

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19667

研究課題名(和文) 出生後FOXP3のエピジェネティクス変化と免疫寛容の関係に関する解析

研究課題名(英文) Analysis of the relationship between postnatal FOXP3 epigenetic changes and immune tolerance

研究代表者

山崎 晋 (Yamazaki, Susumu)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：80771774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：免疫寛容に重要なFOXP3+T細胞の解明はアレルギー・自己免疫疾患の治療につながる。新生児のFOXP3+T細胞は質・量ともに出生前後に急速に変化をするが、その機序は不明な点が多い。本研究では、臍帯血の酪酸値とHDAC阻害能を測定し、新生児のFOXP3の発現との関わりを検証した。臍帯動脈血(UA)と、成人血液について、エピジェネティクスに関わる酵素を比較した所、HDAC11阻害能が成人に比べUAで著明に増強していることを発見した。HDAC11はFOXP3の発現を抑制することが報告されているため、新生児に認められるFOXP3の発現は高いHDAC11阻害能により惹起されている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、新生児期において制御性T細胞が優位な理由の一端としてHDAC11が関わる可能性を示した。制御性T細胞は免疫寛容(過剰な炎症を抑える働き)に重要な役割を担う細胞で、アレルギー疾患や自己免疫疾患のみならず、悪性腫瘍、不妊・早産でもその重要性が指摘されている。特に、食物アレルギーでは食物抗原に対して、不妊・早産では母体の精子・胎児に対して免疫寛容が不十分な状態が原因の一端ともされている。本研究で指摘したHDAC11はこれら疾患の新たな治療ターゲットとなり得る可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Background: Characterization of regulatory T cells (Tregs) is important for the treatment and prevention of autoimmune diseases and allergies. Tregs are known to be actively induced throughout the fetal and neonatal periods. However, it is unknown why Tregs are induced more in the perinatal period than in adults. This study investigated the hypothesis that neonatal ability to inhibit HDAC activity is related to Tregs induction at the fetal and neonatal stage. Methods: The ability of umbilical cord blood and adult serum to inhibit HDAC was compared by enzyme assays. Results: Neonatal blood had significantly higher ability to inhibit HDAC11 activity than did the blood from adults ($P<0.005$). Conclusion: This is the first comparison of the ability to inhibit HDAC activity between adult and neonatal human sera. Since HDAC11 is known to inhibit the expression of FOXP3, our results suggest that Tregs are induced by the increased inhibition of HDAC11 during the perinatal period.

研究分野：免疫

キーワード：免疫 アレルギー 新生児 小児 自己免疫 制御性T細胞 エピジェネティクス ヒストン脱アセチル化酵素

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国のアレルギー疾患罹患率は年々増加傾向にあり、その発症予防や病態解明は社会的急務であった。アレルギーの病態を簡潔に表現すると、「抗原に対する免疫応答を正常な範囲にコントロールできない状態」と言え、この免疫応答を調節する手段として、体内では免疫寛容という現象が誘導され、アレルギー疾患の病態は「免疫寛容の失敗」とも表現できる。

免疫寛容に重要な役割を果たす制御性 T 細胞 (Treg) は胎児期、新生児期に多いことが知られていたが(1, 2)、何故、Treg 優位な免疫状態を維持できるかは不明であった。

一方、Treg に関するエピジェネティクスの解析が進み、Treg のマスター転写因子である FOXP3 について、臍帯血中の FOXP3 のメチル化頻度が高い程、アレルギー罹患率が高い(3)ことが報告され、FOXP3 のエピジェネティクスの差がアレルギー疾患発症の一端であることが明らかになっていた。また、酪酸がもつヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害能が FOXP3 の発現を亢進させることで Treg が増えることや(4)、ある種の HDAC の欠損や低下が Treg を誘導することが報告され(5)、エピジェネティクスを介した Treg を増やすための方法が徐々に報告されてきた。

しかし、本研究開始時点で、FOXP3 のエピジェネティクスの差異の原因やそれに伴うアレルギー疾患の発症機序に関して解析した報告はなかった。

2. 研究の目的

本研究は、「FOXP3 のエピジェネティクス変化の違いを根拠にアレルギー疾患の病態を免疫寛容不足型と免疫寛容崩壊型の二つに分ける」ということを目標とした。そのために、本研究では臍帯血と新生児末梢血細胞に発現する FOXP3 のエピジェネティクス解析を行うこととした。

