

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15198

研究課題名（和文）T細胞分化におけるDNA脱メチル化酵素TETの機能解明

研究課題名（英文）The role of DNA demethylase TET in T cell function and differentiation.

研究代表者

中司 寛子（NAKATSUKASA, Hiroko）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：90749334

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：エピジェネティック修飾のひとつであるDNAメチル化は遺伝子発現の抑制やゲノム安定性の維持に必須の役割を果たし、個体の発生、細胞の分化やがん化に重要な役割を果たしている。本研究では、DNA脱メチル化酵素であるTetの欠損マウスを用い、T細胞増殖/分化における機能を解析した。Tetは末梢でのTreg/Th17/Tfh細胞分化を制御することが明らかとなり、さらにTregにおいてはFoxp3プロモーターの上流領域をターゲットとして安定化に寄与することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでヘルパーT細胞の分化機構に関しては急速に研究が進み、転写ネットワークによるヘルパーT細胞の分化機構については非常に多くの報告がなされているが、エピジェネティックな制御による可塑性、安定性についての研究は端緒についたばかりである。本研究ではDNA脱メチル化酵素TETがヘルパーT細胞分化の安定性と可塑性に関与することを明らかとしたが、今後さらに詳細な制御機構が解明されれば、免疫疾患、炎症性疾患やがんの新規治療法確立への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Ten-eleven translocation (TET) proteins regulate DNA methylation and gene expression. Previously we found that T cell-specific Tet2 and Tet3 double-knockout (Tet2f/fTet3f/fCd4-Cre; DKO) mice displayed splenomegaly and lymph adenopathy accompanied by uncontrolled activation of T cells which exhibited Th17- and/or follicular helper T (Tfh)-like phenotypes. In this study, we revealed that Tet2 and Tet3 regulate Treg/Th17 differentiation in periphery. Furthermore, DKO phenotypes were abrogated by treatment of antibiotics, especially by metronidazole, or restriction of TCR repertoire, suggesting the contribution of gut microbiota as intestinal antigen. We also revealed the involvement of upstream region of Foxp3 gene as Tet target region to regulate Treg stability. Thus, Tet plays important roles in T cell differentiation and function.

研究分野：免疫学

キーワード：DNAメチル化 制御性T細胞 エピジェネティクス 自己免疫疾患 TET

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 免疫応答における DNA 脱メチル化

エピジェネティック修飾のひとつである DNA メチル化は遺伝子発現の抑制やゲノム安定性の維持に必須の役割を果たし、個体の発生、細胞の分化やがん化に重要な役割を果たしている。DNA のシトシンメチル化 (5mC) は DNA メチルトランスフェラーゼ (DNMT) によって触媒される。一方 DNA 脱メチル化は DNMT による『維持メチル化』が抑制される受動的な機構と能動的な脱メチル化が存在し、能動的な脱メチル化のメカニズムとして 5mC をヒドロキシメチル化して 5hmC を生成する酵素 TET が注目を集めている。血球系における TET の機能解明は始まったばかりであるが、造血幹細胞で TET2 および TET3 を欠損させると骨髄系細胞の過増殖による白血病で早期に死亡することが報告されている。DNA 脱メチル化と免疫疾患の関係は様々な報告があるが、TET には 3 つのアイソザイム (TET1, 2, 3) が存在することから、TET による DNA 脱メチル化の免疫応答や免疫関連疾患に関する理解はほとんど進んでいない。

### (2) ヘルパー T 細胞の分化と DNA 脱メチル化

CD4 陽性のヘルパー T 細胞は様々なサイトカインを分泌し、免疫応答の性質を決定することから獲得免疫応答の司令塔と呼ばれている。これには炎症を促進する Th1, Th2, Th9, Th17, Tfh などのエフェクター T 細胞と、免疫を制御する制御性 T 細胞 (Treg) が存在する。それぞれのヘルパー T 細胞の分化には転写因子とエピジェネティックな修飾が重要な役割を果たす。ヘルパー T 細胞の中でも DNA メチル化の意義が最も明確に示されているのは Treg である。Treg には胸腺由来の nTreg と TGF- $\beta$  により末感作 (ナイーブ) T 細胞から誘導される iTreg が存在する。nTreg は Treg マスター遺伝子の Foxp3 遺伝子のエンハンサー領域 CNS2 が DNA 脱メチル化されており、Foxp3 の発現が安定化されている。一方 CNS2 が DNA メチル化されている iTreg は nTreg に比べ Foxp3 の発現が不安定であり、Foxp3 を消失した Treg (exFoxp3 細胞) は他のエフェクター T 細胞サブセットに再分化する。CNS2 を含む TSDR (Treg-specific demethylation region) の DNA 脱メチル化は TET に依存する可能性が示唆されるものの、遺伝子欠損マウスを用いた証明はなされていない。

