

令和 2 年 9 月 3 日現在

機関番号：26301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08887

研究課題名(和文) ヒストン脱メチル化制御を介したメモリーCD8 T細胞分化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of the memory CD8 T-cell differentiation via control of histone demethylation

研究代表者

山田 武司 (Yamada, Takeshi)

愛媛県立医療技術大学・保健科学部・教授

研究者番号：40333554

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)： T細胞の分化と機能にエピジェネティック変化が重要であるが、ヒストンH3K27脱メチル化酵素のCD8+ T細胞の免疫応答における役割については不明であった。そこで我々は、その役割を解明するため、T細胞特異的Utxノックアウトマウスを作製し解析を行った。

抗原特異的なCD8+ T細胞の免疫応答を解析するため、野生型とUtxノックアウトマウスにリステリアを感染させた結果、Utxを欠損させることによりCD8+ T細胞の二次免疫応答の増強を観察した。これらのデータから、抗原刺激を受けたCD8+ T細胞のメモリー分化をUtxがエピジェネティックな遺伝子発現制御により、抑制していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

長期免疫の獲得に重要な記憶(メモリー) T細胞分化の誘導は、感染症克服のための重要な研究課題となっている。実用的なワクチン開発を行う上で、メモリーT細胞分化メカニズムの理解は不可欠であるが、その分化を制御するエピジェネティック調節機構については、まだ明らかとなっていない。そこで本研究は、CD8 T細胞におけるヒストン脱メチル化酵素の役割に焦点を当てた解析を行い、エピジェネティック変化によるメモリーCD8 T細胞分化の制御メカニズムの一部を明らかにした。これらの成果は、エピジェネティック調節をすることで人為的にメモリーT細胞分化制御を行い、感染症に対する長期免疫を誘導できる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)： Although epigenetic changes play a critical role in T-cell differentiation and its function, the role of histone H3K27 methylation in the CD8+ T cell-dependent immune response remains unclear. We therefore analyzed T cell-specific Utx knockout (Utx KO) mice to determine the role of histone H3K27 demethylase in CD8+ T cells.

Wild-type (WT) and Utx KO mice were infected with *Listeria* to analyze the immune response of Ag-specific CD8+ T cells. Utx deficiency resulted in an increased number of Ag-specific CD8+ T cells upon secondary infection. These data suggest that Utx negatively controls the memory formation of Ag-stimulated CD8+ T cells by epigenetically regulating the gene expression.

研究分野：免疫

キーワード：免疫 感染症 T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

感染により活性化した抗原特異的 CD8T 細胞は、クローン増殖と共に、細胞傷害性 T 細胞(エフェクター)へと分化することで感染細胞を排除する。また、活性化した細胞の一部は、記憶(メモリー)T 細胞へと分化して長期間体内で維持され、再感染に対して迅速に二次免疫応答を誘導する。従って、メモリーT 細胞分化のメカニズムを理解することは、実用的なワクチン開発を行う上で非常に重要である。これまでに、抗原刺激の強さや期間、炎症性サイトカインの刺激、分化を誘導する転写因子発現等により、メモリーT 細胞分化が制御されていることが明らかとなっている。しかしながら、メモリーT 細胞分化のエピジェネティック調節機構(転写リプログラミング)については、解析が進んでいない。遺伝子発現のエピジェネティック調節には、DNA のメチル化だけでなく、ヒストンのメチル化、リン酸化、アセチル化、ユビキチン化といった化学的修飾が関わっていることが知られている。近年、ヒストン H3K27 のメチル化修飾の変化が、様々な細胞の分化プロセスにおいて重要な役割を果たすことで注目されており、CD4 T 細胞におけるヒストン H3K27 のメチル化状態が Th1 や Th2、Tfh 細胞への分化に関与することが報告されている (Cook KD, et al., *Immunity*, 2015)。しかしながら、CD8T 細胞分化におけるエピジェネティック変化については、ほとんど解明されていない。そこで本研究では、メモリーCD8T 細胞分化の制御におけるヒストン H3K27 メチル化修飾の役割に焦点を当てた研究を着想した。

