

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：32409  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23790544  
 研究課題名（和文）CD8 陽性 T 細胞におけるヒストン修飾による機能及び分化制御の解明  
 研究課題名（英文）The role of histone modifications in the function and differentiation of CD8 T cells  
 研究代表者  
 荒木 靖人 (ARAKI YASUTO)  
 埼玉医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：10580839

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、CD8 陽性 T 細胞の機能・分化におけるヒストン修飾の制御機構の解析を行った。ヒストン修飾（ChIP-Seq 法）と遺伝子発現（マイクロアレイ法）を活性化 CD8 陽性 T 細胞において比較した結果、H3K4me3 と H3K9ac は遺伝子発現と正の相関があった。これはナイーブ細胞、メモリー細胞において同様であった。CD8 陽性 T 細胞のエフェクター分子のヒストン修飾の刺激後の時間経過を調べたところ、エフェクター機能と相関する結果であった。次に、ヒストンメチル基転移酵素とヒストン脱メチル化酵素において、刺激後に発現が上昇する一群と低下する一群を見だし、活性化後のヒストンメチル化の変化に関与していると推測された。以上の結果より、CD8 陽性 T 細胞の機能・分化において、ヒストンメチル化が変動して遺伝子発現を調節している事が示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

In this study, we analyzed the mechanisms regulating histone modifications in the function and differentiation in CD8 T cells. We compared histone modifications and gene expressions by the genome-wide analyses in activated CD8 T cells. Both H3K4me3 and H3K9ac were positively correlated with gene expressions. The change in histone modifications in effector molecules after stimulation were associated with the effector function in CD8 T cells. Some histone methyltransferases and histone demethylases were upregulated and others were downregulated in CD8 T cells after stimulation. They were suggested to be associated with the change in histone methylation in activated CD8 T cells. Together, the dynamic changes in histone methylation were supposed to regulate gene expressions in the function and differentiation in CD8 T cells.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：リンパ球、CD8 陽性 T 細胞、T 細胞分化、エピゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

(1)CD8 陽性 T 細胞は、ウイルス感染細胞や腫瘍細胞の排除に重要な役割を果たす。病原体などの抗原刺激後に、ナイーブ T 細胞はメモリー T 細胞に分化する。メモリー T 細胞は、同じ抗原刺激に対してより早く反応し、自己

複製能を持ち、長期間に渡って存続する事が出来る。しかしながら、この CD8 陽性 T 細胞分化及びエフェクター機能制御の機序はいまだ不明な部分が多く、これを解明する事はウイルスに対するワクチン作成などの面で臨床応用に有益である。

(2)細胞は分化する時に、各分化段階特異的な遺伝子発現がきちんと調節されている。CD8 陽性 T 細胞において、抗原刺激後に起る遺伝子発現の変化が、CD8 陽性 T 細胞の機能と相関している事がマイクロアレイ法による実験で示された (Kaech SM et al. Cell 111(6):837-851, 2002)。申請者らは、CD8 陽性 T 細胞の機能・分化がエピジェネティクスの制御を受けているのではないかと考え、エピジェネティクス制御で重要なヒストン修飾について CD8 陽性 T 細胞の機能・分化との関連を調べた。まずヒストンアセチル化について調べたところ、H3K9ac は、CD8 陽性 T 細胞機能に重要な転写因子 *EOMES* とエフェクター機能分子 *GZMB*, *PRF1* の 3 つの遺伝子のプロモーター領域でメモリー細胞においてナイーブ細胞と比べて高値を示した (Araki Y et al. Journal of Immunology 180(12):8102-8108, 2008)。これにより、ヒストンアセチル化が CD8 陽性 T 細胞のエフェクター機能と関連する事が示された。次に、申請者らはヒストンメチル化が CD8 陽性 T 細胞の分化における特異的遺伝子発現の変化と関連している事を報告した (Araki Y et al. Immunity 30(6):912-925, 2009)。マイクロアレイ法と ChIP-Seq 法を用いたゲノム全域に渡る CD8 陽性 T 細胞における遺伝子発現とヒストンメチル化の比較解析にて、活性化ヒストンマーカーである H3K4me3 と遺伝子発現の間に正の相関が、抑制的ヒストンマーカーである H3K27me3 と遺伝子発現の間に負の相関が認められた。さらに、メモリー T 細胞においては、ヒストンメチル化と遺伝子発現の間に複雑な相関関係が認められ、ヒストンメチル化がメモリー T 細胞の機能において重要な役割を果たしている事が示唆された。

