

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460599

研究課題名(和文) エピジェネティック制御因子EedによるT細胞機能制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of T cell function by the epigenetic factor Eed

研究代表者

内藤 拓 (NAITO, Taku)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：10568728

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)：DNA配列の変化を伴わない遺伝子発現状態の安定的制御(エピジェネティックな制御)による免疫T細胞機能の制御について研究した。エピジェネティック制御の一つであるヒストンH3のメチル化に必要なEed遺伝子をT細胞特異的に欠損させたところ、腸管に存在するIELと呼ばれるT細胞の一部に特有なタンパク質群が、サイトカインであるTGFβの刺激によりCD4陽性T細胞において顕著に誘導されることが明らかとなった。また腸に付随するリンパ節のリンパ球数も増加した。これらのことからT細胞においてエピジェネティックな制御が、腸管免疫系の恒常性維持に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The role of epigenetic regulation, which establishes and maintains semi-stable gene expression pattern without changes in DNA sequence, in T cell differentiation and function was investigated. When Eed, a gene encoding epigenetic factor involved in histone H3 methylation, was deleted specifically in T cells, proteins associated with a subset of gut IEL (intraepithelial lymphocytes) were highly induced by TGFβ stimulation in CD4+ T cells. Moreover, the lymphocyte number in gut-affiliated lymphnode increased significantly. These results indicated that epigenetic regulation in T cells is involved in the homeostasis of gut immune system.

研究分野：免疫学

キーワード：エピジェネティクス Eed IEL TGF PRC2

1. 研究開始当初の背景

免疫系を含むすべての細胞の分化や機能発現は遺伝子発現プログラムの変化を伴うが、その根底には転写因子の発現や機能の変化と、それに伴うエピジェネティックな遺伝子発現制御機構（以下制御機構）の再編成がある。また遺伝子発現プログラムの安定的な維持にもエピジェネティックな制御機構は重要な役割を果たしている。近年エピジェネティックな制御機構の機能解析が精力的に行われており、初期分化についてはES細胞を中心にかなり研究が進んでいる。しかしそれと比較すると研究開始当初はT細胞の分化/機能を含む獲得免疫におけるエピジェネティックな制御の役割はまだ多くの部分が解明されていなかった。

エピジェネティックな制御機構においてヒストン修飾は重要な役割を果たしている。とりわけ遺伝子発現抑制に関与するトリメチル化 H3K27 (H3K27me3) は、クロマチン状態を検討する際の指標としても用いられる重要な修飾であり、初期分化に必須であることが明らかとなっている。ポリコーム転写調節複合体の一つである PRC2 は H3K27 をジ/トリメチル化 (H3K27me2/3) することが知られており、Ezh1/2 を触媒サブユニットとして含む。また Eed、Suz12 の各サブユニットはそれぞれ PRC2 の活性化、およびヒストンへの結合に必要であり、いずれのサブユニットを欠いても PRC2 のヒストンメチル化活性は消失する。H3K27me3 はもう一つのポリコーム複合体である PRC1 をリクルートすることも知られており、PRC1 と PRC2 は部分的に協調して遺伝子発現調節を行っていると考えられる。

研究代表者はこれまでにT細胞の正常な分化や機能に必須の転写因子である Ikaros の分子生物学的な解析を行ってきた。Ikaros によるT細胞の分化制御、およびリンパ腫抑制の分子機構を明らかにするため、ゲノムワイドな遺伝子発現解析と ChIP-seq を組み合わせた解析を行った。その結果 Ikaros はクロマチン構造変換因子である Mi-2 の染色体上の局在を限定し、またその活性を抑えることでT細胞分化を促し、異常な細胞増殖を抑制していることが明らかとなった。さらに興味深いことに、Ikaros による制御が外れた Mi-2 は標的遺伝子座における H3K27 のメチル化を阻害することが示された。このことは正常な H3K27me3 の分布、あるいは正常な PRC2 の機能がT細胞の正常な分化や機能に必須であることを強く示唆した。

