



Title	RUNX2 and BHLHE40 Orchestrate Tissue-Resident Memory CD4 <sup>+</sup> T cells in Crohn' s disease
Author(s)	荒瀬, 充
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/101782">https://hdl.handle.net/11094/101782</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨  
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	荒瀬 充
論文題名 Title	<b>RUNX2 and BHLHE40 Orchestrate Tissue-Resident Memory CD4<sup>+</sup> T cells in Crohn's disease</b> (RUNX2とBHLHE40がクローン病に特徴的なCD4陽性組織常在性記憶T細胞を誘導する)
<p>論文内容の要旨</p> <p>〔目的(Objective)〕</p> <p>炎症性腸疾患 (IBD) は腸管の慢性的な炎症を呈し、寛解と増悪を繰り返す疾患である。IBDはその臨床的な症状と病理組織学的な所見から潰瘍性大腸炎 (UC) とクローン病 (CD) の二つに主に分類される。IBDは本邦も含め世界中で増加傾向にある疾患であるが、発症の原因などはまだわかっていない。炎症性腸疾患の治療法はいくつか存在しており、近年は抗体製剤の開発により寛解導入率の著名な改善が見られるものの、治療抵抗性の症例も多く、さらなる治療法の開発が期待されている疾患である。</p> <p>所属研究室では先行研究にてCDに特徴的なCD4陽性組織常在性記憶T細胞 (CD4<sup>+</sup> T<sub>RM</sub>) を発見し、この細胞の割合がクローン病の活動性スコアや炎症の程度を示す血清CRPと相関を示していることを発見している。(Yokoi, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2023.) そこで、本研究ではCDの新たな治療ターゲットを探るべく、この細胞の誘導メカニズムを解き明かすことを目的としている。</p> <p>〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕</p> <p>本研究では初めに、CDとコントロール（大腸癌正常部）の大腸手術検体より単離した粘膜固有層の単核球からフローサイトメトリーによってCD4陽性T細胞を回収した。そして、このT細胞を二つに分け、タンパク質とRNAのデータを1細胞から得ることのできるCITE-seqと、RNAとオープンクロマチンのデータを取得することのできるscMultiomeの二つのシングルセル解析を行った。</p> <p>まず、CITE-seqのデータにおいて、タンパク質とRNAの情報を組み合わせた解析を行うことで、先行研究において発見したCD4<sup>+</sup> T<sub>RM</sub>と同様の特徴を持つ特徴を示すCD4<sup>+</sup> T<sub>RM</sub>の細胞集団を同定した。次に、このCITE-seqのデータを元にして、同時に行ったscMultiomeのデータにリファレンスマッピングを用いてCITE-seqの情報を乗せることで、scMultiomeのデータ上でもCDに特徴的なCD4<sup>+</sup> T<sub>RM</sub>を同定し、この細胞集団のオープンクロマチン情報を得た。そして、このオープンクロマチンのデータからChIP-Atlasという公共のChIP-seqデータベースを用いた結合転写因子予測やモチーフ解析を行いCDに特徴的なCD4<sup>+</sup> T<sub>RM</sub>を誘導する転写因子の絞り込みを行った。さらに、ここに転写因子のRNA発現も組み合わせることによってRUNX2とBHLHE40の二つの転写因子がこのCD4<sup>+</sup> T<sub>RM</sub>を誘導しうることが予測された。この結果を確認するために、CellOracleというツールと用いたこれらの転写因子のノックダウンシミュレーションを行ったところ、CDに特徴的なCD4<sup>+</sup> T<sub>RM</sub>への分化を阻害するという結果も得られた。