matsui A., Watanabe M., Harada Y., Kanamori M., Awata N., Kawazoe M., Takao T., Kobayashi Y., Kikutake C., Suyama M., Saito T., Saido T.C., Ito M. (Mar 2023)  
Increased neutrophils in inflammatory bowel disease accelerate the accumulation of amyloid plaques in the mouse model of Alzheimer's disease.  
**Inflamm Regen.** 43(1):20.

### 総説

1. 伊藤 美菜子. (2022 年 8 月)  
組織 Treg.  
炎症と免疫. 30(5), 457-461.
2. 伊藤 美菜子. (2022 年 11 月)

ミクログリアと脳内 T 細胞・B 細胞.

**実験医学**. 40(18), 2967-2971.

3. 松井 亜子, 伊藤 美菜子. (2022 年 12 月)  
脳梗塞と間質に存在する細胞の役割.  
**炎症と免疫**. 31(1), 12-17.
4. Kanamori M., Ito M. (Jan 2023)  
Immunity in the brain and surrounding tissues.  
**J Biochem**. 173(3):145-151.

## 著書

1. 伊藤 美菜子. (2022 年 5 月)  
脳梗塞後の制御性 T 細胞による組織修復機構.  
Annual Review 神経 2022. 67-73, 中外医学社, 東京.

## 学会発表

1. 伊藤 美菜子. (5/29, 2022)  
中枢神経系の免疫細胞の動態と組織修復. (シンポジウム)  
第 32 回サイトメトリー学会学術集会, Web 開催.
2. Minako Ito. (6/5-8, 2022)  
Immune cell behavior and functions in the neurological recovery. (シンポジウム)  
15th World Congress on Inflammation, Roma.
3. Minako Ito. (6/30-7/3, 2022)  
Elucidation of immune cell dynamics after ischemic stroke. (シンポジウム)  
Neuro2022, 沖縄.
4. 伊藤 美菜子. (11/30-12/2, 2022)  
Elucidation of mechanisms of pathological deterioration of central nervous system diseases due to aging and systemic immune activation. (ワークショップ)  
第 45 回日本分子生物学会年会, 千葉.
5. Minako Ito. (12/7-9, 2022)  
Regulation of brain lipid metabolism after ischemic stroke by brain immune cells. (シンポジウム)  
第 51 回日本免疫学会学術集会, 熊本.
6. Minako Ito. (2/21-23, 2023)  
Immune responses in neurological diseases. (シンポジウム)  
19th Mind Brain Conference, Hamamatsu.

## 腫瘍防御学分野

### Division of Cancer Genome Regulation

准 教 授 : 野 島 孝 之

Associate Professor : Takayuki Nojima, Ph.D.

当該分野は、ゲノムから転写されたばかりの RNA (新生 RNA) を調べることによって、ゲノム作動原理を明らかにすることを目標とする。具体的には、独自に開発した Pol II 転写装置-新生 RNA 解析法である mNET 法 (*Cell* 2015, *Nat Protocols* 2016, *Molecular Cell* 2017, 2018a, 2018b) やその応用法 POINT 法 (*Molecular Cell* 2017) を主なアプローチとし、RNA プロセッシング、転写終結、非コード RNA 遺伝子の転写制御機構の解明に取り組む。がん細胞でのゲノム作動機構破綻にも注目し、その分子機構解明から医療への応用にも貢献する。令和 4 年度では、非コード RNA 転写制御についての解析法や最新の成果を英文総説 (*Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2022) としてまとめ、分野内で好評を得ている。また、令和 4 年度の国際共同研究の成果として、RNA 転写制御 (*EMBO Journal*, 2022) や RNA スプライシング制御 (*Molecular Cell*, 2023) の新たな細胞機能を明らかにした。

## 業績目録

### 原著論文

1. Iannone C., Kainov Y., Zhuravskaya A., Hamid F., Nojima T. and Makeyev E.V. (Jan 2023)  
PTBP1-activated co-transcriptional splicing controls epigenetic status of pluripotent stem cells.  
*Molecular Cell*. 83:203-218.
2. Tellier M., Zaborowska J., Neve J., Nojima T., Hester S., Furger A. and Murphy S. (Aug 2022)  
CDK9 and PPA2 regulate the link between RNA polymerase II transcription termination and RNA maturation.  
*EMBO Reports* 23:e54520.

### 学会発表等

1. 野島 孝之. (10/11-13, 2022)  
新生 RNA エンド. (特別講演)  
RNA フロンティアミーティング 2022, 大阪大学銀杏会館.

2. 野島 孝之. (7/27, 2022)  
Transcription termination: Forgotten mechanism in RNA synthesis cycle. (特別講演)  
熊本大学リエゾンラボ/HIGO 最先端研究セミナー, zoom 開催.
3. 野島 孝之. (4/26, 2022)  
新生 RNA ライフサイクルを理解する. (特別講演)  
金沢創発数理セミナー, zoom 開催.
4. 野島 孝之. (7/5, 2022)  
新生 RNA 解析で理解するゲノム作動. (特別講演)  
染色体安定維持研究会, 国立遺伝学研究所.