

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890293

研究課題名(和文)腸内細菌を介したエピゲノム修飾による宿主免疫抑制機構の解明

研究課題名(英文)Commensal microbiota maintains gut homeostasis through epigenetic modification

研究代表者

古澤 之裕 (Furusawa, Yukihiro)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：80632306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：腸管には、制御性T細胞(Treg)が数多く存在し、炎症やアレルギー反応の抑制に寄与している。一部共生細菌の定着は、腸管におけるTregの分化や増殖を促すことが知られているが、その分子機構は不明であった。本研究では、共生細菌定着によるTreg増殖の分子機構を調べるため、無菌マウスおよびノトバイオートマウスからT細胞を単離し、マイクロアレイによる遺伝子発現解析と次世代シーケンサーによるメチローム解析を行った。腸内細菌は酪酸の産生とUhrf1発現の上昇を介して、宿主T細胞のエピジェネティック修飾を積極的に促すことで、Tregの分化・増殖を促進し腸管免疫系の恒常性維持に寄与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Intestinal regulatory T (Treg) cells are necessary for suppression of excessive immune response to commensal bacteria. However, the molecular machinery controlling intestinal Treg cell homeostasis remains largely unknown. Here we report that colonization of germ-free mice with gut microbiota upregulated the expression of the DNA methylation adaptor Uhrf1 in Treg cells. Cd4creUhrf1fl/fl mice were defective in proliferation and functional maturation of colonic Treg cells. Uhrf1 deficiency de-repressed cyclin-dependent kinase inhibitor Cdkn1a due to hypomethylation of its promoter region, resulting in cell-cycle arrest of Treg cells. As a consequence, Cd4creUhrf1fl/fl mice spontaneously developed severe colitis. Thus, Uhrf1-dependent epigenetic silencing of Cdkn1a is required for the maintenance of gut immune homeostasis. This mechanism enforces symbiotic host-microbe interactions without an inflammatory response.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：免疫学

キーワード：エピジェネティクス 制御性T細胞 DNAメチル化 炎症性腸疾患

## 1. 研究開始当初の背景

腸管粘膜は、食餌とともに摂取される病原菌やウイルスに曝されており、常に感染の危険と隣り合わせにある。そのため腸管には生体内において最大の免疫系が発達している。腸管では制御性 T 細胞 (regulatory T cell; 以下 Treg と略) が、炎症性腸疾患や食物アレルギーを含む種々の腸管免疫疾患の抑制に働くことが知られている。マウス大腸組織において、Treg 細胞は CD4 陽性 T 細胞全体の約 30~40%もの高比率で存在しているものの、その分化誘導や維持の分子機構はよくわかっていない。腸内細菌による Treg 誘導のメカニズムを調べる目的で、無菌環境から人工的に共生菌を定着させたマウスから腸管 T 細胞を単離し遺伝子発現変動を調べたところ、エピジェネティックな調節因子である *Uhrf1* の発現が顕著に上昇することを見いだした。

## 2. 研究の目的

昨年、腸内に共生するクロストリジウム属細菌や ASF(8 種類の腸内細菌からなる合成フローラ)には Treg 細胞を誘導する作用があることが報告された。この結果より、少なくとも一部の腸内共生細菌は粘膜免疫系の恒常性維持に積極的に関与すると予想できる。申請者らも無菌マウスでは腸管内の Treg 細胞が通常マウスと比較して著しく減少することを確認している。腸内細菌による Treg 誘導のメカニズムを調べる目的で、無菌環境から人工的に共生菌を定着させたマウスから腸管 T 細胞を単離し遺伝子発現変動を調べたところ、エピジェネティックな調節因子である *Uhrf1* の発現が顕著に上昇することを見いだした。*Uhrf1* は、DNA メチル化やヒストン修飾を介して複数の遺伝子の発現抑制に関わる分子として報告されているものの、免疫系への関与を示唆するデータは皆無であった。本研究申請では、腸内共生細菌による Treg 細胞誘導の分子機構について、*Uhrf1* を介したエピゲノム修飾という視点から解明

