

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15498

研究課題名（和文）免疫応答における新規ヒストン修飾制御因子の役割

研究課題名（英文）Role of a novel histone modification regulator in immune response

研究代表者

高島 謙 (Takashima, Ken)

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・助教

研究者番号：10802647

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は申請者が独自に発見した新規ヒストン修飾制御因子Xの免疫応答での意義を明らかにするものである。分子Xは核小体に局在し、抑制性のヒストン修飾であるH3K27me3のバランスをゲノムワイドに制御する。申請者は本研究において、分子XがB細胞クラススイッチの指向性を制御すること、さらにマクロファージでこれまで知られていなかった「炎症プライミング」の制御に寄与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子XはヒストンH3と類似した配列を持ち、まるで「ヒストンを模倣するかのようにはる舞う」ことでH3K27me3修飾のバランスを制御する。このようなヒストンを模倣し、エピゲノム制御を行う因子の報告は初であり、我々は分子Xが乳がんの形成・進展に必要であることを明らかにしてきた。本研究結果では分子Xが乳がんのみならず、自然免疫応答やB細胞クラススイッチなどの免疫応答の制御にも寄与することを明らかにした。この「ヒストンを模倣する」という新たなエピジェネティクス制御機構をより深く理解することにより、生体恒常性のしなやかな制御を見出すとともに、新たなエピジェネティクス創薬に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study clarifies the significance of the novel histone modification regulator X, which was discovered by us, in immune responses. Molecule X is localized in the nucleolus and controls the balance of the repressive histone modification H3K27me3 genome-wide. In this study, we have revealed that 1) molecule X controls the orientation of B cell class switching, and 2) contributes to the control of "inflammatory priming" in macrophages.

研究分野：免疫学

キーワード：B細胞クラススイッチ 自然免疫応答 エピジェネティクス 核小体

## 1. 研究開始当初の背景

### (1)新規ヒストン修飾制御因子 X による H3K27me3 修飾制御メカニズムの解明

申請者は留学先にて新規ヒストン修飾制御因子として「核小体タンパク質 X」を同定し、転写抑制性のヒストン修飾である H3K27me3 修飾の責任酵素と相互作用することを見出した。さらに申請者は「分子 X は H3K27me3 修飾を負に制御する」ことを発見し、乳癌の形成・進展における本現象の重要性を示してきた。興味深いことに分子 X はヒストン H3 と類似した配列を持っており、申請者は、分子 X はヒストンを模倣し、ヒストン修飾自体を制御するような「内在性ヒストン模倣因子」として機能していると考えている。しかし、本メカニズムの生体での機能は不明な点が多い。

### (2)感染への免疫応答におけるエピジェネティクス制御の意義と分子 X の役割

リンパ球をはじめとする免疫細胞はその分化・成熟の過程で多様性を獲得し、生体防御に寄与する。B 細胞受容体の形成は遺伝子再構成と呼ばれるゲノムの改変が行われており、その制御には H3K27me3 修飾をはじめとしたエピジェネティクスの変化が重要であることが知られている(Xu Z et al., Nat. Rev. Immunol., 2012)。一方で、近年、ウイルス感染時のエピジェネティクスの変化の重要性が指摘されている(Wang X et al., Eur. J. Immunol., 2021)。以前から一部のウイルスタンパク質がヒストン修飾機構を攪乱して免疫逃避を図ることが知られており(Trakhoisky A et al., J. Exp. Med., 2018)、エピジェネティクス制御を接点とした宿主-ウイルス連関が注目を浴びている。大変興味深いことに、申請者は独自の解析から「分子 X が SARS-CoV2 ORF8 タンパク質と結合する」ことを発見し、SARS-CoV2 感染が分子 X を介してエピジェネティクス制御やその他の細胞機能に影響を及ぼしている可能性を見出した。このエピジェネティクスへの影響が、COVID-19 の病態の悪化や後遺症の形成に寄与している可能性が考えられるが、現在メカニズムやその意義は明らかになっていない。さらに最近の申請者の解析から、分子 X は自然免疫応答自体を強力に抑制することもわかったが、その詳細なメカニズムは不明であった。

### (3) B 細胞の機能におけるエピジェネティクス制御の意義

B 細胞は感染に対する液性免疫応答に必須であり、抗体産生を担う形質細胞へ分化することで、抗体を介した生体防御反応に重要な役割を果たす。B 細胞の分化や機能の制御には DNA メチル化やヒストン修飾等のエピジェネティクス制御が重要だが、その動的な制御機構には不明な点が多い。H3K27me3 修飾は B 細胞の分化や、クラススイッチ (class switch recombination: CSR) 等の機能の制御に重要であることが知られている。我々の予備実験からも H3K27me3 修飾は IgA へのクラススイッチに抑制的に働いていることがわかった。興味深いことに、データベース解析から分子 X は CSR が盛んに生じていると考えられるプレ胚中心 B 細胞や、または B 細胞リンパ腫細胞で高発現していることが明らかになったが、分子 X の B 細胞の分化や機能に与える影響は不明である。

