

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26293069

研究課題名（和文）転写抑制因子Bach2による慢性アレルギー炎症制御機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of Bach2-mediated regulation of the chronic allergic inflammation

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） 12,300,000円

研究成果の概要（和文）：CD4 T細胞における転写抑制因子Bach2の発現は抗原刺激によって低下し、それがTh2型アレルギー炎症の発症につながることで予想されていたが、そのメカニズムは不明であった。今回、私たちは、Bach2がBatfファミリーの転写因子と複合体を形成してTh2サイトカイン遺伝子の遺伝子座制御領域に存在するAP-1コンセンサスDNA配列に結合し、Th2細胞分化を負に制御することでTh2型アレルギー性気道炎症の発症を抑制している可能性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The expression of Bach2, a transcriptional repressor, in CD4 T cells is reduced by antigenic stimulation. The decreased Bach2 expression is resulted in the onset of Th2-type allergic airway inflammation. However, molecular mechanism by which Bach2 regulates Th2-type airway inflammation. In this study, we found that Bach2 interacts with Batf family transcription factors and binds to the AP-1 consensus DNA motifs at the locus control region of the Th2 cytokine gene locus. Thus, Bach2-Batf complex inhibits Th2 cell differentiation and subsequent Th2-type airway inflammation.

研究分野：免疫学

キーワード：Bach2 Batf Th2 Th2型気道炎症

1. 研究開始当初の背景

申請者は、一貫して末梢 CD4 T 細胞の活性化、機能分化、機能維持機構 (メモリー CD4 T 細胞の分化機構) について一貫して研究をおこなってきた。特に、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の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 (Suzuki et al. *PLoS ONE*. 2013, Kuwahara et al. *Nat. Immunol.* 2012, Tofukuji et al. *J. Immunol.* 2012, Endo et al. *Immunity* 2011, Onodera et al. *J. Exp. Med.* 2010)。これら一連の研究成果を基盤として、申請者らは、腫瘍抑制因子 Menin の欠損 CD4 T 細胞では、メモリー CD4 T 細胞への分化の低下、終末分化型エフェクター CD4 T (特に Th1, Th2) 細胞への分化亢進、および細胞老化に伴った senescence-associated secretory phenotype (SASP) の誘導が起こることをごく最近明らかにした (論文投稿中)。続いて、Menin の下流に位置し、終末分化型エフェクター CD4 T 細胞への分化亢進と SASP の誘導に関与する分子を ChIP-シーケンスと DNA マイクロアレイを用いて検索し、転写抑制因子 Bach2 を同定した。そこで、本研究申請では、この新規知見をさらに発展させ、慢性アレルギー性炎症疾患の新規治療戦略の提唱につなげるため、“転写抑制因子 Bach2 による慢性アレルギー炎症制御機構の解明”をおこないたいと考えた。

転写抑制因子 BACH2 の遺伝子多型は、気管支喘息、関節リウマチ、多発性硬化症、クローン病、セリアック病、尋常性白斑や 1 型糖尿病等、多くの自己免疫疾患・慢性炎症疾患との関連が報告されている。申請者らは、T 細胞特異的 Bach2 欠損マウスにおいて、リンパ球浸潤を伴った慢性好酸球性肺炎が自然発症することを見いだした (論文投稿準備中) (実験計画・方法項目の図 2)。また、ごく最近、全身性の Bach2 欠損マウスで、制御性 T 細胞数の低下とエフェクター CD4 T 細胞

の分化亢進とともに、クローン病様の大腸炎が発症すること (Roychoudhuri et al. *Nature*. 2013)。Bach2 欠損 CD4 T 細胞では、ナイーブ CD4 T 細胞からエフェクター CD4 T 細胞への分化が亢進し、メモリー CD4 T 細胞様の表現系を呈すること (Tsukumo et al. *PNAS*. 2013) が相次いで報告された。しかしながら、Bach2 は単独では DNA 結合できない転写抑制因子であり、T 細胞におけるパートナー分子も同定されておらず、T 細胞における Bach2 の欠損や発現低下がいかんして慢性炎症を誘発するのかについてはほとんど分かっていない。さらに申請者らは、Bach2 の発現が、加齢や過剰な T 細胞の増殖に伴って低下し、前炎症状態の形成に関与することも見いだしているが、Bach2 の発現調節機構の詳細については全く分かっていなかった。

