

令和元年6月20日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04744

研究課題名(和文) 制御性T細胞の分化に必要な特異的エピゲノム形成機構の解明

研究課題名(英文) Clarification of regulatory T cell-specific epigenome

研究代表者

大倉 永也 (Ohkura, Naganari)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・特定研究員

研究者番号：20300949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：Treg分化誘導の中核機構を明らかとするため、Treg特異的DNA脱メチル化領域を決定し、Treg特異的遺伝子発現との相関を解析した結果、この領域は、Treg特異的遺伝子発現と極めて相関が高く、Treg形質を特徴付ける遺伝子群の調節領域に集中していることが明らかになった。さらに、ヒト疾患SNPと、Treg特異的DNA脱メチル化領域との関連を解析したところ、本領域には、自己免疫疾患SNPが極めて高く集中していた。胸腺におけるTreg発生過程の解析では、Tregおよび通常のT細胞へと分化が進行していく2つの経路、および特異的因子群を見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、自己免疫疾患感受性は、活性化T細胞の機能亢進よりむしろTreg機能の低下が要因となっていることが示された。本研究結果は、エピジェネティック変化に関与する遺伝子やクロマチン構造変化をもたらす遺伝子の変異、多型が、自己免疫疾患ひいては慢性炎症の感受性に影響する可能性を示しており、新たな治療法開発の基礎となる成果である。

加えて、胸腺細胞群のsingle cell解析では、Treg分化の最初期に関わる因子を同定した。本因子群は、Tregの人工的誘導等や分化抑制に応用可能であり、自己免疫疾患や悪性腫瘍の新たな治療法への展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：To reveal the mechanisms for Treg differentiation, we determined Treg-specific DNA hypomethylated regions using whole genome bisulfite sequencing, and examined the association between the regions and Treg-specific characteristics. Treg-hypomethylated regions were highly associated with Treg-specific gene expression, H3K27ac modification, and open chromatin status. In addition, autoimmune disease-associated SNPs were highly accumulated within the regions, but not in the T cell activation-specific hypomethylated regions. These results suggest that autoimmune disease susceptibility would be largely affected by the changes in Treg function rather than those in T cell activation. By single cell analysis of thymic T cells, we also found the path and factors for Treg development, which are different from those of conventional T cells. This information would be useful for the development of therapies or drugs for autoimmune diseases.

研究分野：分子生物学

キーワード：制御性T細胞 エピゲノム DNA脱メチル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

制御性T細胞 (Treg) は、自己免疫疾患、腫瘍免疫、アレルギー、移植臓器拒絶、胎児母体免疫寛容維持、炎症性腸炎などの抑制的制御に枢要な細胞群である。Treg は抑制性免疫制御の中樞を担っていることから、Treg の増強は免疫寛容誘導を可能とし、また逆に Treg 抑制は、がん等に対する抗腫瘍免疫活性の増強を可能とする。そのため、細胞系譜的に安定した Treg 分化誘導の理解は、自己免疫疾患やがん等に対する治療法開発に極めて重要である。しかし、臨床応用に必要な安定した Treg が、どのように産生され維持されるのか、またどのように機能的安定性を維持しているのかに関して不明なところが多い。申請者は、Treg の発生分化の解析から、Treg 特異的な転写因子 Foxp3 の結合因子として Runx1 を同定し、その Treg における機能を明らかにした。また、Foxp3 の発現のみでは、細胞系譜的に安定した Treg が産生されないことから、Treg 特異的 DNA 脱メチル化パターンの成立が安定した Treg に不可欠であることを示した。特に、Foxp3 陽性細胞であっても、Treg 型エピゲノムを持たない細胞は、免疫抑制能を有さない。このことは Treg の分化は Treg 型エピゲノム誘導によって成立することを意味する。安定した Treg の産生に不可欠なこの概念は、国内・国外から注目を集め、Treg 分化の新たな理解が生まれつつある。本研究計画では、Treg 特異的エピゲノム成立にかかるメカニズムに注目し、Treg 発生分化の謎に迫る。

2. 研究の目的

Treg は抑制性免疫制御の中樞を担っていることから、Treg の量的、質的コントロールは免疫寛容誘導や抗腫瘍免疫活性増強を可能とする。そのため、Treg 分化誘導の理解は、自己免疫疾患や癌等に対する治療法開発に極めて重要である。そこで、本研究では、Treg 分化の“要”である特異的エピゲノム成立過程を、複数の角度から検討し分化誘導の分子機構を解明する。さらに、これらの成果を元に、免疫バランスを司るシグナル分子の同定、Treg 分化経路の同定を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、Treg 特異的エピゲノム成立にかかる分子メカニズムの解析と、その成果を利用した応用展開をおこなう。具体的には、conditional KO マウス等を用いた免疫学的解析、ゲノム解析、クロマチン高次構造解析、酵素反応に基づく生化学的解析から、積極的な DNA 脱メチル化の分子基盤解明、ゲノム高次構造変化の役割解明、Treg 分化誘導刺激の同定をおこなう。さらにこれらの成果を元に informatics 技術、臨床検体を用いた統合的解析、細胞刺激のパターン分析を行い、免疫バランスを支配する責任分子の同定をおこなう。

