

研究報告書

「T細胞記憶のエピジェネティック調節による慢性炎症性御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年3月～平成26年3月

研究者: 山下 政克

1. 研究のねらい

生体内において特定の機能を獲得した細胞は、細胞分裂を経た後もその機能を正確に維持することで生体の恒常性を保っている。この生体の恒常性維持には、エピジェネティックな機構による多くの遺伝子の協調的な発現制御が重要であり、それは細胞記憶と呼ばれるシステムによって担われている。慢性炎症では、長期にわたるストレス応答のため恒常性維持のためのエピジェネティクス機構に異常が起こり、正常な細胞記憶システムが破綻する。その結果、組織や臓器機能に異常なリモデリングが起こり、その機能が維持できなくなることで慢性（難治性）炎症疾患が発症すると考えられる。

免疫担当細胞の中でも T 細胞は、細胞内外の環境変化に応じてダイナミックにその機能を変化させることで、生体防御において司令塔としての役割を担っている。私たちは、炎症の遷延・慢性化のトリガーは免疫細胞の司令塔である T 細胞機能の分化誘導と維持のシステム（T 細胞免疫記憶システム）のエピジェネティクス異常にあると想定している。そこで、T 細胞免疫記憶システムのエピジェネティックな分子機構を解明し、その調節法を確立する研究を通して、慢性炎症の制御のための新たな分子基盤の創出を目指す。特に本研究では、免疫反応の司令塔である CD4 陽性ヘルパー T (T_H) 細胞免疫老化・免疫記憶とアレルギー性気道炎症の慢性化をモデルに用い、最先端のゲノム解析技術を駆使して、エピジェネティックな側面から炎症の慢性化のメカニズムに迫りたいと考えている。

T 細胞免疫老化・免疫記憶システムの分子機構を解明し、その調節を目指す研究は、炎症制御のための新たな分子基盤の創出開発につながるだけでなく、効率の良いワクチン開発への突破口となると考えられる。このような流れを背景に、本研究では、T 細胞免疫老化・記憶システムと、その破綻によって引き起こされる難治性炎症疾患の分子病態を、“エピジェネティクス”を中心に解析することにより、慢性炎症の制御のための新たな分子基盤ならびに次世代型エピゲノム創薬の分子基盤を創出することを目標とする。

2. 研究成果

(1) 概要

加齢に伴った T 細胞免疫老化により、免疫記憶の形成をはじめとした抗原に対する正常な免疫反応が抑制されるとともに、遷延する炎症反応が誘導されやすくなることが知られていたが、その分子機構についてはほとんど分かっていなかった。私たちは、免疫反応の司令塔である CD4 T 細胞の老化に伴ったエピジェネティック変化により、CD4 T 細胞に炎症形質が付与されることが炎症の誘発と慢性化につながると仮説を立て研究をおこない、腫瘍抑制因子 Menin を CD4 T 老化制御因子として見いだした。Menin 欠損 T_H 細胞は、野生型 T_H 細胞に比べ、終末分化タイプのエフェクター T_H 細胞へと分化しやすく、senescence-associated

secretory phenotype (SASP) を伴った老化 T_H 細胞へと高頻度で分化する。また、Menin 欠損によって発現変動する遺伝子領域の多くで、ヒストン修飾状態の変化が検出されたことから、Menin 欠損に伴う遺伝子発現変動は、標的遺伝子領域のエピジェネティックな変化によって誘導されたと考えられた。さらに、個体レベルでの解析の結果、Menin 欠損 T_H 細胞では、メモリー-T_H 細胞への分化が顕著に低下していることが明らかとなった。以上のことから、腫瘍抑制因子 Menin は、抗原刺激を受けた CD4 T 細胞において、メモリー-T_H 細胞への分化を維持するとともに、T_H 細胞の終末分化や細胞老化を抑制している可能性が示された。

次に、Menin 下流で、炎症反応の制御に関わる分子として、転写抑制因子 Bach2 を同定した。Bach2 遺伝子座の転写開始点付近には、Menin の結合が検出できるが、そのレベルは、老化 T_H 細胞において著しく低下していた。さらに、Bach2 欠損エフェクター-T_H 細胞においても、Menin 欠損エフェクター-T_H 細胞と同様の SASP 様形質、T_H 細胞の終末分化の亢進が認められたことから、Menin は Bach2 の発現調節を介して CD4 T 細胞老化を制御していることが示された。

