

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860351

研究課題名(和文)ポリコム/トライソラックス複合体による免疫細胞記憶制御機構の解明

研究課題名(英文)Polycomb and Trithorax complexes control epigenetic memory of T helper cells

研究代表者

小野寺 淳 (ONODERA, Atsushi)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10586598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：国民の多くが罹患するアレルギー疾患は、免疫系のアンバランスが原因の一端であり、その対策は急務である。特にヘルパーT細胞(Th)はアレルギー発症および生体防御の両面で重要な役割を果たす。我々は、Th細胞の機能がポリコ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し、空間的相互作用することで調節されることを提唱している。本研究は、ポリコム分子Ezh2がアレルギー発症のブレーキ役を担うこと、並びにトライソラックス分子Meninがステロイド抵抗性喘息発症の鍵となることを見出した。今後は、これらの研究成果のアレルギー疾患治療への応用の可能性を模索したい。

研究成果の概要(英文)：One-thirds of Japanese suffer from allergies, which are caused by imbalances in the immune system. We focus on helper T (Th) cells because they are thought to play important roles both in development of the allergic diseases and host defense against pathogens. Polycomb and Trithorax proteins regulate Th cell function via binding to specific genes, and we propose that their spatial interplay is crucial for regulating target gene transcription. In this study, we investigated the roles of Ezh2, one of the Polycomb group proteins, and demonstrated that it functions to prevent unwanted immune responses. We also clarified the roles of Menin, one of the Trithorax group proteins, in the pathogenesis of steroid-resistant asthma. We hope that these findings will be applied to the development of therapies for allergic disease.

研究分野：医歯薬学

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

免疫記憶は免疫学の根幹をなす概念である。しかしながら、“免疫記憶は免疫系独自の機能であり免疫系特異的な機構によって成り立っている”という固定観念が根強く残っており、分子基盤の解明が進んでいなかったのも事実である。非免疫系と共通する“細胞記憶”即ち“epigenetic”の概念は、免疫記憶の機構を解き明かす上で最も重要なものの一つであるが、免疫学の機能面から研究されることはこれまでにほとんどなかった。ES細胞を含めた多くの体細胞において、epigeneticな制御因子であるポリコーム群(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(Nakayama et al., *Semin. Immunol.*)。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。我々の以前の研究で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ていた(Onodera et al., *J. Exp. Med.*)。

また、我々は最新のepigenetic研究の手法であるChIP-seq法を用いて、Th2細胞分化のマスター転写因子GATA3の標的遺伝子の網羅的解析に成功した(Horiuchi et al., *J. Immunol.*)。これにより、従来考えられていたTh2細胞分化のモデルを作り替えるような発見があった。ChIP-seq法による初めての研究はヒトのCD4 T細胞を用いて行われており(Barski et al., *Cell*)、当時から免疫分野はゲノム規模での研究が比較的進んだ分野であった。国内においては、我々のグループがいち早くChIP-seq解析をスタートさせて上記2報の論文を発表し、epigenetic研究をリードしてきた。しかし、ChIP-seq法の急速な普及と相まって、

その関連論文数は現在に至るまでも飛躍的に伸びている。

初期の頃は、DNA結合タンパク質の標的遺伝子を網羅的に解析するだけでインパクトのある論文になっていたが、最近では単にそれにとどまらずより高度なものを要求される方向に変わりつつある。当時発表された論文(Ram et al., *Cell*)においても、高度な解析技術が用いられており、独自の解析アルゴリズムの確立が急務であった。さらには、genome-wide解析の結果を、個々の遺伝子発現解析や生体内での機能解析に応用していく研究が不可欠となっていた。そこで我々はCD4 T細胞でのPcG/TrxGのgenome-wide解析を完遂させ、それらの細胞内、生体内での役割を明らかにし、アレルギー疾患治療法開発への基盤作りを目的として研究を行った。

2. 研究の目的

我々は免疫記憶機構を細胞記憶即ちepigeneticな観点から研究し、ポリコーム群(PcG)およびトライソラックス群(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、Th細胞でのPcG/TrxG結合のgenome-wide解析を完遂させ、その結果に基づき個々の遺伝子発現制御機構を明らかにすることを目的とした。特に、PcG/TrxG欠損マウスを用いた解析で生体内での役割の解明を中心として進めた。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と最終目標を見据えて基礎的な研究を行うと共に、アレルギー疾患治療への応用の可能性も模索した。

