

CD8 陽性 T 細胞における転写因子とエピゲノムによる制御機構の統合的理解

荒木靖人

埼玉医科大学医学部 リウマチ膠原病科, 埼玉医科大学ゲノム医学研究センター プロジェクト研究部門

【研究の背景】

CD8 陽性 T 細胞は、ウイルスや腫瘍などの細胞内病原体の排除に重要な役割を果たしており、病原体の刺激によりナイーブ T 細胞はメモリー T 細胞へ分化する。ナイーブ及びメモリー CD8 陽性 T 細胞では活性化の過程が異なる事が判明している。抗原による T 細胞抗原受容体を介した刺激を受けると、メモリー T 細胞はナイーブ T 細胞に比べてより急速にまたより強力にエフェクター機能を示す。CD8 陽性 T 細胞分化の分子機構を理解するために、ナイーブ及びメモリー T 細胞の遺伝子発現が解析され、CD8 陽性 T 細胞の分化の過程において特異的な遺伝子発現変化が起きており、エフェクター機能と関連している事がトランスクリプトーム解析による実験で示された。T-box 21 (T-bet)、Eomesodermin homolog (EOMES)、PR domain containing 1 with ZNF domain (PRDM1、別名 BLIMP1) 等の CD8 陽性 T 細胞の分化・機能に重要な転写因子が同定された。これらの転写因子の活性化により、エフェクター機能に関連する分子 (IFNG、PRF1、GZMB) の発現が誘導される。しかしながら、メモリー CD8 陽性 T 細胞は活性化の準備状態にあると考えられるが、このメモリー T 細胞の急速な免疫応答反応の機構は不明である。

最近の実験結果から、ヒストン修飾、DNA メチル化、非コード RNA 等のエピジェネティクス機構とメモリー CD8 陽性 T 細胞の分化やエフェクター機能との関連が示唆されてきた。ヒストンの N 末端は、アセチル化、メチル化、リン酸化などの修飾を受け、クロマチン構造と関連している (ヒストンコード仮説)。ヒストンアセチル化は、ユークロマチン構造と遺伝子転写活性化と関連している。一方、ヒストンメチル化とクロマチン構造の関連は複雑であり、H3K4、H3K36、H3K79 などのメチル化はユークロマチン構造及び遺伝子転写活性化と関連し、H3K9、H3K27 などのメチル化はヘテロクロマチン構造及び遺伝子転写抑制と関連している。CD4 及び CD8 陽性 T 細胞の分化において、ヒストンメチル化は遺伝子発現と関連している事を、我々を含めたいくつかのグループが報告し、ヒストン修飾による T 細胞の分化及びエフェクター機能の制御機構は複雑であると推測された。以前に我々は、クロマチン構造が緩んでおり、刺激後に遺伝子発現が急速に上昇する poised 遺伝子をメモリー CD8 陽性 T 細胞において同定した。さらに、ヒストン修飾の活性化マーカーと抑制性マーカーがともに存在する bivalent 遺伝子をメモリー CD8 陽性 T 細胞において同定した。これらの遺伝子は、メモリー T 細胞が活性化の準備状態にある機構の一つであると考えられた。しかしながら、CD8 陽性 T 細胞の活性化において、ヒストン修飾がどの程度変動し、その変化が遺伝子発現に影響するかについての疑問があった。最近、*in vitro* における短時間刺激 (18 時間) ではヒストンメチル化は安定していると報告されたが、長時間刺激後の CD8 陽性 T 細胞のヒストン修飾変化は現時点では不明である。CD8 陽性 T 細胞の活性化においてヒストンメチル化が変動しているとするならば遺伝子発現に影響しているか、またヒストン修飾が CD8 陽性 T 細胞の活性化を制御しているかどうか不明である。

【目 的】

CD8 陽性 T 細胞の活性化においてヒストンメチル化が変動するか、また遺伝子発現に影響しているのかを明らかにするために、長時間刺激後の CD8 陽性 T 細胞のヒストン修飾と遺伝子発現をゲノムワイドに解析した。活性化後の H3K4me3 及び H3K9ac の変化と遺伝子発現の変化との相関を調べた。さらに、poised 遺伝子やエフェクター分子の遺伝子において、活性化後に特徴的なヒストン修飾変化を調べた。また、ヒストン修飾と転写因子の結合との関連を調べるために、Prfl 遺伝子領域においてヒストンメチル化状態と EOMES の結合状態を比較検討した。以上の結果から、CD8 陽性 T 細胞におけるヒストン修飾と転写因子による遺伝子転写制御ネットワークを明らかにする事が本研究の目的である。

【方 法】

【メモリーCD8 陽性 T 細胞の分離および刺激培養】

ヒト末梢血単核細胞をセルソーターにより CD8 陽性 T 細胞分画(ナイーブ T 細胞:CD45RA+CD62L+, セントラルメモリー T 細胞:CD45RA-CD62L+, エフェクターメモリー T 細胞:CD45RA-CD62L-)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。