## 2. 研究の目的

長期免疫の獲得に重要な記憶(メモリー)T 細胞分化の誘導は、感染症克服のための重要な研究課題となっている。実用的なワクチン開発を行う上で、メモリーT 細胞分化メカニズムの理解は不可欠であるが、その分化を制御するエピジェネティック調節機構については、まだ明らかとなっていない。そこで本研究は、CD8T 細胞におけるヒストン脱メチル化酵素の役割に焦点を当てた解析により、エピジェネティック変化によるメモリーCD8T 細胞分化の制御メカニズム解明を目的とした。さらに、エピジェネティック調節によるメモリーT 細胞分化制御のための研究を行い、長期免疫を誘導する方法論の提唱を目指した。

## 3. 研究の方法

本研究では、ヒストン H3K27 脱メチル化酵素に焦点を当てた解析を行うことで、エピジェネティック変化を介した CD8T 細胞分化メカニズム解明を目指した。まず、T 細胞特異的遺伝子欠損 ( $Utx^{flx/flx} Cd4-Cre$ ) マウスを中心に、CD8T 細胞の感染免疫応答におけるヒストン H3K27 脱メチル化酵素の 1 つ  $Utx$  の役割について、個体レベル、および細胞レベルで解析した。実験には、リステリア感染モデルを用い、遺伝子欠損による抗原特異的 CD8 T 細胞の増殖や分化、および機能や細胞死への影響について解析を行った。次に、 $Utx$  の遺伝子欠損 CD8T 細胞を用いたメモリーT 細胞分化制御に関与する遺伝子の発現解析を行い、ヒストン H3K27 脱メチル化を介したメモリーT 細胞分化メカニズムについて解明を行った。

## 4. 研究成果

感染に対する抗原特異的 CD8 T 細胞の免疫応答を調べるため、野生型 (WT) および  $Utx$  欠損型 ( $Utx$  KO) マウスに OVA を発現するリステリア ( $Lm$ -OVA) を 1 次感染として  $5 \times 10^3$  CFU、2 次感染として  $4 \times 10^5$  CFU の細菌量で尾静脈注射 (*i.v.*) により感染させ、それぞれ感染後 7 日目と 5 日目に OVA 抗原に対する CD8T 細胞の免疫応答の解析を OVA ペンタマー染色により行った。また、感染により活性化した抗原特異的 CD8T 細胞における遺伝子発現、

および転写因子の発現を調べるため、OT-1 CD8 T 細胞の移入実験を行った。以上の結果を以下に示す。

### (1) 感染免疫応答の解析

CD8 T 細胞の感染免疫応答における *Utx* の役割を解析するため、T 細胞特異的 *Utx* KO マウスを使用し、WT マウスと CD8 T 細胞免疫応答の比較を行った。リステリア(*Lm*-OVA)をマウスに感染後 7 日目に OVA ペンタマーを用いて脾臓中の抗原特異的 CD8 T 細胞を検出したところ、WT と *Utx* KO の間に有意な差は見られなかった。そこで、1 次感染から 67 日目に 2 次感染を行ったところ、WT に比べ、*Utx* KO マウスにおいて OVA 抗原特異的ペンタマー陽性 CD8 T 細胞(Pent<sup>+</sup>)の割合と数が増加していることが明らかとなった(図 1)。これらの結果から、*Utx* は CD8 T 細胞のメモリー分化に関与している可能性が示唆された。