加えて副次的な目標として、新生児期エピジェネティクスという発展途上の分野を開拓し、新生児期は何故、寛容系が優位なアレルギー状態を維持できるか、FOXP3 の差異がどのようにアレルギー疾患に関わるかを解明することで、アレルギー疾患のさらなる病態解明と発症予防につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 臍帯血と新生児血液(日齢4の新生児マススクリーニング採血時)を採取し、出生時からの FOXP3 領域のメチル化変化をバイサルファイトシーケンス法により確認した。

(2) 臍帯血と新生児血液、健常成人血液の酪酸濃度の差と、脱アセチル化酵素阻害能を ELISA 法により解析した。

(3) 各検体の FOXP3 の発現量、HDAC 発現量を qRT-PCR 法により比較した。

4. 研究成果

(1) 出生直後から日齢4の間に FOXP3 のメチル化に有意な変化は確認されなかった。

同一被検者間での臍帯血、新生児血液5組(計10検体)について既報(6)をもとに FOXP3 領域の一部 200bp (CNS2 の TSDR 領域) の脱メチル化変化について検討した。結果、それぞれの検体で継時的な変化は確認できず、出生直後の環境による FOXP3 への影響、変化は認められなかった。このため、追加でアレルギー児の検体解析進めても有意な結果が得られないと推測し、費用対効果の面から FOXP3 に対するメチル化の検討は実行した10検体に限ることとした。

(2) 酪酸濃度は臍帯血で有意に高かった。(図1-A)

臍帯血と新生児血液(21組)、健常成人血液(10検体)の酪酸濃度について比較した。酪酸は臍帯血で有意に高く出生後、日齢4の時点では低下していた。酪酸が新生児期に高いという結果は既報(7)に矛盾しなかった。

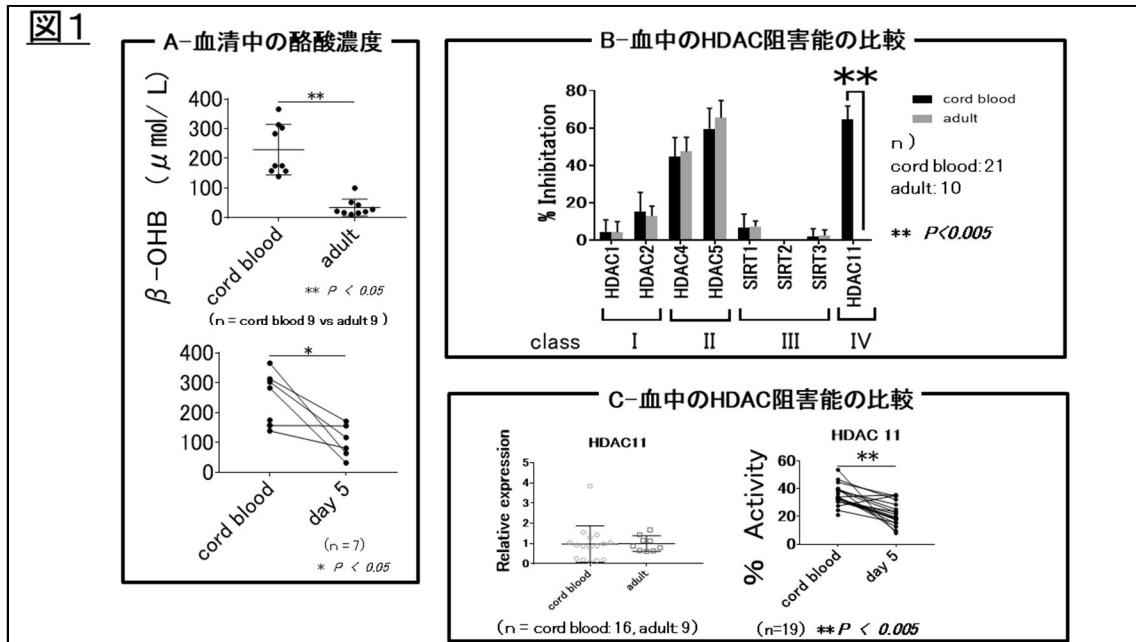
(3) 臍帯血では成人血液に比べ HDAC11 阻害能が優位に高かった。(図1-B)

酪酸濃度による血中の HDAC 阻害能の上昇を確認するために、各 HDAC クラスの代表的な HDAC の阻害能について臍帯血 21 検体、成人血 10 検体で網羅的に検討した。酪酸が有するとされる HDAC クラス 1, 2 の阻害能については臍帯血、成人血では有意差を認めなかった。一方、HDAC11 阻害能が臍帯血で有意に高いことが確認された。

(4) 臍帯血と成人血に HDAC11 の発現量の差は認めなかった。(図1-C)