C57BL/6 マウスの脾細胞からメモリー T 細胞分離キット(Invitrogen)を用いて、CD44+CD62L-CD8+のメモリー T 細胞を分離した。

【クロマチン免疫沈降 (ChIP)法および定量的 PCR 法】

CD8 陽性 T 細胞を、micrococcal nuclease にて処理、あるいはホルムアルデヒドによるクロスリンク後に超音波処理をした後、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、あるいは抗 Eomes 抗体を用いて免疫沈降反応を行い、回収した複合体を洗浄し、proteinase K 及び SDS にて処理し、複合体から DNA を分離した。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) に対するクロマチン免疫沈降にて回収された DNA の割合を計算した。

【ChIP-Seq】

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、クロマチン免疫沈降により回収された DNA の定量化を行った。

【逆転写反応および定量的 PCR 法】

CD8 陽性 T 細胞から TRIzol を用いて mRNA を分離した。SuperScript III と Oligo (dT) 12-18 primer 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 を行い、ACOX1 を internal control として各遺伝子発現を数値化した。

【トランスクリプトーム解析】

CD8 陽性 T 細胞から得られた total RNA を用いて、Whole Human Genome 44K Oligo Chip (Agilent 社)により遺伝子発現を解析した。

【結 果】

【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相関】

長時間刺激後の CD8 陽性 T 細胞におけるヒストンアセチル化とヒストンメチル化のプロフィールと遺伝子発現との関連を調べた。ヒト末梢血液から CD8 陽性のナイーブ T 細胞とメモリー T 細胞分画(セントラルメモリー、エフェクターメモリー)を分離し、抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体にて 72 時間刺激した。ChIP-Seq 法により H3K9ac と H3K4me3 のゲノムワイドな分布を、トランスクリプトーム解析によりゲノムワイドな遺伝子発現を調べた。H3K9ac と H3K4me3 はユークロマチン領域に存在する活性化ヒストンマーカーである。各遺伝子領域の H3K9ac と H3K4me3 の量を定量し mRNA 量と比較したところ、未刺激状態と長時間刺激後の両者において、ナイーブ T 細胞(Naive)、セントラルメモリー T 細胞(Tcm)、エフェクターメモリー T 細胞(Tem)の H3K9ac と H3K4me3 は遺伝子発現と正の相関を示した。

CD4 陽性 T 細胞のヒストンアセチル化とヒストンメチル化は、in vitro における刺激において短時間(18 時間)安定であると報告された。最近の報告ではヒストン修飾は活性化や分化の過程において、大きく変動する事が示唆されており、in vitro における長時間刺激(72 時間)後のヒストン修飾の変化は不明である。そこで、長時間刺激後の CD8 陽性 T 細胞の遺伝子発現を解析したところ、上昇する群と低下する群が存在した。活性化後に活性化前と比べてどの程度変動したかにより、(1)10 倍以上、(2)5 倍以上・10 倍未満、(3)4 倍以上・5 倍未満、(4)3 倍以上・4 倍未満、(5)2 倍以上・3 倍未満の 5 グループに分類したところ、全てのグループにおいて遺伝子発現の変化はヒストン修飾(H3K4me3、H3K9ac)の変化と相関していた。以上から、CD8 陽性 T 細胞において長時間刺激後にヒストンアセチル化とヒストンメチル化は遺伝子発現に影響する事が示唆された。

【メモリーCD8 陽性 T 細胞における poised 遺伝子】

以前に我々は、メモリーCD8 陽性 T 細胞において poised 遺伝子の報告を行った。しかしながら、poised 遺伝子において、CD8 陽性 T 細胞の活性化後にヒストン修飾がどのように変化するかは不明である。そこで、活性化 CD8 陽性 T 細胞における poised 遺伝子のヒストン修飾と遺伝子発現の時間経過を追った。Poised 遺伝子では未刺激時において遺伝子発現は低いものの、刺激後に急速に遺伝子発現は上昇し、活性化後の H3K9ac の変動が H3K4me3 の変動より大きい事が判明した。

【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】

CD8 陽性 T 細胞の活性化後におけるエフェクター反応の時間変化は、ナイーブ T 細胞とメモリー T 細胞において異なる。その機序を明らかにするために、活性化 CD8 陽性 T 細胞におけるエフェクター分子 (GZMB、FASLG、IFNG) のヒストン修飾 (H3K4me3、H3K9ac) の時間経過を調べた。これらの遺伝子発現はメモリー T 細胞 (Tcm、Tem) においてナイーブ T 細胞 (N) よりも未刺激時に高値であり、H3K4me3 と H3K9ac も同様にメモリー T 細胞においてナイーブ T 細胞よりも未刺激時に高値であった。抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体刺激の 72 時間後には、GZMB、FASLG、IFNG 遺伝子において、H3K4me3 と H3K9ac はナイーブ T 細胞よりもメモリー T 細胞において上昇しており、セントラルメモリー T 細胞 (Tcm) よりもエフェクターメモリー T 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エフェクターメモリー T 細胞、セントラルメモリー T 細胞、ナイーブ T 細胞の順に強いと考えられるが、これにヒストン修飾が関連する事が示唆された。興味深い事に H3K9ac は GZMB と FASLG においては未刺激時にエフェクターメモリー T 細胞で高値を示し、刺激後に減少していた。エフェクターメモリー T 細胞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。