Treg 発生期におけるゲノム高次構造変化の役割を明らかにするため、ゲノムオーガナイザー Satb1 を発生期に段階的に欠損させ、ゲノム高次構造変化の分化トリガーとしての役割を明らかにする。ゲノム高次構造がどのように発生、分化を支配しているかは、Treg の可塑性、分化様式、成立過程を理解する上で本質的なポイントである。申請者らは、すでに Satb1 KO マウスでは、Foxp3+ T 細胞は十分に存在するにもかかわらず、Treg 特異的エピゲノムが失われ、重篤な自己免疫疾患を発症することを見いだしている。この結果は、ゲノム高次構造、ルーピングに関わる Satb1 が、特異的エピゲノム形成の鍵となる可能性を示唆する。そこで、発現時期の異なる各種 Cre マウスと Satb1 CKO とを掛け合わせることにより、発生段階ごとに Satb1 を順次欠損するマウスを作製し、ゲノム高次構造変化の分化トリガーとしての役割、および必要時期を明らかにし、特異的エピゲノム成立への過程を解明する。

免疫活性化と抑制の機能的相違も T 細胞エピゲノム上に明確にコードされている。そこで Treg とヘルパー T 細胞の様々なエピゲノム情報から、免疫バランスを司る責任分子を informatics 技術を用いて同定する。データベース上の公開データおよび申請者らが独自に収集したエピゲノムデータを利用し、免疫バランスの分岐点となる分子を informatics 技術を用いて同定する。本解析は、異なった免疫反応を示すさまざまな細胞において、活性化している遺伝子群とエピゲノム変化とをパターン化し推定をおこなう。さらに、高頻度に活性化しているシグナル分子は、エピゲノム上に変化が生じる可能性がある点、および複数の異なるサンプル間で共通した動きを示す遺伝子群は同一のシグナル影響下にある点にもとづき候補選択を行う。

加えて、Treg 細胞の分化過程を解明するため、胸腺 T 細胞群のシングルセル解析を行う。RNA 発現プロファイルデータから、Treg 分化過程の追跡、および Treg エピゲノム成立のトリガーとなりうる因子の同定をおこなう。

4. 研究成果

本研究では、Treg 特異的エピゲノムを形成するプロセスを多角的に解析し、Treg 分化誘導の中核機構を明らかにし、治療、診断、創薬へと発展させる研究基盤を確立することを目的とする。まず Treg の分化誘導機構を解明するため、Treg 特異的エピゲノム変化、特に Treg 機能発現以前の最初期過程における変化を解析し、Treg 分化誘導の鍵となるエピゲノム変化を特定した。DNA methylation の変化については、胸腺 Treg 細胞において、Treg 機能に重要な遺伝子の内部または周辺領域の極短い領域に、Treg 特異的脱メチル化が見いだされた。この Treg 特異的脱メチル化領域は、他の T 細胞系譜には認められず、T 細胞活性化においても変化せず、Treg 系譜

に極めて高い特異性を示した。ヒストン修飾の1つであるH3K27acの修飾パターンについては、遺伝子発現の高い遺伝子の調節領域に強いシグナルが認められ、Treg で高い発現を示す遺伝子群にも強い相関を示した。この修飾のシグナル強度を元にスーパーエンハンサーを同定したところ、大部分は通常のT細胞と共通していたが、一部にTreg 特異的スーパーエンハンサーを認めた。これらのスーパーエンハンサーはTreg 機能発現に必須であるFoxp3, CTLA4, IKZF2等の遺伝子領域の近傍に比較的長い領域として認められ、Treg 特異的遺伝子発現とも強い相関を示した。さらにオープンクロマチン状態も、Treg 特異的DNA脱メチル化パターン、スーパーエンハンサーと強い相関を示し、エピゲノムを構成する要素は互いに強い相関を示すことが明らかになった。

