

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17918

研究課題名（和文）B細胞制御機構と自己免疫疾患発症におけるヒストン脱メチル化酵素UTXの役割

研究課題名（英文）The role(s) of UTX, histone demethylase for H3K27me3, in B cell regulatory mechanisms and autoimmune disease pathogenesis

研究代表者

世良 康如（Sera, Yasuyuki）

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：40836532

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）：UTXはメチル化されたヒストンH3の27番目のリジン残基に対する脱メチル化するエピジェネティック因子である。UTXに先天的な機能欠失型変異を有する歌舞伎症候群の患者は、高頻度に自己免疫疾患を発症することから、免疫細胞におけるUTXの機能欠失がその病態形成に寄与することが予想されるが、その詳細は明らかでない。

申請者らの作成したB細胞特異的UTX欠失マウスは、自己免疫疾患の病態形成に関与するB-1細胞や辺縁帯B細胞などの自然免疫系のB細胞サブセットに種々の異常が認められた。それらの細胞の網羅的発現解析からは、BCR signaling が減衰し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

エピジェネティクスは、クロマチン修飾による、塩基配列によらない可逆的な遺伝子発現制御機構であり、環境変化に感受性を持つ。自己免疫疾患の発症機構には、遺伝的要因に加えて環境要因が発症に重要なことから、エピジェネティクスに関心が寄せられている。本研究の成果は、B細胞のエピジェネティクスによる制御機構の一端を明らかにするとともに、先天性のUTX欠失が原因の歌舞伎症候群でみられる自己免疫疾患や、共通の病態をもつ自己免疫疾患の発症機構解明と治療法開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：UTX is a demethylase for trimethylated 27 on histone H3. The patients with Kabuki syndrome have congenital loss-of-function mutations in UTX. Since patients with this disease frequently develop autoimmune diseases, it is expected that the deletion of UTX in immune cells contributes to their pathogenesis, but the details are not clear. To investigate the role(s) of UTX in B cell regulatory mechanisms and autoimmune diseases, we generated B cell-specific UTX-deficient mice. This mice showed various abnormalities in B cell subsets of the innate immune system, such as B-1 cells and marginal zone B cells, which are involved in the pathogenesis of autoimmune diseases. Transcriptome analysis of those cells suggested that BCR signaling might be attenuated. The results of this study may provide a basis for elucidating the pathogenesis of autoimmune diseases caused by congenital UTX deletion or epigenetic deregulation and for developing therapeutic strategies.

研究分野：実験動物

キーワード：UTX B細胞 B-1細胞 辺縁帯B細胞 自己免疫疾患 エピジェネティクス

### 1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患は、発症機構に未だ不明な点が多く、その多くは遺伝的要因に加え、環境要因が発症に重要なことから、エピジェネティクスに関心が寄せられている。エピジェネティクスは、クロマチン修飾による、塩基配列によらない可逆的な遺伝子発現制御機構であり、環境変化に感受性を持つ。このことから、遺伝的要因や環境要因によるエピジェネティクス変化を介した遺伝子発現変化が、自己免疫疾患発症に重要であると考えられる。

UTX は、メチル化されたヒストン H3 の 27 番目のリジン残基 (H3K27) を脱メチル化するエピジェネティック因子であり、その遺伝子は X 染色体上に位置する。UTX は歌舞伎役者様の顔貌を特徴とする遺伝病、歌舞伎症候群の原因遺伝子としても知られる。歌舞伎症候群の患者は、全身性エリテマトーデスや特発性血小板減少性紫斑症など種々の自己免疫疾患を高頻度に発症することが報告されており (Stagi *et al.*, *Immunol Res*, 2015, Arsov *et al.*, *Eur J Med Genet*, 2018)、UTX 欠失によるエピジェネティクス脱制御によって、自己免疫疾患発症に至ったと推測されるが、その詳細は不明である。

申請者らは後天的かつ誘導可能に全身で UTX を欠失するコンディショナルノックアウト (cKO) マウスを作製し、造血系の解析を行う中で B 細胞分化を規定する表面マーカー、B220 のレベルが低下する分化異常を見出した。そこで B 細胞特異的に UTX を欠失するマウスを作成し解析したところ、全身性 UTX cKO マウスと同様の B220 の低下に加え、脾臓において自己免疫疾患への関与が疑われる CD5+ の B-1 細胞の増加を認めたと (図 1)。以上から、B 細胞での UTX 欠失が、自己免疫疾患発症において重要な役割を担う可能性が示唆された。