を試みた。

## 3. 研究の方法

### 1) *Uhrf1* 欠損マウスおよび野生型マウスにおける腸管 Treg 細胞の性状解析

Treg 細胞には、中枢リンパ組織である胸腺で分化した Natural Treg 細胞 (nTreg 細胞) と腸管などの末梢リンパ組織でサイトカイン刺激により分化する Inducible Treg (iTreg) 細胞の 2 種類が存在することが知られており、腸管には両細胞が存在している。これまでの解析により、*Uhrf1* 欠損マウスでは腸管以外の組織に炎症像が認められないことから、他の組織にも存在している nTreg 細胞よりむしろ iTreg 細胞が主として減少していることが疑われる。Treg 細胞のマーカーとして *Foxp3*、nTreg 細胞のマーカー分子として *Helios* が知られており、両分子を指標として nTreg と iTreg の割合を検討することが可能である。ここでは、両マーカー分子に対する特異的抗体を用いることで、*Uhrf1* 欠損による iTreg 細胞の減少をフローサイトメトリーにて確認する。*Uhrf1* 欠損による Treg 細胞の減少は、Treg 細胞の分化誘導もしくは分化後の増殖過程において異常が生じたためと推測される。*In vivo* における解析では分化誘導過程におけるエピゲノム修飾の影響を詳細に検討するには限界があるため、*in vitro* において末梢リンパ組織の Treg 分化誘導モデルを作成し、更なる性状解析を行う。*In vitro* における培養方法としては、*Uhrf1* cKO マウスからナイーブ T 細胞 (Tnaive 細胞) をセルソーターにて単離し、抗 CD3/28 抗体、TGF- $\beta$  および IL-2 の存在下で培養して Treg 細胞に分化誘導する。申請者らは、本法により培養 4 日目には約 70%の細胞が Treg 細胞へと

分化誘導できることを確認している。増殖の割合は細胞の計数と Nucleotide analog である EdU を用いた細胞周期解析法にて定量する。Uhrf1 の有無で分化誘導に差が見られた場合には、分化中の遺伝子発現変化を解析する。また Uhrf1 の有無により Treg 細胞の増殖に差が見られた場合には、分化誘導後の増殖過程における網羅的遺伝子発現変動解析を行う。

2) Uhrf1 欠損および野生型マウスにおける Treg 細胞のトランスクリプトーム解析

Uhrf1 は DNA メチル化、ヒストンメチル化の維持に關与する Dnmt1 のアダプター分子であり、遺伝子の発現抑制に關与する。現在、腸内細菌の存在下で Uhrf1 が上昇すること、また Uhrf1 cKO マウスでは腸管の Treg 細胞が減少し、腸炎を発症するという知見を得ていることから、Uhrf1 により発現抑制される遺伝子が、腸管の Treg 細胞誘導の責任遺伝子であると予想される。そこで、Uhrf1 cKO マウス腸管から Treg 細胞を単離し、Uhrf1 により発現調節されている遺伝子を探索する。Treg 細胞分取のために用いるマウスは、いずれも Treg 細胞のマスターレギュレーターである Foxp3 下流に Human CD2 (hCD2) 抗原が発現するよう遺伝子改変されており (理研 RCAI 免疫恒常性ユニットより分与)、hCD2 を細胞表面マーカーとして Treg 細胞を分取することが可能である。遺伝子発現はマイクロアレイ (GeneChip, Affymetrix 社) を用いて網羅的に解析する。網羅的解析手法は一度にほぼ全ての遺伝子の発現情報を得られる一方で、膨大な情報量に翻弄されるケースが少なくない。そこで、バイオインフォマティクスツールである Ingenuity pathway

analysis software (IPA) を用いて発現変動した遺伝子を機能別に分類することで、Treg 細胞誘導に關与する遺伝子群を特定する。腸管の Treg 細胞の解析に加えて、上述 1) において *in vitro* Treg 細胞分化誘導モデルを用いて検討を行った場合の、分化誘導過程における Treg 細胞分化に關与する遺伝子、もしくは分化誘導後の Treg 細胞増殖に關与する遺伝子を同手法により特定する。両結果を総合して解析し、Uhrf1 により発現調節を受ける Treg 細胞誘導遺伝子を決する。

