

平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 研究開発領域：エピゲノム研究に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出
2. 研究開発課題名：T 細胞のエピジェネティック改変による免疫疾患制御
3. 研究開発代表者：吉村昭彦（慶應義塾大学 医学部 教授）
4. 研究開発の成果

獲得免疫の中心であるエフェクターT 細胞は環境中のサイトカインの影響で種々のサブセットとして分化誘導され形成される。このような分化はエピジェネティックなレベルで制御、固定されており脱分化や再分化は困難とされている。本研究は免疫応答の中心をなす T 細胞の分化をリプログラムし、免疫疾患の治療、臓器移植の拒絶反応の抑制、あるいは効果的な癌の免疫療法の開発に資する新しい方法を開発することを目標としている。本年度は T 細胞や免疫担当細胞の分化を転換しうる因子と転写制御を分子レベルで検討し、以下の 3 点を明らかにした。

(1) NR4a による制御性 T 細胞 (Treg) の維持機構の解明

我々は Treg に高発現し Foxp3 プロモーターを直接活性化しうる転写因子として NR4a ファミリーを単離した。Treg 特異的 NR4a 欠損マウスを作製したところ、このマウスは加齢とともに自己抗体の産生を伴う自己免疫疾患で死亡した。マイクロアレイ解析を行ったところ NR4a 欠損 Treg は IL-4, IL-5, IL-13 などの Th2 サイトカイン、および Tfh 関連サイトカイン IL-21 の産生が更新し、さらに CD25, CTLA4, *Ikzf4* (Eos) の発現が低下していた。NR4a 欠損 Treg の生体内での運命を調べるために NR4a 欠損 Treg を T 細胞欠損マウスに移入したところ、早期に SLE 様の自己免疫疾患を発症し移入した Treg は多くは Foxp3 の発現が低下し Th2 や Tfh の表現型をもった細胞に転換していた。Whole-genome ChIP の結果、NR4a1 が *Ikzf4* のプロモーター部分に会合していることが証明された。また NR4a は IL-4 や IL-21 遺伝子にも直接結合し、これらの転写を負に制御することも示された。すなわち NR4a は Treg において Foxp3 と Eos の発現を正に制御し、一方で Th2, Tfh エフェクター機能に重要な IL-4 や IL-21 などの炎症促進分子の発現を抑制する機能があることがわかった。本研究は本年度 *J.Exp.Med* (2015;212:1623-40) に掲載された。

(2) クロストリジウム属菌による樹状細胞からの TGF β シグナルによる iTreg 誘導制御機構の解明

消化管における Treg の多くは TGF β によって誘導される iTreg である。iTreg の誘導には腸内細菌、特にクロストリジウム属菌が重要であることが知られている。そこで *Clostridium Butyricum* (CB) 菌の芽胞をマウスに 2 週間投与したところ iTreg の増加と DSS 誘導性腸炎の抑制が見られた。CB はグラム陽性菌でありその主な樹状細胞活性化菌体成分はペプチドグリカン (PGN) である。PGN は TLR2-ERK-AP1 経路を介して TGF β プロモーターを活性化した。さらに TGF β の強力な発現誘導には TGF β そのものの刺激 (オートインダクション) が必要であることが見出された。驚いたことに Smad3 欠損樹状細胞では TGF β の産生が激減するのに対し、Smad2 欠損では逆に TGF β 産生が促進された。Smad3 は p300 ヒストンアセチル化酵素を TGF プロモーター上にリクルートし、Smad2 はこれを抑制することが明らかとなった。本研究は本年度 *Immunity* (2015;43: 65-79) に掲載された。

(3) Tet 遺伝子導入による部位特異的 DNA 脱メチル化方法の確立と安定化 Treg の作製

変異 Cripser や STAT5 を用いて Foxp3-CNS2 領域を認識する人工 DNA 結合蛋白質に Tet (DNA 脱メチル化に関与する酵素) を結合させたコンストラクトを作製し Foxp3 遺伝子の CNS2 特異的に脱メチル化を誘導するシステムを作製した。培養細胞では実際に部位特異的な脱メチル化を確認することができた。一方で primary T 細胞への導入を試みているが遺伝子サイズの問題などでウイルスの感染効率があがらずに十分な細胞数が得られていない。しかし Tet1 の酵素活性部位のみを導入した場合でも十分な CNS2 の脱メチル化が認められ、さらに Foxp3 の発現安定化が確認された。今後本法を用いて免疫疾患の治療実験を行なう。