

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：23201

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26713026

研究課題名(和文) ヒストン修飾を介したTreg誘導機構とIBD治療への展開

研究課題名(英文) Induction of regulatory T cells by histone modification for the treatment of inflammation bowel disease

研究代表者

古澤 之裕 (Furusawa, Yukihiro)

富山県立大学・工学部・講師

研究者番号：80632306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,200,000円

研究成果の概要(和文)：無細胞系のHDAC阻害試験から、酪酸によるヒストン修飾の亢進は、おもに Class I HDACを介したものであり、Class II HDAC阻害に対する寄与はほぼないものと推測された。酪酸は時系列的に TregマーカーであるFoxp3を優先的に誘導する事がわかり、主にClass I HDACの中でも、HDAC1およびHDAC3に対する阻害を介して、Foxp3を誘導している可能性が高いと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Butyrate has a potential to inhibit class I HDAC isozymes but not class II HDAC isozymes. In time course analysis, butyrate preferentially induce Foxp3, a master regulator of regulatory T cells (Treg), but not other master regulators of Th1, Th2 and Th17 (e.g., T-bet, Gata3, Ror-gamma t). Treg induction by using HDAC isozyme specific inhibitors revealed that the butyrate induce Foxp3 probably through the inhibition of HDAC1 and HDAC3 that belong to class I HDAC.

研究分野：分子細胞生物学、免疫学

キーワード：制御性T細胞 エピジェネティクス 短鎖脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

腸管には多くの末梢リンパ球が集積しており、腸管は生体内において最大の免疫系を形成している。腸管には異物である細菌が 100 兆個以上も常在している。腸管免疫系は、常在細菌が体内へと侵入しないよう防御する一方で、過剰な免疫応答を起こさないよう巧みに制御されている。つまり、腸管の免疫恒常性は『防御』と『制御』のバランスによって維持されており、その調節異常が不可逆的な慢性炎症応答を引き起こし、炎症性腸疾患 (IBD) の病因となる。

近年の研究から、腸内細菌の定着は免疫応答の調節に重要であることが判明している。例えば、腸管では、制御性 T 細胞 (Regulatory T cell: 以下 Treg と略) と呼ばれる T 細胞サブセットがヘルパー T 細胞の中で最も大きな割合を占めているが、クロストリジウム属細菌などの定着は腸管における Treg の分化誘導を促進し、炎症やアレルギー反応を抑制する。しかしながらその分子機構については不明であった。

腸内細菌は、食物繊維を発酵分解することで、多様な代謝産物を活発に産生している。最近、申請者らは、無菌アイソレーター内で飼育したマウス (無菌マウス) にクロストリジウムを定着させると、腸内発酵により酪酸が有意に増加することを見出した。そこで酪酸を配合した特殊飼料をマウスに摂取させたところ、Treg の数が通常食マウスに比べて顕著に増加した。さらに酪酸は、Treg のマスター転写因子である *Foxp3* 遺伝子プロモーター領域におけるヒストンアセチル化を亢進させることが判明した。以上の知見から、クロストリジウム属細菌は、腸内代謝産物として酪酸を産生することで、Treg の分化誘導を促すことが明らかとなった。

酪酸はヒストン脱アセチル化酵素 (Histone deacetylase: 以下 HDAC) を阻害

することでヒストンのアセチル化を促進し、遺伝子発現を調節する。実際に、酪酸が *Foxp3* 遺伝子プロモーターのヒストンアセチル化を亢進することや、比較的緩和な HDAC 阻害作用を有するプロピオン酸にも若干の Treg 誘導効果が認められることから、ヒストン修飾を介した Treg 分化促進が予想できる。

2. 研究の目的

HDAC には 11 種類のアイソザイムが存在し、その構造からクラス I、IIa、IIb、III、IV に分類される。酪酸はクラス I およびクラス IIa に対し阻害作用を示すことが報告されている。本知見から、酪酸の標的となる HDAC アイソザイムが、腸管の Treg 誘導を負に調節しているとの予想が成り立つ。本研究申請では、HDAC 阻害による Treg 分化誘導機構を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

