

平成30年 5月23日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08522

研究課題名(和文) 記憶T細胞応答を制御するエピジェネティック機構の解明

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of the memory T cell response

研究代表者

小野寺 淳 (ONODERA, Atsushi)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：10586598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：予防接種に代表される免疫記憶は、二百年以上前から知られる現象であるが、詳細な分子機構は未だ不明な点が多い。我々はその中心を担う記憶ヘルパーT細胞に焦点を当て、抗原に対する反応を統合し解析したレスポンスームのデータベース構築に成功した。また詳細な解析の結果、記憶T細胞のepigenetic制御および転写後制御機構が、迅速な抗原応答に重要であることを見出した。前者の機構には、ポリコムやトライソラックス群による空間的相互作用が、後者の機構には特定のRNA結合タンパク質が、それぞれ関与することも判明した。今後は、これらの研究結果を新規ワクチン開発やアレルギー疾患治療へ繋げていきたい。

研究成果の概要(英文)：Formation of immunological memory after infection or vaccination is a phenomenon known for over 200 years; however, the detailed molecular mechanisms still remain unknown. We have focused on memory helper T cells that play a central role in the immunological memory and built a response database integrating all omics datasets we obtained with the memory T cells. Detailed analysis also revealed that epigenetic and posttranscriptional regulation of memory T cells are important for their rapid response to the cognate antigens. The epigenetic mechanism involves spatial interplay between Polycomb and Trithorax group proteins whereas the posttranscriptional mechanism involves a specific RNA binding protein. In the future, I would like to apply knowledge acquired through these studies to development of a new vaccination system or novel methods of prevention and treatment of allergic diseases.

研究分野：ヘルパーT細胞を中心とした免疫学とエピジェネティクスおよびその融合分野

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 発現制御 抗原応答

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、我々はこのことが研究進展の大きな足かせとなっているのではないかと考えた。我々が着目する、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。

炎症性サイトカインに対して迅速に反応する自然免疫系の細胞では、epigenetic な機構が働いていることが知られている (Smale et al., *Annu Rev Immunol.* 2014)。しかし、厳密に抗原を認識し特異的な応答をする T 細胞はこれとは異なる機構で制御されることが考えられ、未解明な点が多い。T 細胞の抗原応答に関する研究は、動物実験モデルを用いたものが多く分子機構の解明が不十分、記憶細胞を細胞表面分子によって分類するため本当にそれが以前抗原によって感作されたのか不明、などの問題点があった。また *in vitro* の研究でも、T 細胞の抗原への初感作が研究の対象となることは多いものの、抗原に対する再応答を含めた T 細胞の応答性全般について着目したものはほとんど前例がなかった。

これまでに申請者らは 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) 分子群に着目し、それらの欠損が T 細胞応答 (主としてサイトカイン産生) に与える影響について研究を進めてきた (Nakayama et al., *Semin. Immunol.* 2009)。PcG や TrxG とそれらが制御する転写因子 GATA-3 に関する直近の研究成果は以下の通りであった。

(1) Ezh2 (PcG の一種) 欠損マウス由来の CD4 T 細胞は、Th1、Th2 への分化がいずれも亢進し、各サイトカインの過剰産生が見られた。

ChIP-seq 解析により、その原因はサイトカイン遺伝子座自身でなく、各サブセットの分化を誘導する特異的転写因子の制御異常であることが分かった (Tumes et al., *Immunity.* 2013)。

(2) 一方 Menin (TrxG の一種) の欠損マウス由来の CD4 T 細胞は Th1、Th2 へ正常に分化するが、Th2 細胞としての機能を長期間維持できない (Onodera et al., *JEM.* 2010)。また、Menin を欠損すると Th17 への分化能が低下し、IL-17A の産生が低下することも分かった (Watanabe, Onodera et al., *PNAS.* 2014)。

(3) 記憶 Th2 細胞で、siRNA を用いて GATA-3 の発現を低下させると、IL-4, 5, 13 などの Th2 サイトカインの産生が低下することが分かった (Sasaki et al., *PLOS ONE.* 2013)。

