

令和 4 年 4 月 19 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08883

研究課題名(和文) DNA脱メチル化酵素Tetによる免疫寛容メカニズムの解明

研究課題名(英文) The regulation of B cell tolerance by DNA demethylase, Ten-eleven translocation

研究代表者

田中 伸弥 (Tanaka, Shinya)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：80462703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫疾患の発症が、環境要因によってもたらされるエピゲノム制御の乱れによって生じることが示唆されているが、その直接的な関係は明らかになっていない。本研究では、エピゲノム制御因子であるDNA脱メチル化酵素Ten-eleven translocation (Tet) 分子のB細胞特異的欠損によって、B細胞の自己反応性が惹起され、T細胞の活性化を引き起こすことで、自己免疫疾患が発症することが明らかになった。これは、Tet分子が、自己反応性B細胞の末梢寛容維持に必須の役割を担うことを示唆しており、エピゲノム制御不全が自己免疫疾患発症の直接的原因になることを示すものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫疾患は、ライフコース後期に頻発する炎症性疾患であり、その罹患率は、さらに上昇するものと考えられる。最近、遺伝要因だけでなく、環境要因によるエピゲノムの乱れがその発症に寄与する可能性が示唆されるようになった。しかしながら、両者の直接的関係は全く明らかではない。本研究において、DNA脱メチル化酵素の機能不全を切り口として、自己免疫疾患発症におけるエピゲノム制御の直接的な役割を示したことで、今後、エピゲノム制御という観点から自己免疫疾患制御についてさらなる知見がもたらされるものと考えられ、ひいては新たな疾患治療戦略につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)： It has been suggested that autoimmune diseases are induced by defect of epigenetic gene regulations which may be affected by environmental factors exposing human body during life course. However, it remains unclear how dysregulation of epigenetics causes autoimmune diseases. In this current study, B cell-specific deletion of Ten-eleven translocation (Tet), which acts as a DNA demethylase, was causative of an activation of self-reactive B cells which resulted in dysregulated T cell activation via antigen-mediated cell-cell interaction. It turned out autoimmune disease pathogenesis. These findings suggest that Tet molecules play a critical role in induction and/or maintenance of B cell peripheral tolerance. Also, this study indicates the defective epigenetic control could be a direct cause of an induction of autoimmune diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：末梢寛容 自己免疫疾患

1. 研究開始当初の背景

世界人口の 10%程度は、何等かの自己免疫疾患に罹患していると報告されているが、その根本的治療法は確立されていない。これまで、その発症原因として遺伝要因に注目が集まっており、遺伝子配列の変異についての解析が精力的に行われた。一方、同疾患の罹患率がライフコース後期に顕著に上昇することと一致して、ライフコースにおいて環境因子に暴露されることが、疾患発症の一因となる可能性が示唆されるようになった。また、ライフコース後期にエピゲノム修飾パターンの乱れが生じることが報告されたことと合わせて、恐らく、ライフコースにおいて慢性的に環境因子に暴露されることが、エピゲノム制御に影響を及ぼすことでエピゲノム修飾に乱れが生じ、同疾患発症の原因となるのではないかという仮説が立てられるようになった。また、一卵性双生児間における自己免疫疾患発症率が予想したよりも低いことが報告され、先天的遺伝要因以外の原因によって、同疾患が影響されうることもエピゲノム制御の同疾患発症に対する関与を後押しした。確かにこれまでに、自己免疫疾患の患者由来の細胞では、いくつかのエピゲノム修飾において、健常人と異なったパターンが認められており、エピゲノムの関与が示唆されてはいたが、自己免疫疾患とエピゲノム制御の直接的な因果関係は、ほとんど明らかになっていなかった。また、自己免疫疾患発症の根本的な原因は、リンパ球の自己寛容破綻であると考えられており、これまで、T 細胞の寛容制御に注目が集まっていた。一方、B 細胞の関与については、自己抗体産生が主であると考えられていたが、B 細胞の生体内枯渇療法が、いくつかの自己免疫疾患において奏功することが報告されるようになり、かつ、B 細胞枯渇療法から得られた知見は、自己免疫疾患における自己抗体産生以外の B 細胞の役割を示唆していた。しかしながら、B 細胞がどのように自己免疫疾患を制御しうるかについては、明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

