

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670232

研究課題名(和文) 活性化T細胞運命決定の普遍的分子機構の解明

研究課題名(英文) The study to clarify the molecular mechanism of fate decision of activated CD4 T cells

研究代表者

山下 政克 (Yamashita, Masakatsu)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00311605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Meninは、CD4 T細胞、CD8 T細胞の両方においてメモリーT細胞数を維持するために必要であった。さらに、in vitroでT細胞抗原受容体(TCR刺激)し、IL-2を加えて培養したMenin欠損T細胞は、細胞老化が誘導されることが明らかとなった。また、Menin欠損CD4 T細胞では、Th1やTh2細胞分化は亢進するが、Th17やiTreg細胞分化は低下した。これらの原因の一端は、転写抑制因子Bach2の発現低下にあることが示された。以上の結果から、本申請研究によりMenin-Bach2経路は、T細胞免疫系において重要な役割を担っていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that Menin plays a critical role in the fate decision of activated T cells. Menin was required for the memory CD4 and CD8 T cell generation. Furthermore, TCR/IL-2-mediated activation of Menin-deficient T cells in vitro resulted in the premature cellular senescence. Menin-deficient naive CD4 T cells preferentially differentiated into Th1 and Th2 cells in vitro, whereas Th17 cell differentiation was impaired. The phenotypes observed in the Menin-deficient T cells were partially mediated by the reduced expression of Bach2. Therefore, the Menin-Bach2 pathway plays an important role in the regulation T cell-mediated immune responses.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫 T細胞 分化 老化 記憶

1. 研究開始当初の背景

獲得免疫において、活性化 T 細胞の機能(サブセット)分化と免疫記憶形成は、2つの大きな柱であり、多くの研究者がそれぞれの分子機構の解明を目的とした研究を行ってきた。その結果、Th 細胞サブセットには、Th1 や Th2 だけでなく、Th9 や Th17、Tfh などが存在すること、メモリー T 細胞は、セントラルメモリー(Tcm) とエフェクターメモリー(Tem)の少なくとも二つのサブセットに分けられることなどが示されてきた。しかしながら、Th 細胞サブセットの分化とメモリー T 細胞分化は、ともに抗原刺激を受け T 細胞が活性化を受けた後に誘導されるにも関わらず、この二つの T 細胞分化系の相互関係について理解し、T 細胞活性化後の運命決定の普遍的な原理を解明しようとする研究はほとんど行われていない。本申請研究は、Th 細胞サブセット分化とメモリー T 細胞分化の関係を Menin-Bach2 経路の活性化レベルを指標にして解析することで、活性化 T 細胞運命決定の普遍的な分子機構を解明し、新規理論の提唱を目指すものである。申請者は、末梢 CD4 T (Th) 細胞の活性化と機能分化、分化後の細胞における機能維持機構(メモリー CD4 T 細胞維持機構)について一貫して研究を行ってきた。また、最近では、メモリー Th 細胞分化と炎症性疾患発症の関連について、主にエピジェネティクス的手法を用いて解析し、世界に先駆けた研究成果を発表してきた (Kawahara et al. *Nat. Immunol.* 2012, Tofukuji et al. *J. Immunol.* 2012, Endo et al. *Immunity* 2011, Onodera et al. *J. Exp. Med.* 2010)。

2. 研究の目的

獲得免疫において必須の機能である免疫記憶は、メモリー T 細胞によって担われている。一方、獲得免疫反応の多様性は、ヘルパー T (Th) 細胞サブセットの多様性により担保されている。メモリー T 細胞や Th 細胞サブセットの分化メカニズムについては、これまで多くの研究が個々の分野の研究として細分化されておこなわれてきた。つまり、これら二つの異なった分化系の関連性を明らかにし、活性化 T 細胞運命決定の普遍的な(共通の)分子機構解明を目指した研究は、ほとんど行われていない。本申請は、これまで個々に論じられてきた Th 細胞サブセット分化とメモリー T 細胞分化の関係を明らかにし、二つの分化経路につ

いて統合的に理解することで、活性化 T 細胞の運命決定機構の全体像の解明を試みる。

3. 研究の方法

本申請では、以下の3つテーマを中心に解析を行う。1、Menin-Bach2 経路によるメモリー T 細胞分化制御：メモリー T 細胞分化に關与する Menin-Bach2 経路下流遺伝子を同定するとともに、そのエピジェネティックな制御機構を明らかにする。2、Th 細胞サブセット分化における Menin-Bach2 経路の役割解明：Bach2 の発現量変動を介した Th 細胞サブセット分化制御機構を明らかにする。3、Th 細胞サブセット分化とメモリー T 細胞分化への細胞老化の關与：T 細胞運命決定への T 細胞老化の關与を、Menin-Bach2 経路をハブにした研究で明らかにする。また、テーマ1~3の結果をバイオインフォマティクスにより統合することで、Menin-Bach2 経路と T 細胞運命決定の全容を解明し、新しい活性化 T 細胞運命決定に関する理論の提唱を行う。