【Prf1 遺伝子におけるヒストンメチル化状態と Eomes 結合状態の比較】

CD8 陽性 T 細胞の分化及びエフェクター機能において重要な転写因子として Eomes が発見された。マウスのメモリーCD8 陽性 T 細胞において、エフェクター分子であるパーフォリン (Pfr1) 遺伝子のプロモーター領域の Eomes の結合部位とヒストンメチル化 (H3K4me3) の関連を ChIP 法により調べた。その結果、Eomes が結合している部位と H3K4me3 のピークが一致する事が判明した。転写が活性化している遺伝子の近位プロモーター領域～転写開始領域において、H3K4me3 は 2 峰性のピークを示す事が知られている。Eomes の結合は、近位プロモーター領域の H3K4me3 のピーク部に認められた。転写因子の結合にはクロマチン構造が緩んでいる必要があるが、今回の結果はそれと合致するものと考えられた。以上の事から、CD8 陽性 T 細胞において、ヒストンメチル化と転写因子による遺伝子転写制御ネットワークが形成され、分化及びエフェクター機能に関連している可能性が示唆された。

【考 察】

我々はこれまで CD8 陽性 T 細胞の分化とエフェクター機能がエピゲノムにより制御されているという仮説のもとに、ヒストン修飾に関して解析を行ってきた。本研究において、活性化 CD8 陽性 T 細胞において、特に長時間刺激後に、ヒストン修飾 (ヒストンメチル化、ヒストンアセチル化) が変動して遺伝子転写を調節している事が示唆された。CD8 陽性 T 細胞において、Prf1 遺伝子における転写因子 Eomes の結合状態を調べる事により、ヒストン修飾と転写因子による遺伝子転写制御ネットワークが形成され、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重要な役割を果たしている事が示唆された。転写因子による制御、エピゲノムによる制御に関する研究はこれまでは別々に行われてきたため、両者が統合的に理解されていなかった。本研究では、エピゲノム (ヒストン修飾) と転写因子に着目し、両者が相互的に CD8 陽性 T 細胞記憶の制御を行なっているかを明らかにする事ができた。

我々は以前に、CD8 陽性 T 細胞の分化とエフェクター機能におけるヒストン修飾の役割を検討した。転写活性化と関連するヒストンアセチル化 (H3K9ac) を調べたところ、転写因子及びエフェクター機能分子 (EOMES、GZMB、PRF1) の遺伝子発現と相関していた。メモリー T 細胞の GZMB 遺伝子において H3K9ac は高値であったが、遺伝子発現はナイーブ T 細胞と差がなかった。メモリー T 細胞を抗 CD3/CD28 抗体にて刺激したところ GZMB 遺伝子発現は急速に上昇し、メモリー T 細胞において GZMB 遺伝子は転写活性化の準備状態 (poised な状態) にあったと考えられた。CD8 陽性 T 細胞では、エフェクター機能に重要な遺伝子のクロマチン構造がナイーブ T 細胞に比べメモリー T 細胞において緩んだ状態 (高ヒストンアセチル化状態、H3K4 の高メチル化状態、H3K27 の低メチル化状態) であるため、メモリー T 細胞はナイーブ T 細胞と比べてより早く、またより強く病原体を攻撃する事ができると考えられた。本研究では、poised 遺伝子及びエフェクター分子の遺伝子にお

いて特徴的なヒストン修飾変化が活性化後に起こる事を明らかにする事ができた。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

CD8 陽性 T 細胞記憶の機構が明らかになる事により、今後 CD8 陽性 T 細胞分化の制御法の開発が可能となる事が期待される。CD8 陽性 T 細胞のエフェクター機能を高める事により、感染免疫や腫瘍免疫において、効率的な病原体排除につながる。また、CD8 陽性 T 細胞の記憶を高める事により、効率よいワクチンの作成につながる。癌に対する新しい予防の手段となる事も期待される。このように CD8 陽性 T 細胞の記憶の機構を解明する事は、新たな免疫治療につながる事から大事な命題と考えられる。

【参考・引用文献】

- 1) Kaech SM, Hemby S, Kersh E, Ahmed R. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell*. 111(6):837-51. 2002.
- 2) Araki Y, Fann M, Wersto R, Weng NP. Histone acetylation facilitates rapid and robust memory CD8 T cell response through differential expression of effector molecules (Eomesodermin and its targets: perforin and granzyme B). *Journal of Immunology*. 180(12):8102-8108. 2008.
- 3) Araki Y, Wang Z, Zang C, Wood WH, III, Schones D, Cui K, Roh TY, Lhotsky B, Wersto RP, Peng W, Becker KG, Zhao K, Weng NP. Genome-wide analysis of histone methylations reveals chromatin state-based complex regulation of differential gene transcription and function of CD8 memory T cells. *Immunity*. 30(6):912-925. 2009.
- 4) Weng NP, Araki Y, Subedi K. The chromatin basis of memory T cell response: differential gene expression and its epigenetic regulation. *Nat rev Immunol*. 12(4):306-15. 2012.