さらに、胸腺におけるTreg 発生初期段階の細胞について時系列に基づき遺伝子発現解析をおこない、Treg エピゲノム成立に必要な因子としてゲノムオーガナイザーSatb1を特定した。Satb1は胸腺の未分化なT細胞において強く発現し、分化が進むにつれて減少する傾向を示した。特に末梢のTreg細胞においてはSatb1の発現は極めて低く、Satb1の役割は胸腺におけるT細胞分化およびTreg細胞分化の初期に限定されることが解った。これは、末梢特異的にSatb1を欠損させたマウスでは、Foxp3誘導およびTreg機能は阻害されないことから支持される。全ゲノムのDNAメチル化パターン解析、RNA発現解析、各種ヒストン修飾パターン解析、オープンクロマチン解析等をCD4+T細胞特異的Satb1欠損マウスについておこない、Satb1に依存したエピゲノム変化を明らかにした。Satb1の結合はTreg分化過程の最初期にすでに認められ、このSatb1結合部位を中心にしてH3K27ac, H3K4me3等、様々なエピジェネティック修飾が進行していた。さらにSatb1の結合はクロマチン状態がオープンになる前から認められることから、パイオニアファクターの共役因子として働いている可能性が示唆された。Treg特異的ヒストン修飾パターン、オープンクロマチン状態は、Satb1結合領域を中心として、Treg細胞系譜成立過程で段階的に増強され、Treg特異的スーパーエンハンサーの成立が確認された。さらにSatb1欠失に由来するエピゲノム変化がTregの発生分化に強い影響を及ぼし、Treg特異的スーパーエンハンサーの欠如、スーパーエンハンサーの支配下にある遺伝子群の発現低下、さらには前駆細胞段階でのTreg分化誘導の停止を引き起こし、結果、重篤な自己免疫疾患が発症することを明らかにした。加えてSatb1を欠損したTreg前駆細胞では、培養系においてインターロイキン2刺激下でTregへの分化誘導が起らず、Treg特異的脱メチル化パターンの成立も認められなかった。これらのことからTreg分化誘導には転写因子Foxp3の誘導のみならず、Treg特異的エピゲノムの成立が必須であり、本過程の障害、機能喪失はヒトにおいても自己免疫疾患の発症原因となる可能性が示唆された。本研究結果は、エピジェネティック変化を担う遺伝子群およびクロマチン構造変化をもたらす遺伝子群の変異、多型が、自己免疫疾患や慢性炎症の感受性に影響する可能性を示しており、新たな治療法開発の基礎となる成果である。

加えてTreg特異的DNA脱メチル化の意義を明らかにするため、メチル化DNA結合タンパク質の1つであるMBD3をCD4+T細胞特異的に欠損させたマウスを作製し、Tregの分化誘導、特異的エピゲノムパターンの成立を検証した。MBD3欠損マウスにおいては、胸腺におけるTreg前駆細胞数が減少し、Treg特異的H3K27acヒストン修飾の低下が認められた。末梢においてはTreg細胞数の回復を認めるが、自己免疫疾患を発症することから胸腺由来Treg細胞の欠失が考えられた。さらにMBD3欠損マウスにおいて発生期のTreg細胞における遺伝子発現パターンの変化を解析したところ、Treg分化に関わる複数の遺伝子発現の低下が認められた。

Treg機能発現にはマスター遺伝子である転写因子Foxp3が必須である。Foxp3を介した転写調節機構を明らかにし、Treg機能発現に関わる分子機構を解明するため、Foxp3とコンプレックスを形成する分子の同定と解析を進めた。Foxp3を含む転写コンプレックスとしてSatb1, Runx1, HDACと共にBcl11bを同定した。そこで次にTreg特異的条件的Bcl11b遺伝子欠損マウスを作製し、Treg機能発現およびTreg特異的遺伝子発現について解析をおこなった。T細胞系譜維持に関わる因子であるBcl11bの欠損マウスでは、重篤な自己免疫疾患を発症し、Treg機能およびTreg特異的遺伝子発現調節が損なわれていた。さらに発生期に形成されるTreg特異的ヒストン修飾パターンについても異常が認められた。これらのことからBcl11bはTreg分化誘導の初期過程に必須な因子であると推定された。