## 2. 研究の目的

上記の背景から、分子 X は H3K27me3 修飾の制御を介し、抗体産生で重要な B 細胞クラススイッチ、または新型コロナウイルス等のウイルス感染への自然免疫応答や病態の形成に関与していると推察した。本研究では「新規ヒストン修飾制御因子分子 X によるヒストン修飾制御機構が B 細胞クラススイッチや自然免疫応答に及ぼす影響を明らかにすること」を目的とする。

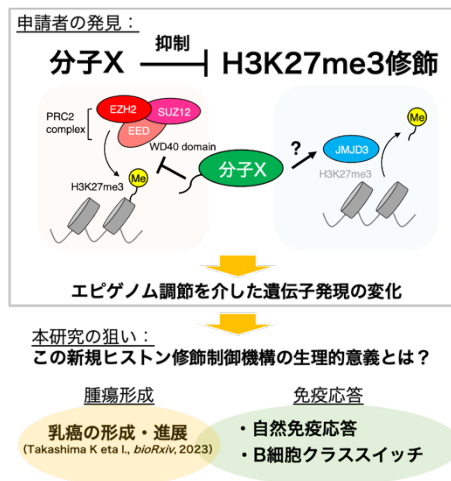


図1: 本研究の背景と狙い

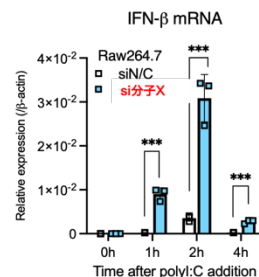


図2: 分子X欠損マクロファージでは自然免疫応答が顕著に亢進する

### 3. 研究の方法

#### 研究項目1：自然免疫応答における分子Xの役割

申請者は「分子Xが二重鎖RNAアナログ poly(I:C) への自然免疫応答を強力に抑制している」ことを見出したが、その機序は不明である。

まず、分子X欠損 Raw264.7 細胞を用いた RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行い、poly(I:C) 刺激の有無の各状況で分子X依存的に発現が変動する遺伝子群を特定する。またウイルス dsRNA 認識に重要である「TLR3 経路」および「RIG-I/MDA5-経路」への影響を調べるため、各受容体やアダプター分子の発現、局在、リン酸化等の翻訳後修飾をウエスタンブロット法や免疫染色法で調べる。なお HEK293T や A549 細胞等の上皮系の細胞でも同様の現象が見られるか確認する。

さらにマクロファージ特異的分子 X ノックアウトマウスを樹立し、マクロファージを分取してウイルス感染への免疫応答を評価し、個体レベルでの感染実験も試みる。

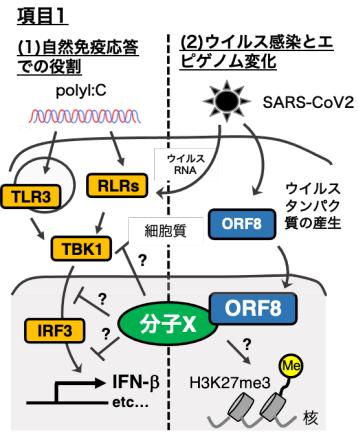


図3:研究の方法(項目1)

#### 研究項目2：B細胞クラススイッチ(CSR)における分子Xの役割

マウス B 細胞リンパ腫細胞株 CH12F3-2A では、IL-4, TGF-β, CD40L の刺激により IgM から IgA への CSR が誘導されることが知られており、CSR の解析に汎用される (右図)。

まず分子XがCSRに与える影響を調べるために、分子X過剰発現および欠損 CH12F3-2A 細胞を樹立し、IL-4, TGF-β, CD40L の刺激で誘導される CSR の効率を調べる。そのために免疫グロブリンをコードする IgH 領域の遺伝子再構成を PCR 法で確認し、CSR 特異的な転写産物を RT-qPCR 法により検出し、さらに細胞表面の IgM および IgA の発現をフローサイトメーターで調べる。さらに分子X過剰発現および欠損 CH12F3-2A 細胞について、IgH 領域での H3K27me3 修飾や分子Xの局在を ChIP-qPCR により調べ、エピジェネティクス制御と CSR の新たな制御機構の連関を明らかにする。

