

平 28 年 度 委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業 ユニットタイプ「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」
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation (AMED-CREST) Development of Fundamental Technologies for Diagnosis and Therapy Based upon Epigenome Analysis (Disease Epigenome)

研究開発課題名： (日本語) T細胞のエピジェネティック変化による免疫疾患制御
(英語) Immune regulation by epigenetic modifications of T cells

研究開発担当者 (日本語) 慶應義塾大学医学部 教授 吉村昭彦

所属 役職 氏名： (英語) Keio University School of Medicine, Professor, Akihiko Yoshimura

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) なし

開発課題名： (英語)

研究開発分担者 (日本語) なし

所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要 (総括研究報告)

平成 28 年度は以下の研究を中心に行なった。

(1) エフェクター／メモリーT細胞を Tscm に転換する方法の確立と抗腫瘍免疫増強への応用

一旦活性化されたエフェクターT細胞やメモリーT細胞をナイーブT細胞に転換できれば、究極的な抗原特異的免疫細胞療法として活用出来る。そこで本研究では活性化されたエフェクターT細胞やメモリーT細胞を様々な培養条件で培養し分化をリセットする方法の開発をめざした。

IFN γ -レポーターマウス、あるいは IL-17-レポーターマウスよりナイーブ CD4⁺T 細胞や CD8⁺T 細胞を単離し、試験管内で活性化した後に Notch リガンドを発現する OP9 細胞(OP9-DL1)との共培養を行うと T 細胞は増殖し、CD44^{low}CD62L^{high} のナイーブ分画に細胞集団が出現することを見出した。この実験系で誘導される naïve-like T 細胞は、サイズがナイーブ T 細胞のように小さいにも関わらず、活性化 T 細胞でみられるようなサイトカイン受容体、および共刺激分子を発現していた。また *in vitro* において naïve-like

T細胞はナイーブ T細胞やメモリーT細胞に比べて TCR 刺激に早い応答性を示し、高いサイトカイン産生能を有していた。また T細胞をマウスに移入したところ、naïve-like T細胞は高い自己増殖能を有しており、ナイーブ T細胞や活性化/メモリーT細胞に比べて長寿であることが明らかになった。このような性質は最近提唱されている幹細胞様の性質を示すメモリーT細胞、ステムセルメモリー(Tscm)によく似ている。よってこの細胞を誘導性 Tscm (iTscm)細胞と名付けた。iTscmの利点は①OP9-DL1との共培養によって細胞数が4~5倍に増加する。②iTscmは2度目のTCR刺激によって急速に増殖する。③TCR刺激でexpandした細胞はもとのThサブセットの性質を保持している。④個体内で抗原刺激後expandして長期に生存する。このような性質から免疫記憶の増強(ワクチン効果の増強や抗腫瘍免疫の増強効果)が期待できる。実際にCD8, CD4両者のiTscmをそれぞれOT-I, OT-IIマウスより作製し、担癌マウスに移入したところ、iTscmは他の種類のT細胞よりも顕著な抗腫瘍効果を示した。さらにヒト末梢血メモリーT細胞からもiTscmが誘導出来ることがわかった。ヒト末梢血のEBウイルス特異的メモリーT細胞分画を増幅させた後にCCR7^{low} CD45RA^{low} CD45RO^{high}のエフェクター分画をOP9-hDL1と共培養を行なった。CD45RA^{high} CD45RO^{high}のナイーブ分画に現れる細胞iTscmとして単離したところ、分裂能、生存能およびEBV感染細胞の殺細胞効果いずれも通常のメモリーT細胞よりも勝っていた。これらの結果はNature Communication誌に発表予定である。