3. 研究の方法

(1)PcG/TrxG複合体の結合領域のgenome-wide解析

ヒストン修飾やPcG/TrxGのように“broad”なパターンを示すChIP-seqの解析は、

現在でも定型の方法がなく非常に難易度が高い。我々は PcG/TrxG などの DNA 結合タンパク質の結合の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、これを用いた解析を行った。これらに加えて、結合のパターンを判定する指標となる 2 種類の“Index”を新たに考案した。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”、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、リンパ球系(B細胞と CD4 T細胞)と ES細胞を用いた PcG/TrxG 複合体の ChIP-seq 解析を行い、結合領域の特徴を明らかにしようと試みた。

(2) Menin 欠損マウスを用いた解析

我々は以前の研究で、トライソックス複合体に含まれる Menin を欠損した場合、Th2 細胞としての機能が維持できなくなることを見出した。また、Menin 欠損 Th17 細胞は IL-17A の産生が低下することも分かっていた。最新の知見で、気管支喘息では Th2 と Th17 の両方が病態に関わるとされ、Menin は病態の形成に大きく関与し、将来的には喘息治療に結びつくと考え、具体的には以下の項目の実験を行った。

Menin 標的遺伝子の time course 解析

我々は 32 個の Th2 特異的遺伝子を同定しており、これらの発現が Menin 欠損によってどのように変化するか *in vitro*, *in vivo* で時系列を設定して qPCR で解析した。解析の一部にデジタル PCR を使用した。さらには、RNA-seq で野生型と欠損型の Th2 細胞の遺伝子発現プロファイルを作成した。

Menin 欠損 Th2 および Th17 細胞に移入による喘息モデルマウスの解析

当研究室で確立されている喘息モデルマウスの系を用いて、Menin のアレルギー性気道炎症への関与について検討を行った。

(3) Ezh2 欠損マウスを用いた解析

我々は Ezh2 と Menin の両方が結合する co-occupied gene において、Ezh2 欠損に感受性の高い遺伝子群の特徴を見出していた。これらの感受性遺伝子に焦点を当て、その脱抑制が細胞形質の変化にどのように関わるかについて、Ezh2 欠損マウスや薬剤を用いて解析を行った。

(4) PcG/TrxG 複合体標的遺伝子上での RNAPII 結合およびリン酸化の動態解析

Epigenetic な制御を受ける遺伝子の最終的なアウトプットは転写の On/Off である。従って、我々は RNAPII の挙動に着目してその動的変化の解析を、Th2 細胞の TCR 刺激前後の比較によって試みた。ChIP-seq とマイクロアレイのデータは取得済みであるので、まずは様々な Th サブセットの TCR 刺激前後の変化を RNA-seq で解析した。その後は対象遺伝子の分類と絞り込みを行い、qPCR による発現解析や薬剤に対する感受性等を調べた。

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

ES 細胞においては、H3K27me3 と H3K4me3 の両方ヒストン修飾を持つ bivalent 遺伝子が報告され多数の研究例があるが、PcG 複合体と TrxG 複合体の両方の標的となる co-occupied 遺伝子についてはほとんど研究されていない。本研究の結果、未分化の ES 細胞と終末分化した CD4 T 細胞では両者の結合パターンの特徴が異なることが分かった。Ezh2 (PcG の一種) と Menin (TrxG の一種) の両方の標的となる co-occupied 遺伝子の数は ES 細胞で多く、T 細胞で少ない。また、いずれの細胞においても両者の結合レベルは互いに相反する。ES

細胞での co-occupied 遺伝子では Ezh2 と Menin が同じ位置に結合して転写は poised 状態になっているのに対し、T 細胞での co-occupied 遺伝子は多様性を示す。TSS の上流に抑制性の Ezh2、下流に活性型の Menin が結合すれば転写レベルは高く、逆に TSS の下流に Ezh2、上流に Menin の結合が見られれば転写レベルは低いことが分かった。このような DNA 結合タンパクの空間的位置と機能との関連についての先行研究はほとんどなく、我々の得た知見は非常に有用であると考えている(Onodera et al., *TMM*)。

