

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860376

研究課題名(和文) T細胞運命決定における転写抑制因子Bach2の役割解析

研究課題名(英文) An investigation of the role of the transcription repressor Bach2 in CD4 T cell-mediated immune homeostasis

研究代表者

桑原 誠 (Kuwahara, Makoto)

愛媛大学・医学部附属病院・その他

研究者番号：00568214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究課題の目的は、末梢 CD4 T 細胞の運命決定機構における転写抑制因子 Bach2 の役割を明らかにすることである。Bach2 は転写調節因子 Batf と会合し、Th2 サイトカイン遺伝子座の IL-4 エンハンサー、locus control region の AP-1 結合領域に結合し、IL-4 の産生を抑制することで、Th2 型免疫反応を制御していることがわかった。また、Bach2 は老化 CD4 T 細胞における SASP (炎症性サイトカインを含む分泌性炎症因子を高発現する細胞形質) を抑制していることも明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The transcriptional repressor Bach2 acts as a key regulator of T cell-mediated immune homeostasis. However, molecular mechanisms by which Bach2 controls T cell-mediated immune homeostasis remain unclear. We found that Bach2 associates with transcriptional factor Batf and binds to the Th2 cytokine gene loci including the IL4 enhancer and locus control regions both of which containing AP-1 motifs, which led to the inhibition of IL-4 production. Furthermore, the spontaneous development of Th2-type lung inflammation and accelerated Th2 cell differentiation caused by the T cell-specific Bach2 deficiency was normalized by the T cell-specific deletion of the Batf gene. These results indicated that Bach2-Batf complex is required to repress the Th2-type immune responses. We also showed that Bach2 inhibits the senescence-associated secretory phenotype (SASP) in senescent CD4 T cells. These findings reveal a critical role of the Bach2 in regulating CD4 T cell-mediated immune homeostasis.

研究分野：免疫学

キーワード：Th2 免疫老化 Bach2

1. 研究開始当初の背景

転写抑制因子 Bach2 (BTB and CNC homology 1) は、免疫担当細胞においては、B 細胞に選択的に発現し、クラススイッチリコンビネーションや体細胞高頻度突然変異、形質細胞の分化に関与することが報告されている。T 細胞株を主に用いたこれまでの研究では、T 細胞では Bach2 は発現しておらず、機能していないと考えられてきた。しかし、申請者らは、T 細胞でも Bach2 が T 細胞の活性化に影響を与える可能性を新たに見出した。これまでの基礎検討から、ナイーブ CD4 T 細胞で高発現している Bach2 は抗原刺激により発現が低下すること、ヘルパー T (Th) 細胞サブセットやメモリー Th 細胞サブセット間で発現が異なること、Bach2 欠損 CD4 T 細胞では Th1/Th2 細胞分化が亢進し、iTreg 細胞の分化が低下する (*in vitro*) ことがわかっている。そこで、これらの基礎検討に基づいて本申請研究では、Th 細胞サブセットとメモリー T 細胞分化、そして T 細胞老化における Bach2 の役割解析を介して、免疫反応における Bach2 の役割の全体像を明らかにし、Bach2 を介した新規の免疫反応制御経路を提唱する。

2. 研究の目的

本申請研究では、T 細胞分化における Bach2 の役割を、特に末梢 T 細胞の運命決定機構への関与を中心に検討する。具体的には (1) Th 細胞サブセットの分化、(2) メモリー T 細胞分化、(3) T 細胞老化における Bach2 の役割について解析をおこなうとともに、(4) Bach2 の発現調節機構を明らかにする。最終的には、免疫反応における Bach2 の役割の全体像を解明し、Bach2 を介した免疫反応の新規制御経路の提唱を目指す。