続いて、クロマチンリモデリング調節を介して炎症を制御できる可能性を持つ低分子化合物を検索し、SH-2251 を見いだした。SH-2251 は、Gfi-1 遺伝子の発現を活性化ヒストン修飾の阻害により抑制することで T_H 細胞からのサイトカイン産生パターン変化を誘導し、抗炎症作用を発揮する可能性が示された。

(2) 詳細

研究テーマ1「慢性炎症における T 細胞エピジェネティクス研究」

加齢に伴った免疫老化により、免疫記憶の形成をはじめとした正常な免疫反応が抑制されるとともに、遷延化する炎症反応が誘導されやすくなることが知られているが、その分子機構についてはほとんど分かっていない。そこで、免疫反応の司令塔である CD4 T 細胞の老化に伴い網羅的エピジェネティック変化が誘導され、それが CD4 T 細胞に炎症形質を付与し、炎症の誘発と慢性化引き起こすという仮説を立て研究をおこなった。

正常なエフェクター-CD4 T 細胞と老化したエフェクター-CD4 T 細胞の遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイで比較していた過程で、変動遺伝子のパターンが腫瘍抑制因子 Menin 欠損 CD4 T 細胞での変化に極めて類似していることに気づき、T 細胞特異的 Menin 欠損マウスを用いた慢性炎症における CD4 T 細胞エピジェネティクス研究を開始した。

Menin 欠損 T_H 細胞は、*in vitro* で抗原刺激した場合、野生型 T_H 細胞に比べ、IL-2 産生能、CD62L/CD27 分子の発現が低下し、CTLA-4 や PD-1 の発現が上昇した終末分化タイプのエフェクター-T_H 細胞へと分化しやすいことが分かった。また、Menin 欠損 T_H 細胞培養を長期間培養した場合、細胞死の亢進とともに、senescence-associated secretory phenotype (SASP) を伴った老化 T_H 細胞が高頻度で出現することも同時に見いだした。ChIP-シーケンス解析の結果、Menin 欠損によって発現変動する遺伝子領域の多くで、ヒストン H3K4me3、H3K27ac、H3K27me3 修飾状態の変化が出されたことから、Menin 欠損に伴う遺伝子発現変動は、標的遺伝子領域のエピジェネティックな変化によって誘導されたと考えられた。さらに、個体レベルでの解析の結果、Menin 欠損 T_H 細胞では、メモリー-T_H 細胞への分化が顕著に低下していることが分かった。以上のことから、腫瘍抑制因子 Menin は、抗原刺激を受けた CD4

T細胞において、メモリー T_H 細胞への分化を維持するとともに、炎症形質の誘導につながる T_H 細胞の終末分化や細胞老化を抑制している可能性が示された(図1)。

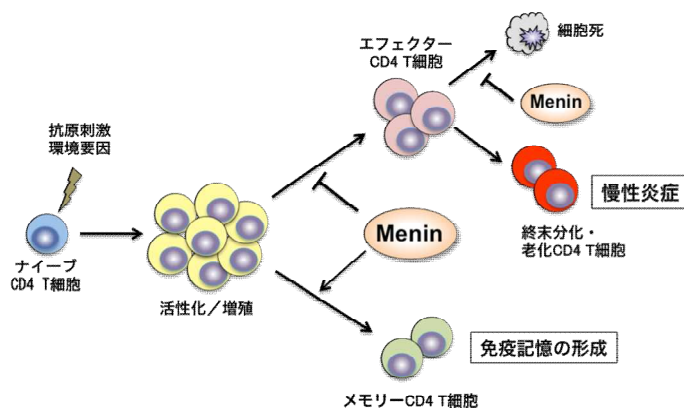


図1. 腫瘍抑制因子 Menin による CD4 T 細胞機能の制御

次に、Menin の下流に位置し T_H 細胞の終末分化と老化、炎症誘発を制御している候補分子を同定するため、ChIP-シーケンス解析、DNA マイクロアレイ解析をおこない、転写抑制因子 Bach2 を見いだした。Menin 欠損エフェクター T_H 細胞では、Bach2 遺伝子座の活性化ヒストン修飾が低下し、Bach2 の発現が減少した。Bach2 発現の低下は、人為的に細胞老化を誘導した T_H 細胞でも確認された。また、Bach2 遺伝子座の転写開始点付近には、Menin の結合が検出できるが、そのレベルは、老化 T_H 細胞において著しく低下していた。さらに、Menin 欠損エフェクター T_H 細胞の SASP 様形質、 T_H 細胞の終末分化の亢進は、Menin 欠損エフェクター T_H 細胞に Bach2 を遺伝子導入することで、正常レベルにまで回復した。Bach2 欠損エフェクター T_H 細胞においても、Menin 欠損エフェクター T_H 細胞と同様の SASP 様形質、 T_H 細胞の終末分化の亢進が認められたことから、Menin は Bach2 の発現調節を介して CD4 T 細胞老化を制御している可能性が示唆された。