Treg特異的エピゲノム成立過程の解析には、ヒト末梢血中のTregサブタイプの全ゲノムDNAメチル化パターンを取得し、Treg特異的脱メチル化領域、活性化特異的脱メチル化領域等を決定し、他のエピゲノム修飾領域との相関、Treg特異的遺伝子発現との相関を解析した。結果、ゲノム上の極限られた領域がTreg特異的脱メチル化を示し、Treg特異的变化はほとんどの領域においてTreg特異的メチル化ではなく、脱メチル化であった。一方、T細胞活性化によるDNA脱メチル化では、ゲノム上の多くの領域が活性化依存的DNA脱メチル化を示し、これらの領域の近傍にはT細胞活性化に関与する遺伝子群が集積していた。これらの変化は主に遺伝子内部のイントロン領域に認められ、プロモーター領域にはほとんど認められなかった。さらにこれらTreg特異的脱メチル化は、CD8+T細胞、B細胞、NK細胞等他の細胞系譜では全く認められず、極めてTreg特異性が高かった。さらにTreg特異的DNA脱メチル化領域は、Treg特異的遺伝子発現やH3K27ac修飾と極めて相関が高く、Treg形質を特徴付ける遺伝子群の調節領域に集

中していた。つづいて、Genome-wide association study(GWAS)データベースおよび1000人ゲノムプロジェクトのデータを利用し、Treg 特異的 DNA 脱メチル化領域と疾患 SNP との関連を解析したところ、Treg 特異的脱メチル化領域には、リウマチ、一型糖尿病等の自己免疫疾患に関連した SNP が極めて高く集中していた。一方、T 細胞活性化に関わる DNA 脱メチル化領域では、自己免疫疾患 SNP の集中は見られなかった。これらのことから、自己免疫疾患感受性は、活性化 T 細胞の機能亢進よりむしろ Treg 機能の低下が要因となっていることが示唆された。本研究結果は、エピジェネティック変化に關与する遺伝子やクロマチン構造変化をもたらす遺伝子の変異、多型が、自己免疫疾患感受性に影響する可能性を示している。

胸腺における Treg 発生過程の解析には、胸腺細胞群のシングルセル解析をおこない、通常の T 細胞と Treg 細胞との分岐を決定づける機構について解析をおこなった。胸腺の様々な細胞のシングルセル RNA-seq をおこない、細胞の分化に応じた細胞分画を同定後、分画内における特異的变化を示す遺伝子群の抽出を行い、Treg 発生に重要な細胞内変化を解析した。結果、マウス胸腺細胞群の解析では、Treg および通常の T 細胞へと分化が進行していく 2 つの経路が見いだされた。これらの経路では、胸腺 CD4+CD8+T 細胞を基点として、CD4+T 細胞へと進行した後、通常の T 細胞へと進む経路、Treg へと進行する経路、さらに分化が途切れる経路に分離された。この分化が途切れる経路は、negative selection による細胞死へ至る経路、またはアナジーとして細胞分裂が停止し、その後細胞死に至る経路と推定された。Foxp3 等に代表される Treg 関連因子の発現は、胸腺における Treg 分化過程の後半から検出され、Treg 特異的 DNA 脱メチル化パターンの成立も胸腺における Treg 分化がほぼ終了した時点から検出される。このことは、Foxp3 誘導、Treg 特異的 DNA 脱メチル化パターンの成立の上位機構が存在することを示唆している。single cell RNA 解析の結果から、胸腺の Treg 分化過程の最初期に変化する転写調節因子群、クロマチンリモデリング因子等を複数同定した。これらの因子の人工的コントロールは、Treg 機能をコントロールしうる可能性がある。

5 . 主な発表論文等

Guidance of regulatory T cell development by Satb1-dependent super-enhancer establishment. Kitagawa Y, Ohkura N, Kidani Y, Vandenbon A, Hirota K, Kawakami R, Yasuda K, Motooka D, Nakamura S, Kondo M, Taniuchi I, Kohwi-Shigematsu T, Sakaguchi S. Nat Immunol. 2017 Feb;18(2):173-183

A distinct subpopulation of CD25- T-follicular regulatory cells localizes in the germinal centers. Wing JB, Kitagawa Y, Locci M, Hume H, Tay C, Morita T, Kidani Y, Matsuda K, Inoue T, Kurosaki T, Crotty S, Coban C, Ohkura N, Sakaguchi S. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Aug 1;114(31):E6400-E6409.

Ultraviolet B-Induced Maturation of CD11b-Type Langerin- Dendritic Cells Controls the Expansion of Foxp3+ Regulatory T Cells in the Skin. Yamazaki S, Odanaka M, Nishioka A, Kasuya S, Shime H, Hemmi H, Imai M, Riethmacher D, Kaisho T, Ohkura N, Sakaguchi S, Morita A. J Immunol. 2018 Jan 1;200(1):119-129.

〔雑誌論文〕(計 11 件)

〔学会発表〕(計 16 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称：癌治療用医薬組成物

発明者：大倉永也 坂口志文他

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2017-065603

出願年：2017

国内外の別：国内

名称：癌治療用医薬組成物

発明者：大倉永也 他

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2018/012644

出願年：2018

国内外の別：国外

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。