### (3) これまでの研究経緯

T 細胞においては Tet2 と Tet3 の発現が高く Tet1 は比較的発現が低い。そこで、ヘルパー T 細胞分化における Tet の役割を明らかにするために T 細胞特異的 Tet2, 3 の両欠損マウス (*Tet2<sup>-/-</sup>Tet3<sup>-/-</sup>Cd4-Cre*; DKO) を作製した。その結果、DKO マウスは、オリゴクローナルな T 細胞増殖/活性化、および B 細胞の活性化を伴う二次リンパ器官の腫大を引き起こし、早期 (生後 75 日前後) に死亡することが明らかとなった。このとき T 細胞の多くは Th17 型の分化を伴っており、血中 IL-17 や IL-21 などが高値を示した。一方 Th1 や Treg は減少していた。また、Treg への Tet の影響を明らかにするために、Treg 特異的 Tet2/3 欠損マウス (*Tet2<sup>-/-</sup>Tet3<sup>-/-</sup>Foxp3<sup>FP-Cre</sup>*; FDKO) を作製したところ、DKO マウスと比べると長寿ではあるが、WT に比べて早期に、平均して生後 150 日程度で死亡することがわかった。FDKO マウスも高年齢 (4 カ月齢以上) になると DKO マウスと同様に T 細胞および B 細胞の活性化を伴う二次リンパ器官の腫大を引き起こした。また、FDKO マウスから単離した Treg を解析したところ、WT Treg に比して Tet2/3 欠損 Treg は TSDR メチル化の部分的亢進、および脱メチル化の指標である 5hmC の減少が認められ、Treg において Tet2/3 が TSDR の脱メチル化に関与することが明らかとなった。このようにヘルパー T 細胞、Treg いずれにおいても Tet が重要な働きを持つことを見出したが、Tet がどの遺伝子をターゲットとして働いているのか、DKO マウスでは T 細胞は何を認識して増殖性の疾患を呈するのか、Tet は末梢組織でどのように誘導されるのかなど詳細なメカニズムは未解明であった。

## 2. 研究の目的

本研究は、DNA 脱メチル化酵素である TET が制御する T 細胞増殖と分化に関与する遺伝子を明らかにし、DNA 脱メチル化による T 細胞分化の安定性と可塑性における意義を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) T 細胞における Tet の機能解明

T 細胞特異的 Tet2/3 欠損マウス (*Tet2<sup>-/-</sup>Tet3<sup>-/-</sup>Cd4-Cre*; DKO) を用い、フローサイトメトリー、RT-PCR、ELISA 法により T 細胞の表現系を解析した。さらに、DKO マウスを *Rag2<sup>-/-</sup>OT-11* TCR トランスジェニックマウス (*Rag2<sup>-/-</sup>OT-11*)、*117<sup>-/-</sup>*、*Rorct<sup>-/-</sup>*、*1123<sup>-/-</sup>*、*1121R<sup>-/-</sup>* マウスと交配させ原因遺伝子を探索した。

*Rag2<sup>-/-</sup>OT-11* マウスの T 細胞は OVA を抗原とし、OVA で刺激することで個体内および試験管内で分化誘導を再現出来る。この系を用いて T 細胞の増殖、分化を解析した。

DKO マウスより採取した糞便中の細菌叢を 16S rRNA-seq 法により解析した。

### (2) 制御性 T 細胞における Tet の機能解明

WT および Treg 特異的 Tet2/3 欠損マウス (*Tet2<sup>-/-</sup>Tet3<sup>-/-</sup>Foxp3<sup>FP-Cre</sup>*; FDKO) より Treg を FACS 分離し、PBAT 法、MBD-seq、ATAC-seq、マイクロアレイにより DNA メチル化、オープンクロマチン領域、遺伝子発現を統合解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) T細胞における Tet の機能解明

###### 末梢での T細胞分化における Tet の機能解明

DKO マウスでは末梢の T細胞は Th17 および Tfh 様細胞となっていることが明らかとなっていたが (図 1A, B) 大腸粘膜固有層における Treg/Th17 の割合を測定したところ、DKO マウスでは WT に比して Treg の割合は減少しており、Th17 細胞は増加していた (図 1C)。さらに DKO マウスの Treg のほとんどが胸腺由来 Treg のマーカーである Helios が高発現していた。この結果から、Tet2/3 は末梢における Treg/Th17 分化を制御することが示唆された。そこで、WT および DKO マウスより分離した naïve T細胞を in vitro において各種ヘルパー T細胞分化条件下で培養したところ、Tet2/3 欠損 naïve T細胞は Treg に分化しにくく、逆に Th17 細胞に分化しやすいことがわかった (図 1D)。

