

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07541

研究課題名(和文) Treg/Th17細胞分化におけるDNA脱メチル化酵素TETの機能解明

研究課題名(英文) The role of DNA demethylase TET in Treg/Th17 differentiation.

研究代表者

中司 寛子 (Nakatsukasa, Hiroko)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：90749334

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)：エピジェネティック修飾のひとつであるDNAメチル化は遺伝子発現の抑制やゲノム安定性の維持に必須の役割を果たし、個体の発生、細胞の分化やがん化に重要な役割を果たしている。本研究では、DNA脱メチル化酵素であるTetの欠損マウスを用いて末梢ヘルパーT細胞の分化制御機構の解明を行い、腸内細菌依存性のトリプトファン代謝物によるAhRシグナルや、RaraおよびBach2遺伝子のDNAメチル化を介してTetがTreg/Th17分化を制御していることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでヘルパーT細胞の分化機構に関しては転写ネットワークによる制御機構に関する報告が多くなされてきたが、エピジェネティック制御による調節機構についての研究は端緒にすぎたばかりである。本研究では、Tetによる末梢でのTreg/Th17分化制御機構について明らかとし、本研究がさらに発展すれば、免疫疾患、炎症性疾患やがんの新規治療法確立への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Ten-eleven translocation (TET) proteins regulate DNA methylation and gene expression. Previously we found that T cell-specific Tet2 and Tet3 double-knockout (Tet2f/fTet3f/fCd4-Cre; DKO) mice displayed splenomegaly and lymph adenopathy accompanied by uncontrolled activation of T cells which exhibited Th17- and/or follicular helper T (Tfh)-like phenotypes. In this study, we revealed that Tet2 and Tet3 regulate Treg/Th17 differentiation in the periphery. We found that Tet regulates Treg/Th17 differentiation via AhR signaling by gut microbiota-dependent tryptophan metabolites. Furthermore, gene expression and methylation analysis revealed that Tet regulates Th17 differentiation through DNA methylation of the Rara and Bach2 genes.

研究分野：免疫学

キーワード：DNAメチル化 Th17細胞 制御性T細胞 エピジェネティクス TET

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 免疫応答における DNA 脱メチル化

エピジェネティック修飾のひとつである DNA メチル化は遺伝子発現の抑制やゲノム安定性の維持に必須の役割を果たし、個体の発生、細胞の分化やがん化に重要な役割を果たしている。DNA のシトシンメチル化 (5mC) は DNA メチルトランスフェラーゼ (DNMT) によって触媒される。一方、能動的な DNA 脱メチル化のメカニズムとして、5mC をヒドロキシメチル化して 5hmC を生成する酵素 TET が注目を集めている。DNA メチル化と免疫疾患の関係は近年注目を集め、様々な報告がされつつあるが、TET による DNA 脱メチル化の免疫応答や免疫関連疾患に関する理解はほとんど進んでいない。

### (2) ヘルパー T 細胞の分化と DNA 脱メチル化

CD4 陽性のヘルパー T 細胞は様々なサイトカインを分泌し、免疫応答の性質を決定することから獲得免疫応答の司令塔と呼ばれている。これには炎症を促進する Th1, Th2, Th9, Th17, Tfh などのエフェクター T 細胞と、免疫を制御する制御性 T 細胞 (Treg) が存在する。それぞれのヘルパー T 細胞の分化は主に周囲のサイトカイン環境により決定され、転写因子とエピジェネティックな修飾が重要な役割を果たす。ヘルパー T 細胞の中でも DNA メチル化の意義が最も明確に示されているのは Treg である。これまでに Treg マスター遺伝子の Foxp3 遺伝子のエンハンサー領域 CNS2 が DNA 脱メチル化されることで、Foxp3 の発現が安定化されることが報告されている。

### (3) これまでの研究経緯

ヘルパー T 細胞分化における Tet の役割を明らかにするため、T 細胞特異的 Tet2/3 両欠損マウス (*Tet2<sup>fl</sup>Tet3<sup>fl</sup>Cd4-Cre*; DKO) を作製し、解析を進めてきた。その結果、DKO マウスはオリゴクローナルな T 細胞増殖/活性化、および B 細胞の活性化を伴う二次リンパ器官の腫大を引き起こし、早期 (生後 75 日前後) に死亡することが明らかとなった。このとき T 細胞の多くは Th17 および Tfh 型の分化を伴っており、血中 IL-17 や IL-21 などが高値を示した。一方 Th1 や Treg は減少していた。また、成熟 Treg への Tet の影響を明らかにするために、Treg 特異的 Tet2/3 欠損マウス (*Tet2<sup>fl</sup>Tet3<sup>fl</sup>Foxp3<sup>YFP-Cre</sup>*; FDKO) を作製したところ、DKO マウスと比べると長寿ではあるが、WT に比べて早期に、平均して生後 150 日程度で死亡することがわかった。FDKO マウスも高齢 (4 カ月齢以上) になると DKO マウスと同様に T 細胞および B 細胞の活性化を伴う二次リンパ器官の腫大を引き起こした。また、FDKO マウスから単離した Treg を解析したところ、WT Treg に比して Tet2/3 欠損 Treg は TSDR メチル化の部分的亢進、および脱メチル化の指標である 5hmC の減少が認められ、Treg において Tet2/3 が TSDR の脱メチル化に関与することが明らかとなった。