## 2. 研究の目的

(1)CD8 陽性 T 細胞の分化及びエフェクター機能がどのように制御されているかはいまだ不明である。申請者らはエピジェネティクス機構の中でもヒストン修飾による遺伝子発現の制御が、CD8 陽性 T 細胞の機能・分化において重要であることを報告してきた。本研究では、CD8 陽性 T 細胞の機能・分化におけるヒストン修飾の制御機構の解析を行った。

(2) ナーブ、セントラルメモリー、エフェクターメモリー CD8 陽性 T 細胞の未刺激の状態におけるヒストンメチル化のプロファイルを申請者らは以前に報告した。しかしながら、活性化後に CD8 陽性 T 細胞のヒストン修飾の状態がどのように変化するかは不明である。そこで、CD8 陽性 T 細胞をナイーブ、セントラルメモリー、エフェクターメモリー細胞に分離し、抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体によ

り刺激して、ヒストンアセチル化およびヒストンメチル化のプロファイルの変化を調べた。最初に全遺伝子についてヒストン修飾のプロファイルと遺伝子発現を比較した。次に、CD8 陽性 T 細胞におけるエフェクター分子 (*GZMB*, *IFNG*, *FASLG*) について、刺激後にヒストン修飾がどのように変化していくか時間経過を追った。

(3)CD8 陽性 T 細胞の機能・分化においてヒストンメチル化がどのように制御されているのかを検討するため、申請者はヒストンメチル化修飾酵素に着目した。ヒストンメチル化修飾酵素にはヒストンメチル基転移酵素 (HMT) とヒストン脱メチル化酵素 (HDM) の 2 つがあり、ヒストンメチル化をそれぞれ正負に制御している。これらの酵素はほとんどが最近発見されたものであり、特に HDM はここ数年の間に報告された新規の酵素である。そのため、まだこれらの酵素の機能はまだ十分に解明されていない。HMT の G9a が、CD4 陽性 T 細胞の分化・機能に關与しているという報告が最近にあり (Lehnertz B et al. J Exp Med. 207(5):915-922, 2010)、T 細胞におけるヒストン修飾酵素の役割について注目されてきている。しかしながら、ヒストンメチル化修飾酵素が、CD8 陽性 T 細胞の機能・分化と関連しているという報告はまだみられない。そこで、申請者は CD8 陽性 T 細胞のエフェクター機能・分化において、HMT・HDM がどのようにヒストンメチル化を制御しているのか解析を行った。

(4)以上から、細胞分化の一つのモデルとして、末梢血液中の CD8 陽性 T 細胞を用いて、ヒストンメチル化を調節するエピジェネティクス機構を明らかにする事が本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### (1)抗体と試薬

FITC-抗 CD45RA 抗体、PE-抗 CD62L 抗体は eBioscience 社より購入した。TC-抗 CD8 抗体は Invitrogen 社より購入した。抗 H3K4me3 抗体、抗 H3K9ac 抗体、抗 H3K27me3 抗体は Abcam 社より購入した。精製ラビット IgG 抗体は Millipore 社より購入した。micrococcal nuclease (MNase)は Sigma 社より購入した。抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体は Invitrogen 社より購入した。

### (2)CD8 陽性 T 細胞の分離と刺激

ヒト末梢血単核細胞からセルソーターによりナイーブ細胞 (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>)、セントラルメモリー細胞 (CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>)、エフェクターメモリー細胞 (CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>) に分離した。分離後すぐに実験に用いるか、抗 CD3