#### 項目2

分子X過剰発現・欠損  
CH12F3-2A細胞の樹立

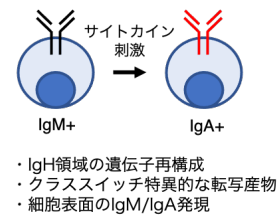


図4:研究の方法(項目2)

### 4. 研究成果

#### 研究項目1：自然免疫応答における分子Xの役割

分子X欠損 Raw264.7 細胞を用いた RNA-seq を行ったところ、分子Xの欠損によって poly(I:C) への自然免疫応答が全般的に亢進することが明らかとなった。具体的にはエンリッチメント解析から、IFN-α, IL-6, TNF など幅広いパスウェイに影響を及ぼしていることがわかった。次に TLR3 経路および RIG-I/MDA5 経路への経路への影響を調べた。各種受容体やアダプターの発現は分子X欠損のみでは変化はないものの、poly(I:C) 刺激によってアダプター分子の一つである TBK1 のリン酸化(活性型)が顕著に亢進することがわかった。興味深いことに分子Xの欠損による自然免疫応答の亢進はマクロファージや単球系の細胞で見られるものの、HEK293T や HeLa, A549 などの上皮系の細胞では見られなかった。

分子Xは核小体に局在する分子で、リボソーム 60S の補助因子でもある。そのため、我々は分子Xが欠損することで核小体の機能に影響が出ているのではないかと考えた。実際分子X欠損細胞ではリボソーム RNA(rRNA) の転写が減少し、核小体ストレスマーカー p38 のリン酸化が亢進していた。以前より核小体と炎症惹起の関連は示唆されていたものの、詳細な分子メカニズムは不明であった。rRNA の転写に必須である TIF-1A/RRN3 分子は特定のストレス環境で分解され、その後 IκB の分解を介して NF-κB の活性化に寄与することが知られている。我々は分子Xのみならず、RRN3 の欠損によっても、同様な自然免疫応答の増強(プライミング)が生じることを見出した。近年の報告からミトコンドリアや ER などのオルガネラストレスが生じた場合に、ミトコンドリア DNA が細胞質内に漏れこんで、cGAS-STING 経路に認識されることによって自然免疫応答をプライミングすることが知られている。我々の解析から、分子Xの欠損による自然免疫応答にも cGAS-STING 経路が関与することを見出しており、現在その詳細な機序を調べている。

#### 研究項目2：B細胞クラススイッチ(CSR)における分子Xの役割

##### 1. クラススイッチの誘導に伴って、分子Xの発現は一過性に減少する。

CH12F3-2A 細胞に IgA への CSR を誘導するように IL-4, TGF-β, CD40L(CIT 刺激)を加えたところ、6 時間後には分子X mRNA の発現が有意に減少することがわかった。このときクラススイッチに必須である DNA デアミネース AID をコードする Aicda 遺伝子の発現は 6 時間から 24 時間にかけて誘導され、逆の傾向となることが明らかとなった。どの因子が分子Xの発現減少に重要なのか調べたところ、IL-4 と TGF-β が発現低下に寄与していることがわかった。

## 2. 分子Xの欠損によりIgAへのクラススイッチが促進する。

クラススイッチを誘導する過程で分子Xの発現が減少すること意義を調べるため、CH12F3-2A細胞にCRISPR-Cas9システムを導入し、分子Xを欠損した細胞を構築した(図5A)。まずコントロール細胞と分子X欠損細胞について、CIT刺激を行い、免疫グロブリン重鎖コード領域でのDNA組換えを調べたところ、分子X欠損細胞ではIgMからIgAにクラススイッチする際に組換えが起きた際に生じるSu-Saジャンクション由来のPCR産物の量が優位に増加していた(図2B)。またこの時、細胞表面の免疫グロブリンのサブタイプを評価したところ、分子X欠損CH12F3-2A細胞では組換え効率の増加に伴ってIgA陽性細胞の割合が優位に増加していることが明らかとなった(図2C)。