さらに、*Rag2*<sup>-/-</sup>OT-II 背景のマウスを用いて in vivo におけるヘルパー T細胞分化を検討した。*Rag2*<sup>-/-</sup>OT-II および DKO/*Rag2*<sup>-/-</sup>OT-II マウスに OVA を投与し末梢 T細胞を解析したところ、脾臓、リンパ節、および大腸粘膜固有層において *Rag2*<sup>-/-</sup>OT-II マウスでは OVA 投与による Treg の誘導が認められたが、DKO/*Rag2*<sup>-/-</sup>OT-II マウスでは Th17 が誘導されていた。

以上の結果より、Tet は末梢の Treg/Th17 分化を制御することが明らかとなった。

###### DKO における T細胞分化メカニズムの解明

DKO マウスを Th17 関連サイトカインシグナルを欠失したマウスと掛け合わせたと、いずれも T細胞の異常増殖は抑制できなかったが、*Il17*<sup>-/-</sup>、*Rorgt*<sup>-/-</sup>、*Il23*<sup>-/-</sup> マウスとの掛け合わせにより Treg 割合は回復し、*Il21R*<sup>-/-</sup> マウスとの掛け合わせでは Tfh 細胞分化を抑制できた。この結果より、DKO マウスにおいては Tet2/3 の欠損により Th17 関連サイトカインが優位に産生されることが、Th17/Tfh 細胞分化に重要であることが明らかとなった。

###### DKO マウスにおける T細胞異常増殖メカニズムの解明

DKO マウスは、オリゴクローナルな T細胞増殖/活性化、および B細胞の活性化を伴う二次リンパ器官の腫大を引き起こし早期に死亡するが、抗生物質投与により腸内細菌を除去するとマウスの症状は緩和されることから、DKO マウスは腸内細菌による末梢での強い T細胞受容体 (TCR) 刺激が過増殖の原因であると考えられた。また、DKO マウスを全身の T細胞が特異抗原の OVA と反応する TCR のみを発現する CD4<sup>+</sup>T細胞となる *Rag2*<sup>-/-</sup>OT-II トランスジェニック (*Rag2*<sup>-/-</sup>OT-II) 背景で作成した。本マウスは脾・リンパ節腫脹等の症状を自然発症せず、OVA の投与により発症が認められたことから、DKO の病態はやはり腸内細菌による TCR 刺激が症状の引き金となっていることが明らかとなった。

そこで DKO マウスにおいて病態発症に関与する腸内細菌を同定するため、抗生物質投与実験および糞便中の腸内細菌叢の解析を行った。その結果、WT と DKO マウスでは糞便中の構成細菌が異なり、その中でも metronidazole が活性を示す嫌気性菌である Bacteroidaceae および Helicobacteraceae に属する菌が DKO マウス病態に関与する可能性が示唆された。

##### (2) 制御性 T細胞における Tet の機能解明

これまでの研究により、Tet2/3 欠損 Treg は不安定であることが明らかとなっていたため、本研究ではそのメカニズムの解明を行なった。WT および Tet2/3 欠損 Treg における DNA メチル化状態を Postt-bisulfite Adaptor Tagging (PBAT) 法により、オープンクロマチン状態を Assay for transposase-accessible chromatin using sequencing (ATAC-Seq) を用いて解析した。その結果、Tet2/3 欠損 Treg では Foxp3 遺伝子の約 5kb

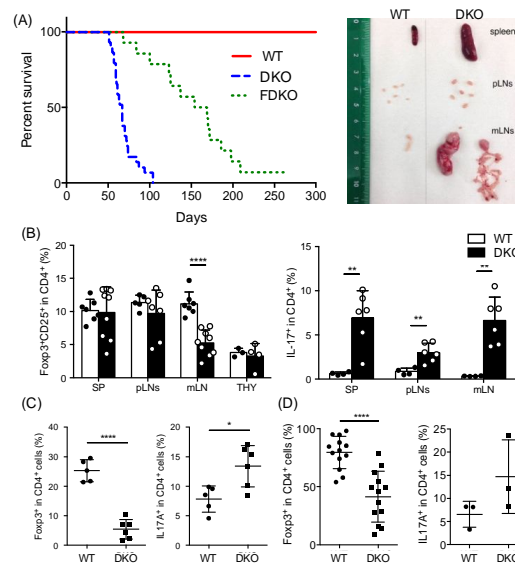


図1 Tet2/3欠損マウスは二次リンパ節腫脹をきたし早期に死亡する(A)、DKOマウスの各臓器(B)と大腸粘膜固有層(C)におけるTreg、Th17細胞割合、(D)in vitroでのnaïve T細胞からのTregおよびTh17細胞の誘導。

