

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 25 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460401

研究課題名(和文) ヘルパーT細胞機能発現の機序解析

研究課題名(英文) ThPOK represses CXXC5, which inhibits CD40L expression in cytotoxic T cells through epigenetic regulation

研究代表者

直江 吉則 (Naoe, Yoshinori)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・運動器疾患研究部・流動研究員

研究者番号：50392048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：CD40Lは細胞障害性T細胞では発現せず、その詳細な機序は不明である。細胞障害性T細胞においてCd40lg遺伝子のプロモーター領域でCpG DNA、ヒストンH3K9、ヒストンH3K27ならびにヒストンH4K20がメチル化されていることを見出した。ThPOKはヘルパーT細胞機能発現に必須な分子であることから、細胞障害性T細胞にThPOKを強制発現したところ、ヒストンH3K9ならびにヒストンH4K20がメチル化が低下した。ThPOK標的分子探索を行い、CXXC5を見出した。CXXC5はSUV39H1と結合し、Cd40lg遺伝子のプロモーター領域のヒストンH3K9をメチル化することを見出した。

研究成果の概要(英文)：CD40L is induced in helper T cells upon TCR stimulation. However, the mechanisms whereby CD40L becomes expressed in T cells remain unclear. We showed that CD40L expression in cytotoxic T cells was suppressed by combined epigenetic regulations in the promoter of the Cd40lg gene such as the methylation of CpG dinucleotides, histone H3 lysine 9 (H3K9), H3K27, and H4K20. As ThPOK is critical in helper T cell development, we focused on the role of ThPOK in CD40L expression. CD40L expression is moderately induced by retroviral Thpok transduction into cytotoxic T cells, which was accompanied by a reduction of H3K9 methylation (H3K9me) and H4K20me in the promoter of the Cd40lg gene. ThPOK directly inhibited the expression of CXXC5 that induced H3K9me through an interaction with SUV39H1. In addition to inhibit CD40L induction in activated helper T cells by CXXC5, our findings indicate that CXXC5 was one of the key molecules contributing to repressing CD40L expression in cytotoxic T cells.

研究分野：免疫

キーワード：ヘルパーT細胞 細胞障害性T細胞 ThPOK CXXC5 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

近年、肥満、糖尿病、慢性腎臓病、非アルコール性肝炎や動脈硬化性疾患などの生活習慣病、アルツハイマー病やパーキンソン病のような神経変性疾患、慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患、癌の発症・浸潤・転移に共通する基盤病態として慢性炎症が注目されている。これら慢性疾患にT細胞の浸潤ならびに炎症部位でのT細胞とマクロファージや樹状細胞との相互作用が生じることにより、炎症性サイトカインの発現が認められ、T細胞は慢性炎症の増悪化ならびにその抑制に大きく関与していることが知られている。それらT細胞は胸腺においてCD4⁺CD8⁺ダブルポジティブ細胞(DP細胞)からCD4⁺ヘルパーT細胞(ヘルパーT細胞)およびCD8⁺細胞障害性T細胞(細胞障害性T細胞)へ分化成熟するが、どのように分化し、さらにどのような機序によりそれら細胞が異なる機能を獲得し発揮するか等の詳細な機序は不明である。

2. 研究の目的

ヘルパーT細胞は末梢において、IFN- γ を主に産生するTh1細胞やIL-4, 5, 13を主に産生するTh2細胞に分化することが知られている。従来、Th1およびTh2細胞がさまざまな免疫応答に関与し、感染免疫、腫瘍免疫などに重要な役割を果たす一方、過剰な免疫反応を引き起こすことによってアレルギー、自己免疫疾患、炎症性腸疾患、移植臓器の拒絶反応が惹起される。同時に、FoxP3陽性制御性T細胞は抗原提示細胞、T細胞の活性化の抑制、または、末梢標的臓器においてエフェクターT細胞の働きを制御することによって免疫寛容維持に重要な役割を担っている。ヘルパーT細胞および細胞傷害性T細胞は胸腺において共通の前駆細胞であるDP細胞から分化成熟するが、どのような機序で分化、さらに異なる機能を獲得し発揮するか詳細は不明である。