(2) Foxp3 遺伝子特異的 DNA 脱メチル化方法の確立と治療への応用

Tregのマスター制御因子はFoxp3であり、*in vitro*においてTGFβの作用でその発現を人為的に惹起することでiTregを誘導・増幅することができる。しかし、iTregはFoxp3の発現を失いやすく、*in vitro*で誘導したiTregを生体に移入してもその免疫抑制効果は限定的であることも報告されている。様々な免疫疾患治療において安全で安定的な結果を得るにはFoxp3の発現を安定に維持する方法の開発が不可欠である。胸腺由来の安定的なnTregでは、Foxp3のエンハンサーのひとつCNS2領域のCpGアイランドが、完全に脱メチル化されており、この脱メチル化がFoxp3の安定発現に重要である。そこでDNA脱メチル化酵素TET (ten-eleven translocation)に注目し、TETの酵素ドメイン(TET-CD)をプライマリーT細胞に導入を行なった。遺伝子特異的DNA脱メチル化を誘導する方法として、DNA切断活性を失ったCRISPR-dCas9にTETの酵素活性ドメインを融合して細胞に導入する方法を試みた。培養細胞レベルではFoxp3のCNS2領域特異的に部分的にDNA脱メチル化を導入することに成功したが、レンチウイルスベクターでは遺伝子が大きすぎてプライマリーT細胞への導入効率が5%以下で、実験に使用出来る発現細胞を得ることが困難であった(Epigenetics & Chromatin 印刷中)。しかし幸いなことにTET-CDの強制発現だけでFoxp3-CNS2のDNA脱メチル化が認められた。またTET-CDの強制発現ではFoxp3-CNS2領域以外の各種iTreg関連遺伝子(GITR, CTLA4, Eos)のCpGアイランドにおいては有意な脱メチル化の亢進は確認されなかった。TET-CD遺伝子導入iTregではTh1誘導条件下でもFoxp3の発現が有意に維持された。また、Rag2^{-/-}マウスに移植したところTET-CD発現iTregは個体内でもFoxp3の発現が安定して維持されていることが分かった。またTET-CD遺伝子導入iTregはマウス炎症性腸管疾患(inflammatory bowel disease: IBD)モデルを有意に抑制した。これらの結果は、TET酵素活性ドメインをiTregに導入することによりFoxp3-CNS2領域の脱メチル化を介して、iTregにおけるFoxp3の発現を安定化し、機能強化することが可能であることを示すものである。

II.(英文)

We conducted following research in 2016.

(1) Establishing a method to convert effector / memory T cells to Tscm and its application to antitumor immunity

Our goal is establishing the method to reprogram activated effector T cells and memory T cells to naive T cells. Such antigen specific T cells are ultimate cell therapy for treating immunological disorders including autoimmune diseases and cancer. In this study, we aimed to develop a method of resetting differentiation. by cultivating activated effector T cells and memory T cells under various culture conditions.

Nerve CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells isolated from IFNγ-reporter mice or IL-17-reporter mice were activated, then co-cultured with OP9 cells expressing Notch ligands (OP9-DL1). The T cells proliferated and showed CD44^{low} CD62^{L^{high}} naïve T cell-like phenotypes. The naïve-like T cells induced in this experimental system expressed cytokine receptors and co-stimulatory molecules as seen in activated T cells, however their size was smaller like naïve T cells. In vitro, the naïve-like T cells showed faster response to TCR stimulation than naïve and activated/memory T cells, and had higher cytokine producing ability. Naïve-like T cells also have high self-propagating

ability and longevity compared with naive T cells and memory T cells. Such properties are similar to those of recently proposed “stem cell-like memory T cell” (Tscm). Therefore, this cell was termed an inducible Tscm (iTscm) cell. The advantage of iTscm is that (1) co-culture with OP9-DL1 increases the number of cells by 4 to 5 times. (2) iTscm cells rapidly proliferate in response to secondary TCR stimulation. (3) Cells expanded by TCR stimulation retain the properties of the original Th subset. (4) T cells expanded after antigen stimulation survive for a long time. From these properties, iTscm cells can be expected to enhance immune memory responses, eg, enhancement of vaccine effects and enhancement of antitumor immunity. In fact, iTscm of both CD8 and CD4 cells showed superior antitumor effects to other T cell subsets when they transferred into tumor bearing mice. Furthermore, we found that Tscm can be induced from human peripheral blood memory T cells. After amplifying the EB virus-specific memory T cells from human peripheral blood, the CCR7^{low} CD45RA^{low} CD45RO^{high} effector T cells were co-cultured with OP9-hDL1. iTscm cells appeared in the CD45RA^{high} CD45RO^{high} naive fraction. Human iTscm cells showed higher division ability, viability and cell-killing effect for EB-infected cells than normal memory T cells. These results will be published in *Nature Communications*.