本申請ではこれらの知見を踏まえ、T 細胞が抗原に反応して起こす様々な応答を統合し“レスポンソーム”として捉え、記憶 T 細胞の迅速応答の機構を明らかにすることを目的とした。

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、免疫記憶に関する未解決問題の 1 つ、“なぜメモリー (記憶) T 細胞はナイーブ (未感作) T 細胞に比べて迅速な免疫応答を起こすことができるのか”を解明することを目的とした。特に、T 細胞が抗原に反応して起こす様々な応答を統合し“レスポンソーム”として捉え、迅速応答機構の解明を目指した。具体的にはナイーブ T 細胞とメモリー T 細胞の抗原刺激後の応答を中心にトランスクリプトーム解析、エピゲノム解析およびプロテオーム解析などの網羅的解析を行い、T 細胞応答の新規“中核因子”を探索した。また、PcG/TrxG による T 細胞応答の

制御機構についても合わせて解析を行った。最終的には、T細胞応答を利用したワクチン開発や過剰なT細胞応答が原因となるアレルギー疾患治療への応用の可能性を模索した。

3. 研究の方法

(1) 記憶 T 細胞のトランスクリプトーム解析、エピゲノム解析およびプロテオーム解析

通常生体内に存在する記憶 T 細胞は少数であるが、我々はそれらをゲノムワイドで解析可能な量確保するシステムを既に構築している。具体的には、*in vitro* で作製した抗原特異的 Th1/Th2/Th17 細胞を同系マウスに移入し、4 週間経過後にセルソーターで分離する方法を用いた (Nakayama et al., *Semin. Immunol.* 2009)。この方法を用いるもう 1 つの利点は、抗原に一度感作された細胞と未感作の細胞を区別できることであり、記憶 T 細胞の迅速応答の機構を解析するのに最適の実験系である。

① 記憶 T 細胞のトランスクリプトーム解析とエピゲノム解析

未感作 (ナイーブ) Th 細胞と記憶 (メモリー) Th2 細胞の抗原刺激前後の比較を中心として RNA-seq、ChIP-seq で解析した。ChIP-seq では RNAPII およびヒストン修飾 (H3K9Ac、H3K4Me3、H3K27Me3) のデータを取得し解析した。

② 記憶 T 細胞のプロテオーム解析およびその他のオミクス解析

プロテオーム解析として、(1)-①と同様のサンプルを用いて、Bioplex にて分泌サイトカイン量の網羅的解析を行った。また、その他のオミクス解析として、ATP の主な産生源であり、抗酸化作用にも重要なミトコンドリアに着目した実験を行った。本学に新規導入された超高解像度顕微鏡 (Structured Illumination Microscopy; SIM) を用いた細胞の形態観察と、細胞内の抗酸化機構として重要な Txnip-Txn 系を人工的に改変したマウス由

来の T 細胞を用いた実験を行った。

(2) 記憶 T 細胞の迅速応答を制御する新規中核因子の同定と機能解析

① 新規中核因子の候補の抽出

(1)-①の RNA-seq の結果より新規中核因子の候補を抽出した。具体的には、記憶 Th2 細胞で抗原刺激後短時間で発現が上昇する遺伝子に着目した。その後定量的 PCR で発現変動の確認を行い、候補の絞り込みを行った。

② 新規中核因子のスクリーニングと機能解析

siRNA を用いたスクリーニングを行った。先述の通り、siRNA を用いた GATA-3 のノックダウンの系は報告済みであり (Sasaki et al., *PLOS ONE.* 2013)、他の遺伝子についても同様の実験系で評価を行った。アウトプットとして解析したのはサイトカイン産生や細胞増殖である。その後、レトロウイルスベクターを用いた過剰発現系や各種阻害剤を用いた実験系で、中核因子の機能解析を行った。

(3) PcG/TrxG 分子群による記憶 T 細胞応答性の制御機構の解析

(2)で同定した新規中核因子の発現や機能が、PcG/TrxG 分子によりどのように制御されるかに焦点を当て解析を進めた。特に PcG と TrxG の両方が結合する co-occupied 遺伝子群と T 細胞応答との関連について、以下の解析を行った。