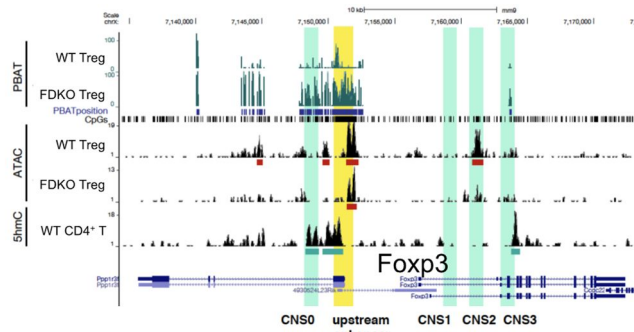


図2 制御性T細胞(Treg)特異的Tet2/3欠損マウス(FDKO)由来のTet欠損 TregはFoxp3のCNS領域およびupstream enhancer領域にメチル化とヘテロクロマチン化が認められ、これがFoxp3の不安定性に寄与すると考えられる。

上流領域に強いメチル化と ATAC ピークの消失が認められ、本領域における Foxp3 の安定性への寄与が示唆された(図2)。また、遺伝子発現(microarray)、DNAメチル化状態(PBAT法、MBD-seq)、オープンクロマチン(ATAC-seq)の統合解析により、TregにおいてTet2/3により制御される遺伝子群を抽出することができた。

(3) 以上の結果から、Tet2/3はT細胞において末梢、特に腸管における抗原刺激に対する増殖制御および末梢でのTreg/Th17/Tfh分化制御に関与することが明らかとなった。また、Tregの安定性に関与する遺伝子群の抽出ができたので、今後さらなる解析により原因遺伝子の特定を行う予定である。

これまでヘルパーT細胞の分化機構に関しては急速に研究が進み、転写ネットワークによるヘルパーT細胞の分化機構については非常に多くの報告がなされているが、エピジェネティックな制御による可塑性、安定性についての研究は端緒にすぎたばかりである。本研究ではDNA脱メチル化酵素TETに注目してヘルパーT細胞分化の安定性と可塑性を解明することを目標としたが、今後さらにT細胞分化の制御機構が詳細に解明されれば、免疫疾患、炎症性疾患やがんの新規治療法確立への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakatsukasa H, Oda M, Yin J, Chikuma S, Ito M, Koga-lizuka M, Someya K, Kitagawa Y, Ohkura N, Sakaguchi S, Koya I, Sanosaka T, Kohyama J, Tsukada YI, Yamanaka S, Takamura-Enya T, Lu Q, Yoshimura A.	4. 巻 31(5)
2. 論文標題 Loss of TET proteins in regulatory T cells promotes abnormal proliferation, Foxp3 destabilization, and IL-17 expression.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int Immunol.	6. 最初と最後の頁 335-347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ito M, Komai K, Mise-Omata S, Iizuka-Koga M, Noguchi Y, Kondo T, Sakai R, Matsuo K, Nakayama T, Yoshie O, Nakatsukasa H, Chikuma S, Shichita T, Yoshimura A.	4. 巻 565
2. 論文標題 Brain regulatory T cells suppress astrogliosis and potentiate neurological recovery.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 246-250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-018-0824-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Oike T, Kanagawa H, Sato Y, Kobayashi T, Nakatsukasa H, Miyamoto K, Nakamura S, Kaneko Y, Kobayashi S, Harato K, Yoshimura A, Iwakura Y, Takeuchi T, Matsumoto M, Nakamura M, Niki Y, Miyamoto T.	4. 巻 -
2. 論文標題 IL-6, IL-17 and Stat3 are required for auto-inflammatory syndrome development in mouse.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-34173-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kanamori M, Nakatsukasa H, Ito M, Chikuma S, Yoshimura A.	4. 巻 30
2. 論文標題 Reprogramming of Th1 cells into regulatory T cells through rewiring of the metabolic status.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int Immunol.	6. 最初と最後の頁 357-373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxy043.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hibino S, Chikuma S, Kondo T, Ito M, Nakatsukasa H, Omata-Mise S, Yoshimura A.	4. 巻 78
2. 論文標題 Inhibition of Nr4a Receptors Enhances Antitumor Immunity by Breaking Treg-Mediated Immune Tolerance.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 3027-3040
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-17-3102.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中司寛子、吉村昭彦
2. 発表標題 T細胞分化におけるDNA脱メチル化酵素Tetの機能解明
3. 学会等名 大阪大学第13回若手研究フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中司寛子、吉村昭彦
2. 発表標題 Gut microbiota mediate T cell senescence in Tet-deficient T cells.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroko Nakatsukasa, Akihiko Yoshimura
2. 発表標題 Tet2 and Tet3 regulate helper T cell differentiation in the periphery.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中司寛子、吉村昭彦
2. 発表標題 T細胞分化におけるDNA脱メチル化酵素Tetの機能解明
3. 学会等名 第39回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2018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