抗体/抗 CD28 抗体にて 16 時間および 72 時間刺激後に実験に用いた。

### (3)クロマチン免疫沈降 (ChIP)-定量的 PCR 法および ChIP-Seq 法

CD8 陽性 T 細胞を 0.2U MNase にて処理をする事によりモノヌクレオソームとゲノム DNA の複合体を精製した。各ヒストン修飾特異的抗体を用いて免疫沈降反応を行った後、回収された複合体を洗浄し、1mg/ml proteinase K および 0.3% SDS にて処理を行い、複合体から DNA を分離した。フェノール・クロロホルムにて DNA を抽出し、エタノール沈殿により DNA を精製した。各遺伝子特異的なプライマーを用いて、リアルタイム PCR を行い、免疫沈降していない DNA (input) に対する免疫沈降にて回収された DNA の割合を計算して比較検討を行った。

ChIP-Seq 法については、付属のプロトコールに従い、ChIP 法により精製した DNA からアダプターの付いたライブラリーを作成し、1G Genome analyzer (Illumina 社)により DNA の塩基配列を決定した。Illumina Analysis Pipeline を用いて、DNA をゲノム上にマッピングし、免疫沈降により回収された DNA の定量化を行った。

### (4)定量的 RT-PCR 法

培養細胞を TRIzol (Invitrogen 社) に懸濁した後、付属のプロトコールに従い、mRNA を分離した。SuperScript III (Invitrogen 社) と Oligo(dT)12-18 primer (Invitrogen 社) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作成した。各遺伝子特異的なプライマーを用いて、リアルタイム PCR (Applied Biosystems 社の StepOnePlus システム) を行い、*ACOX1* を internal control として各遺伝子発現を数値化して比較検討を行った。

### (5)DNA マイクロアレイ法

CD8 陽性 T 細胞から得られた total RNA を用いて、付属のプロトコールに従い、Whole Human Genome 44K Oligo Chip (Agilent 社) により遺伝子発現を解析した。