研究テーマ2「T細胞記憶形成のエピジェネティクス研究」

テーマ1の成果から、腫瘍抑制因子 Menin がメモリー T_H 細胞の分化に必要であることが分かった。しかしながら、その分子機構の解析はまだ十分に進んでいない。また、慢性炎症に関与すると考えられる炎症性の T_H 細胞記憶の維持にも Menin が関わっているのかについても、未だ明らかになっていない。現在、人為的に細胞老化を誘導した T_H 細胞を移入し、炎症性メモリー T_H 細胞を誘導した後、Meninを欠損する系を立ち上げ、Meninの炎症記憶維持における役割について解析中である。

研究テーマ3「クロマチンリモデリング調節による慢性炎症制御研究」

慢性アレルギー性気道炎症の病態には、好酸球による気道上皮細胞の損傷や杯細胞の過形成が深く関与している。気道上皮の損傷は、気道過敏症の発症を誘発することでアレルギー性気道炎症の慢性化を引き起こすことから、炎症部位への好酸球浸潤を調節する方法論を確立することは、アレルギー性炎症の慢性化を抑制する上で非常に重要である。好酸球分化や炎症部位への浸潤には T_H2 細胞などから分泌される IL-5 によって制御されている。そこ

で、IL-5 の産生を阻害する戦略を確立することで、アレルギー性気道炎症の慢性化を抑制できると考え、研究をおこなった。

ナイーブ CD4 T 細胞から IL-5 産生 T_H2 細胞への分化は、IL-5 遺伝子座のクロマチンリモデリング誘導を伴う。私たちは、CD4 T 細胞において IL-5 遺伝子座のクロマチンリモデリングの誘導を抑制できる低分子化合物を検索し、石原産業(株)が IL-5 産生阻害薬として合成した SH-2251 が目的とする活性を有することを見いだした。SH-2251 は、*in vitro* では 100 nM の低濃度で IL-5 遺伝子座のクロマチンリモデリングと IL-5 産生 T_H2 細胞分化を選択的に抑制した。さらに、*in vivo* において、SH-2251 は、OVA 誘発マウス気道炎症の発症を 10mg/Kg の経口投与により完全に抑制した。続いて、私たちは、SH-2251 の作用点の一つが転写抑制因子 Gfi-1 の発現抑制にあることを明らかにした。Gfi-1 欠損 CD4 T 細胞では、IL-5 遺伝子座のクロマチンリモデリングが誘導(維持)されず、IL-5 産生 T_H2 細胞の分化が低下した。

以上の結果から、SH-2251 は、IL-5 遺伝子座クロマチンリモデリング調節を介してアレルギー性気道炎症の慢性化を阻害できる化合物であることが示された。

クロマチンリモデリング調節による慢性炎症制御のためのもう一つのアプローチとして、TGF-β 下流に位置して、T_H2 細胞への分化をコントロールしている因子の同定をおこなった。TGF-β は、T_H2 サイトカイン遺伝子座のクロマチンリモデリング誘導を阻害することや、T_H2 細胞分化を抑制することは良く知られているが、その分子機構の解明は十分に解明されていない。私たちは、TGF-β によって発現が誘導される転写調節因子 Sox4 が T_H2 細胞分化の抑制に関与していることを明らかにした。Sox4 欠損 CD4 T 細胞では、T_H2 細胞分化の亢進が認められ、さらに、T 細胞特異的 Sox4 欠損マウスにおいても、OVA 誘発マウスアレルギー性気道炎症が増悪した。一方、T 細胞特異的 Sox4 Tg マウスでは、OVA 誘発マウスアレルギー性気道炎症の病態改善が確認できた。