このようにヘルパー T 細胞、Treg いずれにおいても Tet が重要な働きを持つことを見出したが、Tet がどの遺伝子をターゲットとして働いているのか、DKO マウスでは T 細胞は何を認識して増殖性の疾患を呈するのか、Tet は末梢組織でどのように誘導されるのかなど詳細なメカニズムは未解明であった。

## 2. 研究の目的

本研究は、DNA 脱メチル化酵素である TET が制御する T 細胞増殖と分化に関与する遺伝子を明らかにし、DNA 脱メチル化による T 細胞分化の安定性と可塑性における意義を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) Tet による末梢ヘルパー T 細胞分化調節における腸内細菌の関与

これまで用いてきた DKO マウスは、胸腺 DP 細胞の段階で Cre が発現するため、naïve T 細胞で既に Tet が欠損しており、その後の末梢での分化における Tet の機能を正確に評価することができない。そこで、タモキシフェン誘導型 CreERT2 システムを用いた (*Tet2<sup>fl</sup>Tet3<sup>fl</sup>Cd4<sup>CreERT2</sup>*; iDKO マウス) T 細胞の成熟に影響を与えることなく Tet の機能を評価した。

また、DKO マウスと Th17 および Tfh 細胞関連遺伝子欠損マウスを交配し、DKO マウス病態に対する Th17 および Tfh 細胞関連遺伝子の影響を検討した。さらに、芳香族炭化水素受容体 AhR シグナルに着目し、AhR アゴニスト I3C の投与実験や、AhR アゴニストとなる糞便中の

トリプトファン代謝物の検出を行った。

#### (2) Tet による末梢ヘルパーT 細胞分化調節機構の解明

WT および DKO マウスより単離した CD4<sup>+</sup> T 細胞を用いてシングルセル RNA-seq による遺伝子発現解析を行った。さらに DNA メチル化状態(MBD-seq)や、DNA 脱メチル化の指標である 5-hydroxymethyl cytosine (5hmC)の ChIP (chromatin immunoprecipitation)-seq 情報との統合解析を行った。

### 4 . 研究成果

#### (1) Tet による末梢ヘルパーT 細胞分化調節における腸内細菌の関与

タモキシフェン誘導型 T 細胞特異的 Tet2/3 欠損マウス(iDKO)にタモキシフェンを投与することで、脾・リンパ節腫脹、Th17/Tfh 様細胞増加等 DKO マウスと同様の病態を誘導することができた。また、iDKO マウスより単離した CD4<sup>+</sup> T 細胞を Rag 欠損マウスに移入後、タモキシフェン投与することでも同様の病態を再現でき、Tet は末梢 T 細胞において細胞増殖や Th17/Tfh 様細胞への分化に重要な働きをすることが明らかとなった。また、タモキシフェン投与 iDKO マウスにおいても抗生物質投与により病態が抑制され、Tet 欠損による T 細胞活性化/増殖と分化に腸内細菌が関与することが示唆された。

DKO マウスでは T 細胞が Th17/Tfh 細胞様の形質を示すことから、DKO マウスを種々の Th17/Tfh 細胞関連遺伝子欠損マウス (*Bcl6*-flox、*cMaf*-flox、*AhR*-flox、IL-21 受容体欠損マウス) と交配した。いずれも T 細胞異常増殖/活性化や Th17/Tfh 様細胞分化の抑制と寿命の延伸が認められ、DKO マウスの病態発症にこれらの遺伝子の関与が示唆された。さらに、DKO マウスに抗生物質投与下で AhR アゴニスト I3C を投与したところ、抗生物質単独では抑制される病態が I3C 投与により悪化したことから、DKO マウスでは AhR を介した腸内細菌によるシグナルが病態発症に重要であることが示された。さらに、この時の糞便中トリプトファン代謝物を測定したところ、生体内で AhR アゴニストとして働くことが報告されている IAA が DKO マウスで増加し、抗生物質投与により減少したことから、IAA による AhR シグナルが DKO マウスにおいて病態発症に寄与する可能性が示唆された。