近年、ヘルパーT細胞分化のマスター転写因子としてThPOKが同定された。ThPOKはZinc fingerを持つ転写因子で、Zinc fingerに変異があるマウスならびにThPOKを欠損するマウスはヘルパーT細胞を有さないことから、ヘルパーT細胞分化に必須であることが知られている。さらに、ThPOKを欠損するMHC class II拘束性ヘルパーT細胞様細胞では機能が著しく低下することから、ThPOKがヘルパーT細胞機能発揮に重要な役割を果たしていることは明らかである。しかしながら、ThPOKの標的遺伝子は未だ不明である。したがって、ThPOK標的遺伝子を探索し、ThPOKの下流シグナルを明らかにすることにより、ヘルパーT細胞において、いかにヘルパーT細胞機能が発現するか、ならびに細胞障害性T細胞機能が抑制されるか、その機序の解明が可能となると考えられる。

3. 研究の方法

(1) T細胞単離ならびにレトロウイルスによるT細胞へのThPOK導入

野生型ならびにCXXC5 Tgマウスからcell sorterを用いてヘルパーT細胞および細胞傷害性T細胞を単離した。ThPOK欠損マウスからCD8⁺GFP⁺T細胞およびCD8⁺GFP⁻T細胞をcell sorterを用いて単離した。得られたT細胞をin vitroにおいて抗CD3抗体および抗CD28抗体を用い刺激した。活性化したT細胞にThPOKを発現可能なレトロウイルスを感染させ、ThPOKを強制発現させた。

(2) *Cd40lg* 遺伝子プロモーター領域におけるCpG DNAおよびヒストンのメチル化の測定

CpG DNAのメチル化はバイサルファイト法を用いて検討した。単離したT細胞からゲノムDNAを抽出し、MethylEdge Bisulfite Conversion System Kitを用いてバイサルファイト処理した。バイサルファイト処理したゲノムDNAを*Cd40lg* promoter forward、5' -TTAATAAAAAGGGAAAGTTTGGAAAGT-3' および*Cd40lg* promoter reverse、5' -TCTAACCAAAAATAAAAACAAAACAAC-3' によりPCR法で増幅し、シーケンスによりDNA配列を調べ、CpG DNAのメチル化を調べた。

ヒストンのメチル化はクロマチン免疫沈降法を用いて調べた。単離したT細胞を1%ホルムアルデヒドで固定化した。固定化したT細胞を溶解し、超音波にてDNAを細断した。抗ヒストンH3K9トリメチル、抗ヒストンH3K27トリメチル、抗ヒストンH4K20トリメチル、抗SUV39H1、または抗HA抗体を用いて免疫沈降し、得られたDNAを*Cd40lg* promoter forward、5' -CCCAAACCTTTAGAGAGCAATAGG-3' および*Cd40lg* promoter reverse、5' -TAATCACACCCATATCATTCACT-3' を用い、定量PCR法にて増幅、定量した。

4. 研究成果

ThPOKの標的遺伝子の同定をcDNAマイクロアレイとChIP on chip法により行い、その結果、164個のThPOK標的遺伝子候補を見出した。それら候補遺伝子の中でヘルパーT細胞では発現が認められず、しかし、細胞障害性T細胞で発現が見られ、さらにThPOK欠損T細胞でも発現が見られる遺伝子(ThPOKにより発現が抑制される遺伝子)に注目し、これら候補遺伝子の中で*Cxcr5*遺伝子を選んだ。

CXXC5のT細胞における発現量をリアルタイムPCR法により測定した。CXXC5は胸腺においてThPOKが発現していないDP細胞、ならびにCD8SP細胞に発現が見られたが、ThPOKが発現しているCD4SP細胞には発現していなかった。また、ThPOK、欠損マウスから得られたMHC class II拘束性細胞であるCD8⁺GFP⁺T細胞においてCXXC5の発現誘導が認められた。さらに、ThPOKが発現していない細胞障害性T細胞にレトロウイルスを用いてThPOKを強制発現したところ、CXXC5の発現は著しく抑制された(図1)。またクロマチン免疫沈降法を用いてThPOKが*Cxcr5*遺伝子

座に直接結合するかを検討したところ、ThPOK の *Cxcr5* 遺伝子座への結合が確認できた。これらのことから CXXC5 の発現は ThPOK により直接抑制されることが示唆され、ヘルパーT細胞ではThPOKがCXXC5の発現を抑制し、ヘルパーT細胞の機能が発揮すると考えられる。

