

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790523

研究課題名（和文）ポリコーム/トライソラックス複合体による免疫記憶維持機構の解明

研究課題名（英文）Molecular basis of Polycomb and Trithorax complexes in the maintenance of immunological memory

研究代表者

小野寺 淳（ONODERA ATSUSHI）

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：10586598

研究成果の概要（和文）：国民病とも言われるアレルギー疾患は免疫系のバランスの乱れが原因の一端である。特に我々が注目したのは、アレルギー誘導の主役と考えられる Th2 細胞である。Th2 細胞の機能は、ポリコームやトライソラックスというタンパク質が特定の遺伝子領域に結合することで調節される。我々は ChIP-seq 法という最先端の手法で、それらが結合する場所の遺伝子地図を作成し、予想外の特徴を発見した。また、トライソラックス分子の欠損マウスではアレルギー反応が減弱することを見出した。これらの研究結果はアレルギー疾患治療法開発へ応用されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Allergic disease, which is caused by a disorder of the balance of the immune system, is said to be the Japanese national disease. We focus on Th2 cells because they are thought to play leading role in development of the allergic disease. Polycomb and Trithorax proteins regulate Th2 cell function via binding to specific genes. We made gene maps of the place where they bound using an advanced technique called the ChIP-seq method and discovered some unexpected characteristics. In addition, we found that allergic reactions were attenuated in the mice lacking the Trithorax molecules. We hope that these findings will be applied to the development of therapies for allergic disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：免疫学

キーワード：免疫記憶、発生・分化、エピジェネティクス、アレルギー・ぜんそく

1. 研究開始当初の背景

ポリコーム群(PcG)およびトライソラックス群(TrxG)タンパク質は、それぞれ特異的な複

合体を形成し、互いに拮抗的に働いて転写調節を行うことが知られている。我々は、アレルギー疾患に関与するTh2細胞をモデル系として、

Th2細胞の分化および機能維持がPcGやTrxG複合体によって制御されることを報告してきたが、その詳細な分子機構は未知な部分も多い。申請者らの以前の研究結果により、Th2細胞分化のマスター転写因子である*Gata3*遺伝子座における、PcG/TrxGによる転写制御機構の一端が明らかとなった。

それまでの申請者らの研究から得られている成果は以下の通りであった。(1)ナイーブ CD4 T 細胞が Th2 細胞に分化する過程で転写活性化される、*Gata3* 遺伝子座において、PcG が TrxG に置き換えられる現象(displacement)が見られる。(2)この PcG/TrxG displacement は、STAT6 に依存している。(3)PcG の解離には STAT6 によるヒストンアセチル化が関与している。(4)TrxG 複合体の結合領域の拡大には Menin が必要である。(5)Menin 欠損マウス由来の CD4 T 細胞は、Th2 細胞に正常に分化することはできるが、その形質を維持できない。その原因として、Menin 欠損による *Gata3* 発現維持の欠如が考えられる。以上のことから、STAT6 依存的な PcG/TrxG displacement が、Th2 細胞特異的な *Gata3* の発現と Th2 細胞の機能維持を制御していることが分かった (Onodera et al., *JEM*)。

これらの研究結果を踏まえて我々は、*Gata3* 遺伝子座で見られたPcG/TrxG displacement が他の多くの遺伝子座でも起こるのか、という疑問を抱いた。もしその答えがyesならば、PcG/TrxG displacementが様々な局面で起こる一般的な生命現象として捉えることができる。答えがnoならば、*Gata3*遺伝子座というのは非常に特異な場所であり、ここで起こる反応を制御できれば、副作用の少ないアレルギー疾患の治療法開発への道筋が見えてくる。この疑問点を解決するのに非常に有効な手法が、当時日本で導入され始めていた。それが、高速シーケンサーによるシーケンス法とクロマチン免疫沈降法(ChIP)と組み合わせたChIP-seq法(Barski et al., *Cell*)である。これを駆使して、我々が抱いた疑問を解決するとともに、最終的にはアレルギー疾患治療法開発を目指し以下に記述する研究に取り組んだ。尚、本研究は東京大学の鈴木穰先生との共同研究である。