以上の結果より、Tet 欠損マウスにおいて腸内細菌依存性のトリプトファン代謝物による AhR シグナルが Treg/Th17 分化に関与する可能性が示唆された。

#### (2) Tet による末梢ヘルパーT 細胞分化調節機構の解明

Tet による末梢ヘルパーT 細胞分化調節機構を解明するため、7 週齢の WT および DKO マウスより CD4<sup>+</sup> T 細胞を単離し、シングルセル RNA-seq を行った。クラスター解析により遺伝子発現プロファイルから 6 つの集団に分類したところ、DKO マウスでは増殖細胞、活性化 T 細胞、および老化 T 細胞のクラスターが WT マウスに比して顕著に多く検出され、DKO マウス CD4<sup>+</sup> T 細胞は異常増殖活性化を示すことが確認された。また、Th17 細胞のマスターレギュレーターである *Rorc* が DKO マウスの活性化細胞、増殖細胞クラスターにおいて高発現することが示され、DKO マウスでは CD4<sup>+</sup> T 細胞が Th17 細胞に分化し、増殖していることが示唆された。同様に Th17 細胞関連遺伝子である *Il17a*、*Il17f*、*cMaf*、*Ahr*、*Il21*、*Il22* 等も DKO での高発現が認められた。一方、Treg 関連遺伝子群は DKO マウス CD4<sup>+</sup> T 細胞での減少は認められず、Treg への分化が抑制されているわけではないことが示唆された。

さらに、シングルセル RNA-seq のデータに加え、MeDIP (methylated DNA immunoprecipitation)-seq により得られた DNA メチル化情報と DNA 脱メチル化の指標である 5-hydroxymethyl cytosine (5hmC)の ChIP (chromatin immunoprecipitation)-seq 情報との統合解析を行った。その結果、WT に比して DKO マウスでは核内レチノイン酸受容体 をコードする *Rara* 遺伝子および転写因子 *Bach2* の発現が低いことが明らかとなった。さらにこれらの遺伝子では WT に比べて DKO マウスで高メチル化が認められ、WT では 5hmC のピークが認められた。これらの遺伝子はいずれも Th17 細胞分化を抑制し、Treg 分化を亢進することが既に報告されている。

以上の結果より、末梢ヘルパーT 細胞分化ににおいて、Tet は *Rara* や *Bach2* 遺伝子のメチル化を制御することで遺伝子発現を調節し、Treg および Th17 細胞の分化制御に寄与することが示唆された。

これまでヘルパーT 細胞の分化機構に関しては転写ネットワークによる制御機構に関する報告が多くなされてきたが、エピジェネティック制御による調節機構についての研究は端緒につ

いたばかりである。本研究では、Tet 欠損マウスを用いて末梢ヘルパーT細胞の分化制御機構の解明を行い、腸内細菌依存性のトリプトファン代謝物による AhR シグナルや、Rara および Bach2 遺伝子の DNA メチル化を介して Tet が Treg/Th17 分化を制御していることを明らかにした。本研究がさらに発展すれば、免疫疾患、炎症性疾患やがんの新規治療法確立への応用が期待される。

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 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Dunfang Zhang, Chaohong Liu, Hiroko Nakatsukasa, WanJun Chen	4. 巻 12
2. 論文標題 Editorial: Hexose Uptake and Metabolism in Immune Homeostasis and Inflammation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in immunology	6. 最初と最後の頁 832293
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2021.832293	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kyoko Komai, Minako Ito, Seitaro Nomura, Shigeyuki Shichino, Manami Katoh, Shintaro Yamada, Toshiyuki Ko, Mana Iizuka-Koga, Hiroko Nakatsukasa, Akihiko Yoshimura	4. 巻 12
2. 論文標題 Single-Cell Analysis Revealed the Role of CD8+ Effector T Cells in Preventing Cardioprotective Macrophage Differentiation in the Early Phase of Heart Failure.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in immunology	6. 最初と最後の頁 763647
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2021.763647	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takashi MaruYama, Shuhei Kobayashi, Hiroko Nakatsukasa, Yuki Moritoki, Daiki Taguchi, Yoichi Sunagawa, Tatsuya Morimoto, Atsuko Asao, Wenwen Jin, Yuji Owada, Naoto Ishii, Yoshiharu Iwabuchi, Akihiko Yoshimura, WanJun Chen, Hiroyuki Shibata	4. 巻 12
2. 論文標題 The Curcumin Analog G0-Y030 Controls the Generation and Stability of Regulatory T Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in immunology	6. 最初と最後の頁 687669
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2021.687669	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中司寛子、吉村昭彦
2. 発表標題 Role of intestinal microbiota in DNA methylation-mediated T cell senescence and tumorigenesis.
3. 学会等名 第50回 日本免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中司寛子、吉村昭彦
2. 発表標題 Role of intestinal microbiota in DNA methylation-mediated T cell senescence and tumorigenesis.
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroko Nakatsukasa
2. 発表標題 Epigenetics, microbiota, and T cell differentiation
3. 学会等名 Nature Cafe: Type 2 immunity: challenges and opportunities（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中司寛子、吉村昭彦
2. 発表標題 Role of Bcl6 in DNA methylation-mediated T cell senescence and tumorigenesis.
3. 学会等名 第51回 日本免疫学会総会
4. 発表年 2022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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------