さらに、Sox4 Tg CD4 T 細胞では、IL-4 存在下においても T_H1 細胞分化が亢進することが分

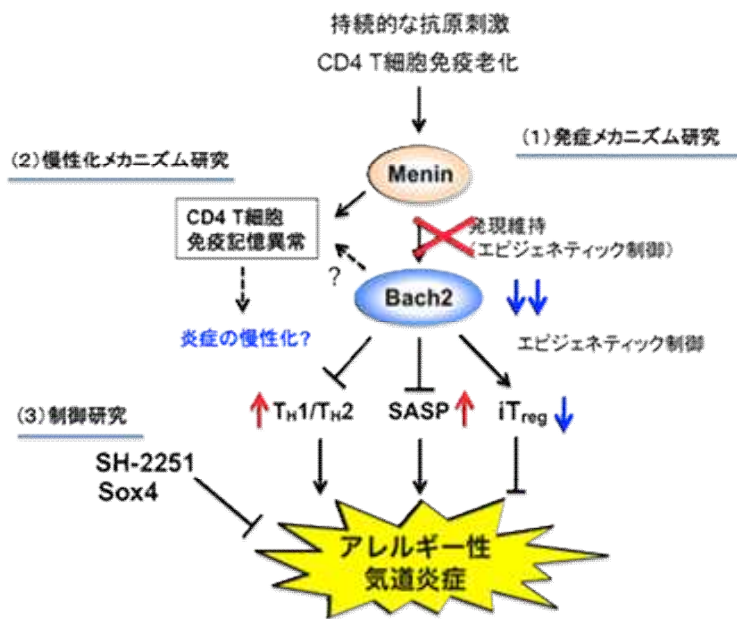


図 2. 本研究で得られた研究成果のまとめ

かった。そこで、T_H1 分化における TGF-β の作用を詳しく検討したところ、IL-4/IFN-γ (IL-12) の両方が存在する場合、TGF-β は、T_H1 分化誘導因子として作用することが明らかとなった。TGF-β /IL-4/IFN-γ で誘導される T_H1 細胞は、IL-12 によって *in vitro* で誘導される T_H1 細胞とは異なり、細胞表面に CD103 を高発現しており、IEL 様の形質を示すことを見いだして CD103 陽性 T_H1 として報告

した。これらの研究の結果から、Sox4 の発現をコントロールすることで、 T_H1/T_H2 細胞の分化(クロマチンリモデリング)バランスの調節を介した、炎症性御が可能になると考えられた。

3. 今後の展開

本計画研究により、CD4 T 細胞における転写抑制因子 Bach2 の発現低下が、炎症状態の形成に関与していることが明らかになった。また、Bach2 の発現維持には、腫瘍抑制因子 Menin による活性化ヒストン修飾の維持が必要であることも示された。当初、Bach2 は B 細胞特異的な転写抑制因子として見いだされ、免疫グロブリンのクラススイッチの誘導や形質細胞分化の抑制への関与が報告された。しかし、最近、T細胞や肺胞マクロファージにおいてもBach2は発現しており、それぞれの細胞においてBach2が欠損することで、炎症性腸疾患や肺胞蛋白症が発症することも報告されている。さらに、GWAS 解析などにより、BACH2 の遺伝子多型がアレルギー性喘息、関節リウマチ、クローン病、セリアック病、尋常性白斑や多発性硬化症など、多くの慢性炎症疾患や自己免疫疾患と関連していることも指摘されている。このことは、Bach2 の発現や機能を制御することが、慢性炎症疾患の治療につながる可能性があることを意味している。私たちは、本計画研究の成果として Menin が Bach2 の発現維持に関与していること、CD4 T 細胞における Bach2 の発現は、免疫老化によって低下することを新たに見いだした。今後は、この成果を基盤として、Bach2 の発現・機能調節を介した慢性炎症制御戦略の提唱を目指した研究を展開したいと考えている。

また、SH-2251 によるクロマチンリモデリング調節を介した慢性炎症性御研究については、まず、SH-2251 の直接の標的分子の同定を試みる。それにより、SH-2251 の慢性炎症性御薬としての可能性を模索していく予定である。

4. 評価

(1) 自己評価

本さがけ研究期間では、T 細胞免疫老化に伴う炎症性形質獲得の分子機構の一端を世界に先駆けて明らかにできた。これは、CD4 T 細胞のエピジェネティックな機能変化を介した、炎症の発症の新たな機構を解明したものであり、当初の研究目的の一つを達成できたと考えている。しかし、これらの成果を記載した論文は、現在、リバイス中や投稿準備中であり、成果を外部に発信するという点では、当初計画より進捗が遅れている。今後、本研究を継続することにより、2~3年以内にさがけ研究の成果を世界に向けて発信する予定である。