2. 研究の目的

これまでに我々は、Th2 細胞分化のマスター

転写因子である *Gata3* 遺伝子座に着目し、ポリコーム群 (PcG) およびトライソックス群 (TrxG) 複合体による転写制御機構を明らかにしてきた。本研究では、最先端の genome-wide 解析によりどのような遺伝子がこの制御を受けているのかを明らかにすることを目標とした。具体的には、高速シーケンサーによるシーケンス法とクロマチン免疫沈降法(ChIP)と組み合わせた ChIP-seq 法を駆使して、PcG/TrxG による Th1/Th2 細胞の分化・機能維持機構の全貌の解明を目指した。将来的には、免疫系の枠を超え、PcG/TrxG が細胞分化・機能維持、即ち細胞記憶の中核を担う分子群であるという理論として普遍化することを最終目的とした。

3. 研究の方法

(1)PcG/TrxG 複合体の結合領域の genome-wide 解析

申請者らのこれまでの研究から、*Gata3* 遺伝子座において STAT6 依存的な PcG/TrxG displacement が起こることが分かっている。この内容をさらに発展させるために、我々は B 細胞や CD4 T 細胞の各分化段階での PcG/TrxG 結合パターンの、ChIP-seq 法を用いた解析を行った。特に我々は、PcG 複合体の標的遺伝子が明らかとなっている ES 細胞との共通点(標的遺伝子の重複が見られる)および相違点(B細胞やT細胞ではいわゆる bivalent gene がほとんど見られないこと)に着目し、解析を進めた。実験方法は以下に示す方法を用いて行った。

①ES細胞、B細胞、CD4 T細胞、Th2細胞を用いた、Ezh2 (PcG の1種)、Bmi1 (PcG の1種)、Menin (TrxG の1種)、RNAPII のChIP-seq解析
②細胞分化に伴う PcG/TrxG displacement が起こる遺伝子座の抽出、絞り込みを効率的に行える Bioinformatics 技術の確立
③上記 Bioinformatics 技術によって選び出した、PcG/TrxG 標的遺伝子の発現変動プロファイルの作成

以上の結果から、PcG/TrxG 複合体の結合が、相互排他的 (mutually exclusive) であるという概念の証明を目指した。

(2)PcG/TrxG による転写因子結合の制御機構の解析

PcG/TrxG による標的遺伝子の発現制御機構については、明らかでない点も多い。我々は、T細胞受容体からのシグナルが、PcG/TrxG の結合パターンを変化させるとともに、RNAPII のリン

酸化状態にも影響を与えることを見出し、両者の関連性について解析を試みた。実験方法は以下の通りである。

①T細胞受容体シグナルによる発変動遺伝子の網羅的解析

②上記①で得られた遺伝子座における、PcG/TrxGの結合パターン解析

③上記①で得られた遺伝子座における、RNAPIIのリン酸化状態の解析

(3)Menin遺伝子欠損マウスを用いた *in vivo* 免疫応答の解析

申請者らのこれまでの研究により、Menin欠損マウス由来のCD4T細胞は、Th2細胞に正常に分化することはできるが、その形質を維持できないことが分かっていた。また、MeninはTh17細胞の分化に重要であることも分かってきた。そこで、Menin遺伝子欠損マウスにおいて気道炎症モデルなどの病態モデルを用いて *in vivo* におけるMeninの役割について解析し、MeninによるTh2、Th17細胞分化の制御について生体レベルでの生理的な意義を検討した。

4. 研究成果

研究成果については、研究計画・方法に即して以下に記述する。

(1)PcG/TrxG複合体の結合領域のgenome-wide解析

研究計画に記載したChIP-seqデータを取得後、我々はそのデータ解析システムの構築に取り組んだ。これまでのChIP-Seq解析では、転写因子の結合の“ありなし”で評価するケースが多かった。我々はPcG/TrxGなどのDNA結合タンパク質の結合を、単に“ありなし”ではなく、“質”や“量”まで評価する新規システム(Peak and Tag count Combination Method; PTCM)を開発し、解析を行った。これをさらにグレードアップして、結合のパターンを判定する指標となる2種類の“Index”を考案した。具体的には、結合が転写開始点の上流下流どちらに偏在しているかの指標となる“UD Index”(図1)、および結合の形の鋭敏さを判定する根拠になる“Sharp Index”である。これらを総合的に組み合わせて、ES細胞や通常のリンパ球(B細胞とCD4T細胞)におけるPcG/TrxG複合体結合の特徴を見出すことに成功した(図2:論文投稿準備中)。