臍帯血と新生児血液で FOXP3 の発現量を比較したところ、わずかに新生児血で発現量が増加していたが検体データにばらつきが多く、十分な評価とは考えられなかった。HDAC11 阻害能に差を認めた検体で HDAC11 発現量を検討したところ、HDAC11 自体の発現量には差を認めず、阻害能にのみ差があることが確認された。

図1



考察：

本研究の第一目標である、「FOXP3のエピジェネティクス変化の違いを根拠にアレルギー疾患の病態は免疫寛容不足型と免疫寛容崩壊型の二つに分ける」ことについては、成果(1)で言及したとおりFOXP3のメチル化変化に有意な差を見出せずアレルギー児の検体まで解析できなかったことから、達成はできなかった。しかし、副次的な目標であった「新生児期は何故、寛容系優位な免疫状態を維持してできるか」については成果(1)(2)(3)から新たな知見が得られたと考える。

当初、血中の酪酸によるHDAC阻害能が新生児期のTregを発現していると推測したが、酪酸の血中濃度は高いものの、酪酸の関わるHDAC class 1、2に関しては差を認めなかったことから否定的であると考えた。一方、予期していなかったことでHDAC11の阻害能が臍帯血で有意に高いことが示された。HDAC11はTregの発現を抑制することが報告(8)されており、本研究成果は臍帯血での高いHDAC11阻害能がTregを誘導している可能性を示唆している。

上述した第122回小児科学会学術集会(金沢)、第68回日本アレルギー学会(東京)、第55回日本周産期新生児医学会(長野)で発表報告し、新生児期のエピジェネティクスという未発達な分野という研究であることに高評価を得た。

海外誌に投稿したが、「HDAC11阻害能が成人血と比較し著明に高値であることは大変興味深いですが、Tregの発現に結び付けるにはまだ追従実験が不十分である」という評価からrejectされ、現在、次の課題と合わせて追加検討中である。

具体的には、本研究のlimitationとして、臍帯血、成人血のTregについてフローサイトメトリーを用いたTregの差の証明が必要であること、HDAC阻害能のELISA法の検証について検体保存方法による差の有無の提示などが今後の課題である。

しかし、本研究は臍帯血、新生児血液、成人血液のHDAC阻害能を比較した初めての報告である。今後、HDAC11阻害能が何によってもたらされているのか、どれくらいのTreg誘導力をもつのかを証明することによりアレルギーや免疫寛容に関する新たな治療標的となり得るかもしれない。

1. Basha S, Surendran N, Pichichero M. Immune responses in neonates. Expert review of clinical immunology. 2014;10(9):1171-84.
2. Burt TD. Fetal regulatory T cells and peripheral immune tolerance in utero: implications for development and disease. American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989). 2013;69(4):346-58.
3. Hinz D, Bauer M, Röder S, Olek S, Huehn J, Sack U, et al. Cord blood Tregs with stable FOXP3 expression are influenced by prenatal environment and associated with atopic dermatitis at the age of one year. Allergy. 2012;67(3):380-9.
4. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells.

Nature. 2013;504(7480):446-50.

5. Falkenberg KJ, Johnstone RW. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nature reviews Drug discovery*. 2014;13(9):673-91.

6. Baron U, Floess S, Wieczorek G, Baumann K, Grützkau A, Dong J, et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *European journal of immunology*. 2007;37(9):2378-89.

7. Williams AF. Hypoglycaemia of the newborn: a review. *Bulletin of the World Health Organization*. 1997;75(3):261-90.

8. Huang J, Wang L, Dahiya S, Beier UH, Han R, Samanta A, et al. Histone/protein deacetylase 11 targeting promotes Foxp3+ Treg function. *Scientific reports*. 2017;7(1):8626.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎 晋 齋藤 暢知 山田 啓迪 馬場 洋介 大川 夏紀 工藤 孝広 寒竹 正人 大塚 宜一 清水 俊明
2. 発表標題 新生児期のヒストン脱アセチル化酵素阻害能と酪酸の関係
3. 学会等名 第122回日本小児科学会学術集会,
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎晋 田中裕子 佐藤まゆき 山田啓迪 米山俊之 横倉友諒 本庄明日香 馬場洋介 森真理 工藤孝広 大塚宜一 清水俊明
2. 発表標題 新生児の酪酸によるヒストン脱アセチル化酵素阻害能とFOXP3発現の関係
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎 晋, 齋藤 暢知, 横倉 友諒, 大川 夏紀, 東海林 宏道, 寒竹 正人, 清水 俊明.
2. 発表標題 新生児のヒストン脱アセチル化酵素阻害能の特徴とFOXP3発現の関係
3. 学会等名 第55回日本周産期新生児医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----