(2) Menin 欠損マウスを用いた解析

Menin 標的遺伝子の time course 解析

RNA-seq の結果、Menin は遺伝子発現誘導(欠損型で約 100 遺伝子の発現が低下)よりも遺伝子発現維持(欠損型で約 1000 遺伝子の発現が低下)に対する寄与が大きいことが分かった。また Menin は *Gata3* の高発現の維持を介して、多くの遺伝子発現を制御することも分かり、論文発表した(Sasaki et al., *PLOS ONE*)。

Menin 欠損 Th2 および Th17 細胞に移入による喘息モデルマウスの解析

野生型 Th17 細胞を移入したマウスの気道炎症モデルで見られた好中球の浸潤は、Menin を欠損させると起こらなくなった。また、ステロイド抵抗性喘息モデルを用いると、野生型マウスでは IL-17A による好中球性の炎症が起こるが、Menin 欠損型ではこれが観察されないことも分かった(図1)以上より Menin は

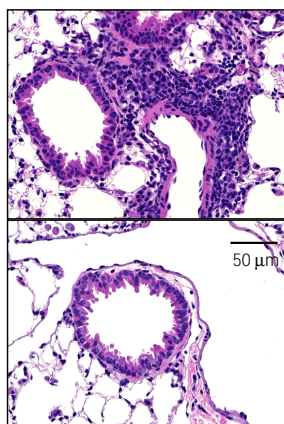


図1. 気道周囲の炎症

Th17 細胞の分化並びにそれらによる気道炎症の病態形成に重要であるとの結論を得て論文発表した(Watanabe et al., *PNAS*)。

(3) Ezh2 欠損マウスを用いた解析

Ezh2 は、*Tbx21* や *Gata3* などの PcG/TrxG 複合体の co-occupied 遺伝子の制御を介して、免疫系の過剰な反応を抑えることが分かった(図2)。

我々は、これを免疫系のブレーキ役として提唱してプレスリリースを行い、その内容は

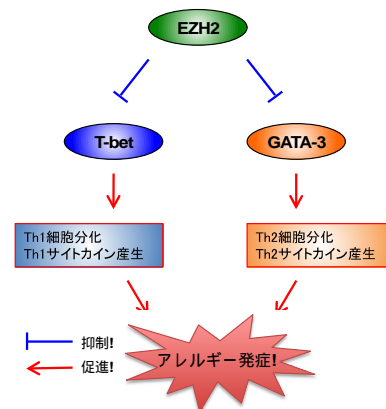


図2. 免疫系のブレーキ機構

NHK ニュースおはよう日本の首都圏版で放送されたことから、非常に意義のある研究成果を挙げることができたと考えている(Tumes et al., *Immunity*)。またヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤 TSA を用いても、Ezh2 欠損と類似した現象を誘導することも見出し、PcG と TrxG 複合体の空間的相互作用の重要性について明らかにした(論文投稿中)。

(4) PcG/TrxG 複合体標的遺伝子上での RNAPII 結合およびリン酸化の動態解析

RNA-seqの結果、TCRの前後で発現変動する多くの遺伝子の同定に成功した。その中で、PcG/TrxG複合体の標的となっている遺伝子の多くは転写因子をコードするものであった。特に *Egr2* 遺伝子はRNAPIIの結合レベルの変動が著しく、ノックダウンすると一部のケモカインの発現の低下が観察されたことから、重要な候補遺伝子として現在リストアップしている。またこれらのTCR依存的な遺伝子の発現にはミトコンドリアの電子伝達系が重要

であることが、薬剤を用いた実験により明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件) 全て査読有

Onodera, A., and Nakayama, T.:

Epigenetics of T cells regulated by Polycomb/Trithorax molecules. *Trends Mol Med*.21(5):330-340. (2015).

DOI:10.1016/j.molmed.2015.03.001.

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. G., Yamaguchi, N., Koseki, H., Taniuchi, I., and Iwama, A.: Histone acetylation mediated by Brd1 is crucial for Cd8 gene activation during early thymocyte development. *Nat Commun*.5:5872. (2014).

DOI:10.1038/ncomms6872

Tanaka, S., Suto, A., Iwamoto, T., Kashiwakuma, D., Kagami, S., 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*. 211(9):1857-1874. (2014).

DOI:10.1084/jem.20130791

Watanabe, Y., **Onodera, A.**, Kanai, U., Ichikawa, T., Obata-Ninomiya, K., Wada, T., Kiuchi, M., Iwamura, C., Tumes, D. J., Shinoda, K., Yagi, R., Motohashi, S., Hirahara, K., and Nakayama, T.: Trithorax complex component Menin controls differentiation and maintenance of T helper 17 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111(35):12829-12834. (2014).