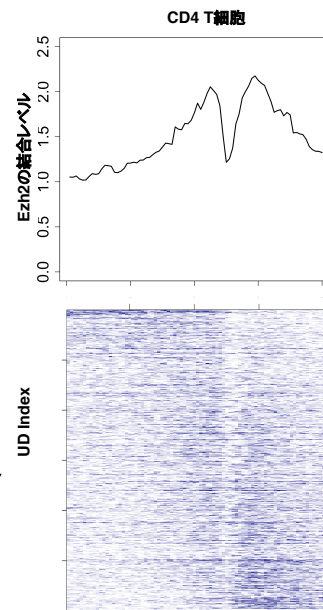


図1. Ezh2結合パターンのUD Indexによる評価

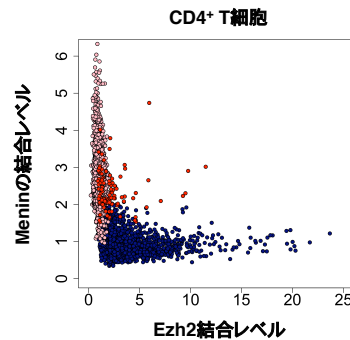


図2. Ezh2とMeninの結合レベルの関係

(2)PcG/TrxGによる転写因子結合の制御機構の解析

①T細胞受容体シグナルによる発変動遺伝子の網羅的解析

CD4 T細胞、Th2細胞、Th17細胞における発現変動遺伝子をDNAマイクロアレイにより解析し、研究対象の遺伝子の絞り込みを行った。当初の予想通り、サイトカイン遺伝子の多くが発現変動群に含まれることが分かった。

②上記①で得られた遺伝子座における、PcG/TrxGの結合パターン解析

Th17細胞における *Il17a* 遺伝子はTrxG複合体の構成因子であるMeninが結合すること、Menin欠損により発現低下が起こることが分かった。

③上記①で得られた遺伝子座における、RNAPIIのリン酸化状態の解析

Meninの直接的な遺伝子発現制御を検討する

ため、遺伝子発現の調節を行なう RNA ポリメラーゼ II (RNAP II) のリン酸化状態 (2P, 5P) との関連性を検討した。その結果、Menin 欠損型では *I117a* 遺伝子において RNAPII の集積が障害されていることが分かった。

(3) Menin 遺伝子欠損マウスを用いた *in vivo* 免疫応答の解析

気道炎症モデルによる *in vivo* 免疫応答の解析については、Th17 細胞を移入する系を用い、Menin 欠損型移入マウスの肺胞洗浄液中に浸潤する好中球数の減少が見られた。さらに、肺胞洗浄液中のサイトカイン定量や肺の組織染色の結果も上記を支持するものであり、Menin 欠損によりアレルギー性喘息が軽減されると結論づけた(論文投稿準備中)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件) 査読有 : 1, 4, 7, 9

1. Hosokawa, H., Tanaka, T., Suzuki, Y., Iwamura, C., Ohkubo, S., Endoh, K., Kato, M., Endo, Y., Onodera, A., Tumes, D. J., Kanai, A., Sugano, S., and Nakayama, T.: Functionally distinct Gata3/Chd4 complexes coordinately establish T helper 2 (Th2) cell identity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110(12):4691-4696(2013). DOI:10.1073/pnas.1220865110
2. Onodera, A., Tumes, D. J., and Nakayama, T.: Too much of a good thing. Nat. Immunol. 14(2):112-114 (2013) DOI:10.1038/ni.2510
3. 堀内周、小野寺淳、中山俊憲、Th2 特異的遺伝子の GATA3 依存的、非依存的な発現制御機構 臨床免疫・アレルギー科 (科学評論社)、59(1):25-33 (2013・1)
4. 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 Th2 differentiation. Nat. Immunol. 13(8):778-786 (2012) DOI:10.1038/ni.2362
5. 小野寺淳、中山俊憲 STAT6 依存的および非依存的な Gata3 の発現制御機構-Gata3

発現は STAT6 によって誘導され、Menin/TrxG 複合体によって維持される-臨床免疫・アレルギー科 57(3):330-341(2012・3)