4. 研究成果

項目 1、Menin-Bach2 経路によるメモリー T 細胞分化制御

当初の計画では、CD4 T 細胞を用いてメモリー T 細胞研究をおこなう予定であった。しかしながら、CD4 T 細胞においてヘルパー T (Th) 細胞のサブセット分化とメモリー T 細胞分化は複雑に影響しあっていることが解析を困難にした。そこで、まず、CD8 T 細胞を用いて Menin-Bach2 経路のメモリー T 細胞分化における役割を明らかにすることにした。マウスリステリア感染モデルにおいて Menin 欠損 CD8 T 細胞は、正常に抗原に反応して、増殖をはじめた。しかし、感染5日目において増殖が低下するとともに、一部の細胞に細胞死が誘導された(図1)。

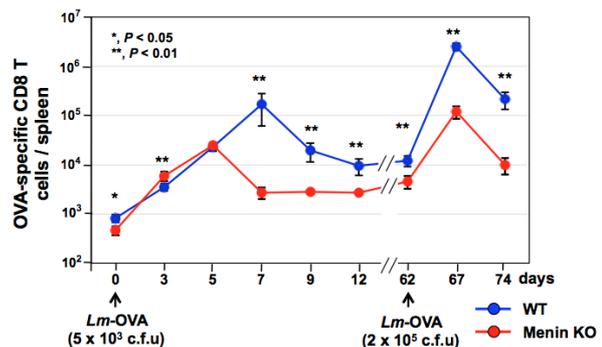


図1 リステリア感染後の抗原特異的 CD8 T 細胞数の変化(野生型:WT、T細胞特異的 Menin 欠損(Menin-floxed x CD4-Cre トランスジェニックマウス: Men KO)

その原因を探るため、DNA マイクロアレイ解析を行なったところ、Menin 欠損 CD8 T 細胞において転写抑制因子 Blimp1 の著しい発現

上昇が確認された。これまでに、Blimp1 の発現量の上昇は、short-lived エフェクター CD8 T 細胞分化を促進し、メモリー前駆細胞の分化を抑制することが報告されている。また、Blimp1 の発現上昇は Bach2 欠損エフェクター CD8 T 細胞でも認められたことから、Blimp1 は、Menin-Bach2 経路の下流に位置し、メモリー CD8 T 細胞分化を負に制御していると考えられた。現在は、T 細胞特異的 Menin/Blimp1 欠損マウスを作製し、更なる解析を進めている。(論文投稿準備中)

項目 2、Th 細胞サブセット分化における Menin-Bach2 経路の役割解明

申請者らは、Menin 欠損 CD4 T 細胞の Th サブセット分化能について *in vitro* 培養系を用いて解析し、図 2 に示す結果を得た。

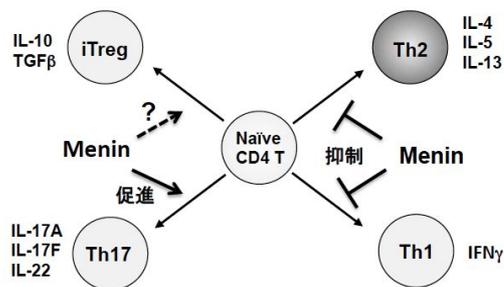


図 2 ヘルパー T 細胞サブセット分化における腫瘍抑制因子 Menin の役割

具体的には、Menin は Th1 や Th2 細胞分化を抑制している一方で、Th17 分化を促進していることが分かった。さらに、iTreg の分化に対しても抑制的に働きうる可能性も示唆されている。

次に、Menin 下流の分子として私たちが同定した Bach2 の T 細胞特異的欠損マウス (Bach2-floxed x CD4-Cre トランスジェニックマウス: Bach2 KO) を作製して解析したところ、Bach2 欠損 CD4 T 細胞において著しい Th2 細胞分化の亢進が認められた。(発表論文)

項目 3、Th 細胞サブセット分化とメモリー T 細胞分化への細胞老化の関与

申請者らは、Menin 欠損 CD4 T 細胞では、コントロールの野生型 CD4 T 細胞に比べ、*in vitro* で活性化後のごく早期に細胞老化が誘導されることを見いだした。さらに、Menin 欠損マウスを卵白アルブミンで免疫した場合、1 次応答は誘導されるが、2 次応答はほとんど誘導されないことも分かった。この結果は、Menin が CD4 T 細胞の免疫記憶形成に関与している可能性を示唆している。