(2) Establishment of Foxp3 gene specific DNA demethylation method and its application to therapy

The regulatory T (Treg) cells can be induced from naive T cells by the action of TGFβ *in vitro*, which are called induced Treg (iTreg) cells. However, it has been reported that iTreg cells easily lose the expression of Foxp3, the master gene of Treg, and thus its immunosuppressive effect is limited when iTreg cells were transferred into the body. In order to obtain safe and stable results in the treatment of various immune diseases, it is indispensable to develop a method for stable expression of Foxp3 in iTreg cells. In the stable nTreg cells derived from the thymus, the CpG islands in the CNS 2 region, one of Foxp3 enhancers, are completely demethylated, and this demethylation is important for stable expression of Foxp3. Thus, we focused on the DNA demethylating enzyme, TET (ten-eleven translocation), and the enzyme catalytic domain of TET (TET-CD) was introduced into the primary T cell. First, as a method of inducing gene-specific DNA demethylation, we fused TET-CD to CRISPR-dCas9 which lacks DNA cleavage activity but binds to DNA, then introduced the fusion gene into cultured and primary T cells. Although we successfully introduced partial DNA demethylation specifically in the CNS2 region of the Foxp3 locus in a cultured cells, the efficiency of introduction into primary T cells was less than 5% (*Epigenetics & Chromatin* in press). Thus, we could not use this system for therapeutic examination. Fortunately, DNA demethylation of Foxp3-CNS2 was observed just by overexpression of TET-CD. While no significant enhancement of demethylation was confirmed in the CpG islands of various iTreg-related genes (GITR, CTLA4, Eos). Expression of Foxp3 was significantly maintained in TET-CD gene-introduced iTreg even under Th1 induction conditions. In addition, transfer experiment into Rag2^{-/-} mice revealed that the expression of Foxp3 was stable in TET-CD expressing iTreg even *in vivo*. In addition, the TET-CD gene transduced iTreg significantly inhibited the inflammatory bowel disease (IBD) model in mice. These results indicate that it is possible to stabilize the expression of Foxp3 in iTreg cells and enhance their suppression activity through demethylation of the Foxp3-CNS2 region by introducing the TET enzyme catalytic domain into the iTreg cells.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 3 件、国際誌 23 件)

1. Kondo T, Morita R, Okuzono Y, Nakatsukasa H, Sekiya T, Chikuma S, Shichita T, Kanamori M, Kubo M, Koga K, Miyazaki T, Kassai Y, **Yoshimura A**; Notch-mediated conversion of activated T cells into stem cell memory-like T cells for adoptive immunotherapy *Nature Commun.* 印刷中

2. Okada M., Kanamori M, Someya K., Nakatsukasa H, and **Yoshimura A**, Stabilization of Foxp3 expression by CRISPR-dCas9-based epigenome editing in mouse primary T cells *Epigenetics & Chromatin* 印刷中

3. Shichita T, Ito M, Morita R, Komai K, Noguchi Y, Ooboshi H, Koshida R, Takahashi S, Kodama T, **Yoshimura A**. MAFB prevents excess inflammation after ischemic stroke by accelerating clearance of damage signals through MSR1. *Nature Med.* 2017 Apr 10. doi: 10.1038/nm.4312. in press