PRC2 については、研究開始当初 H3K27 メチル化を触媒するサブユニットである Ezh2 のT細胞特異的ノックアウトマウスが作成され、解析されていた。胸腺 DN ステージではたらく Lck-Cre を用いたノックアウトでは、DN から DP ステージへの移行が強く阻害されていた。興味深いことにその原

因は、PRC2 複合体がアクチン重合の制御を介して TCR (T細胞受容体) シグナルを制御していることにあった。また DP ステージでの欠損を起こす CD4-Cre を用いた場合には細胞分化や機能の異常は観察されず、また H3K27me3 レベルにも変化が見られなかった。これは Ezh1 が Ezh2 欠損を補ったためであると考えられていた。したがって当時 PRC2/H3K27me3 の異常がT細胞の成熟や末梢での機能にどのような影響を与えるのかは明らかでなかった。PRC1 のサブユニットのT細胞特異的ノックアウトマウスについてもこれまでに解析がなされ、末梢T細胞におけるサイトカイン産生の異常が報告されていた。しかし PRC1 は PRC2 非依存的な経路でも遺伝子発現制御をしていることが知られており、PRC1 と PRC2 がどの程度共通の経路で機能しているのかについては検討すべき課題として残されていた。以上のことを踏まえると PRC2/H3K27me3 が獲得免疫やT細胞の機能に果たす役割の解明には、新たな研究ツールが必要とされていると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では前述の制約を超えて PRC2/H3K27me3 のT細胞における生理機能を解明するために、(1) PRC2 複合体のサブユニットの一つである Eed を標的とした新規T細胞特異的ノックアウトマウスの解析を行うこととした。Eed はマウスゲノム内にホモログを持たず、Ezh2 ノックアウトで見られた重複分子による補償という問題を避けることができると考えられた。また Eed は PRC2 複合体の形成、機能に必須であるため、ノックアウトにより確実に PRC2 の機能を欠損させることが期待できた。

Eed は核内での H3K27 メチル化以外にも、細胞質において他の PRC2 サブユニットと共にアクチン重合制御を介して TCR シグナルを制御していると考えられており、またインテグリンや TNF によるシグナル伝達との相互作用も報告されていた。このように PRC2 複合体が核質 (nucleoplasm)/細胞質の両方において機能を持つことから、それらの機能を分離するために (2) 核質特異的な条件的 Eed 欠損マウスの作成と解析を試みることにした。

3. 研究の方法

T細胞特異的 Eed 欠損マウスは、プロモーターおよび第1エクソンを LoxP 配列ではさんだアレルをホモにもつ Eed^{fllox/fllox} マウスに胸腺 DN2 ステージから発現する Lck-Cre、もしくは DN4 ステージから発現する CD4-Cre トランスジェニックマウスを交配したものをを用いた。また核質特異的 Eed 欠損マウスを作製するために、Eed が細胞質に保持されるよう核移行シグナルを変異させさらに ERT2 (エストロゲン受容体変異タンパク) と融合さ

せた Eed-ERT2 を作成した。次にこの Eed-ERT2 を LoxP サイトで挟まれた転写終結配列の下流に配置したものを Rosa26 遺伝子座に挿入することで、Cre 組換えタンパク質の発現により条件的に Eed-ERT2 を発現できる系を構築した。最後にこの改変遺伝子を Eed^{flox/flox} と掛け合わせることで、Cre 遺伝子発現により Eed が細胞質に局在するようにした。以上は理研 IMS の谷内一郎グループリーダーの協力の下に作製された。解析はフローサイトメーター、細胞培養、定量的 PCR など を適宜組み合わせて行った。

4. 研究成果

(1) Eed 欠損の T 細胞分化への影響

初期解析として Eed を Lck-Cre、CD4-Cre それぞれと掛け合わせたマウスについて、T 細胞分化を検討した。Lck-Cre による Eed 欠損 (Δ Eed (Lck)) では T 細胞分化は DN-DP の移行期で大きく阻害され、single positive (SP) ステージまで成熟し、末梢に出て行く T 細胞はごくわずかであった。これは Lck-Cre を用いた Ezh2 欠損と同様の表現型であり、TCR シグナル伝達に PRC2 複合体が必要であることを裏付けていると考えられた。また Δ Eed (Lck) の末梢で見られた T 細胞はすべて Eed の欠失を逃れた細胞であった。