また、老化した細胞は Senescence-associated secretory phenotype (SASP) と呼ばれる形質を示し、炎症性因子を高発現、分泌することが知られている。SASP は、加齢に伴う前炎症状態の形成

に (炎症のおきやすさ) に関与していることが分かっているが、誘導機構に関しては解明が遅れている。申請者らの今回の解析結果から、少なくとも CD4 T 細胞において SASP 誘導は Menin によって抑制されていることが明らかとなった (図 3)。(発表論文) Menin は、T 細胞だけでなく様々な細胞に普遍的に存在している分子であることから、T 細胞以外の細胞での SASP 制御における Menin の役割解析は興味深く、今後の課題である。

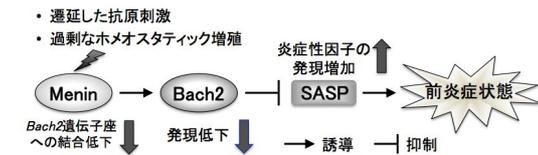


図 3 Menin-Bach2 経路による SASP の制御

本申請研究から、腫瘍抑制因子 Menin は、メモリー T 細胞分化、Th サブセット分化、T 細胞老化を統合して制御している可能性が明らかとなってきた。今後は、Menin の作用メカニズムの詳細をさらに解析することで、活性化 T 細胞運命決定の普遍的な分子機構解明できると考えている。

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 3 件)

Kuwahara M, Suzuki J, Tofukuji S, Yamada T, Kanoh M, Matsumoto A, Maruyama S, Kometani K, Kurosaki T, Ohara O, Nakayama T and Yamashita M: Menin-Bach2 axis is critical for regulating CD4 T-cell senescence and cytokine homeostasis. *Nat. Commun.* 5: 3555 (2014) 査読有

Tanaka S, Suto A, Iwamoto T, Kashiwakuma D, Kagami SI, Suzuki K, Takatori H, Tamachi T, Hirose K, Onodera A, Suzuki J, Ohara O, Yamashita M, Nakayama T and Nakajima H.: Sox5 and c-Maf cooperatively induce Th17 cell differentiation via ROR γ t induction as downstream targets of Stat3. *J. Exp. Med.* pii: jem.20130791 (2014) 査読有

Nojima A, Yamashita M, Yoshida Y, Shimizu I, Ichimiya H, Kamimura N, Kobayashi Y, Ohta S, Ishii N and Minamino T.: Haploinsufficiency of Akt1 prolongs the life span of mice. *PLoS ONE* 8: e69178 (2013) 査読有

[学会発表](計 6 件)

Yamada Takeshi, Kanoh Makoto, Matsumoto Akira, Yasuoka Toshiaki, Suzuki Junpei,

Kuwahara Makoto, Yamashita Masakatsu.: Menin plays a critical role in the expansion and maintenance of antigen-specific CD8+ T cells upon infection. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Kyoto, 京都国際会議場 (京都府京都市)、2014.12.10-12.

Izumoto Maya, Kuwahara Makoto, Kiyoi Takeshi, Shinoda Kenta, Nakayama Toshinori, Kurosaki Tomohiro, Yamashita Masakatsu.: Bach2-Blimp1 axis plays an important role in the regulation of allergic airway inflammation. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Kyoto, 京都国際会議場 (京都府京都市) 2014.12.10-12.

Kuwahara Makoto, Ochi Mizuki, Kiyoi Takeshi, Kurosaki Tomohiro, Yamashita Masakatsu.: Bach2 controls Th2 cell-mediated immune responses through regulation of glutaminolysis. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Kyoto, 京都国際会議場 (京都府京都市) 2014.12.10-12.

桑原誠、篠田健太、米谷耕平、黒崎智博、中山俊憲、山下政克 転写抑制因子 Bach2 によるヘルパーT細胞サブセット分化とアレレギー性気道炎症の制御 第24回 KTCC 学術集会、京都平安ホテル (京都府京都市) 2014.5.16-17.

Kuwahara Makoto, Yamada Takeshi, Nakayama Toshinori, Yamashita Masakatsu: Menin inhibits transcriptional programs that promote CD4 T cell senescence and Th1/Th2 differentiation. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Chiba, 幕張メッセ (千葉県千葉市)、2013.12.11-13.

Makoto Kuwahara, Toshinori Nakayama, Msakatsu Yamashita.: Critical role of Menin in the regulation of CD4 T cell terminal differentiation and senescence. The 6th International Workshop of Kyoto T cell conference, Kyoto, 京都大学芝蘭会館 (京都府京都市) 2013.6.3-7.

〔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 件)

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

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/immunology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 政克 (Yamashita, Masakatsu)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00311605

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

小原 収 (Ohara Osamu)
公益財団法人かずさDNA研究所・副所長、
技術開発研究部・部長
研究者番号：20370926