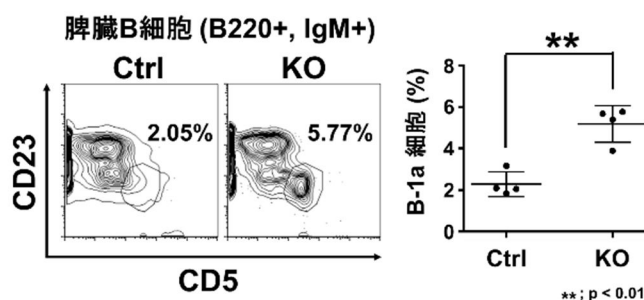


図1. B細胞特異的UTX cKO マウスは脾臓B-1a細胞の割合が増加する

### 2. 研究の目的

上記の背景から、先天性の UTX 欠失が原因の歌舞伎症候群でみられる自己免疫疾患や、エピジェネティクス脱制御などの共通の病態をもつ自己免疫疾患の発症機構解明と治療法開発につながる可能性があると考え、B 細胞での UTX 欠失によって生じる変化と自己免疫疾患発症における意義を、個体レベルから分子レベルにわたって明らかとすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 各種 B 細胞に対する UTX 欠失の影響の解析

若齢 (6~7 週齢) 成体 (10~12 週齢) および老齢 (1.5~2 年齢) の B 細胞特異的 UTX cKO マウスとコントロールマウスより骨髓細胞、脾臓細胞、腹腔内細胞を回収し、フローサイトメトリーにより各分化段階の B 細胞の割合や表面抗原の表出レベルを測定した。

#### (2) UTX 欠失自然免疫 B 細胞の発現解析

成体の B 細胞特異的 UTX cKO マウスとコントロールマウスより回収した B-1 細胞を含む腹腔内の CD23 陰性の B 細胞 (B220+, IgM+, CD23-) と脾臓辺縁帯 B 細胞 (B220+, IgM+, CD23+, CD21/35-) から RNA を抽出し、網羅的な遺伝子発現解析 (RNA-seq) を行い、UTX 欠失により発現変動したパスウェイを Gene set enrichment analysis (GSEA) により検証した。

#### (3) UTX との相互作用タンパク質の解析

先行研究より、UTX と協調して B 細胞制御に関わると考えられた SPI1 と UTX の結合を、免疫沈降法により検証した。また、新規 UTX 結合タンパク質同定のため、コムギ無細胞合成系で合成したエピジェネティック因子を用いたプロテインアレイにより、新規 UTX 結合タンパク質の探索を行った。

#### (4) UTX のアイソフォーム毎の局在解析

(3) などの実験で用いるため、哺乳細胞で全長やドメイン欠失などの変異体の UTX cDNA をクローニングし、発現ベクターに導入した。その結果、申請者の作成した UTX cDNA が既報とは異なる局在を示し、詳細を検討した結果、既報とは異なるアイソフォームを用いたことが原因と考えられた。そこでアイソフォーム毎に種々の発現ベクターを構築し、アイソフォーム間の局在を検証した。

#### 4. 研究成果

(1) 若齢の B 細胞特異的 UTX cKO マウスの骨髄中の B 細胞ではネガティブセレクションを終えた Mature B 細胞 (CD43<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>, IgM<sup>+</sup>, IgD<sup>+</sup>) の割合がコントロールに比べ減少しており、反対により未分化な段階にある Imature B 細胞 (CD43<sup>-</sup>, B220<sup>+</sup>, IgM<sup>+</sup>) や Small-Pre B 細胞 (CD43<sup>-</sup>, B220<sup>+</sup>, IgM<sup>-</sup>) などの細胞の割合は増加する分化不全が認められた。またもっとも未分化な B 細胞分画である Pro B 細胞 (CD43<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>, IgM<sup>-</sup>, IgD<sup>-</sup>) のうち Late Pro B 細胞 (HSA<sup>+</sup>, BP-1<sup>+</sup>) の割合が増加傾向にあり、V(D)J リコンビネーションやそのシグナル伝達過程に障害が生じている可能性が示唆された。

成体マウスの脾臓においては、CD5 陽性の B-1a 細胞 (B220<sup>+</sup>, IgM<sup>+</sup>, CD23<sup>-</sup>, CD5<sup>+</sup>) に加え、B-1 細胞と同様に自己免疫疾患の病態に関与する辺縁帯 B 細胞 (B220<sup>+</sup>, IgM<sup>+</sup>, CD23<sup>-</sup>, CD21/35<sup>+</sup>) の増加も認められた (図 2)。一方で、腹腔内細胞では、B-1 細胞が多分に含まれる CD23 陰性の B 細胞 (B220<sup>+</sup>, IgM<sup>+</sup>, CD23<sup>-</sup>) の割合やその数に UTX 欠失の影響は認められないが、腹腔内 B-1 細胞に通常は認められる CD5 や Mac-1 を表出した細胞の割合が著しく減少していた (図 3)。