まず酪酸による HDAC アイソザイム特異的阻害活性の評価を行った。ここでは、HDAC アイソザイムに対する酪酸の半数阻害濃度 (IC_{50}) を測定し、酪酸によって選択的に阻害されるアイソザイムを特定した。

次に、酪酸が *Foxp3* の転写を選択的に促進することで、*Foxp3* タンパクの発現を促進するか調べるため、マイクロアレイシステムを用いて mRNA レベルを網羅的に解析した。

さらに、Treg の分化誘導に關与する HDAC の特定を試みた。現在までに多くの HDAC 阻害薬が開発されており、広域スペクトルを有する HDAC 阻害剤以外にも、各々の HDAC を選択的に阻害する薬剤が開発されている。そこで、HDAC に対して酪酸と同様かまたはより選択性の高い阻害剤を用いて、Treg 分化に対する効果を調べた。

4. 研究成果

1 mM 濃度の酪酸は、試験管中でクラス I HDAC である HDAC1、HDAC2 および HDAC3 に対

して、90%以上の阻害活性を示した一方、クラス II HDAC である HDAC6 や HDAC9 にはほとんど阻害活性を示さなかった。またクラス III HDAC である Sirt1 に対しても同様にほとんど阻害活性を示さなかった。大腸組織の酪酸の濃度は 0.1 mM 程度であったことや、本濃度の酪酸は *in vitro*での Treg 誘導を促進することから、酪酸による Treg 誘導は、クラス I HDAC の阻害作用を介している可能性が高いと考えられた。

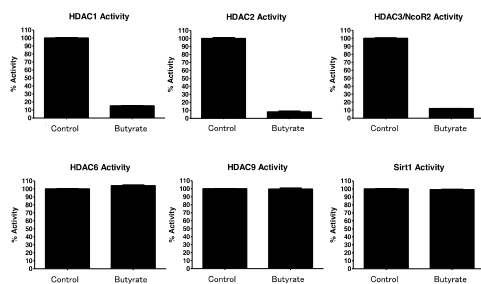


図 1. 酪酸の HDAC アイソザイムに対する阻害活性

次に、マイクロアレイによる酪酸応答遺伝子の網羅解析を行った。酪酸による Foxp3 mRNA 発現誘導は、処理後 2 日目に顕著に認められた一方、Th1 のマスター転写因子である Tbx21 の増加はわずかであった。Gata3 については、酪酸処理で未処理よりも増加しているものの、コントロールに比べて発現レベルは同程度であった。また、Rorc については、処理後 1 日目からすでに、酪酸処理で未処理と比べて発現レベルが低かった。以上のことから、酪酸は T 細胞において、Foxp3 の転写を選択的に促進する事で、Treg 分化を誘導すると考えられた。