2. 研究の目的

前述の成果を基盤に、本申請研究では、まず、Bach2 の発現調節機構を明らかにし、Bach2 結合分子を同定することで、T 細胞応答・恒常性維持における Bach2 の役割を解明する。次に、慢性アレルギー発症における Bach2 の関与を証明する。

具体的には、以下の 4 項目について検討をおこなう。

Bach2 遺伝子の転写調節機構の解析

申請者らが同定した腫瘍抑制因子 Menin は、Bach2 の発現維持 (エピジェネティック制御) に必要であるが、転写には必須ではない。そこで、T 細胞において Bach2 の転写を誘導する転写活性化因子とシグナル伝達経路の同定をおこなう。

Bach2 結合 (パートナー) 分子の同定

Bach2 は、単独では DNA 結合能を持たず、転写因子等の何らかの DNA 結合タンパク質と複合体を形成して転写調節をおこなうと予想される。そこで、T 細胞における Bach2 結合因子の同定をおこない、作用機構を解明す

る。

Bach2 欠損マウスにおける好酸球性肺炎自然発症の分子機構解明

T 細胞特異的 Bach2 欠損マウスで自然発症する好酸球性肺炎の発症機序を解析することで、慢性炎症の病態形成における Bach2 の関与を明らかにする。

Bach2 欠損マウスを用いた遅延型食物アレルギー誘発自己免疫疾患（セリアック病）モデルの確立

Bach2 の遺伝子多型とセリアック病やクローン病との関連が報告されている。また、全身性の Bach2 欠損マウスでは、クローン病様の大腸炎が発症する。これらのことから、T 細胞特異的 Bach2 欠損マウスを用い、セリアック病マウスモデルが作製を目指す。

3. 研究の方法

Bach2 遺伝子の発現解析は、主に Bach2 発現の低下が顕著に認められる T 細胞特異的 *Menin* 欠損マウス (*Menin*^{flox/flox} x CD4-Cre トランスジェニックマウス) 由来の T 細胞を用いた ChIP 解析により行なう。

Bach2 結合（パートナー）分子の同定は、愛媛大学で開発されたコムギ無細胞タンパク質合成システムとアルファスクリーン法にて行なう。

Bach2 欠損マウスにおける好酸球性肺炎自然発症の分子機構解明は、T 細胞特異的 *Bach2* 欠損マウス (*Bach2*^{lox/flox} x CD4-Cre トランスジェニックマウス) 由来の肺 CD4 T 細胞の解析を中心に行う。

Bach2 欠損マウスを用いた遅延型食物アレルギー誘発自己免疫疾患（セリアック病）モデルの確立は、T 細胞特異的 *Bach2* 欠損マウスに食物抗原として卵白アルブミンを投与して行なう。

4. 研究成果

Bach2 遺伝子の転写調節機構の解析

本申請研究開始直後に、*Bach2* 遺伝子上流

にはスーパーエンハンサーが存在し、その遺伝子領域が *Bach2* の発現制御に関与していること、*Bach2* 遺伝子のスーパーエンハンサーは CD4 T 細胞特異的なスーパーエンハンサー群の最も上流に位置しており、他のスーパーエンハンサーの活性を制御することで CD4 T 細胞のアイデンティティを維持している可能性が報告された。申請者らは、この *Bach2* 上流のスーパーエンハンサー活性の維持に腫瘍抑制因子 *Menin* が必要であることを見だし、そのメカニズムについて解析を進めている。

Bach2 のパートナー分子同定に関する研究

コムギ無細胞タンパク質合成システムとアルファスクリーン法により同定した *Batf* と *Bach2* の相互作用によるアレルギー炎症の制御について解析を進めた。その結果、*Bach2*/*Batf* 複合体は、*Bach2*/*Irf4* 複合体と競合的に AP-1 配列に結合して、転写を抑制することが分かった。*Bach2*/*Batf* 複合体の標的として、Th2 サイトカイン遺伝子座の locus control region だけでなく、*Batf* や *Batf3* 遺伝子を同定した。さらに、IL-4 が *Batf* や *Irf4* の発現を維持するだけでなく、*Bach2* の発現を低下させる作用を持つことを見いだした。これらの結果は、*Bach2* の発現が低下することで IL-4 と *Batf*/*Irf4* 複合体がポジティブフィードバックループを形成し、アレルギー炎症の慢性化を誘導する可能性を示唆している (Kuwahara et al. *Nat. Commun.* 2016)。