老齢マウスにおいては、UTX 欠失によって脾臓細胞と CD5<sup>+</sup> の B 細胞の割合が増加傾向にあった。腹腔内細胞では UTX 欠失によって腹腔内細胞の減少傾向であり、成体で認められた分化異常が同様に認められた。また、この腹腔内細胞の減少は雌雄ともに認められたのに対し、脾臓細胞の増加傾向は雌マウスでのみ認められた。Y 染色体には脱メチル化活性を欠いた相補体 UTY が存在する。このことから脾臓細胞の増加は、UTX の脱メチル化活性依存的な機能の欠失、腹腔内細胞の減少は脱メチル化活性非依存的な機能の欠失がそれぞれ主要な原因であると推察された。

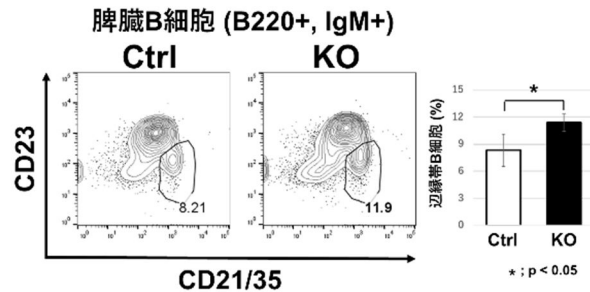


図2. B細胞特異的UTX cKO マウスは辺縁帯B細胞の割合が増加する

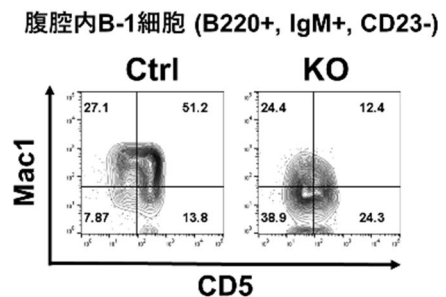


図3. B細胞特異的UTX cKO マウスは腹腔内B細胞に異常を呈する

(2) 上記のように、B 細胞特異的 UTX cKO マウスは、自己免疫疾患発症への関与が推察される自然免疫系 B 胞に異常を呈していることが明らかとなった。これらの異常の分子基盤を明らかにするため、B 細胞特異的 UTX cKO とコントロールマウスの腹腔内の CD23 陰性の B 細胞 (B-1 細胞) と脾臓の辺縁帯 B 細胞を用いて RNA-seq を行った。得られたプロファイルを対象とした GSEA から、腹腔内 B-1 細胞では UTX 欠失によって "CELL ADHESION MOLECULES" の遺伝子セットとの負の相関がトップヒットとなった (図 4 左)。この遺伝子セットには抗原提示や共刺激に関連する遺伝子が多く含まれており、B 細胞の機能不全を反映しているものと推察された。辺縁帯 B 細胞では、"MAPK SIGNALING PATHWAY" の遺伝子セットとの負の相関がトップヒットとなった。B 細胞特異的 UTX cKO マウスで認められた辺縁帯 B 細胞の増加は、BCR signaling の減衰によって起こる表現型と共通しており (Palm *et al.*, *J Autoimmun.* 2021) UTX cKO マウスにおいても BCR signaling が減衰している可能性が考えられた。MAPK signaling は BCR signaling において重要な役割を担っており、このことを反映しているものと推察された。実際に MAPK signaling と同様に BCR signaling において重要な役割をもつ "CALCIUM SIGNALING PATHWAY" の遺伝子セットにも強い負の相関が見られた。今後は BCR signaling の減衰が UTX の欠失により実際に起こるのかを検証するとともに、発現変動した遺伝子の UTX による制御のメカニズムを ChIP-seq などにより検証していく予定である。