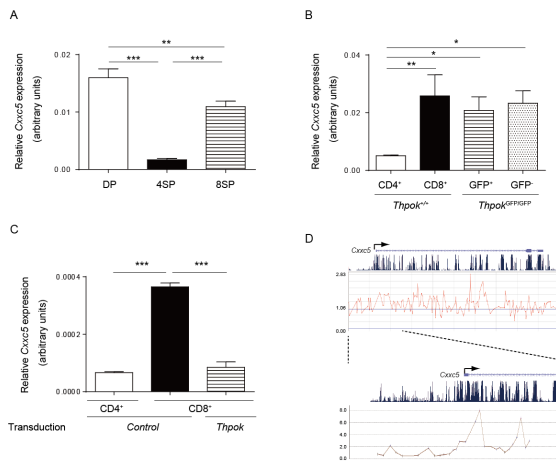


図 1. CXXC5 の発現は ThPOK によって直接抑制される。

CXXC5 はヘルパーT細胞の機能を抑制する因子であるとも考えられるが、直接的な証拠が無い。そこでT細胞特異的にCXXC5を発現する Transgenic Mouse(Tg マウス)を作成した。その結果、CXXC5 Tg マウスの胸腺におけるT細胞の分化に大きな影響は見られなかったが、末梢リンパ組織におけるヘルパーT細胞ならびに細胞障害性T細胞の数が減少することを確認した(特に細胞障害性T細胞数)。さらに、CXXC5 Tg マウスのヘルパーT細胞を *in vitro* において活性化し、ヘルパーT細胞特異的に発現するCD40Lの発現を調べたところ、その発現誘導は認められなかった(図2)。また、細胞内染色を行ったところ、細胞内CD40Lたんぱく質の量もCXXC5 Tg マウスのヘルパーT細胞において明らかに減少した。さらに、CXXC5 Tg マウスのヘルパーT細胞においてCD40L mRNAの量も明らかに減少した。このことからCXXC5は活性化ヘルパーT細胞におけるCD40Lの発現を転写レベルにおいて何らかの機序で抑制することが明らかになった。

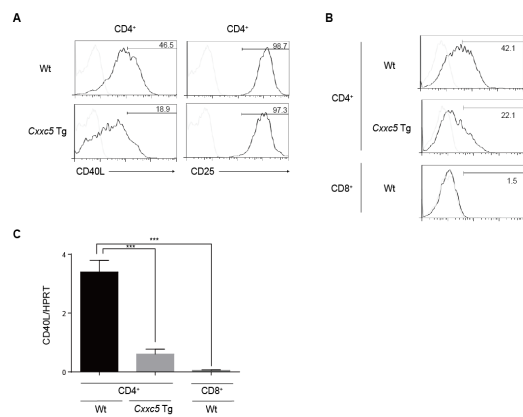


図 2. CXXC5 は CD40L の発現を抑制する

ThPOK により発現が抑制される CXXC5 をヘルパーT細胞に発現させると、ヘルパーT細胞特異的に発現するCD40Lの発現が著しく抑制された。このことは、CXXC5が発現する細胞障害性T細胞において、CXXC5がCD40Lの発現を抑制することを示唆するが、その詳細な機序は不明である。そこで、CXXC5がどのようにCD40Lの発現を抑制するかを *Cd40lg* 遺伝子のプロモーター領域のエピジェネティックな調節に注目し解析した。CpG DNA、ヒストン H3K9、ヒストン H3K27ならびにヒストン H4K20のメチル化は遺伝子発現を抑制するエピジェネティックな修飾であることが報告されていることから、*Cd40lg* 遺伝子のプロモーター領域のそれらメチル化を測定した(図3)。CXXC5が発現していないヘルパーT細胞では *Cd40lg* 遺伝子のプロモーター領域の CpG DNA のメチル化は見られなかったが、CXXC5が発現している細胞障害性T細胞では明らかに CpG DNA のメチル化が認められた。CXXC5の発現はThPOKにより抑制されることから、細胞障害性T細胞にレトロウイルスを用いてThPOKを導入したところ、CpG DNAのメチル化が見られ、ThPOK導入による影響は認められなかった。さらに、ThPOK欠損マウスから得られたMHC class II拘束性細胞であるCD8⁺GFP⁺T細胞においてCpG DNAのメチル化は確認できなかった。これらのことは *Cd40lg* 遺伝子のプロモーター領域の CpG DNA のメチル化にThPOKならびにCXXC5が関与していないことを示唆している。

次に *Cd40lg* 遺伝子のプロモーター領域におけるヒストン H3K9、ヒストン H3K27ならびにヒストン H4K20のメチル化をクロマチン免疫沈降法にて検討した(図3)。CXXC5が発現していないヘルパーT細胞では *Cd40lg* 遺伝子のプロモーター領域のヒストン H3K9、ヒストン H3K27ならびにヒストン H4K20のメチル化は認められなかった。一方、CXXC5が発現している細胞障害性T細胞では明らかにヒストン H3K9、ヒストン H3K27ならびにヒストン H4K20のメチル化が誘導されていた。また、ThPOKをレトロウイルスにより導入した細胞