Bach2 欠損マウスにおける好酸球性肺炎自然発症の分子機構解明

Bach2 欠損マウスの肺 CD4 T 細胞で、IL-33 受容体が高発現していることを見いだした。IL-33 受容体 α 鎖は、*Il1rl1* 遺伝子でコードされているが、*Bach2* は *Il1rl1* 遺伝子の 5' 上流領域に結合し、ヒストン H3K27 のアセチル化の抑制を介して *Il1rl1* の転写を負に制御している可能性が示唆された。*Il1rl1* 遺伝子は、多くのアレルギー疾患との関連が GWAS 解

析で示されていることから、Bach2 欠損マウスにおける好酸球性肺炎自然発症に IL-33 受容体の発現亢進が関与している可能性が高い。現在、抗 IL-33 受容体抗体投与の Bach2 欠損マウスにおける好酸球性肺炎自然発症に対する作用について検討している（論文投稿中）。

Bach2 欠損マウスを用いた遅延型食物アレルギー誘発自己免疫疾患（セリアック病）モデルの確立

当初に計画した T 細胞特異的 Bach2 欠損マウスを用いた慢性食物アレルギーの確立に関しては、卵白アルブミン抗原に対する食物アレルギーの発症が上手く誘導できず、残念ながらモデルを確立することが出来なかった。

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 2 件)

Kuwahara M., Ise W., Ochi M., Suzuki J., Kometani K., Maruyama S., Izumoto M., Matsumoto A., Takemori N., Takemori A., Shinoda K., Nakayama T., Ohara O., Yasukawa M., Sawasaki T., Kurosaki T. and Yamashita M. Bach2-Batf interactions control Th2-type immune response by regulating the IL-4 amplification loop. *Nat. Commun* ncomms12596, 2016, 査読あり, DOI: 10.1038/ncomms12596.

Suzuki J., Maruyama S., Tamauchi H., Kuwahara M., Horiuchi M., Mizuki M., Ochi M., Sawasaki T., Zhu J., Yasukawa M., Yamashita M. Gfi1, a transcriptional repressor, inhibits the induction of the T helper type1 programme in activated CD4 T cells. *Immunology*. 147(4), 476-487, 2016, 査読有り, DOI : 10. 1111/imm. 12580

〔学会発表〕(計 5 件)

Ochi M., Kuwahara M., Suzuki J., Matsumoto A., Kurosaki T., Sawasaki T and Yamashita M.: Bach2 interacts with Batf family transcription factors and inhibits Th2 cell differentiation. INTERNATIONAL CONGRESS OF IMMUNOLOGY 2016, 2016 年 8 月 22 日～26 日, Melbourne Convention and Exhibition

Centre (オーストラリア・メルボルン)

KUWAHARA Makoto, OCHI Mizuki, IZUMOTO Maya, KUROSAKI Tomohiro, YAMASHITA Masakatsu: Bach2 controls the thpe-2 immune response by regulating glutamine metabolism. 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会、2015 年 12 月 18 日～20 日、札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

IZUMOTO Maya, KUWAHARA Makoto, OCHI Mizuki, MATSUMOTO Akira, YAMASHITA Masakatsu: Bach2 and Blimp1 cooperatively regulate *Iir1* expression in CD4 T cells. 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会、2015 年 12 月 18 日～20 日、札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

OCHI Mizuki, KUWAHARA makoto, MATSUMOTO Akira, KUROSAKI Tomohiro, YAMASHITA Masakatsu: Bach2 interacts with Batf family transcription factors and inhibits Th2 cell differentiation. 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会、2015 年 12 月 18 日～20 日、札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

Masakatsu Ymasahita, Makoto Kuwahara: Bach2 inhibits Th2-type immune responses by regulating glutamine metabolism. 第 64 回日本アレルギー学会学術大会、2015 年 5 月 26 日～28 日、グランドプリンスホテル新高輪（東京都品川区）

〔図書〕(計 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
愛媛大学大学院医学研究科免疫学・感染防御
学講座
<http://ehime-u-immunology.com>

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

桑原 誠 (KUWAHARA Makoto)
研究者番号：00568214
愛媛大学・大学院医学系研究科・助教

玉内 秀一 (TAMAUCHI Hidekazu)
研究者番号：60188414
愛媛県立医療大学・保健科学部・教授

(4) 研究協力者

なし