4. Shirakabe K, Omura T, Shibagaki Y, Mihara E, Homma K, Kato Y, **Yoshimura A**, Murakami Y, Takagi J, Hattori S, Ogawa Y. Mechanistic insights into ectodomain shedding: susceptibility of CADMI adhesion molecule is determined by alternative splicing and O-glycosylation. *Sci Rep*. 2017 Apr 10;7:46174. doi: 10.1038/srep46174.
5. Matsui-Hasumi A, Sato Y, Uto-Konomi A, Yamashita S, Uehori J, **Yoshimura A**, Yamashita M, Asahara H, Suzuki S, Kubo M. E3 ubiquitin ligases SIAH1/2 regulates hypoxia-inducible factor 1(HIF1)-mediated TH17 cell differentiation. *Int Immunol*. 2017 Mar 17. doi: 10.1093/intimm/dxx014.
6. Komai K, Shichita T, Ito M, Kanamori M, Chikuma S, **Yoshimura A**. Role of scavenger receptors as damage-associated molecular pattern receptors in Toll-like receptor activation. *Int Immunol*. 2017 Feb 1;29(2):59-70. doi: 10.1093/intimm/dxx010.
7. Chikuma S, Kanamori M, Mise-Omata S, **Yoshimura A**. Suppressors of cytokine signaling: Potential immune checkpoint molecules for cancer immunotherapy. *Cancer Sci*. 2017 Feb 11. doi: 10.1111/cas.13194.
8. Fujii U, Miyahara N, Taniguchi A, Waseda K, Morichika D, Kurimoto E, Koga H, Kataoka M, Gelfand EW, Cua DJ, **Yoshimura A**, Tanimoto M, Kanehiro A. L-23 Is Essential for the Development of Elastase-Induced Pulmonary Inflammation and Emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016 Nov;55(5):697-707.
9. Kurebayashi Y, Baba Y, Minowa A, Nadya NA, Azuma M, **Yoshimura A**, Koyasu S, Nagai S. TGF- β -induced phosphorylation of Akt and Foxo transcription factors negatively regulates induced regulatory T cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Nov 4;480(1):114-119. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.153.
10. Morita M, Yoshida S, Iwasaki R, Yasui T, Sato Y, Kobayashi T, Watanabe R, Oike T, Miyamoto K, Takami M, Ozato K, Deng CX, Aburatani H, Tanaka S, **Yoshimura A**, Toyama Y, Matsumoto M, Nakamura M, Kawana H, Nakagawa T, Miyamoto T. Smad4 is required to inhibit osteoclastogenesis and maintain bone mass. *Sci Rep*. 2016 Oct 12;6:35221. doi: 10.1038/srep35221.
11. Kanamori M, Nakatsukasa H, Okada M, Lu Q, **Yoshimura A**. Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends Immunol*. 2016 Nov;37(11):803-811. doi: 10.1016/j.it.2016.08.012.
12. Akiyama M, Yasuoka H, Yamaoka K, Suzuki K, Kaneko Y, Kondo H, Kassai Y, Koga K, Miyazaki T, Morita R, **Yoshimura A**, Takeuchi T. Enhanced IgG4 production by follicular helper 2 T cells and the involvement of follicular helper 1 T cells in the pathogenesis of IgG4-related disease. *Arthritis Res Ther*. 2016 Jul 13;18:167. doi: 10.1186/s13075-016-1064-4.
13. Wu H, Huang X, Qiu H, Zhao M, Liao W, Yuan S, Xie Y, Dai Y, Chang C, **Yoshimura A**, Lu Q. High salt promotes autoimmunity by TET2-induced DNA demethylation and driving the differentiation of Tfh cells. *Sci Rep*. 2016 Jun 21;6:28065. doi: 10.1038/srep28065.
14. Masamoto Y, Arai S, Sato T, Yoshimi A, Kubota N, Takamoto I, Iwakura Y, **Yoshimura A**, Kadowaki T, Kurokawa M. Adiponectin Enhances Antibacterial Activity of Hematopoietic Cells by Suppressing Bone Marrow Inflammation. *Immunity*. 2016 Jun 21;44(6):1422-33. doi: 10.1016/j.immuni.2016.05.010.
15. Zhou Q, Anderson C, Hanus J, Zhao F, Ma J, **Yoshimura A**, Wang S. Strand and Cell Type-specific Function of microRNA-126 in Angiogenesis. *Mol Ther*. 2016 Oct;24(10):1823-1835. doi: 10.1038/mt.2016.108.
16. Nishikawa A, Suzuki K, Kassai Y, Gotou Y, Takiguchi M, Miyazaki T, Yoshimoto K, Yasuoka H, Yamaoka K, Morita R, **Yoshimura A**, Takeuchi T. Identification of definitive serum biomarkers associated with disease activity in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Res Ther*. 2016 May 14;18(1):106. doi: 10.1186/s13075-016-1006-1.
17. Takizawa T, Shibata M, Kayama Y, Shimizu T, Toriumi H, Ebine T, Unekawa M, Koh A, **Yoshimura A**, Suzuki N. High-mobility group box 1 is an important mediator of microglial activation induced by cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017 Mar;37(3):890-901. doi: 10.1177/0271678X16647398.
18. Tando T, Hirayama A, Furukawa M, Sato Y, Kobayashi T, Funayama A, Kanaji A, Hao W, Watanabe R, Morita M, Oike T, Miyamoto K, Soga T, Nomura M, **Yoshimura A**, Tomita M, Matsumoto M, Nakamura M, Toyama Y, Miyamoto T. Smad2/3 Proteins Are Required for Immobilization-induced Skeletal Muscle Atrophy. *J Biol Chem*. 2016 Jun 3;291(23):12184-94. doi: 10.1074/jbc.M115.680579. E

