

## 免疫細胞におけるエピジェネティック制御機構の解明

中司寛子

慶應義塾大学 医学部 微生物学 免疫学教室

### 【研究の背景】

エピジェネティック修飾のひとつである DNA メチル化は遺伝子発現の抑制やゲノム安定性の維持に必須の役割を果たし、個体の発生、細胞の分化やがん化に重要な役割を果たしている。近年 DNA 脱メチル化酵素 TET が注目を集めており、DNA 脱メチル化と免疫疾患の関係についての研究は端緒についたところであるが、遺伝子改変マウスを用いて TET の免疫応答や免疫関連疾患に関する意義を理解する研究はほとんどなされていない。

### 【目 的】

本研究は、DNA 脱メチル化酵素である TET (Ten-eleven translocation) が制御する T 細胞増殖と分化に関与する遺伝子を明らかにし、DNA 脱メチル化による T 細胞分化の安定性と可塑性における意義を解明することを目的とした。

### 【方 法】

T 細胞特異的 Tet2/3 欠損マウス (CD4DKO マウス) を用い、フローサイトメトリー、RT-PCR、ELISA 法により T 細胞の表現系を解析した。さらに、CD4DKO マウスを OT-II TCR トランスジェニックマウス (OT-II Tg)、*Il17*<sup>-/-</sup>、*Rorc*<sup>-/-</sup>、*Il23*<sup>-/-</sup> マウスと交配させ原因遺伝子を探索した。OT-II Tg マウスの T 細胞は OVA を抗原とし、OVA で刺激することで個体内および試験管内で分化誘導を再現出来る。この系を用いて T 細胞の増殖、分化を解析した。

また、Treg 特異的 Tet2/3 欠損マウスの Treg を FACS 分離し、PBAT 法、MBD-seq、ATAC-seq、マイクロアレイにより DNA メチル化、オープンクロマチン領域、遺伝子発現を統合解析した。

### 【結 果】

#### I. T 細胞における TET の機能解明

T 細胞特異的 Tet2/3 欠損マウス (CD4DKO マウス) は、オリゴクローナルな T 細胞増殖/活性化、および B 細胞の活性化を伴う二次リンパ器官の腫大を引き起こし早期に死亡するが、抗生物質投与により腸内細菌を除去するとマウスの症状は緩和されることから、CD4DKO マウスは腸内細菌による末梢での強い T 細胞受容体 (TCR) 刺激が過増殖の原因であると考えられた。大腸粘膜固有層における Treg/Th17 の割合を測定したところ、CD4DKO マウスでは WT に比して Treg の割合は減少しており、Th17 細胞は増加していた。さらに CD4DKO マウスの Treg のほとんどは胸腺由来 Treg のマーカーである Helios を高発現していた。この結果から、Tet2/3 は末梢における Treg/Th17 分化を制御することが示唆された。CD4DKO マウスを IL-17 欠損マウス、IL-23 欠損マウス、ROR $\gamma$  欠損マウスとそれぞれ交配させ、Th17 関連サイトカインシグナルを阻害したところ、Treg 割合は回復した。また、CD4DKO マウスを全身の T 細胞が特異抗原の OVA と反応する TCR のみを発現する CD4<sup>+</sup>T 細胞となる *Rag2*<sup>-/-</sup> OT-II トランスジェニック (*Rag2*<sup>-/-</sup> OT-II) 背景で作成した。本マウスは脾・リンパ節腫脹等の症状を自然発症せず、OVA の投与により発症が認められたことから、CD4DKO の病態はやはり腸内細菌による TCR 刺激が症状の引き金となっていることが明らかとなった。さらに、OVA 投与後の *Rag2*<sup>-/-</sup> OT-II マウスを解析したところ、脾臓、リンパ節、およ

び大腸粘膜固有層において Treg が誘導されていたのに対し、CD4DKO/*Rag2*<sup>-/-</sup>OT-II マウスでは Treg の誘導は見られず、Th17 細胞の誘導が見られたことから、Tet が末梢における Treg/Th17 分化に重要であることが示された。

## II. 制御性 T 細胞における TET の機能解明

Tet2/3 欠損 Treg を成熟 T 細胞および B 細胞が存在しない *Rag2*<sup>-/-</sup>マウスに移入したところ、Foxp3 発現が低下し、移入した Treg は IL-17 を産生する exFoxp3 細胞に転換したことから、Tet2/3 は Treg の安定性に重要であることが示唆された。そこで、WT および Tet2/3 欠損 Treg における DNA メチル化状態を Post-bisulfite Adaptor Tagging (PBAT) 法により、オープンクロマチン状態を Assay for transposase-accessible chromatin using sequencing (ATAC-Seq) を用いて解析した。その結果、Tet2/3 欠損 Treg では Foxp3 遺伝子の約 5kb 上流領域に強いメチル化と ATAC ピークの消失が認められ、本領域における Foxp3 の安定性への寄与が示唆された。また、遺伝子発現 (microarray)、DNA メチル化状態 (PBAT 法, MBD-seq)、オープンクロマチン (ATAC-seq) の統合解析により、Treg において Tet2/3 により制御される遺伝子群を抽出することができた。

## 【考 察】

以上の結果から、Tet2/3 は T 細胞において末梢、特に腸管における抗原刺激に対する増殖制御および末梢での Treg/Th17 分化制御に関与することが明らかとなった。また、Treg の安定性に関与する遺伝子群の抽出ができたので、今後さらなる解析により原因遺伝子の特定を行う予定である。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

これまでヘルパー T 細胞の分化機構に関しては急速に研究が進み、転写ネットワークによるヘルパー T 細胞の分化機構については非常に多くの報告がなされているが、エピジェネティックな制御による可塑性、安定性についての研究は端緒に終わったばかりである。本研究では DNA 脱メチル化酵素 TET に注目してヘルパー T 細胞分化の安定性と可塑性を解明することを目標とした。本研究により T 細胞分化の新たな制御機構が解明されれば、免疫疾患、炎症性疾患やがんの新規治療法確立への応用が期待でき、高い波及効果がある。

## 【参考・引用文献】

Nakatsukasa H, Oda M, Yin J, Chikuma S, Ito M, Koga-Iizuka M, Someya K, Kitagawa Y, Ohkura N, Sakaguchi S, Koya I, Sanosaka T, Kohyama J, Tsukada Y, Yamanaka S, Takamura-Enya T, Lu Q, and Yoshimura A. Loss of TET proteins in regulatory T cells promotes abnormal proliferation, Foxp3 destabilization, and IL-17 expression. *Int Immunol*. 2019 Feb 6 [Epub ahead of print]