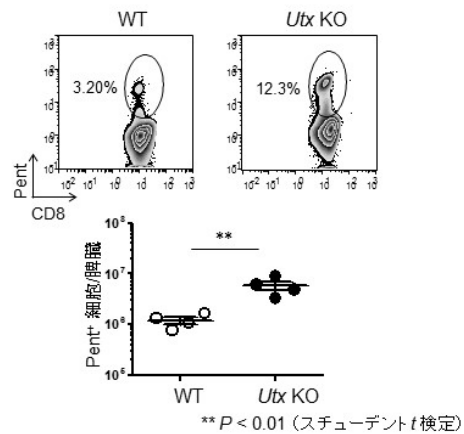


図1 抗原特異的CD8 T細胞の2次免疫応答

### (2) 活性化 CD8 T 細胞における分化の解析

*Utx* が活性化 T 細胞のメモリー分化に関与していることが示唆されたことから、OT-1 マウスから分離した CD8 T 細胞を移入し、リステリア感染後のドナー細胞の分化についてフローサイトメトリーにより解析を行った。感染後の CD8 T 細胞の分化について調べるため、エフェクター分化マーカーとして知られる KLRG1 (キラー細胞レクチン様レセプター G1)、およびメモリー分化マーカーとして知られる CD127 (IL-7 レセプター)の発現について調べた。その結果、感染後 7 日目における活性化 *Utx* KO 細胞で、WT 細胞に比べて CD127 の高発現および KLRG1 の低発現を示すメモリー前駆細胞 (CD127<sup>hi</sup>KLRG1<sup>lo</sup>) の高い割合と、脾臓中でより増加したメモリー前駆細胞数が観察された(図 2)。この結果、*Utx* KO CD8 T 細胞ではメモリー T 細胞への分化促進が起こっていることが明らかとなり、*Utx* が CD8 T 細胞のメモリー分化を抑制していることが示唆された。

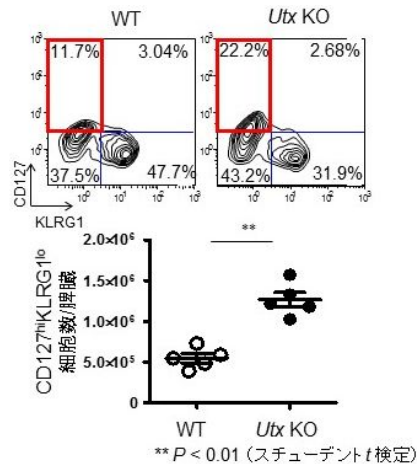


図2 リステリア感染後のCD8 T細胞分化

この結果、*Utx* KO CD8 T 細胞ではメモリー T 細胞への分化促進が起こっていることが明らかとなり、*Utx* が CD8 T 細胞のメモリー分化を抑制していることが示唆された。

### (3)メモリー分化促進メカニズムの解析

活性化 CD8 T 細胞において、*Utx* の欠損によりメモリー分化促進が起こるメカニズムを明らかにするため、OT-1 CD8 T 細胞を移入し、リステリア感染させて活性化(5 日間および 7 日間)したドナー細胞を用いて分化に関連した転写因子の遺伝子発現を解析した。その結果、*Utx* 欠損によりエフェクター分化に関連した *Prdm1* と *Tbx21* の発現の低下が見られ、逆にメモリー分化に関連した *Tcf7* と *Lef1* の有意な発現上昇が認められた(図 3)。これらの結果、*Utx* は分化に