一方 CD4-Cre を用いて Eed を欠損させたマウス (以下単に Δ Eed) では DP-SP の移行に若干の阻害が見られた。これも Lck-Cre 同様 TCR シグナル伝達への影響が原因と考えられた。CD4⁺へと分化する OT-II、および CD8⁺へと分化する OT-I トランスジェニックマウスとの掛け合わせでは、OT-II の場合 CD4⁺へと分化するものの割合が減少したのに対して、OT-I の場合は CD8⁺へと分化するものの割合は影響を受けなかった。また通常未熟 T 細胞は胸腺内において自己抗原に反応するなどして強い TCR シグナルを受け取った細胞は細胞死を起こして除去される (ネガティブセレクション) が、一部の細胞はそれにより特定の T 細胞サブセットへの分化が誘導される。このような「アゴニストセレクション」を受けるサブセットとしては Treg (制御性 T 細胞)、iNKT、そして CD8⁺ IEL (腸上皮間リンパ球) が知られている。これらサブセットの胸腺内での分化も検討したところ、全サブセットとも conventional T 細胞と比較してより強く障害されていた。

H3K27me3 は CD4⁺ および CD8⁺ T 細胞を特徴付ける遺伝子を、発現していない細胞系譜において修飾していることが知られているが、末梢の CD4⁺/CD8⁺ の比に大きな差は見られなかった。

(2) CD4 サブセット分化への影響

ナイーブな CD4⁺ T 細胞は抗原刺激時に受け取る サイトカインシグナルにより機能的

に異なるいくつかのサブセットへと分化することが可能であり、代表的なものとして Th1, Th2, Th17, Treg がある。このようなサブセットの分化に Eed が必要であるかを次に検討した。各 Th サブセットへの分化を *in vitro* において TCR 刺激 + サイトカインにより誘導したところ、いくつか興味深い現象が観察された。IL-12 により Th1 へ誘導したところ、 Δ Eed では野生型と比べはるかに高いレベルの IFN γ が産生されるようになった。通常 Th2 誘導時には IFN γ は産生されないが、 Δ Eed ではわずかながら産生が認められた。これらのことは Eed が Th1 サブセットへの分化を抑制していることを示唆している。また Th2 誘導条件下では過剰な IL-10 産生が認められたが、IL-4 に関してはほとんど変わらなかった。これらの表現型はこの時点で発表された Ezh2 ノックアウトの表現型とも一致するものであった。

興味深いことに Δ Eed ナイーブ CD4⁺ T 細胞を TGF β 添加により Treg へと誘導したところ、Treg 特異的な転写因子である Foxp3 とともに、通常は細胞傷害性 T 細胞に発現している CD8 α を過剰に発現した。 Δ Ezh2 のナイーブ CD4⁺ T 細胞でも同様な表現型を示したことから、TGF β 依存的な CD8 α の脱抑制は PRC2 複合体の機能欠損によることが明らかとなった。TGF β はナイーブ CD4⁺ T 細胞の Treg への分化とともに CD4⁺ CD8 α ⁺ 表現型を示す腸上皮間リンパ球 (IEL) の分化にも関与することが知られている。IEL 分化は IFN γ により亢進することが知られている。実際に Δ Eed に TGF β に加え IFN γ を添加したところ、CD8 α ⁺ 細胞の割合が増加したことから、IEL 分化経路の脱抑制である可能性が示唆された。CD4⁺ CD8 α ⁺ IEL の分化には転写因子 ThPOK の発現低下、それに続く転写因子 Runx3 の発現上昇が必要である。実際 TGF β 添加した Δ Eed CD4⁺ T 細胞では野生型と比較して distal promoter 由来の Runx3 転写産物 (dRunx3) が著明に増加していた。このことは dRunx3 過剰発現による Thpok/Runx3 のバランスの乱れが異常な CD8 α の発現上昇につながったことを強く示唆した。Runx 転写因子複合体の関与について検討するため Runx 複合体の必須サブユニットをコードする Cbfb 遺伝子の変異を Δ Eed に掛け合わせたところ、 Δ Eed Δ Cbfb の二重変異細胞では TGF β 依存的な CD8 α の発現上昇が顕著に抑制された。また CD4⁺ CD8 α ⁺ IEL の分化には T-bet の関与も報告されているため、ドミナントネガティブ (DN) 型 T-bet の導入の効果についても検討したところ、DN-Tbet の導入でも TGF β 依存的な CD8 α 発現上昇が抑制された。上記の知見は Eed が IEL 分化経路の抑制に働いていることを明らかにした。実際の TGF β 応答における上記の知見の妥当性について検討するため、野生型細胞を TGF β 処理して経時的な遺伝子発現変化を