3. 研究の方法

末梢 T 細胞運命決定機構における Bach2 の役割を解析するために、T 細胞特異的 Bach2 欠損マウスを作製した。In vitro 分化誘導系を用いて、Bach2 欠損 naïve CD4 T 細胞の Th サブセット分化について検討した (*in vitro* 分化誘導系)。また、これまでに老化 T 細胞モデルは確立していなかったが、申請者らは腫瘍抑制因子 Menin 欠損 T 細胞が抗原刺激後早期に老化 T 細胞様の表現型を呈することを明らかにしていることから (Kawahara et al. Nat. Commun. 2014)、Menin 欠損活性化 T 細胞を老化 T 細胞モデルとして使用し、老化 T 細胞における Bach2 の役割を解析した。T 細胞における新規 Bach2 結合タンパク質を、コムギ無細胞蛋白質合成系とアルファスクリーンによるハイスループットスクリーニング法により探索した。

4. 研究成果

(1) Bach2 による IL-4 産生抑制と Th2 型免疫反応の制御

T 細胞特異的 Bach2 欠損 (Bach2 KO) マウスの肺において、細気管支周囲への炎症細胞の浸潤、肺組織構造の破壊、粘液産生の亢進、杯細胞の過形成が観察された (図 1)。

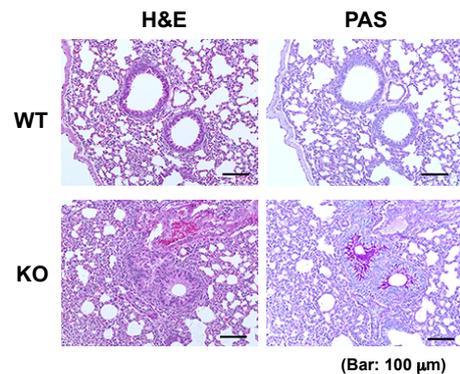


図 1 T 細胞特異的 Bach2 欠損マウスの肺では炎症が自然発症する。(WT: 野生型、KO: Bach2 KO)

さらに、野生型に対して Bach2 KO マウスにおいて、メサコリン感受性を指標にした気道過敏性の亢進、気道肺胞洗浄液中の炎症性細胞の有意な上昇、特に好酸球の顕著な増加が明らかになった。さらに、Bach2 KO マウスの肺 CD4 T 細胞において、IL-4、IL-5、IL-13 の産生は野生型に対して有意に上昇することもわかった。これらの結果から、Bach2 KO マウスではアレルギー性気道炎症が自然発症していることがわかった。一方、*in vitro* 分化誘導系において、Bach2 欠損ナイーブ CD4 T 細胞の IL-4 産生細胞が増加しており、Th2 細胞分化が亢進することがわかった (図 2)。

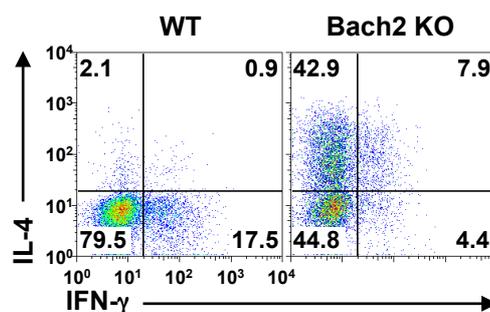


図 2 Bach2 欠損活性化 CD4 T 細胞では Th2 細胞分化が亢進する。

加えて、Bach2 欠損 CD4 T 細胞では TCR 刺激後の初期 IL-4 産生が亢進することもわかった。さらに、Bach2 欠損による Th2 細胞分化の亢進、およびアレルギー性気道炎症の病態は、Stat6 の欠損により抑制された。したがって、Bach2 は IL-4 の産生抑制により、Th2 型免疫反応を制御していることが示された。

次に、Bach2 による IL-4 産生抑制のメカニズムを検討した。クロマチン免疫沈降 (ChIP) -シーケンスおよびマニユアル ChIP の解析から、Bach2 は Th2 サイトカイン遺