6. 小野寺淳、堀内周、中山俊憲 CD4 免疫記憶と機能維持-エピジェネティック研究から得られた新知見 実験医学増刊免疫学のブラックボックス 免疫記憶の制御と疾患治療 29(17):20-28(2011)
7. Kitajima, M., Ito, T., Tumes, J. D., Endo, Y., Onodera, A., Hashimoto, K., Motohashi, S., Yamashita, M., Nishimura, T., Ziegler, F. S., and Nakayama, T.: Memory type 2 helper T cells induce long-lasting anti-tumor immunity by activating natural killer cells. Cancer Res. 71:4790-4798 (2011) DOI:10.1158/0008-5472.CAN-10-1572
8. 小野寺淳、中山俊憲 T 細胞機能分化のエピジェネティクス 感染・炎症・免疫 41(2):22-31(2011・7)
9. Horiuchi, S., Onodera, A., Hosokawa, H., Watanabe, Y., Tanaka, T., Sugano, S., Suzuki, Y., and Nakayama, T.: Genome-wide analysis reveals unique regulation of transcription of Th2-specific genes by GATA3. J. Immunol. 186:6378-6389 (2011) DOI: 10.4049/jimmunol.1100179
10. 小野寺淳 ポリコームとトライソラックスによる Gata3 遺伝子発現のエピジェネティック制御 医学のあゆみ 237(13):1154-1160(2011・6)
11. 小野寺淳 Gata3 遺伝子のエピジェネティック制御 医学のあゆみ 237(4):314-(2011・4)

[学会発表] (計 11 件)

1. Onodera, A., Horiuchi, S., Sasaki, T., Hosokawa, H., Watanabe, Y., Suzuki, Y., and Nakayama, T.: Epigenetic regulation of helper T cells by Polycomb and Trithorax complexes. International Symposium on Genome Science 2013 Jan. 9, Tokyo
2. Iwamura, C., Endo, Y., Onodera, A., Watanabe, Y., Suzuki, A., Kinjo, Y., and Nakayama, T.: Regulation of memory CD4 T cell pool size and function by NKT cells *in vivo*. 第 41 回日本免疫学会学術集会 2012 年 12 月 6 日、神戸

3. Sasaki, T., Onodera, A., Hosokawa, H., Watanabe, Y., Horiuchi, S., Yamashita, J., and Nakayama, T.: Genome-wide gene expression profiling revealed a critical role for GATA3 in the maintenance of the Th2 cell phenotype. 第41回日本免疫学会学術集会 2012年12月5日、神戸
 4. Ito, T., Kitajima, M., Tumes, J. D., Endo, Y., Onodera, A., Hashimoto, K., Motohashi, S., Yamashita, M., Nishimura, T., and Nakayama, T.: メモリ-Th2細胞はNK細胞を活性化し抗腫瘍効果を持続させる/ Memory type 2 helper T cells induce long-lasting anti-tumor immunity by activating natural killer cells. 第40回日本免疫学会学術集会 2011年11月28日、幕張
 5. Onodera, A., Yamashita, M., Endo, Y., Kuwahara, M., Tofukuji, S., Hosokawa, H., Horiuchi, S., Watanabe, Y., and Nakayama, T.: STAT6によって誘導されるポリコームとトライソラックスの置換反応/ STAT6-mediated displacement of Polycomb by Trithorax complex establishes long-term maintenance of GATA3 expression in Th2 cells. 第40回日本免疫学会学術集会 2011年11月27日、幕張
 6. 堀内周、小野寺淳、細川裕之、渡邊友紀子、中山俊憲 GATA3 ChIP-sequence 解析を用いた Th2 特異的遺伝子の転写調節機構の解明 / Genome-wide analysis reveals unique regulation of transcription of Th2-specific genes by GATA3. 第40回日本免疫学会学術集会 2011年11月27日、幕張
 7. Onodera, A., Horiuchi, S., Hosokawa, H., Watanabe, Y., Suzuki, Y., and Nakayama, T.: Genome-wide analysis reveals unique regulation of transcription of Th2-specific genes by GATA3. NCI Symposium on Chromosome Structure and Function, 2011 November 1, Bethesda, MD, USA
 8. Nakayama, T., and Onodera, A.: Regulation of memory Th2 cell function and allergic airway inflammation via polycomb and trithorax molecules. 30th Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, 2011 June 15, Istanbul, Turkey
 9. 遠藤裕介、小野寺淳、細川裕之、中山俊憲 Eomesodermin controls IL-5 production in memory Th2 cells through the inhibition of GATA3 activity 第21回 Kyoto T Cell Conference 2011年6月11日、京都
 10. Nakayama, T., and Onodera, A.: Epigenetic control of memory Th2 cell function via Polycomb and Trithorax molecules. Euthyme-Rolduc Meeting, 2011 May 24, Leeuwenhorst, NL
 11. 堀内周、小野寺淳、細川裕之、渡邊友紀子、鈴木穰、中山俊憲 GATA3 ChIP-sequence 解析を用いた Th2 特異的遺伝子の転写調節機構の解明, 第5回日本エピジェネティックス研究会 2011年5月19日、熊本
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
- 小野寺 淳 (ONODERA ATSUSHI)
 千葉大学・大学院医学研究院・助教
 研究者番号：10586598