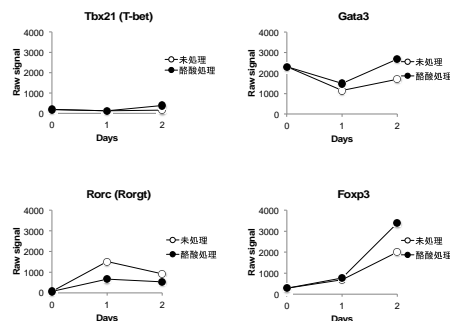


図 2. 酪酸処理後の、各ヘルパー T 細胞マスター転写因子の mRNA 発現レベル

酪酸がクラス I HDAC を阻害し、Foxp3 mRNA の転写を促進する事で、Treg 分化を誘導する可能性が高いと考えられた。ここではさらに、酪酸による Foxp3 誘導に関する責任 HDAC アイソザイムを調べるため、クラス I HDAC に対して阻害作用を示す薬剤を用いて、Treg 分化誘導試験を行った。クラス I HDAC である HDAC8 に対し特異的に阻害作用を示す PCI34051 は低濃度から細胞毒性を示さない高濃度のいずれにおいても、Treg 誘導作用を示さず、酪酸による Treg 誘導は HDAC1、HDAC2 および HDAC3 のいずれかを介したものであると考えられた。次に、HDAC3 特異的阻害剤である RGFP966 で処理したところ、濃度依存的な Treg 誘導効果が認められた。しかしながら、RGFP966 による Treg 誘導割合は、酪酸による Treg 誘導割合をたまわっており、HDAC3 以外の他のクラス I HDAC も Treg 分化を担っていると考えられた。そこで、HDAC8 以外のクラス I HDAC に対して阻害作用を示す Mocetinostat、MS-275、CI-994 で処理した所、酪酸と同程度もしくはそれ以上の割合で Treg 誘導が認められた。HDAC2 に対する siRNA を導入した所、HDAC2 の発現は 75%程度まで減弱し、Treg マーカーである Foxp3 の発現も減弱していた。

以上のことから、酪酸による Treg 誘導は、クラス I HDAC である HDAC1 と HDAC3 の阻害を介している可能性が高いと考えられた。現在クラス I HDAC の阻害剤として、本研究で使用した Mocetinostat や CI-994 などが、癌治療のための候補薬剤として臨床試験で検討されている。本研究成果は、これら HDAC 阻害剤が、癌治療のみでなく、Treg 誘導を介した IBD の治療につながる可能性を示している。また、現在クラス I HDAC 阻害剤について、HDAC1 および HDAC2 をそれぞれ選択的に

阻害する薬剤は開発されていないが、HDAC2 阻害が Treg 誘導をむしろ阻害してしまう点を考えると、HDAC1 と HDAC3 に対して選択的な阻害剤を開発することができれば、より効率的な Treg 誘導剤として利用できる可能性がある。

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5件)

1. 古澤之裕. 「腸内細菌によるエピゲノム修飾を介した腸管制御性 T 細胞の誘導機構」, 腸内細菌学会誌 31: 15-22, 2017
2. Obata Y, Furusawa Y, Hase K. Epigenetic modifications of the immune system in health and disease. **Immunol. Cell. Biol.** 93: 226-32, 2015
3. Furusawa Y, Obata Y, Hase K. Commensal microbiota regulates T cell fate decision in the gut. **Seminar in immunopath.** 37: 17-25, 2015
4. 古澤之裕, 尾畑佑樹, 長谷耕二. 「腸内細菌由来代謝物による免疫エピゲノム制御」細胞 47: 5-8, 2015
5. Furusawa Y, Endo TA, Obata Y, Ohara O, Ohno H, Hase K. Pitfalls in global normalization of ChIP-seq data in CD4+ T cells treated with butyrate: A possible solution strategy. **Genom Data.** 2: 176-180, 2014

[学会発表](計7件)

1. 「腸内細菌によるエピジェネティック修飾を介した制御性 T 細胞の誘導」第 66 回日本細胞生物学会(奈良)
2. 「腸内細菌によるエピジェネティクス修飾を介した免疫調節」第 9 回北陸合同バイオシンポジウム

3. 「腸内細菌によるエピジェネティクス修飾と免疫調節」第 7 回北陸ライフサイエンスクラスターシンポジウム
4. 「腸内細菌によるエピゲノム修飾を介した腸管免疫恒常性維持機構の解明」第 20 回腸内細菌学会受賞講演
5. 「食物繊維由来の短鎖脂肪酸によるエピゲノム修飾を介した制御性細胞の誘導」第 37 回分子生物学会年会
6. 「腸内細菌による免疫バリア修飾作用の解明」日本薬学会第 135 年会
7. 「腸内細菌が産生する酪酸は制御性 T 細胞への分化を誘導する」日本薬学会第 134 年会

[図書](計1件)

エピジェネティクスキーワード辞典(分筆担当)

[産業財産権]

出願状況(計 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:
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
古澤 之裕 (FURUSAWA Yukihiro)
富山県立大学工学部・講師
研究者番号: 80632306

(2)研究分担者
()

研究者番号:

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()