また、クロマチンリモデリング調節による慢性炎症性御研究では、Gfi-1 の発現調節を介して IL-5 遺伝子座のクロマチンリモデリングを制御し、OVA 誘発マウスアレルギー性気道炎症の発症を抑制する低分子化合物 SH-2251 を見いだした。この成果は、本領域研究の目的の一つである炎症の慢性化の制御に合致しており、十分な成果をあげたと考えている。

一方、炎症の慢性化に焦点を当てた、炎症性の T 細胞記憶の維持機構に関する研究は立ち後れており、当初の狙いが達成できたとは言い難い状況である。

(2) 研究総括評価(公開項目)

老化などによるヘルパーT 細胞のエピジェネティックな変化に伴う免疫記憶の機能異常が

炎症の慢性化に関わっているという仮説の元に研究が実施された。その結果、ヘルパーT細胞の終末分化や細胞老化といった炎症形質を誘発イベントに対する腫瘍抑制因子 Menin の抑制作用が、その下流で働く転写抑制因子 Bach2 遺伝子の活性化ヒストン修飾を行うことによる Bach2 発現の維持により達成されていること、また 2 型ヘルパーT細胞分化に対する TGF β の抑制作用に転写抑制因子 Sox4 の発現が関与していることを見出すと共に、この Sox4 の T細胞における発現がマウス喘息モデルの病態形成を抑制すること、さらに IL-5 産生阻害薬 SH-2251 が IL-5 遺伝子座のクロマチンリモデリングと IL-5 産生 2 型ヘルパーT細胞分化を選択的に抑制することを明らかにした。これらは何れも新規性・独創性が高く、優れた解析能力による成果であると評価できる。今後は、Menin-Bach2 経路や TGF β -Sox4 経路による T細胞分化制御に基づく免疫制御メカニズムの異常が炎症の慢性化に関わることを明らかにし、疾患の制御に結びつくことを期待している。また、IL-5 産生阻害薬の創薬としての展開も、より実際の面から大いに期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Tofukuji, S., Kuwahara, M., Suzuki, J., Ohara, O., Nakayama, T., and **Yamashita, M.**: Identification of a new pathway for Th1 cell development induced by cooperative stimulation with IL-4 and TGF β . *J. Immunol.* 188:4846-4857 (2012)
2. # Kuwahara, M., #**Yamashita, M.**, Shinoda, K., Tofukuji, S., Onodera, A., Shinnakasu, R., Motohashi, S., Hosokawa, H., Tumes, D., Iwamura, C., Lefebvre, V., and Nakayama, T.: The transcription factor Sox4 is a downstream target of signaling by the cytokine TGF- β and suppresses T_H2 differentiation. *Nat. Immunol.* 13:778-786 (2012) #equal contribution
3. Suzuki, J., Kuwahara, M., Tofukuji, S., Imamura, M., Kato, F., Nakayama, T., Ohara, O., and **Yamashita, M.**: A novel small compound SH-2251 suppresses Th2 cell-dependent airway inflammation through selective modulation of chromatin status at the *Ii5* gene locus. *PLoS ONE* 8:e61785 (2013)

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

Yamashita M. Menin-Bach2 pathway controls senescence-associated secretory phenotype (SASP) in CD4 T cells. JST-CREST International Symposium, Frontiers in Immunology and Inflammation: From Molecules to Disease, Tokyo

Kuwahara M, Nakayama T, Yamashita M. Crucial role of Menin in the regulation of CD4 T cell terminal differentiation and senescence: 6th International Workshop of Kyoto T Cell Conference (KTCC2013), Kyoto

山下 政克、東福寺 聡一、鈴木 淳平、桑原 誠 Th2 細胞分化・機能の調節を介した気道炎症制御 第 48 回日本小児アレルギー学会・第 16 回アジア太平洋小児アレルギー呼吸器免疫学会合同学術大会

プレスリリース

CREST 中山チームとの共同研究

アレルギーの新たな抑制経路の発見～慢性難治性アレルギー疾患の新規治療法確立に期待～ 2012 年 6 月 28 日

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/meneki/pdf/20120628.pdf>