

令和元年6月7日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08738

研究課題名(和文) 能動的DNA脱メチル化を介したメモリーB細胞分化制御

研究課題名(英文) The regulation of memory B cell by DNA demethylation

研究代表者

田中 伸弥 (TANAKA, SHINYA)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：80462703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：DNAメチル化は、細胞分化、機能を制御する最もよく知られたエピゲノム修飾であるが、未梢B細胞の分化にどのような役割をになっているか明らかではない。本研究において、DNAメチル化を除去するTen-Eleven Translocation (Tet) 分子が、B細胞の過剰活性化抑制を担うことによって、自己免疫疾患発症を抑制していることが明らかとなった。一方、外来抗原に対する免疫応答では、抗体産生プラズマ細胞、高親和性抗体産生を担う胚中心B細胞、または、二次免疫応答時に抗体産生を担うメモリーB細胞の分化、維持に必須の役割を担うことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

B細胞は、抗体産生を担い生体防御に寄与する免疫細胞であるが、その制御が適切になされない場合は、自己免疫疾患の発症に寄与することが知られている。本研究によって、DNAメチル化制御因子であるTet分子が、B細胞の不適切な過剰活性化を抑制することにより、自己免疫疾患の発症を防ぐ役割を担っていることが明らかとなった。Tet分子活性の人為的操作によって、B細胞が原因となる自己免疫疾患のみならず、ウイルス、バクテリア感染時のB細胞の活性を制御することで液性免疫応答を調節するための新たな標的としての可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：DNA methylation is a well-known epigenetic modification to regulate differentiation and function of multiple lineage cells. However, it has been unknown that how the modification regulates the B cell biology. In the current study, we demonstrated that a DNA demethylase, Ten-Eleven Translocation (Tet) prevented autoimmune disease by suppressing aberrant activation of B cells. In contrast, Tet molecules played a pivotal role in differentiation and/or maintenance of effector B cells such as plasma cells, germinal center B cells and memory B cells for appropriate humoral immune response. These data suggest that Tet molecules play a pleiotropic roles in differentiation and/or function of peripheral B cells.

研究分野：免疫学

キーワード：DNA methylation Ten-Eleven Translocation B cells

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNAメチル化は、細胞分化、機能を制御する最もよく知られたエピゲノム修飾であり、末梢B細胞の分化過程においても、DNAメチル化パターンの変化が起こることが知られている。これはB細胞の分化、機能におけるDNAメチル化の重要性を示唆しているが、メチル化が、どのような役割を担っているかは、十分明らかではない。DNAメチル化パターンは、DNAメチル化と脱メチル化反応によって形成される。DNAメチル化修飾は、DNAメチル基転移酵素によって触媒されることがわかっている一方で、脱メチル化については、細胞分裂による受動的機構に加え、能動的メカニズムの存在が示唆されていた。Ten-Eleven translocation (Tet) 分子は、能動的メチル化を担う哺乳類では唯一その活性が同定されている分子群である。これら分子は、3分子 (Tet1, Tet2, Tet3) でファミリーを形成し、メチル基の酸化反応を触媒することで脱メチル化を誘導する。これまでに、Tet分子が、幹細胞等の各細胞種の分化、機能を制御することが報告されている。また、ゲノムワイド関連解析によって、Tet遺伝子と自己免疫疾患の関連性が示唆されているが、末梢B細胞分化、機能制御における役割は、全く明らかになっていない。

2. 研究の目的

Tet分子は、DNAメチル化を制御し、遺伝子発現を調節することによって、B細胞の分化、機能、ホメオスタシスを担っている可能性が示唆される。従って、B細胞特異的 Tet分子欠損マウスを作製することにより、末梢B細胞の分化、機能、ホメオスタシス制御におけるTet分子の役割を明らかにする。Tet分子の機能的重複についてもTet分子の多重欠損マウスを樹立し検討を行う。さらに、個体レベルの解析だけでなく、Tet分子がいかにして遺伝子発現を制御するのかについても分子レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

Tet分子のB細胞における役割を個体レベルで明らかにするため、B細胞特異的 Tet分子欠損マウス (CD19*Cre Tet flox*) を樹立する。これまでの報告で、Tet分子は、ファミリー分子間で非常に似た構造を有し、機能重複があることが報告されているため、Tet分子多重欠損マウスについても樹立する。これらマウスにおけるB細胞の初期分化、末梢におけるホメオスタシスについて解析を行う。また、末梢分化における機能を経時的に解析する為、ハプテンNP特異的B細胞受容体 knock in マウス (B1-8)、Rosa26 ERT2*Cre* を *Tet flox* マウス と交配することでNPを認識し、任意のタイミングで Tet 欠損を誘導するシステムを構築する。B細胞をそれぞれ CD45 congenic マウスに adaptive transfer し、タモキシフェン投与により Tet 遺伝子を欠損させる。NPCGG alum 免疫後、ドナー由来B細胞の末梢分化を経時的にフローサイトメーターを用いて解析する。