19. Sekiya T, Nakatsukasa H, Lu Q, **Yoshimura A**. Roles of transcription factors and epigenetic modifications in differentiation and maintenance of regulatory T cells. *Microbes Infect.* 2016 Jun;18(6):378-86. doi: 10.1016/j.micinf.2016.02.004.
20. Wu H, Zhao M, **Yoshimura A**, Chang C, Lu Q. Critical Link Between Epigenetics and Transcription Factors in the Induction of Autoimmunity: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2016 Jun;50(3):333-44. doi: 10.1007/s12016-016-8534-y.
21. Yeganeh M, Gui Y, Kandhi R, Bobbala D, Tobelaim WS, Saucier C, **Yoshimura A**, Ferbeyre G, Ramanathan S, Ilangumaran S. Suppressor of cytokine signaling 1-dependent regulation of the expression and oncogenic functions of p21(CIP1/WAF1) in the liver. *Oncogene.* 2016 Aug 11;35(32):4200-11. doi: 10.1038/onc.2015.485.
23. Murota A, Suzuki K, Kassai Y, Miyazaki T, Morita R, Kondo Y, Takeshita M, Niki Y, **Yoshimura A**, Takeuchi T. Serum proteomic analysis identifies interleukin 16 as a biomarker for clinical response during early treatment of rheumatoid arthritis. *Cytokine.* 2016, 78:87-93. doi: 10.1016/j.cyto.2015.12.002.
24. Sakaguchi R, Chikuma S, Shichita T, Morita R, Sekiya T, Ouyang W, Ueda T, Seki H, Morisaki H, **Yoshimura A**. Innate-like function of memory Th17 cells for enhancing endotoxin-induced acute lung inflammation through IL-22. *Int Immunol.* 2016 May;28(5):233-43. doi: 10.1093/intimm/dxv070.
25. 七田 崇, 吉村 昭彦 死細胞の認識、食食、生体応答 脳虚血と細胞死(解説/特集)
実験医学 (0288-5514)34巻7号 Page1113-1117(2016. 05)
26. 酒井 亮太, 吉村 昭彦 IL-17産生 γ δ T細胞(解説/特集)
炎症と免疫 (0918-8371)24巻3号 Page178-183(2016. 04)
27. 吉村 昭彦, 岡田 匡央, 金森 光広, 中司 寛子 免疫疾患のエピゲノムとT細胞のエピゲノム変化によるその制御(解説/特集)
実験医学 (0288-5514)34巻10号 Page1643-1650(2016. 06)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
(国内)