上述したように、環境因子による生体暴露が、自己免疫疾患の発症に関与することが示唆されている。その発症に至るまでの過程として、環境因子による暴露が、エピゲノム制御不全、およびエピゲノム修飾パターンの乱れを生じ、ライフコースにおいて蓄積されたこれら異常が、遺伝子発現パターンを変化させることで寛容メカニズムが破綻した結果、自己免疫疾患が発症するのではないかと考えた。そこで、まず、明らかになっていなかったエピゲノム制御と自己寛容破綻、自己免疫疾患発症との関係を解明する為、研究を実施した。DNA メチル化は、エピゲノム修飾の中でも環境因子によって影響を受けやすい修飾であることが示唆されていたことから、DNA メチル化に着目して研究を開始した。メチル化 DNA パターンは、メチルトランスフェラーゼと脱メチル化酵素の活性の産物として形成される。従って、哺乳類で唯一活性化が同定されていた脱メチル化酵素 Ten-eleven translocation (Tet) に着目し、B 細胞寛容を含めた B 細胞における同分子の機能解明を目的とした。

3. 研究の方法

Tet 分子の B 細胞における機能、役割を生体レベルで明らかにする為、B 細胞特異的に Tet2、Tet3 を欠損するコンディショナル欠損マウスを樹立し、解析を行った。Tet 分子は、3 分子 (Tet1、Tet2、Tet3) でファミリーを形成する。造血系において、Tet2、Tet3 分子は、機能的重複を有することが報告されていたので、Tet2、Tet3 の単欠損、および、Tet2、Tet3 の二重欠損マウスを樹立し、中枢および末梢リンパ組織における B 細胞分化、末梢リンパ組織における T 細胞を含めた免疫細胞の形質、および、自己免疫疾患に伴う恒常性異常について解析を行った。

4. 研究成果

これまでの基盤研究において、B 細胞特異的 Tet2 もしくは、Tet3 欠損マウスにおいては、顕著な異常は認められなかったものの、B 細胞特異的 Tet2、Tet3 二重欠損では、リンパ球を含めた免疫細胞の異常活性化に伴った SLE 様の自己免疫疾患が誘導されることが明らかになっていた。また、それら免疫細胞の異常活性化には、B-T 細胞間相互作用が必須であり、その仲介分子として、副刺激分子 CD86 の関与が示唆されていた。本研究においては、それら基盤的研究結果に基づき、さらに Tet 分子の B 細胞寛容における役割について明らかにした。上述したように B-T 細胞間相互作用が、自己免疫疾患の発症に必須であることが示唆されていたが、抗原を介した細胞間相互作用が CD4+T 細胞の活性化に必要であるか検討する為、B 細胞特異的 Tet2、Tet3 二重欠損にさらに B 細胞特異的 MHC クラス II 欠損を導入したところ、B 細胞特異的 Tet2、Tet3 二重欠損マウスで認められた CD4+T 細胞の異常活性化は、ほぼ完全に抑制された。それに伴っ