</p> <p>次に、実際にこれらの転写因子が実際に先行研究で発見したCDに特徴的なCD4<sup>+</sup> T<sub>RM</sub>を誘導するかを調べるため、レンチウイルスベクターを用いてヒトの血液から単離したCD4陽性T細胞にRUNX2とBHLHE40を過剰発現し、フローサイトメトリーやBulk RNA-seqによる評価を行った。すると、シングルセル解析の結果から予測された通り、フローサイトメトリーによるタンパク質の解析の結果、これらの転写因子の過剰発現によって先行研究にて発見したCD4<sup>+</sup> T<sub>RM</sub>の特徴であるCD103とIFN<math>\gamma</math>の発現が上昇した。また、RNA-seqのデータにおいてもこのCD4<sup>+</sup> T<sub>RM</sub>に特徴的な <i>IFNG</i>や<i>GZMB</i>などのRNAの発現が誘導された。</p> <p>最後に、クローン病の大腸手術検体から単離した粘膜固有層のT細胞に対してRUNX2とBHLHE40をレンチウイルスベクターによるCRISPRiシステムによってノックダウンし、qPCRやBulk RNA-seqによって遺伝子発現の評価を行った。すると、いずれのノックダウンにおいてもこの細胞の特徴である <i>IFNG</i>の発現が低下し、T<sub>RM</sub>で低下する組織遊走マーカーの <i>SIP1</i>の発現が上昇することがわかった。またBHLHE40のノックダウンでは<i>GZMB</i>や<i>PRF1</i>といった他のCD4<sup>+</sup> T<sub>RM</sub>に特徴的なRNAの発現も低下していた。Bulk RNA-seqではこのT<sub>RM</sub>に特徴的な遺伝子であるHLA-DRQB2などの発現も低下した。</p> <p>以上の結果からRUNX2とBHLHE40は先行研究にて発見したクローン病に特徴的なT<sub>RM</sub>を誘導することができ、これら二つの転写因子をノックダウンすることによって炎症性サイトカインの産生や組織常在性というこの細胞の持つ特徴を低下させることができるということがわかった。</p> <p>〔総括(Conclusion)〕</p> <p>本研究ではIBDの大腸手術サンプルから単離したT細胞を用いたシングルセル解析を複数組み合わせることによって、IBDの一つであるCDの疾患活動性に関与するCD4<sup>+</sup> T<sub>RM</sub>を誘導する転写因子として、RUNX2とBHLHE40の二つを同定した。そして、レンチウイルスを用いたT細胞のゲノム編集によってバイオインフォマティクスの解析から得られた結果をin vitroでも再現した。今回発見した二つの転写因子は今後CDの新たな治療ターゲットとして応用されることが期待される。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 荒瀬 充				
論文審査担当者	(職)	氏 名		
	主 査	大阪大学教授	山崎 晶	署名
	副 査	大阪大学教授	鈴木 一博	署名
	副 査	大阪大学教授	長澤 正司	署名

論文審査の結果の要旨

本論文は、炎症性腸疾患の一つであるクローン病に特徴的なCD4陽性組織常在性記憶T細胞 (T<sub>RM</sub>) の特徴とその誘導メカニズムを明らかにすることを目的としている。まず初めに、クローン病とコントロールの大腸手術検体から単離したCD4陽性T細胞を用いてCITE-seqやscMultiomeを行ったところ、クローン病に特徴的なCD4陽性T<sub>RM</sub>は様々な炎症性サイトカインを分泌し、RUNX2とBHLHE40という二つの転写因子によって制御されていることが明らかになった。次に、これらの結果を確かめるべく、健常人から採取したCD4陽性T細胞にレンチウイルスを用いてRUNX2とBHLHE40を過剰発現することでクローン病に特徴的なCD4陽性T<sub>RM</sub>を誘導できることを発見した。さらに、クローン病腸管検体から採取したCD4陽性T細胞でRUNX2とBHLHE40をノックダウンすると、この細胞の持つ炎症性サイトカインの産生や組織常在性が低下することも発見した。本論文はクローン病の病態に関与するT細胞の制御メカニズムを明らかにしたものであり、学位の授与に値すると考えられる。