① PcG/TrxG 分子群の ChIP-seq 解析

PcG/TrxG の co-occupied 遺伝子を網羅的に同定するために、Ezh2 と Menin、PcG/TrxG 分子群に含まれるその他分子の ChIP-seq 解析を行った。また、阻害剤等でこれらの結合パターンを人為的に変化させた場合の影響も調べた。

② PcG 分子および TrxG 分子の欠損マウスの解析

Ezh2 などの PcG 分子および Menin、Cxxc1 などの TrxG 分子の遺伝子欠損マウスを解析した。これらのマウス由来の CD4 T 細胞から

調整した活性化 Th1/Th2/Th17 細胞および記憶 Th1/Th2/Th17 細胞を用いて抗原応答性を調べた。またマウス個体での免疫応答を、喘息モデルで評価した。

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) 記憶 T 細胞のトランスクリプトーム解析、エピゲノム解析およびプロテオーム解析

記憶 T 細胞のトランスクリプトーム解析とエピゲノム解析として予定していた、未感作(ナイーブ)Th 細胞と記憶(メモリー)Th2 細胞の抗原刺激前後の比較を中心とした RNA-seq、ChIP-seq 解析は終了した(公共データベース GEO; Gene Expression Omnibus へのデータサブミット準備中)。結果として、ナイーブとメモリーのトランスクリプトームの違いは、抗原刺激後に顕著になること、両者のエピゲノムの違いは抗原刺激前から準備されていることが分かった。また、Bioplex を使用した分泌サイトカイン量の網羅的測定により、トランスクリプトーム解析で観察された、記憶 T 細胞における種々のサイトカイン・ケモカインの発現上昇がタンパク質レベルで裏付けられた。

さらに我々は、上述した記憶 T 細胞のサイトカイン産生と、ミトコンドリア機能との関連性を調べた。本学に新規導入された超高解像度顕微鏡(SIM)のセットアップを完了し、T 細胞のミトコンドリアの形態を観察することに成

功した。そして、細胞内の抗酸化機構として重要な Txnip-

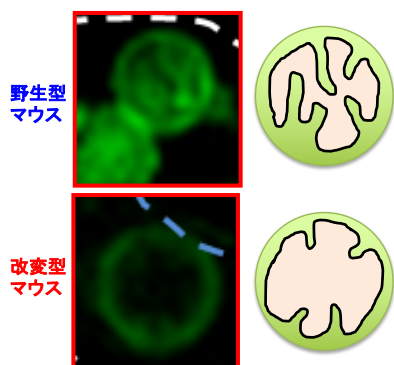


図1. Txnip-Txn系改変マウスではミトコンドリアの形態異常が見られる

Txn 系を人工的に改変したマウス由来の T 細胞では、ミトコンドリアの形態異常が生じることを発見した(図1)。またこの遺伝子改変マウス由来の T 細胞のミトコンドリアの機能異常は、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイリングによっても確認された。

以上、記憶 T 細胞の抗原応答時の変化“レスポンスーム”を各種オミクス解析で統合的に捉え、有用なデータベースを構築することができた。

(2) 記憶 T 細胞の迅速応答を制御する新規中核因子の同定と機能解析

(1)の RNA-seq の結果より新規中核因子の候補を抽出し、その後 siRNA を用いたスクリーニングを行った。その結果、Egr2(転写制御因子)や RBP(RNA 結合タンパク質)が記憶 T 細胞のサイトカイン発現および細胞増殖を制御することが分かった。さらに、siRNA を用いたノックダウンの実験系、レトロウイルスを用いた過剰発現系において、RBP が解糖系の mRNA の転写後調節に関与することを突きとめた。加えて、RNA immunoprecipitation (RIP) および RIP-seq の実験系の立ち上げにも成功し、研究を飛躍的に進めることができた(現在論文投稿準備中)。

(3) PcG/TrxG 分子群による記憶 T 細胞応答性の制御機構の解析

はじめに、エピジェネティック制御因子、ポリコーム群(PcG)およびトライソラックス群(TrxG)タンパク質の両方の標的となる co-occupied 遺伝子について解析を行った。その結果、PcG/TrxG の空間的相互作用が T 細胞の抗原応答時の変化“レスポンスーム”の制御に関わることが分かった。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意義深いものであると考えている(論文発表済、公共データベース登録済; GSE73825)。また、TrxG タンパク質の一種である Menin によるエピジェネティック