4. 研究成果

Tet分子のB細胞初期分化における役割を検討するため、フローサイトメーターを用いB細胞

特異的 Tet2, Tet3 二重欠損マウス由来の骨髄細胞を各分化段階に分け解析を行ったが、初期分化における顕著な欠陥は認められなかった。しかしながら、このマウスは、生後 4 週程度から、脾腫やリンパ節腫脹を示し、T 細胞、B 細胞のみならず、ミエロイド細胞を含めた免疫細胞の異常増殖、活性化が顕著であり、非リンパ組織である肝臓、肺にリンパ球浸潤を認めた。さらに、過齢に伴って、2 重鎖 DNA、ヒストンなどの自己に対する抗体産生（自己抗体産生）、腎臓における抗体沈着を示した。これらの結果から B 細胞特異的 Tet2, Tet3 二重欠損マウスは、新規の Systemic lupus erythematosus (SLE) モデルであることが示唆された。一方で、B 細胞特異的 Tet2 もしくは、Tet3 単独欠損マウスにおいては、上述したような自己免疫疾患に関わる兆候は、非常に軽微であり、Tet2, Tet3 分子の機能的重複を示唆した。上記二重欠損マウスにおいて、抗体投与による B 細胞または、CD4T 細胞の枯渇によって、炎症症状が抑制されたため、当モデルにおける自己免疫炎症惹起には、T-B 相互作用が必須であることが示唆された。さらに、炎症が惹起された直後において、B 細胞における遺伝子発現を網羅的に解析したところ、T-B 相互作用に重要な副刺激分子 CD86 の発現上昇を認めた。炎症惹起前に B 細胞特異的 Tet2, Tet3 二重欠損マウスを CD86 分子に対する中和抗体で処置することにより、炎症症状の緩和が認められたことから、Tet 分子は、CD86 遺伝子を抑制的に制御することで自己免疫疾患発症を抑制していることが示唆された。しかし、一方で、CD86 中和抗体投与による炎症抑制効果は部分的なものであり、Tet 分子が CD86 発現抑制以外の機序を制御することで、当該疾患抑制に寄与していることが示唆された。また、B 細胞特異的 Tet2, Tet3 二重欠損条件下においてさらに、B 細胞特異的に MHC class II 分子を欠損させることにより自己免疫性炎症が抑えられたこと、B 細胞、CD4T 細胞の抗原受容体特異性をそれぞれ、外来タンパク質である HEL、OVA に固定することによって、炎症がほぼ完全に抑えられたことは、本モデルにおける自己免疫疾患発症に、なんらかの自己抗原、ネオセルフ抗原依存的な T-B 相互作用が必須であることを予想させた。

また、Tet 分子の末梢 B 細胞分化における役割を検討するため、モデル抗原 NP-CGG に対する免疫実験を実施したところ、Tet2 もしくは Tet3 単独欠損によってナイーブ B 細胞からプラズマ細胞への分化が部分的に抑制され、Tet3 欠損 B 細胞は、二次免疫応答において機能的欠陥を有していた。また、Tet2, Tet3 二重欠損条件下においては、ほぼ完全にプラズマ分化が抑制され、胚中心 B 細胞分化も障害されていた。これは、Tet 分子が、これらエフェクター B 細胞の分化に必須な遺伝子発現パターンを制御している可能性を示唆する結果であった。

本研究において、Tet 分子は、CD86 分子の発現を適切に制御することによって、生体ホメオスタシスの破綻の原因となる過剰な T 細胞と B 細胞の相互作用を抑制していることが示唆された。この結果は、B 細胞における免疫寛容の破綻、自己免疫疾患との関連を想起させるが、その詳細なメカニズムについては、今後、検討を行う必要がある。また、一方で、抗原受容体の特異性が外来抗原に特定された状況を設定し、B 細胞の末梢における分化について解析することで、Tet 分子が、B 細胞のプラズマもしくは、胚中心、メモリー B 細胞への分化、機能、維持に対して必須な役割を担うことを明らかにした。モデル抗原を用いた免疫応答の際にも Tet2, Tet3 分子は、機能的重複を有しているが、二次免疫応答など特定の現象においては、それぞれ個別の役割がある

ことが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Tanaka, K., Martinez, G.J., Yan, X., Long, W., Ichiyama, K., Chi, X., Kim, B.S., Reynolds, J.M., Chung, Y., Tanaka, S., et al. (2018a). Regulation of Pathogenic T Helper 17 Cell Differentiation by Steroid Receptor Coactivator-3. Cell Rep 23, 2318-2329.

2. Tanaka, S., Jiang, Y., Martinez, G.J., Tanaka, K., Yan, X., Kurosaki, T., Kaartinen, V., Feng, X.H., Tian, Q., Wang, X., and Dong, C. (2018b). Trim33 mediates the proinflammatory function of Th17 cells. The Journal of experimental medicine 215, 1853-1868.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 発表者名 Shinya Tanaka

発表標題 Ten-eleven translocation (Tet) demethylases mediate peripheral B cell tolerance.

学会名 The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology

発表年等 December 10, 2018, Fukuoka

2. 発表者名 Shinya Tanaka

発表標題 B cell-mediated inflammation by epigenetic regulators

学会名 Fall international convention of the pharmaceutical society of Korea

発表年等 Oct. 18-19, 2018, Jeju, South Korea

3. 発表者名 Shinya Tanaka

発表標題 Ten-eleven translocation (Tet) DNA demethylases maintain peripheral B cell tolerance

学会名 シグナルネットワーク研究会

発表年等 2018年6月29日, 神戸

6 . 研究組織

(1)研究分担者 該当なし

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8桁) :

(2)研究協力者 該当なし

研究協力者氏名 :

ローマ字氏名 :

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。