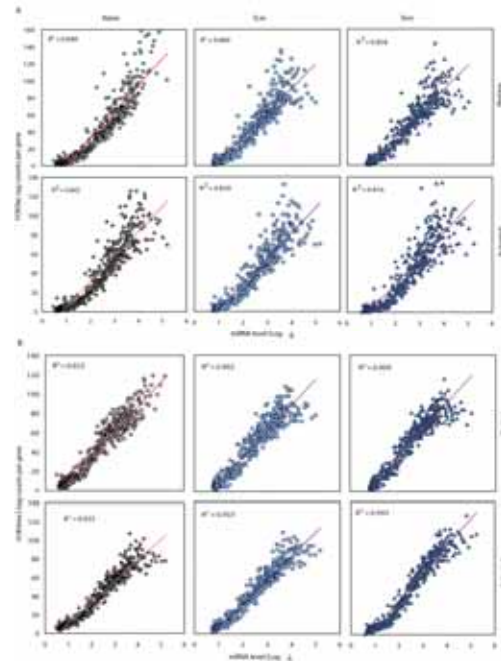
### (6)統計処理

Mann-Whitney の U-test にて P 値<0.05 を有意差ありと判断した。

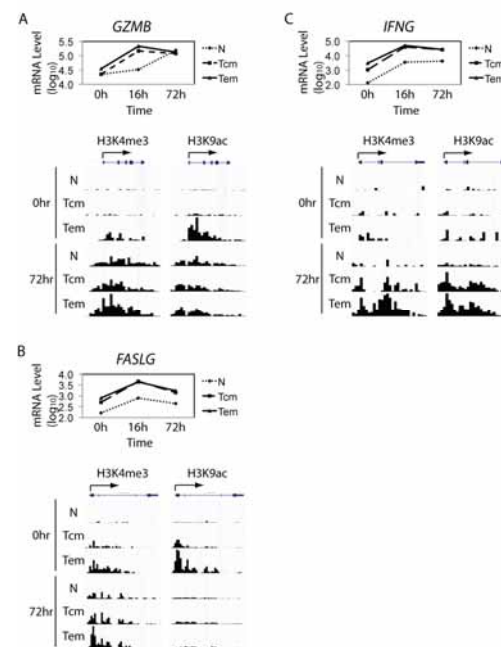
## 4. 研究成果

(1)活性化 CD8 陽性 T 細胞におけるヒストン修飾と遺伝子発現の全体的な関連: ChIP-Seq 法を用いてゲノムワイドにヒストンのメチル化とアセチル化のプロファイルを刺激後の CD8 陽性 T 細胞において調べ、同様にマイクロアレイ法にて調べたゲノムワイドな遺伝子発現と比較した。その結果、刺激後 72

時間の CD8 陽性 T 細胞において、H3K4me3 と H3K9ac は遺伝子発現と正の相関を認めた(下図 A.H3K9ac、B.H3K4me3)。ナイーブ細胞 (Naive)、セントラルメモリー細胞 (Tcm)、エフェクターメモリー細胞 (Tem) においても比較したが、同様の結果であった。



### (2)CD8 陽性 T 細胞の各分画における刺激後のエフェクター分子のヒストン修飾変化: 抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体刺激 72 時間後の活性化



ヒストンマーカー (H3K4me3、H3K9ac) を *GZMB*、*FASLG*、*IFNG* 遺伝子において比較すると、ナイーブ細胞 (Naive) よりもメモリー細胞 (Tcm、Tem) において上昇していた。メモリー細胞

のあいだで比較すると、H3K4me3、H3K9ac とともにセントラルメモリー細胞 (Tcm) よりもエフェクターメモリー細胞 (Tem) において上昇していた。抗原刺激後のエフェクター機能は Tem、Tcm、Naïve の順に強いと考えられるが、それとヒストン修飾が関連する事が示唆された。また、興味深い事に H3K9ac は GZMB と FASLG においては未刺激時に Tem で高値を示し、刺激後に減少していた。Tem は抗原に対して即時的にエフェクター機能を示す。GZMB と FASLG のエフェクター分子では、H3K9ac がその機能に重要な役割を持つものと考えられた。

(3)CD8 陽性 T 細胞における刺激後の HMT と HDM 発現の変化：ナイーブとメモリーCD8 陽性 T 細胞において、HMT と HDM の発現を未刺激時と抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体による刺激後に比較した。その結果、刺激後に発現が上昇する一群と低下する一群を見いだした。HMT では 4 酵素 (SETD8、SUV39H1、SUV39H2、EZH2) が上昇し、9 酵素 (SETD1A、SETD1B、SETD2、SETDB1、MLL5、EHMT1、PRDM2、EZH1、SUV420H1) が低下していた。HDM では 4 酵素 (LSD1、JMJD2D、FBXL10、JMJD2A) が上昇し、4 酵素 (FBXL11、JMJD2C、JARID1D、UTX) が低下していた。これらは、CD8 陽性 T 細胞のエフェクター機能・分化に重要な役割を果たすヒストンメチル化修飾酵素と考えられ、活性化後のヒストンメチル化の変化に関与しているものと推測された。

(4)以上の結果は、CD8 陽性 T 細胞の分化及びエフェクター機能発現の過程において、ヒストンメチル化が変動して遺伝子発現を調節している事を示唆している。本研究により、CD8 陽性 T 細胞におけるヒストン修飾の制御ネットワークの一端を明らかにする事が出来たと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

(1) Weng NP, Araki Y, Subedi K. The molecular basis of the memory T cell response: differential gene expression and its epigenetic regulation. Nature Reviews Immunology. 査読有. 12(4). 2012. 306-315  
DOI: 10.1038/nri3173