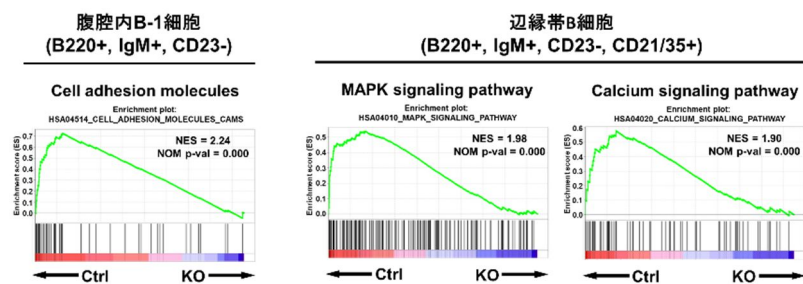


図4. 腹腔内B-1細胞と辺縁帯B細胞の発現パターンに対するUTX 欠失の影響

(3) UTX は N 末端にタンパク質結合ドメインである TPR ドメインを有しており、他のタンパク質と結合して複合体となることでその機能を発揮すると考えられる。全身性 UTX cKO マウスの造血幹前駆細胞の RNA-seq データを用いたエンリッチメント解析や KO マウスの表現型から、転写因子 SPI1 が UTX の B 細胞制御において重要な役割を担うと推測し、UTX と SPI1 の過剰発現細胞を用いた免疫沈降実験を実施したが、これら 2 つのタンパク質の結合は認められなかった。そこでエピジェネティック因子を用いたプロテインアレイにより新規 UTX 結合タンパク

質の同定を試みた。その結果 UTX 結合タンパク質候補として、15 種類のタンパク質を同定することに成功した。この 15 種類のうち 10 種類は TPR 欠失 UTX を bait タンパク質にした際のスコアは 2 倍以上低下していた。このことから候補タンパク質の多くは予想通り UTX の TPR ドメイン依存的に結合していることが示唆された。結合候補タンパク質のうち 1 種類は、そのノックアウトマウスにおいて自己免疫疾患様の表現型を呈することが報告されていることから着目しており、UTX との相互作用と免疫抑制におけるその意義の検証を進める予定である。

(4) TPR ドメイン直下のエクソンに違いのある UTX の代表的なアイソフォームそれぞれの全長と、それらアイソフォーム毎の TPR ドメイン欠失変異体の細胞内局在を検証した。その結果、一部のアイソフォームは TPR ドメイン非依存的な核内局在が認められ、そのアイソフォームのみにみられるエクソン内に NLS を同定した。これらの結果はアイソフォーム毎の機能差を示唆するとともに、核内だけではなく細胞質での UTX の機能の存在を示唆する。B 細胞制御に対してこれらのアイソフォーム毎にどのような役割を持つのかを検討することは今後の課題である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sera Y, Nakata Y, Ueda T, Yamasaki N, Koide S, Kobayashi H, Ikeda KI, Kobatake K, Iwasaki M, Oda H, Wolff L, Kanai A, Nagamachi A, Inaba T, Sotomaru Y, Ichinohe T, Koizumi M, Miyakawa Y, Honda ZI, Iwama A, Suda T, Takubo K, Honda H.	4. 巻 137
2. 論文標題 UTX maintains the functional integrity of the murine hematopoietic system by globally regulating aging-associated genes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 908 ~ 922
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019001044	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 Kobatake K, Ikeda K, Nakata Y, Yamasaki N, Ueda T, Kanai A, Sentani K, Sera Y, Hayashi T, Koizumi M, Miyakawa Y, Inaba T, Sotomaru Y, Kaminuma O, Ichinohe T, Honda Z, Yasui W, Horie S, Black Peter C., Matsubara A, Honda H	4. 巻 26
2. 論文標題 Kdm6a Deficiency Activates Inflammatory Pathways, Promotes M2 Macrophage Polarization, and Causes Bladder Cancer in Cooperation with p53 Dysfunction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 2065 ~ 2079
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.CCR-19-2230	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 Koizumi Miho, Eto Hikaru, Saeki Mai, Seki Masahide, Fukushima Tsuyoshi, Mukai Shoichiro, Ide Hisamitsu, Sera Yasuyuki, Iwasaki Masayuki, Suzuki Yutaka, Tohei Atsushi, Kishi Yusuke, Honda Hiroaki	4. 巻 36
2. 論文標題 UTX deficiency in neural stem/progenitor cells results in impaired neural development, fetal ventriculomegaly, and postnatal death	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e22662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202201002RR	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 世良康如, 中田雄一郎, 上田健, 山崎憲政, 小出周平, 小林央, 池田健一郎, 小島浩平, 岩崎正幸, 小田秀明, 金井昭教, 長町安希子, 稲葉俊哉, 外丸祐介, 一戸辰夫, 小泉美穂, 宮川佳彦, 本田善一郎, 岩間厚志, 須田年生, 田久保圭誉, 本田浩章
2. 発表標題 ヒストン修飾因子UTXは老化関連遺伝子を制御することにより造血系維持に関与する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年～2022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
研究協力者	竹田 浩之  (Takeda Hiroyuki)  (40609393)	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授    (16301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------