解析した。Eed遺伝子はT細胞活性化後一時的に発現レベルが2倍ほどに上昇するが、2日目以降はTGFβ未処理細胞と比較して半分ほどに低下することが明らかとなった。このことはPRC2複合体の機能抑制がCD4⁺T細胞のTGFβ応答において重要であることが示唆された。またOVA抗原特異的なTCR (OT-II) をもつ野生型またはΔEedのCD4⁺T細胞を養子移入しOVA経口投与によりTGFβ 依存的なTreg分化を誘導したところ、予備的な結果ではΔEed OT-IIではWT OT-IIと比較してCD8⁺を発現する細胞が多く見られたことから、in vivoでもin vitro同様にCD4⁺ CD8⁺ T細胞の分化亢進が起きることが示唆された。

CD4⁺ CD8αα⁺ IELとTregはともに腸管免疫系を構成する細胞であり、TGFβ依存的に分化する。上記のデータはEedがTGFβ受容に際したCD4⁺T細胞の運命決定においてIEL分化経路を抑制していることを示している。これらのデータは現在論文投稿準備中である。ΔEedにおいては腸間膜リンパ節の細胞数が野生型と比較して約2倍に増加していた。細胞表面マーカーの解析からはリンパ球の活性化は亢進していないことから、樹状細胞によるリンパ球誘引が考えられた。IELによる腸上皮層の恒常性維持の異常による可能性があり、現在さらに検討を進めている。

TGFβは腸管免疫を統合する上でキーとなる役割を果たしており、本研究によりEedがその詳細な応答を制御していることが示された。どのようなシグナルがEed・PRC2 をどのように制御することによりTreg分化を抑制しつつIELへと誘導するかの詳細については今後の課題である。

(3) 核質特異的Eed変異マウスの解析
Eedはβ7インテグリンの細胞質ドメインと相互作用することが報告されている。またEedを含むPRC2複合体は細胞骨格を制御することも示唆されていた。上記の両者ともT細胞の機能に重要な役割を果たしている。したがってT細胞におけるH3K27me3の役割を詳細に解析するためには、PRC2機能を細胞質、あるいは核質特異的に不活性化する必要がある。そこで代表者は核質特異的にEedを不活性化する系を構築した(「3. 研究の方法」参照)。このような変異マウス(以下Eed^{Δnuc})では、期待通り末梢T細胞においてH3K27me3の顕著な減少が見られた。またΔEed(Lck)では顕著なDN-DP移行の阻害が見られるが、Lck-Cre誘導によるEed^{Δnuc}ではこの阻害が緩和されたことから、細胞質におけるEed機能は期待通り保持されていることが示唆された。興味深いことにCD4-Cre誘導によるEed^{Δnuc}ではアゴニストセレクションを受けるサブセット、とりわけiNKTとCD8⁺ IELの前駆細胞が野生型と比較して増加していた。ただしその細胞表面マーカーに