伝子座の IL-4 エンハンサー、locus control region (LCR) に結合していることがわかった。これらの Bach2 結合領域は AP-1 結合領域であることも明らかになった。Bach2 は DNA 結合領域を有していないため、パートナー分子が必要である。そこで、コムギ無細胞蛋白質合成系とアルファスクリーンによるハイスループットスクリーニング法により Bach2 結合蛋白を探索したところ、転写調節因子 Batf ファミリー (Batf, Batf1) を新たに見いだした。共免疫沈降法による Bach2-Batf (Batf3) の会合、ChIP 法による Th2 サイトカイン遺伝子座の Bach2 結合領域における Batf の結合が確認できた。さらに、Bach2 欠損活性化 CD4 T 細胞では、Bach2 結合領域に、Batf、IRF4、JunD が結合していることが明らかになった。この結果から、Bach2 は Batf-IRF4-JunD 活性化型 AP1 複合体の形成を抑制していることが考えられた。また、T 細胞特異的 Bach2 欠損による Th2 細胞分化の亢進、アレルギー性気道炎症の病態は、T 細胞特異的に Batf を欠損することで改善されることもわかった。

以上の結果から、Bach2 は Batf と複合体を形成し IL-4 産生抑制と Th2 型免疫反応の制御に機能していることが明らかとなった (現在、論文投稿中)。

(2) Menin-Bach2 による老化 T 細胞 SASP の制御

申請者らは、腫瘍抑制因子 Menin (多発性内分泌腫瘍症 I 型の責任遺伝子) が、末梢 CD4 T 細胞老化の調節に関与していることを明らかにした。具体的には、T 細胞特異的 Menin 欠損マウスの CD4 T 細胞は、野生型に比べ、抗原刺激後の早期の細胞増殖の低下、senescence-associated β -galactosidase (SA β -gal) 活性の上昇、SASP (炎症性サイトカインを含む分泌性炎症因子を高発現する細胞形質) の誘導、RelA の遷延した活性化などの老化した細胞に特徴的な表現型を示した。

本申請研究では、Menin の標的遺伝子の同定を試み、転写抑制因子 Bach2 を候補分子として見いだした。Menin 欠損活性化 CD4 T 細胞に Bach2 遺伝子を導入することで、Menin 欠損 CD4 T 細胞で認められる早期の SA β -gal 活性の上昇、SASP の誘導、RelA 活性の遷延が抑制された。さらに、Bach2 欠損 CD4 T 細胞においても Menin と同様な SASP 様形質の誘導、RelA の遷延した活性化が認められた。また、エピゲノム解析の結果、Menin は、Bach2 遺伝子座のプロモーター領域に結合し、ヒストンアセチル化酵素の 1 つである PCAF をリクルートすることでヒストン H3 をアセチル化して、Bach2 の発現を維持していることがわかった。

以上の研究結果から、Menin-Bach2 経路が CD4 T 細胞老化の制御に関与していることが、初めて明らかとなった (Kuwahara et al. Nat.

Commun. 2014)。また、遷延した抗原刺激によって Menin 結合活性が低下し、Bach2 などの Menin 標的分子の発現が維持できなくなることで CD4 T 細胞老化が促進され、炎症疾患の増加を引き起こす可能性が示唆考えられた。

(3) 国内外における位置づけとインパクト

これまで Bach2 は B 細胞を中心に解析されてきており、T 細胞機能における Bach2 の役割は完全に解明されていなかった。本申請研究では、新規 Bach2 結合タンパク質として Batf ファミリー (Batf, Batf3) を初めて同定し、Bach2-Batf 複合体が Batf-IRF4-JunD による AP1 複合体の活性を抑制している知見を得た。A この成果は、これまでに報告されておらず、インパクトは高い。また、これまでの T 細胞老化研究では、老化制御の分子機構がほとんどわかっていなかった。本申請研究により、Menin-Bach2 経路が CD4 T 細胞老化の制御に関与していること、T 細胞特異的 Menin 欠損マウスや T 細胞特異的 Bach2 欠損マウスが T 細胞老化研究のモデルとして利用可能であることを示したことは今後の T 細胞老化研究を発展させると考えられる。

(4) 今後の展望

近年、細胞内エネルギー代謝変化が T 細胞機能を制御していることが明らかになりつつある。本研究過程において、申請者らは Bach2 欠損や Menin 欠損により活性化 T 細胞のグルタミン代謝が促進されることを新たに見いだしている。今後は、抗原刺激によって誘導される細胞内代謝経路の変化にともなう T 細胞運命決定における、Bach2 や Menin の役割を解析したいと考えている。また、エネルギー代謝変化はメモリー T 細胞分化や維持に重要であることが報告されており、本申請研究で明らかにできなかった、メモリー T 細胞における Bach2 の役割解析について、グルタミン代謝を中心とした細胞内エネルギー代謝変化の観点から検討したいと考えている。