な制御機構が、記憶 T 細胞の応答に重要であることを見出した (論文発表済、公共データベース登録済; GSE99261)。さらに、別の TrxG タンパク質の一種である Cxxc1 の機能解析を進め、現在論文投稿準備中の段階までできている。

(4) その他

上記の研究に加えて、研究代表者が得意とするトランスクリプトーム解析手法を生かして、国内外の研究者と共同研究を行い、共著者として論文発表を行った。このようなプログラミングを用いた解析法は多方面に応用可能であり、研究室内外で共同研究のニーズが高い。その中でも、炎症を制御する分子 CD69 に関する研究は、NHK のテレビニュースやインターネットのヤフーニュースでも紹介され、広く一般社会に興味を持たれる研究であった。

本研究を通じて発表した総説、原著論文の多くが海外の研究者との共同研究であり、国際的なネットワークが構築できたことも重要な成果の一つであると考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件) 全て査読有

- (1). Ito, T., Hirahara, K., **Onodera, A.**, Koyama-Nasu, R., Yano, I., Nakayama, T.: Anti-tumor immunity via the superoxide-eosinophil axis induced by a lipophilic component of Mycobacterium lipomannan. *Int Immunol.* 29(9):411-421(2017). DOI:10.1093/intimm/dxx051.
- (2). **Onodera, A.**, Kiuchi, M., Kokubo, K., Kato, M., Ogino, T., Horiuchi, S., Kanai, U., Hirahara, K., and Nakayama, T.: Menin controls the memory Th2 cell function by maintaining the epigenetic integrity of Th2 cells. *J. Immunol.* 199:1153-1162 (2017). DOI:10.4049/jimmunol.1602129.
- (3). Tumes, D. J., Papadopoulos, M., Endo, Y., **Onodera, A.**, Hirahara, K., and Nakayama, T.: Epigenetic regulation of T-helper cell

differentiation, memory, and plasticity in allergic asthma. *Immunol. Rev.* 278(1):8-19(2017).

DOI:10.1111/imr.12560

- (4). Iwata, S., Mikami, Y., Sun, H.-W., Brooks, S. R., Jankovic, D., Hirahara, K., **Onodera, A.**, Shih, H.-Y., Kawabe, T., Jiang, K., Nakayama, T., Sher, A., O'Shea, J. J., Davis, F. P., and Kanno, Y.: The transcription factor T-bet limits amplification of type I IFN transcriptome and circuitry in T helper 1 cells. *Immunity* 46:983-991 e4 (2017). DOI:10.1016/j.immuni.2017.05.005
- (5). Nakayama, T., Hirahara, K., **Onodera, A.**, Endo, Y., Hosokawa, H., Shinoda, K., Tumes, D. J., and Okamoto, Y.: Th2 cells in health and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 35:53-84 (2017). DOI:10.1146/annurev-immunol-051116-052350
- (6). Hayashizaki, K.,* Kimura, M. Y.,* Tokoyoda, K.,* Hosokawa, H., Shinoda, K., Hirahara, K., Ichikawa, T., **Onodera, A.**, Hanazawa, A., Iwamura, C., Kakuta, J., Muramoto, K., Motohashi, S., Tumes, D. J., Iinuma, T., Yamamoto, H., Ikehara, Y., Okamoto, Y., and Nakayama, T.: Myosin light chain 9 and 12 are functional ligands for CD69 that regulate airway inflammation. (*these authors contributed equally to this work) *Sci. Immunol.* 1:eaaf9154 (2016). DOI:10.1126/sciimmunol.aaf9154
- (7). **Onodera, A.**, Tumes, D. J., Watanabe, Y., Hirahara, K., Kaneda, A., Sugiyama, F., Suzuki, Y., and Nakayama, T.: Spatial interplay between Polycomb and Trithorax complexes controls transcriptional activity in T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* 35(22):3841-3853 (2015). DOI:10.1128/MCB.00677-15
- (8). Hirahara, K., **Onodera, A.**, Villario, A. V., Bonelli, M., Sciume, G., Laurence, A., Sun, H. W., Brooks, S. R., Vahedi, G., Shih, H. Y., Gtierrez-Cruz, G., Iwata, S., Suzuki, R., Mikami, Y., Okamoto, Y., Nakayama, T., Holland, S. M., Hunter, C. A., Kanno, Y., and O'Shea, J. J.: Asymmetric action of STAT transcription factors drives transcriptional outputs and cytokine