よる表現型は野生型の同じサブセットとは若干異なるものであった。

抗CD3 /抗CD28抗体による活性化の効率は、細胞分裂を指標にした場合ΔEedとEed^{Δnuc}では大きな差が見られず、野生型と比較して若干効率が悪かった。従来のPRC2複合体ノックアウトでは細胞質と核内でのイベントを区別できなかったが、本実験系ではこれらを分けて解析できる可能性が示された。

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 6 件)

Tsuchiya Y, Naito T, Tenno M, Maruyama M, Koseki H, Taniuchi I, Naoe Y. (2016) ThPOK represses CXXC5, which induces methylation of histone H3 lysine 9 in Cd40lg promoter by association with SUV39H1: implications in repression of CD40L expression in CD8⁺ cytotoxic T cells. *J Leukoc Biol.* pii: jlb.1A0915-396RR. [Epub ahead of print] 査読有り

Kondo M, Tanaka Y, Kuwabara T, Naito T, Kohwi-Shigematsu T, Watanabe A. (2016) SATB1 Plays a Critical Role in Establishment of Immune Tolerance. *J Immunol.* 196:563-72. doi: 10.4049/jimmunol.1501429 査読有り

Mishima Y, Wang C, Miyagi S, Saraya A, Hosokawa H, Mochizuki-Kashio M, Nakajima-Takagi Y, Koide S, Negishi M, Sashida G, Naito T, Ishikura T, Onodera A, Nakayama T, Tenen D, Yamaguchi N, Koseki H, Taniuchi I, Iwama A. (2014) Histone acetylation mediated by Brd1 is crucial for Cd8 gene activation during early thymocyte development. *Nature Commun.* 5:5872. doi: 10.1038/ncomms6872. 査読有り

Naito T (2014) Epigenetics in T-cell development and function. *Advances Neuroimmune Biol.* 5: 161-170 査読有り

Yoshida T, Landhuis E, Dose M, Hazan I, Zhang J, Naito T, Jackson AF, Wu J, Perotti EA, Kaufmann C, Gounari F, Morgan BA, Georgopoulos K. (2013) Transcriptional regulation of the Ikzf1 locus. *Blood.* 122: 3149-59. doi: 10.1182/blood-2013-01-474916. 査読有り

Tanaka H*, Naito T*, Muroi S, Seo W, Chihara R, Miyamoto C, Kominami R, Taniuchi I. (2013) Epigenetic Thpok silencing limits the time window to choose helper-lineage fate in the thymus. EMBO J. 32: 1183-94 doi: 10.1038/emboj.2013.47. (* equal contribution) 査読有り

[学会発表](計 6 件)

Taku Naito, Yuriko Tanaka, Ichiro Taniuchi, Motonari Kondo 「Role of Eed in TGFb-induced Th subset differentiation」第44回日本免疫学会学術集会、2015/11/19、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Yukihide Matsui, Taku Naito, Yuriko Tanaka, Motonari Kondo 「Eed affects the differentiation of CD8aa+ TCRab+ intraepithelial lymphocytes」第44回日本免疫学会学術集会、2015/11/20、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Yasushi Akiba, Taku Kuwabara, Yuriko Tanaka, Taku Naito, Motonari Kondo 「Nuclear protein SATB1 is required for development of experimental autoimmune encephalomyelitis」第44回日本免疫学会学術集会、2015/11/19、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Taku Naito, Sawako Muroi, Ichiro Taniuchi, Motonari Kondo 「Role of Eed in T-cell lineage decision and maintenance」第43回日本免疫学会学術集会、2014/12/10、京都国際会議場(京都市)

Taku Kuwabara, Yasushi Akiba, Yuriko Tanaka, Taku Naito, Motonari Kondo 「SATB1 is required for development of experimental autoimmune encephalomyelitis」第43回日本免疫学会学術集会、2014/12/10、京都国際会議場(京都市)

内藤拓、室井佐和子、近藤元就、谷内一郎 「EedのT細胞分化および機能における役割」第42回日本免疫学会学術集会、2013/12/11、幕張メッセ(千葉県千葉市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 拓 (NAITO, Taku)
東邦大学・医学部・講師
研究者番号：10568728