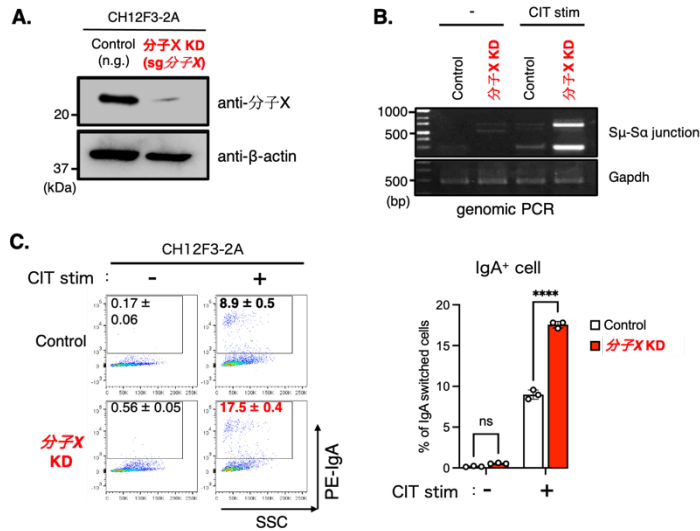


図5:分子X欠損細胞ではIgAへのクラススイッチが亢進する

## 3. 分子XはCIT刺激によるAID発現誘導を制御する。

分子Xの欠損によりIgAへのクラススイッチが亢進する機序として、我々はクラススイッチに必須であるDNAデアミナーAIDの発現に注目した。AIDは抗原刺激やCD40Lの刺激によって誘導され、クラススイッチや体細胞突然変異などB細胞の多様性を生む現象で必須の分子である。分子X欠損細胞でCIT刺激に伴う*Aicda*遺伝子の発現変動を調べたところ、分子X欠損細胞では*Aicda*の発現誘導が有意に亢進していた(図3A)。これは転写のみならずタンパク質のレベルでも顕著にその発現亢進が認められた(図3B)。さらに抗AID抗体を用いたクロマチン免疫沈降から、分子X欠損細胞ではAIDのSa領域へのリクルートが有意に増加していることがわかった(図3C)。以上から分子XはAIDの発現誘導を抑えることで、IgAへのクラススイッチを抑制することが示唆された。

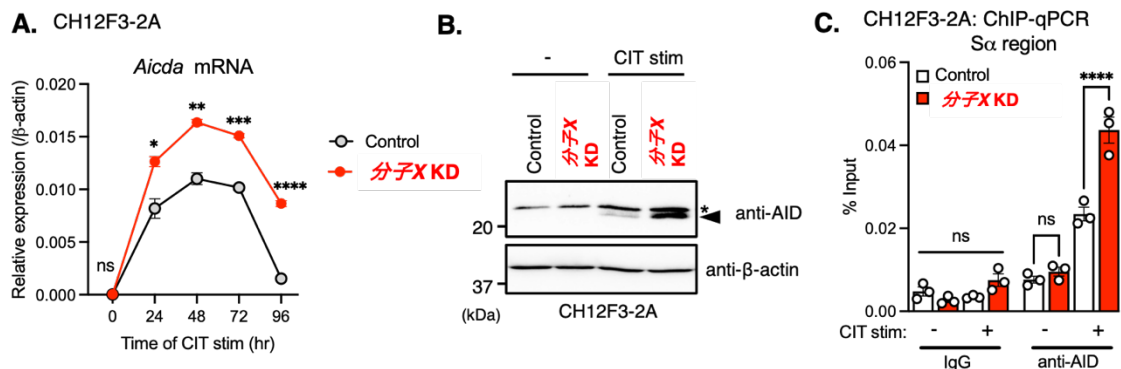


図6: 分子XはCIT刺激によるAID発現誘導を制御する。

既にCH12F3-2A細胞のみならずマウス脾臓由来のプライマリB細胞を用いた解析からも分子Xがクラススイッチの指向性を制御することを見出している。さらに我々はB細胞特異的タモキシフェン誘導型分子X欠損マウス(分子X<sup>f/f</sup>CD19-CreERT2)の樹立に成功し、B細胞でのクラススイッチの「指向性」を制御するメカニズムを今後生体レベルで明らかにしてゆく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Takashima Ken, Lee Dian-Jang, Trovero Maria Fernanda, Rothi M. Hafiz, Mistry Meeta, Zhang Ying, Li Zhouyihan, Davis Christopher P., Li Zilan, Natale Julia, Schmid Ernst, Al Haddad Joseph, Hoffmann Gabriela Brunsting, Dietmann Sabine, Sui Shannan Ho, Oshiumi Hiroyuki, Lieberman Judy, Greer Eric Lieberman	4. 巻 -
2. 論文標題 NOP16 is a histone mimetic that regulates Histone H3K27 methylation and gene repression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	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） 10.1101/2023.06.13.544862	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 Yamaguchi Mako, Mtali Yohana S., Sonokawa Hitomi, Takashima Ken, Fukushima Yoshimi, Kowaki Takahisa, Oshiumi Hiroyuki	4. 巻 68
2. 論文標題 HPV vaccines induce trained immunity and modulate pro inflammatory cytokine expression in response to secondary Toll like receptor stimulations	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 65~74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.13108	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ken Takashima
2. 発表標題 Nucleolus dysfunction-induced DNA leaking alters innate immune response under nutrition starvation
3. 学会等名 JSICR/MMCB 2023（国際学会）
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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			
米国	Washington University in St. Louis	Boston Children's Hospital	Harvard Medical School	