- 「サイトカインのシグナルと自己免疫疾患および治療への応用」吉村昭彦
第16回鹿児島トシリズマブ適正使用研究会 2016年5/25 鹿児島サンロイヤルホテル
- 「マクロファージによる脳梗塞後炎症の制御」吉村昭彦
ライフサイエンスセミナー 神経と免疫炎症のクロストーク 2016年5/31 千里大阪府豊中市
- 「サイトカインによる脳梗塞後の炎症制御」吉村昭彦
「免疫サマースクール2016 in 北海道」2016年7/12 函館市
- “Inhibition of Nr4a breaks Treg-mediated suppression of anti-tumor immunity” 日比野沙奈、吉村昭彦
第20回日本がん免疫学会総会 2016年7月29日大阪市 大阪国際交流センター
- 「腸内細菌によるアレルギーと自己免疫疾患の制御」吉村昭彦
岡山IBD研究会 2016年8/31 岡山県倉敷市
- 「制御性T細胞の分化と可塑性」吉村昭彦
第44回日本臨床免疫学会 2016年9/9 東京京王プラザ
- “Pathological Implications of Post-Ischemic Inflammation in the Brain” 吉村昭彦
第41回日本微小循環学会 2016年9/23 品川
- 日比野沙奈、吉村昭彦 「Nr4aの機能阻害は制御性T細胞を介した抗腫瘍免疫応答の抑制を解除する」第75回日本癌学会学術総会 2016年10/7 横浜

9. 「慢性期脳梗塞における抑制性T細胞の役割」 伊藤美菜子、吉村昭彦 第3回病因研究会別府シンポジウム 2017年 3/4~5 大分県別府市

10. 「T細胞リプログラミングによる新たな免疫チェックポイント克服法」 吉村昭彦
第26回泌尿器科分子・細胞研究会 大分市 3/10-11

(国際)

1. Akihiko Yoshimura “SOCS, inflammation and tumor”

CIACCO-2016 5th Annual symposium on Cytokines in Inflammation, Ageing, CanCer and Obesity
2016 5/20 The Round Hearth Eastman, Québec, Canada

2. Akihiko Yoshimura “SPRED1, the gene responsible for Legius Syndrome, suppresses Ras activation by interacting with the GAP-related domain of neurofibromin” NF conference 2016 2016 6/20 Austin USA

3. Minako Ito and Akihiko Yoshimura “Role of T cells accumulated in the brain at the late onset of stroke”
International Congress of Immunology-2016 2016 8/21-26 Melbourne Australia

4. Kazue Someya and Akihiko Yoshimura “Enhanced stability of the Foxp3 expression by forced expression of TET DNA demethylase catalytic domain in iTregs” International Congress of Immunology-2016 2016 8/21-26 Melbourne Australia

5. Hiroko Nakatsukasa and Akihiko Yoshimura “TET2 and TET3 play essential roles in Treg-specific DNA demethylation and Treg stability” International Congress of Immunology-2016 2016 8/21-26 Melbourne Australia

6. Taisuke Kondo and Akihiko Yoshimura “Reprogramming of T cells from Effector to Stem Cell Memory by Notch Signaling” International Congress of Immunology-2016 2016 8/21-26 Melbourne Australia

7. Akihiko YOSHIMURA (Keio University) “TET enzymes promote DNA demethylation of the Foxp3 gene locus and improve Treg stability” Akihiko Yoshimura 日本免疫学会 学術集会国際シンポジウム 2016 12/5-7 宜野湾市

8. Akihiko Yoshimura, “*Induction of Stable TGF- β -Mediated Regulatory T Cells by Epigenetic Modifications*”
2017 Keystone Symposia on TGF- β in Immunity, Inflammation and Cancer. 1/ 9-14, 2017, Taos, New Mexico, USA

9. Akihiko Yoshimura “Role of Inflammation in the Brain after Stroke” 9th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience. Chronic Inflammation - initiation, Progression and Resolution 1/20,21, 2017 Osaka Suita-shi

10. Akihiko Yoshimura “Regulation of stability and functions of induced regulatory T cells by epigenetic modifications”
2017 International Symposium on Autoimmunity: Epigenomics and Beyond (2017ISAEB), 4/ 27-29, 2017. Beijing China

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 「サイトカインによる脳梗塞後の炎症制御」 吉村昭彦
「免疫サマースクール2016 in 北海道」2016年 7/12 函館市

(4) 特許出願

なし