DOI:10.1073/pnas.1321245111

Tumes, D. J., **Onodera, A.**, Suzuki, A., Shinoda, K., Endo, Y., Iwamura, C., Hosokawa, H., Koseki, H., Tokoyoda, K., Suzuki, Y., Motohashi, S., and Nakayama, T.: The polycomb protein Ezh2 regulates differentiation and plasticity of CD4+ T helper type 1 and type 2 cells. *Immunity*39(5): 819-832 (2013).

DOI:10.1016/j.immuni.2013.09.012

Sasaki, T., **Onodera, A.**, Hosokawa, H., Watanabe, Y., Horiuchi, S., Yamashita, J., Tanaka, H., Ogawa, Y., Suzuki, Y., and Nakayama, T.: Genomic-wide gene expression profiling revealed a critical role for GATA3 in the maintenance of the Th2 cell identity. *PLOS ONE*8(6): e66468 (2013).

DOI:10.1371/journal.pone.0066468

〔学会発表〕(計 8 件)

Onodera A and Nakayama T.: Polycomb and Trithorax complexes control epigenetic memory of T helper cells. International Symposium on Genome Science 2015, 2015年1月20日, 一橋講堂(東京都千代田区)

Watanabe Y, **Onodera A**, Ichikawa T, Obata-Ninomiya K, Wada T, Kiuchi M, Morimoto Y, Shinoda K, Yagi R, Motohashi S, Hirahara K and Nakayama T.: The trithorax complex component Menin controls differentiation and maintenance of T helper 17 cells. 第43回日本免疫学会学術集会, 2014年12月12日, 京都国際会館(京都府京都市)

Tanaka S, Suto A, Iwamoto T, Suzuki K, Takatori H, Tamachi T, Hirose K, **Onodera A**, Suzuki J, Ohara O, Yamashita M, Nakayama T, Nakajima H.: Sox5 and c-Maf cooperatively induce Th17 cell

differentiation via ROR γ t induction as downstream targets of Stat3. 第43回日本免疫学会学術集会, 2014年12月12日, 京都国際会館(京都府京都市)

Onodera A and Nakayama T.: Polycomb and Trithorax complexes control epigenetic memory of T helper cells. 第43回日本免疫学会学術集会, 2014年12月12日, 京都国際会館(京都府京都市)

Tumes DJ, **Onodera A**, Hosokawa H, Koseki H, Suzuki Y, Motohashi S and Nakayama T.: The polycomb protein Ezh2 regulates differentiation and plasticity of CD4⁺ T helper type-1 and type-2 cells. 第24回 Kyoto T cell Conference, 2014年5月17日, 京都平安ホテル(京都府京都市)

Onodera, A., Horiuchi, S., Sasaki, T., Hosokawa, H., Watanabe, Y., and Nakayama, T.: Cellular memory of T helper type 2 cells controlled by GATA3 and epigenetic regulators. 第42回日本免疫学会学術集会, 2013年12月11日, 幕張メッセ(千葉県千葉市)

Nakayama, T., Endo, Y., **Onodera, A.**, and Tumes, D. J.: Generation and maintenance of pathogenic memory CD4 T cells. The 3rd CSI/JSI/KAI Joint Symposium on Immunology, 2013年12月2日, POSTECH Biotech Center(慶尚北道浦項市・韓国)

Tumes, D., **Onodera, A.**, Suzuki, A., Shinoda, K., Endo, Y., Iwamura, C., Hosokawa, H., Koseki, H., Tokoyoda, K., Suzuki, Y., and Nakayama, T.: The histone methyltransferase Ezh2 regulates differentiation and plasticity of CD4 T helper cells. AAI Annual Meeting, 2013年5月6日, Hawaii Convention Center (Honolulu, Hawaii)

T.: Springer Berlin Heidelberg, Transcriptional and Epigenetic Mechanisms Regulating Normal and Aberrant Blood Cell Development, 2014, pp 367-382

〔その他〕

千葉大学大学院医学研究院免疫発生学ホームページ

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/meneki/>

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

〔図書〕(計 1件)

Onodera, A., Tumes, D. J., and Nakayama,