また、本申請研究では、Menin が Bach2 遺伝子座のプロモーター領域に結合し、Bach2 の発現をエピジェネティックな制御により維持していることがわかった。一方、他の研究グループから Foxo1 が Bach2 の発現を制御していることも報告されている。そこで Bach2 発現制御における Menin、Foxo1 の関係を解析し、Bach2 発現の詳細な制御機構を明らかにしたいと考えている。

以上の解析を進めることで、免疫老化と慢性炎症の関係を明らかにできると考えている。また、これらの成果を基盤として、人為的な細胞老化の制御方法が開発されれば、加齢に伴う疾患への新規治療法が提案できるのではないかと考えている。

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3件)

1. Suzuki J, Maruyama S, Tamauchi H, Kuwahara M, Horiuchi M, Mizuki M, Ochi M, Sawasaki T, Zhu J, Yasukawa M, Yamashita M. Gfi1, a transcriptional repressor, inhibits the induction of the T helper type 1 program in activated CD4 T cells. *Immunology* 147, 476-487 (2016) doi: 10.1111/imm.12580. (査読有)
2. Maruyama S, Kanoh M, Matsumoto A, Kuwahara M, Yamashita M, Asano Y. A novel function of Interferon regulatory factor-1: Inhibition of Th2 cells by down-regulating the *Il4* gene during *Listeria* infection. *Int. Immunol.* 27, 143-152 (2015) doi: 10.1093/intimm/dxu092. (査読有)
3. Kuwahara M, Suzuki J, Tofukuji S, Yamada T, Kanoh M, Matsumoto A, Maruyama S, Kometani K, Kurosaki T, Ohara O, Nakayama T, Yamashita M. The Menin-Bach2 axis is critical for regulating CD4 T-cell senescence and cytokine homeostasis. *Nat. Commun.* 5, 3555, (2014) doi: 10.1038/ncomms4555. (査読有)

[学会発表] (計6件)

1. 桑原 誠, 鈴木淳平, 山下政克. 腫瘍抑制因子 Menin は T 細胞の老化を制御する (Crucial role of Menin in the regulation of T cell immunosenescence). 第 38 回に本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会・合同大会, 2015 年 12 月 02 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)
2. Kuwahara M, Ochi M, Izumoto M, Kurosaki T, Yamashita M. Bach2 control the type-2 immune response by regulating glutamine metabolism. 第 44 回日本免疫学会学術集会, 2015 年 11 月 19 日, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)
3. Kuwahara M, Ochi M, Kiyoi T, Kurosaki T, Yamashita M. Bach2 control Th2 cell-mediated immune responses through regulation of glutaminolysis. 第 43 回日本免疫学会学術集会, 2014 年 12 月 12 日, 国立京都国際会館 (京都府・京都市)
4. Kuwahara M, Yamada T, Nakayama T, Yamashita M. Menin inhibits transcriptional programs that promote CD4 T cell senescence and

Th1/Th2 differentiation. 第 42 回日本免疫学会学術集会, 2013 年 12 月 11 日, 幕張メッセ (千葉県・千葉市)

5. Kuwahara M, Nakayama T, Yamashita M. Crucial role of Menin in the regulation of CD4 T cell senescence. 15th International Congress of Immunology. 2013 年 08 月 26 日, Milan (Italy)
6. 桑原 誠, 山下政克. 腫瘍抑制因子 Menin による CD4 T 細胞機能の制御. 第 12 回四国免疫フォーラム, 2013 年 06 月 22 日, 徳島文理大学香川校 (香川県・さぬき市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

愛媛大学大学院医学系研究科免疫学・感染防御学講座
(<http://ehime-u-immunology.com/>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑原 誠 (Kuwahara, Makoto)

愛媛大学・医学部附属病院・助教 (病院教員)

研究者番号 : 00568214

(3) 連携研究者

山下政克 (Yamashita, Masakatsu)

愛媛大学大学院・医学系研究科免疫学・教授

研究者番号 : 00311605