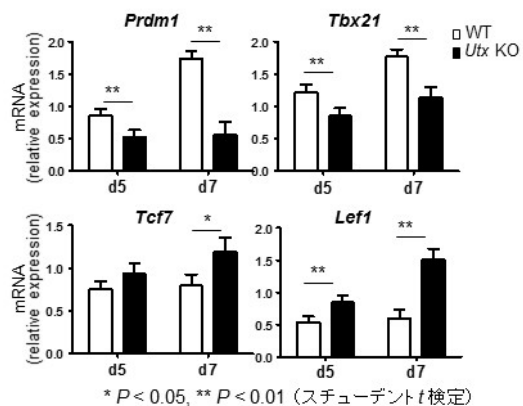


図3 分化関連転写因子の遺伝子発現

関連した転写因子の発現を調節している可能性が示唆された。

今回、我々は、ヒストンメチル化状態を制御する酵素に焦点を当てた解析から、ヒストン H3K27 の脱メチル化酵素である *Utx* の発現が、感染後により活性化した抗原特異的 CD8T 細胞において急速に上昇することが分かった。そこで、WT マウスと T 細胞特異的 *Utx* KO マウスを用いて抗原特異的 CD8T 細胞免疫応答を比較したところ、1 次免疫応答に有意な差が無く、2 次免疫応答で *Utx* 欠損による抗原特異的 CD8T 細胞数の増加を認めた。この結果に基づき、分化マーカー *KLRG1* と *IL-7R $\alpha$*  の発現解析から、メモリーマーカーである *IL-7R $\alpha$*  陽性細胞数が多く、*Utx* 欠損によりメモリー分化が促進していることが明らかとなった。さらに、分化を調節する転写因子の解析から、*Utx* KO CD8T 細胞ではエフェクター分化関連の転写因子発現が抑制され、メモリー分化関連の転写因子発現が亢進し、*Utx* はメモリー分化に重要な転写因子の発現調節を介してメモリー分化を制御していることが明らかとなった。これらのことから *Utx* を抑制することにより、長期免疫に重要なメモリー分化を促進できる可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nabe Shogo, Yamada Takeshi, Suzuki Junpei, Toriyama Koji, Yasuoka Toshiaki, Kuwahara Makoto, Shiraishi Atsushi, Takenaka Katsuto, Yasukawa Masaki, Yamashita Masakatsu	4. 巻 109
2. 論文標題 Reinforce the antitumor activity of CD8+ T cells via glutamine restriction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3737 ~ 3750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13827	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Junpei, Yamada Takeshi, Inoue Kazuki, Nabe Shogo, Kuwahara Makoto, Takemori Nobuaki, Takemori Ayako, Matsuda Seiji, Kanoh Makoto, Imai Yuuki, Yasukawa Masaki, Yamashita Masakatsu	4. 巻 9
2. 論文標題 The tumor suppressor menin prevents effector CD8 T-cell dysfunction by targeting mTORC1-dependent metabolic activation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-05854-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Takeshi, Nabe Shogo, Toriyama Koji, Suzuki Junpei, Inoue Kazuki, Imai Yuuki, Shiraishi Atsushi, Takenaka Katsuto, Yasukawa Masaki, Yamashita Masakatsu	4. 巻 202
2. 論文標題 Histone H3K27 Demethylase Negatively Controls the Memory Formation of Antigen-Stimulated CD8+ T Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1088 ~ 1098
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1801083	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 名部省吾、山田武司、鈴木淳平、安川正貴
2. 発表標題 グルタミン代謝抑制によるCD8+ T細胞の抗腫瘍活性増強メカニズム
3. 学会等名 第22回日本がん免疫学会
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名 山田武司
2. 発表標題 T細胞のエネルギー代謝制御と免疫応答
3. 学会等名 第26回分子寄生虫フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Suzuki J, Kuwahara M, Yamada T, Yasukawa M, and Yamashita M.
2. 発表標題 The tumor suppressor menin determines activated CD8 T cell fate by targeting mTORC1-dependent metabolic activation
3. 学会等名 The 47th Annual Meeting of the Japanese Society of Immunology
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 名部彰悟, 山田武司, 鈴木淳平, 山下政克, 安川正貴
2. 発表標題 細胞内グルタミン代謝制御によるCD8+ T細胞の抗腫瘍活性増強効果
3. 学会等名 日本がん免疫学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shogo Nabe, Takeshi Yamada, Junpei Suzuki, Masakatsu Yamashita, and Masaki Yasukawa
2. 発表標題 Restricted glutamine metabolism enhances anti-tumor activity of CD8+ T cells
3. 学会等名 日本血液学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takeshi Yamada, Koji Toriyama, Shogo Nabe, Makoto Kanoh, Yuuki Imai, Hiroaki Honda, and Masaki Yasukawa, Masakatsu Yamashita
2. 発表標題 Histone H3K27 demethylase negatively controls memory formation of Ag-stimulated CD8+ T cells
3. 学会等名 Kyoto T cell coferece (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----