3) Uhrf1 欠損および野生型マウスにおける Treg 細胞のエピゲノム解析これまでの検討から、Uhrf1 cKO マウスでは Treg 細胞数が減少し、大腸炎を自然発症することが観察されている。その他の臓器には炎症像を認めないことから、Uhrf1 を介したメチル化機構は腸管 Treg 細胞のホメオスタシス維持に重要なことが予想される。上述 1) - 2) では Uhrf1 により発現調節される Treg 細胞誘導遺伝子を特定する計画を策定した。ここでは更に発現変動した遺伝子情報を元にして、Uhrf1 を介した、Treg 細胞誘導に必要な遺伝子のエピゲノム調節機構を解明していく。上述 1) の手法で Treg 細胞を取得し、Uhrf1 cKO による DNA のメチル化変化を解析する。DNA メチル化は MeDIP (methylated DNA immunoprecipitation) - シークエンシング法 (Hi-Seq 2000 イルミナ社) によりゲノムワイドに解析する。ここで得られる情報を、マイクロアレイで取得した遺伝子発現情報と 2 次的に共相関解析することで、DNA メチル化もしくはヒストンメチル化により影響を受ける遺伝子をプロファイリングする。以上の解析を通じて、腸内共生菌による Treg 細胞

誘導のメカニズムを分子レベルで解明する。

#### 4. 研究成果

Uhrf1 を T 細胞特異的に欠損させると、腸管における Treg 増殖が抑制され、マウスが大腸炎を自然発症していた。そこで Uhrf1 欠損マウスから単離した Treg の RNA および DNA を単離し、マイクロアレイによる遺伝子発現解析と次世代シーケンサーによるメチローム解析による共相関解析を行った。細胞周期に関連する遺伝子に着目したところ、*Cdkn1a* 遺伝子プロモーター領域の CpG が Uhrf1 欠損により脱メチル化しており、*Cdkn1a* 発現の上昇が認められた。実際に、Uhrf1 欠損した Treg 細胞ではマスター転写因子である Foxp3 の発現に影響は見られなかったが、G0/G1 期における細胞周期停止が顕著に認められた。

以上の知見から、腸内細菌は酪酸の産生と Uhrf1 発現の上昇を介して、宿主 T 細胞のエピジェネティック修飾を積極的に促すことで、Treg の分化・増殖を促進し腸管免疫系の恒常性維持に寄与していると考えられた。

#### 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1件)

Obata Y, Furusawa Y (1<sup>st</sup> equal contribution), Endo TA, Sharif J, Takahashi D, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Takahashi M, Ikawa T, Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T, Tajima S, Ohara O, Honda K, Hori S, Ohno H, Koseki H, Hase K. Epigenetic regulator Uhrf1 is critical for functional expansion of colonic regulatory T cells. **Nat. Immunol.** 2014, *in press*

[学会発表](計1件)

Furusawa Y, Obata Y, Sharif J, Hori S, Ohno H, Koseki H, Hase K, Commensal microbiota shapes gut immune system through epigenetic modification. International Congress of Mucosal Immunology 2013.7.17-20. Vancouver, Canada.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

古澤 之裕 (Furusawa Yukihiro)  
東京大学医科学研究所 特任助教  
研究者番号：80632306

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)研究協力者

遠藤 高帆 (Endo Takaho )  
理化学研究所 統合生命医科学研究所  
統合ゲノミクスグループ 上級研究員  
研究者番号：40384862