(2) 荒木靖人、関節リウマチにおけるエピジェネティクス制御の異常の解明、埼玉医科大学雑誌、査読無、39、2012、4-8

(3) 荒木靖人、CD8 陽性 T 細胞の分化・機能におけるヒストン修飾の役割:ゲノムワイドな解析を含めた最新の知見、日本臨床免疫学会誌、査読無、34(3)、2011、131-137

(4) Sato K, Miyoshi F, Yokota K, Araki Y, Asanuma Y, Akiyama Y, Yoh K, Takahashi S, Aburatani H, Mimura T. Marked induction of c-Maf protein during Th17 cell differentiation and its implication in memory Th cell development. The Journal of Biological Chemistry. 査読有. 286(17). 2011. 14963-14971  
DOI: 10.1074/jbc.M111.218867

[学会発表](計6件)

荒木靖人、和田琢、佐藤浩二郎、織田弘美、黒川理樹、三村俊英、関節リウマチ滑膜線維芽細胞の IL-6 依存性 MMP 遺伝子転写活性化におけるヒストンメチル化の役割、第7回日本エピジェネティクス研究会年会、2013年05月30日、奈良新公会堂

荒木靖人、和田琢、佐藤浩二郎、横田和浩、三由文彦、梶山浩、舟久保ゆう、金潤澤、織田弘美、秋山雄次、三村俊英、関節リウマチ滑膜線維芽細胞の IL-6 依存性 MMP 遺伝子転写活性化におけるヒストンメチル化の役割、第57回日本リウマチ学会総会・学術集会、2013年04月18日、京都国際会議場

Y. Araki, T. Wada, K. Sato, N. Kurosawa, K. Fujimoto, S. Suzuki, K. Yokota, F. Miyoshi, Y.T. Kim, H. Oda, R. Kurokawa, T. Mimura. Histone methylation is associated with MMPs gene transcriptional activation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. The 10th RCGM International Symposium of Academic. Nov 3, 2012. Commemoration Hall, Saitama Medcal University Hidaka Campus, Saitama, Japan

Subedi K, Araki Y, De S, Wood W, Sharov A, Zang C, Schones D, Lhotsky B, Dudekula D, Becker K, Ko M, Peng W, Zhao K, Weng NP. Dynamic changes of gene expression in concordance with histone modifications in CD8 T cells after activation. 98th The American Association of Immunologists Annual Meeting. May 13, 2011. the Moscone Center, San Francisco, California, USA.

Araki Y, Yokota K, Sato K, Miyoshi F, Wada T, Kim YT, Oda H, Mimura T. Histone methylation is associated with MMP gene expressions in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. The 4th East Asian

Group of Rheumatology (EAGOR2011).  
October 15, 2011. Keio Plaza Hotel Tokyo,  
Tokyo, Japan

荒木靖人、横田和浩、三由文彦、佐藤浩二  
郎、金 潤澤、織田弘美、三村俊英、関節リ  
ウマチの滑膜線維芽細胞におけるヒストン  
メチル化は MMPs 遺伝子発現と関連する、第  
55 回日本リウマチ学会総会・学術集会、  
2011.7.20、神戸ポートピアホテル、神戸

〔図書〕(計 2 件)

- (1) 荒木靖人, 他、南山堂、南山堂医学大辞  
典、in press
- (2) 荒木靖人, 他、ヌーヴェルヒロカワ社、  
臨床病態学 2 巻、2013、611-614

〔その他〕

ホームページ等

- (1) 埼玉医科大学リウマチ膠原病科 研究内  
容(荒木靖人)  
[http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/rium  
achi/Dr.Araki.html](http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/riumachi/Dr.Araki.html)
- (2) ゲノム医学研究センタープロジェクト  
研究部門  
[http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/rium  
achi/genome.html](http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/riumachi/genome.html)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

荒木 靖人 (ARAKI YASUTO)  
埼玉医科大学・医学部・助教  
研究者番号：10580839

### (2)研究分担者

該当なし

### (3)連携研究者

該当なし