て、プラズマ細胞、胚中心様活性化 B 細胞の数が減少し、自己抗体産生量も減少していたことから、何等かの抗原を介した B-T 細胞間相互作用が必須であることが示された。また、Tet2、Tet3 二重欠損マウス由来の血清中に産生された抗体が認識する抗原について自己抗原アレイを用いて調べたところ、様々な種類の自己抗原に反応が認められた。このことから、Tet2、Tet3 欠損 B 細胞は、多種多様な自己抗原に対して活性化することが示唆され、恐らくそれら自己抗原を介した細胞間相互作用によって CD4+T 細胞を活性化することが示唆された。実際に、Tet2、Tet3 二重欠損マウス由来の B 細胞は、野生型マウス由来の B 細胞と比べ、抗原依存的にナイーブ CD4+T 細胞を効率よく Th1 細胞に分化誘導することが明らかになっている。これらの異常は、B 細胞の末梢寛容破綻が原因となっている可能性が考えられた為、次に、B 細胞末梢寛容における Tet2、Tet3 分子の役割について検討を行った。B 細胞の末梢寛容は、モデル自己抗原 Hen egg lysozyme (HEL) と HEL 特異的 B 細胞受容体 Transgenic マウス (MD4) 由来の B 細胞を用いて解析される。通常、MD4B 細胞を可溶性 HEL (sHEL) 発現マウスに移入すると、一過性に活性化し、補助刺激分子である CD86 を発現するが、数日で細胞死が誘導され、生体から排除される (末梢寛容)。しかし、Tet2、Tet3 分子を欠損することにより、B 細胞の排除は、遅延し、CD86 の細胞膜表面における発現も維持されていた。恐らく、このことが CD4+T 細胞を活性化させる効率を上昇させていると考えられる。実際、末梢寛容モデルマウスから得られた寛容が破綻したと考えられる Tet2、Tet3 欠損 B 細胞は、効率よく CD4+T 細胞を活性化させることが示されている。これまでの研究結果を踏まえ、Tet2、Tet3 欠損 B 細胞が、CD4+T 細胞を活性化させやすい一因は、副刺激分子 CD86 の恒常的、高発現にあると考えられた。従って、最後に Tet2、Tet3 分子欠損が直接的に CD86 の発現異常に寄与するかについて検討を行った。上述したように Tet 分子は、DNA 脱メチル化酵素として同定されたが、その後、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) を標的遺伝子座に集積させることで、遺伝子転写抑制に寄与しうることが報告された。従って、Tet2、Tet3 分子の有無による DNA メチル化及び、HDAC のゲノム DNA における結合を全ゲノムスケールで解析を行った。Tet2、Tet3 分子欠損によって、DNA メチル化パターンに変化が認められ、過剰な DNA メチル化修飾が生じている遺伝子座が同定されたこと、またこれら変化は、ゲノム DNA 上の non-coding 領域で認められたことから、Tet 分子は、B 細胞においても DNA 脱メチル化酵素として機能し、遺伝子転写制御領域における DNA メチル化パターンを制御していることが示唆された。また、クロマチン免疫沈降法を用いた HDAC のゲノム DNA 上における結合については、Tet2、Tet3 分子欠損によって、主に転写開始点近傍における HDAC1、HDAC2 結合が減弱していることが示され、B 細胞において Tet 分子は、HDAC を標的遺伝子座に集積させるアダプター分子としての機能を有することが示唆された。CD86 遺伝子座においては、Tet 分子依存的な DNA 脱メチル化は、イントロン 1 において生じること、HDAC の集積は、プロモーター近傍とイントロン 1 において認められるが、Tet2、Tet3 欠損によって、これらの集積が減弱することが示された。これと一致して、プロモーター近傍におけるアセチル化ヒストン修飾は亢進していた。このことから、Tet 分子は、HDAC を CD86 遺伝子座に集積させることにより、転写活性化に寄与するヒストンアセチル化修飾を抑制することにより CD86 遺伝子発現を負に制御している可能性が示唆された。上述した様に、Tet 分子依存的な DNA 脱メチル化と HDAC 集積は、CD86 遺伝子イントロン 1 において近接して起こることが明らかになったが、両者の関係性については明らかではなく、更なる研究が必要である。以上のことから、Tet 分子は、恐らく、B 細胞が末梢リンパ組織において、自己抗原を認識した際、CD86 分子発現を抑制することで、自己反応性 CD4+T 細胞との自己抗原を介した細胞間相互作用によって、同 T 細胞が活性化されることを阻害することを介し、B 細胞の末梢寛容維持に重要な役割を担っていることが示唆された。本研究による成果は、エピゲノム制御不全が、自己寛容破綻、自己免疫疾患発症に対する直接的な原因となることを示すものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanaka, S. Ise, W. Inoue, T. Ito, A. Ono, C. Shima, Y. Sakakibara, S. Nakayama, M. Fujii, K. Miura, I. Sharif, J. Koseki, H. Koni, P. A. Raman, I. Li, Q. Z. Kubo, M. Fujiki, K. Nakato, R. Shirahige, K. Araki, H. Miura, F. Ito, T. Kawakami, E. Baba, Y. Kurosaki, T.	4. 巻 21
2. 論文標題 Tet2 and Tet3 in B cells are required to repress CD86 and prevent autoimmunity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 950-961
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41590-020-0700-y	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 該当する

1. 著者名 Fujii, K. Tanaka, S. Hasegawa, T. Narazaki, M. Kumanogoh, A. Koseki, H. Kurosaki, T. Ise, W.	4. 巻 32
2. 論文標題 Tet DNA demethylase is required for plasma cell differentiation by controlling expression levels of IRF4	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 683-690
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxaa042	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 Shinya Tanaka, Wataru Ise, Yoshihiro Baba, Tomohiro Kurosaki	4. 巻 5-1
2. 論文標題 The Role of TET Proteins in B Cell Biology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Immunological Sciences	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.29245/2578-3009/2021/1.1202	査読の有無 無
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4件（うち招待講演 2件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shinya Tanaka
2. 発表標題 Role of Ten eleven translocation in B cell self tolerance
3. 学会等名 The 15h International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中伸弥
2. 発表標題 Ten-eleven translocation (Tet) in B cells prevents autoimmunity
3. 学会等名 日本免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinya Tanaka
2. 発表標題 Role of Ten-eleven translocation (Tet) in B cell self-tolerance
3. 学会等名 FIMSA 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shinya Tanaka, Wataru Ise, Tomohiro Kurosaki, Yoshihiro Baba
2. 発表標題 Role of Ten-eleven translocation (Tet) in B cell self-tolerance
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Shinya Tanaka	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer International Publishing	5. 総ページ数 Not determined yet
3. 書名 Advances in Experimental Medicine and Biology (Chapter 4 of B Cell Receptor Signaling)	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------