障害性 T 細胞ではヒストン H3K9 ならびにヒストン H4K20 のメチル化が抑制されたが、ヒストン H3K27 のメチル化は抑制されなかった。さらに、ThPOK 欠損マウスの CD8⁺GFP⁺T 細胞においてヒストン H3K9 ならびにヒストン H4K20 のメチル化の上昇が見られたが、ヒストン H3K27 のメチル化の上昇は見られなかった。これらのことから、*Cd401g* 遺伝子のプロモーター領域のヒストン H3K9 ならびにヒストン H4K20 のメチル化は ThPOK ならびに CXXC5 依存性、一方、CpG DNA およびヒストン H3K27 のメチル化は ThPOK ならびに CXXC5 非依存性であることが示唆された。

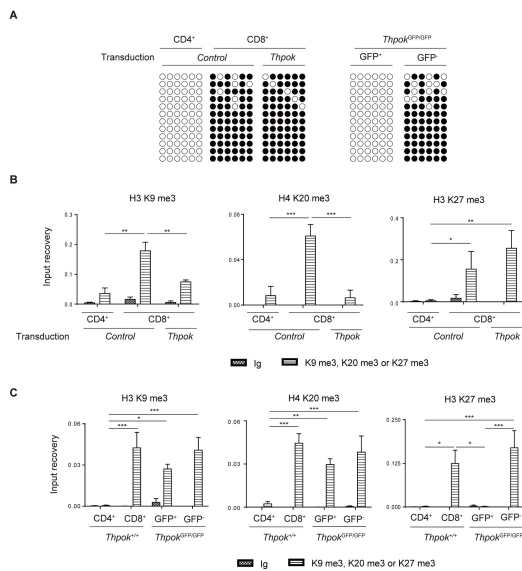


図 3. ThPOK はヒストン H3K9 およびヒストン H4K20 のメチル化を抑制する

さらに、CXXC5 が *Cd401g* 遺伝子のプロモーター領域のヒストン H3K9 ならびにヒストン H4K20 のメチル化に与えるかどうか、それらメチル化の程度を CXXC5 Tg マウスから得たヘルパー T 細胞を用いてクロマチン免疫沈降法にて検討した(図 4)。CXXC5 Tg マウスから得られたヘルパー T 細胞において、ヒストン H3K9 のメチル化の増加が見られたが、ヒストン H4K20 のメチル化は見られなかった。このことは、*Cd401g* 遺伝子のプロモーター領域のヒストン H3K9 のメチル化は CXXC5 依存性、一方、ヒストン H4K20 のメチル化は CXXC5 非依存性であることが示唆された。

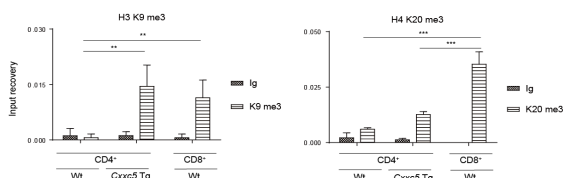


図 4 .CXXC5 を強制発現するヘルパー T 細胞の *Cd401g* 遺伝子のプロモーター領域における

ヒストン H3K9 はメチル化されている。

CXXC5 を発現するヘルパー T 細胞において *Cd401g* 遺伝子のプロモーター領域のヒストン H3K9 はメチル化されていたが、CXXC5 にはメチル化に与える酵素活性部位はない。このことは CXXC5 がヒストンメチル化酵素と結合することを示唆する。そこで、CXXC5 とヒストン H3K9 メチル化酵素の SUV39H1 との結合を免疫沈降法にて検討したところ、細胞障害性 T 細胞において、CXXC5 と SUV39H1 の結合が認められた(図 5)。さらに、CXXC5 が発現する細胞障害性 T 細胞、CXXC5 を強制発現したヘルパー T 細胞、ならびに ThPOK 欠損マウスの CD8⁺GFP⁺T 細胞において SUV39H1 が *Cd401g* 遺伝子のプロモーター領域に結合するかどうかクロマチン免疫法にて調べた(図 5)。CXXC5 が発現する細胞障害性 T 細胞、CXXC5 を強制発現したヘルパー T 細胞、ならびに ThPOK 欠損マウスの CD8⁺GFP⁺T 細胞において SUV39H1 が *Cd401g* 遺伝子のプロモーター領域に結合することが明らかになった。一方、CXXC5 欠損マウスから得られた細胞障害性 T 細胞において SUV39H1 の *Cd401g* 遺伝子のプロモーター領域への結合は見られなかった。