specificity. *Immunity* 42(5):877-889 (2015).
DOI:10.1016/j.immuni.2015.04.014

〔学会発表〕 (計 8 件)

(1). Kokubo, K., **Onodera, A.**, Kiuchi, M., Ogino, T., and Nakayama, T.: Menin controls the memory Th2 cell function by maintaining the epigenetic integrity of Th2 cells. 第46回日本免疫学会総会・学術集会 2017年12月12-14日、仙台国際センター (宮城県・仙台市) (O/P)12/12

(2). **Onodera, A.**, Ogino, T., Kiuchi, M., Kokubo, K., and Nakayama, T.: A quantitative method for evaluating binding positions of Trithorax and Polycomb proteins based on correlation function. The Inaugural Chiba University - UC San Diego Symposium on Mucosal Immunology, Allergy and Vaccines: Impact on Mucosal Diseases and Global Health. 2017年2月21-22日、San Diego(USA) (O/P) 2/21-2/22

(3). **Onodera, A.**, Ogino, T., Kiuchi, M., Kokubo, K., and Nakayama, T.: A quantitative method for evaluating binding positions of Trithorax and Polycomb proteins based on correlation function or entropy. 第45回日本免疫学会総会・学術集会 2016年12月5-7日、沖縄コンベンションセンター (沖縄県・宜野湾市) (O/P) 12/7

(4). **Onodera, A.**, Tumes, D.J., Kiuchi, M., Kokubo, K., Watanabe, Y., Hirahara, K., Kaneda, A., Sugiyama, F., Suzuki, Y., and Nakayama, T.: Spatial interplay between Polycomb and Trithorax complexes controls transcriptional activity in T lymphocytes. International Congress of Immunology 2016, 2016年8月21-26日、Melbourne(Australia)(O/P) 8/23

(5). **Onodera, A.**, Kiuchi, M., Wada, T., Kanno, T., Hayashizaki, K., and Nakayama, T.: Fine scale positioning of Polycomb and Trithorax complexes controls transcriptional activity in T lymphocytes. 第44回日本免疫学会総会・学術集会 2015年11月18-20日、札幌コンベ

ンションセンター (北海道・札幌市) (O/P) 11/19

(6). Nakayama, T., Endo, Y., Shinoda, K., Hirahara, K., and **Onodera, A.**: Pathogenic Th2 (Tpath2) cells in airway inflammation. シンポジウム The 3rd Symposium of International Immunological Memory and Vaccine Forum (IIMVF), 2015年10月30-31日, Berlin (10/30)

(7). **Onodera, A.**, and Nakayama, T.: ポリコーン/トライソラックス複合体による免疫細胞記憶維持機構の解明, 第25回 Kyoto T Cell Conference 2015年5月15-16日、京都芝蘭会館 (京都府・京都市) (O/P) 5/16

(8). **Onodera, A.**, Hirahara K and Nakayama T.: Polycomb and Trithorax complexes control epigenetic memory of T helper cells. NCI Symposium on Chromosome Biology, 2015年4月16-17日, Bethesda, MD(USA)

〔図書〕 (計 1 件)

(1). **Onodera, A.**, Kokubo, K., and Nakayama, T.: The Interplay between Transcription Factors and Epigenetic Modifications in Th2 Cells. *Gene Expression and Regulation in Mammalian Cells - Transcription From General Aspects Edited by Fumiaki Uchiumi* 191-211 (2018). DOI:10.5772/intechopen.73027, ISBN 978-953-51-3856-3, Print ISBN 978-953-51-3855-6

〔その他〕

ホームページ等
千葉大学大学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・准教授
研究者番号 : 1 0 5 8 6 5 9 8