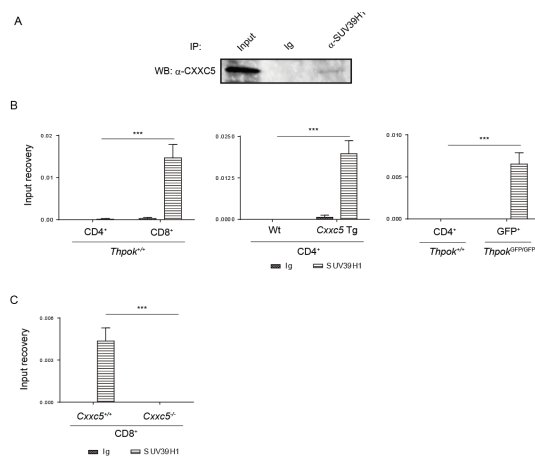


図 5 .細胞障害性 T 細胞において CXXC5 と SUV39H1 は結合する

以上より、ヘルパー T 細胞において CXXC5 の発現は ThPOK によって抑制される。一方、細胞障害性 T 細胞において、CXXC5 は発現し、SUV39H1 と結合し *Cd401g* 遺伝子のプロモーター領域のヒストン H3K9 をメチル化することにより CD40L の発現を抑制していることが明らかになった。

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 7 件)

Ubiquitin-specific protease 2-69 in macrophages potentially modulates

metainflammation. Kitamura H, Kimura S, Shimamoto Y, Okabe J, Ito M, Miyamoto T, Naoe Y, Kikuguchi C, Meek B, Toda C, Okamoto S, Kanehira K, Hase K, Watarai H, Ishizuka M, El-Osta A, Ohara O and Miyoshi I. FASEB J. 査読有、27 巻: 4940-53: 2013

Beneficial effects of Brazilian propolis on type 2 diabetes in ob/ob mice: Possible involvement of immune cells in mesenteric adipose tissue. Kitamura H, Naoe Y, Kimura S, Miyamoto T, Okamoto S, Toda C, Shimamoto Y, Iwanaga T and Miyoshi I. Adipocyte. 査読有、2 巻: 227-36: 2013

Integrin α v in the mechanical response of osteoblast lineage cells. Kaneko K, Ito M, Naoe Y, Lacy-Hulbert A and Ikeda K. Biochem Biophys Res Commun. 査読有、447 巻: 352-7: 2014

Age-related marrow adipogenesis is linked to increased expression of RANKL. Takeshita S, Fumoto T, Naoe Y and Ikeda K. J Biol Chem. 査読有、289 巻: 16699-710: 2014

A novel Cd8-cis-regulatory element preferentially directs expression in CD44hiCD62L+CD8+ T cells and in CD8+ dendritic cells. Sakaguchi S, Hombauer M, Hassan H, Tanaka H, Yasmin N, Naoe Y, Bilic I, Moser MA, Hainberger D, Mayer H, Seiser C, Bergthaler A, Taniuchi I and Ellmeier W. J Leukoc Biol. 査読有、97 巻: 635-44: 2015

Proliferation-coupled osteoclast differentiation by RANKL: Cell density as a determinant of osteoclast formation. Motiur Rahman M, Takeshita S, Matsuoka K, Kaneko K, Naoe Y, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A and Ikeda K. Bone. 査読有、81 巻: 392-399: 2015

ThPOK represses CXXC5, which induces methylation of histone H3 lysine 9 in *Cd401g* promoter by association with SUV39H1: implications in repression of CD40L expression in CD8+ cytotoxic T cells. Tsuchiya Y, Naito T, Tenno M, Maruyama M, Koseki H, Taniuchi I, Naoe Y. J Leukoc Biol. 査読有、(In press)

〔学会発表〕(計 1 件)

直江吉則、内藤拓、久保久美子、土屋由加子、原恵子、古関明彦、谷内一郎
Cxxc5, ThPOK target gene, suppresses CD4+ helper T cell functions during CD8+ cytotoxic T differentiation. 第 42 回日本免疫学会、2013 年 12 月 11 日

〔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

直江 吉則 (NAOE YOSHINORI)
国立長寿医療研究センター研究所運動器
疾患研究部・流動研究員
研究者番号: 50392048