

「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」  
平成 25 年度採択研究代表者

H25 年度  
実績報告

吉村 昭彦

慶應義塾大学  
教授

T 細胞のエピジェネティック改変による免疫疾患制御

## § 1. 研究実施体制

(1) 「吉村」グループ (慶應義塾大学)

- ① 研究代表者: 吉村昭彦 (慶應義塾大学医学部、教授)
- ② 研究項目
  - ・ NR4a の解析
  - ・ T 細胞リプログラミング因子の探索
  - ・ Foxp3 遺伝子 DNA 脱メチル化の解析

## § 2. 研究実施の概要

本研究は免疫応答の中心をなす CD4 陽性ヘルパーT(Th)細胞の分化をリプログラムし、アレルギーなどの免疫疾患を治療したり、臓器移植の拒絶反応を抑制する新しい方法を開発することを目標としている。獲得免疫の中心であるエフェクターT細胞はナイーブT細胞より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。しかし人為的にエピジェネティック制御を改変しT細胞の性質を変更できれば、非常に効果的な免疫疾患の治療方法となるはずである。例えば分化した成熟Th細胞を抑制性T細胞(Treg)に転換できれば、免疫系全体を抑制すること無く抗原特異的な免疫抑制が可能となる。そこで本研究においては本年度は以下のような研究を行った。

(1) NR4a によって誘導された人工的な Treg の抑制能を確認する。(2) 抗原特異的な iTreg を作製し心臓移植の拒絶反応を抑制できことを検証する。(3) 線維芽細胞から T 細胞を誘導する目的で種々の遺伝子導入を行う。(4) TGF-β による IL-9 産生機構のエピジェネティック制御を明らかにする。

(1)について我々はすでに NR4a ファミリーが胸腺における Treg の発生に必須の役割を果たしている事を示している。今回、Nr4a2 のリガンド結合ドメインをエストロゲン受容体のリガンド結合ドメインと置換したキメラ遺伝子(Nr4a-ERT2)を骨髄細胞に導入して Foxp3 を誘導した。その結果、卵白アルブミン(OVA)によって誘導される喘息モデルを抑制することがわかった。これらの結果より Nr4a2-ERT2 で誘導された Treg は機能的であることが強く支持された。(2)では試験管内で抗原特異的 iTreg を誘導、増幅する方法を確立し、心臓移植モデルにおける拒絶反応を抑制する事を示した。(3)においてはヒト線維芽細胞に造血細胞やリンパ球の分化に必須の遺伝子群をレンチウイルスによって導入した。その過程で線維芽細胞を1遺伝子導入によって血管内皮細胞に転換できる事がわかった。(4)では IL-9 産生性の Th9 の産生機構を明らかにした。Th9 は TGF-β と IL-4 の作用によって誘導され、IL-9 はアレルギー性喘息やアトピー性皮膚炎、寄生虫感染に関わるサイトカインである。我々は今回 Smad2/3 欠損マウスを用いて IL-9 産生の詳しいメカニズムを調べた。TGF-β 依存性 IL-9 産生は Smad2 欠損 Smad3 ヘテロ(Smad2<sup>-/-</sup>Smad3<sup>+/+</sup>)マウス T 細胞ではほぼ完全に IL-9 産生能が失われていた。さらに Smad2 や Smad3 単独欠損マウス T 細胞では部分的にしか減少しないことから、Smad2/3 は IL-9 産生において必要不可欠であり、Smad2 と Smad3 は互いに重複性をもっていることが考えられた。IL-9 promoter 上のヒストン修飾をクロマチン免疫沈降法(ChIP assay)を用いて解析を行ったところ、Th9 において遺伝子転写促進性のヒストン H3 アセチル化(AcH3)やヒストン H3 リジン K4 トリメチル化(H3K4me3)が Th2 と比較し増加していることが確認された。さらに Samd2<sup>-/-</sup>Samd2<sup>+/+</sup>Th9 では AcH3 および H3K4me3 が大幅に減弱しており、TGF-β は Smad2/3 を介して IL-9 promoter 上において転写促進性のヒストン修飾を誘導していることが示された。次に Smad2/3 がどのような分子と協調して働いているかを調べたところ転写因子 IRF4 と IL-9 promoter 上の同じ領域に結合しており、さらに免疫沈降法によって両者が互いに結合していることが確認された。IRF4KO マウスを使った実験では IRF4KO Th9 において IL-9 promoter 上に Smad2/3 がリクルートできず、Smad2/3 のリクルートは TGF-β および IRF4 に依存していることが明らかになった。

### § 3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### 論文詳細情報(国際)

1. Yoshida H, Kotani H, Kondo T, Tani I, Wei X, Tsuruta S, Kimura A, Asakawa M, Ito M, Nagai S, Yoshimura A. CDK inhibitors suppress Th17 and promote iTreg differentiation, and ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Jun 7;435(3):378-84. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.04.096.

2. Romain M, Taleb S, Dalloz M, Ponnuswamy P, Esposito B, Pérez N, Wang Y, Yoshimura A, Tedgui A, Mallat Z. Overexpression of SOCS3 in T Lymphocytes Leads to Impaired Interleukin-17 Production and Severe Aortic Aneurysm Formation in Mice--Brief Report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 Mar;33(3):581-4. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300516.

61. Hasegawa E, Sonoda KH, Shichita T, Morita R, Sekiya T, Kimura A, Oshima Y, Takeda A, Yoshimura T, Yoshida S, Ishibashi T, Yoshimura A. IL-23-Independent Induction of IL-17 from  $\gamma\delta$ T Cells and Innate Lymphoid Cells Promotes Experimental Intraocular Neovascularization. *J Immunol*. 2013 Feb 15;190(4):1778-87. doi: 10.4049/jimmunol.1202495.

3. Ishida H, Imai T, Suzue K, Hirai M, Taniguchi T, Yoshimura A, Iwakura Y, Okada H, Suzuki T, Shimokawa C, Hisaeda H. IL-23 protection against *Plasmodium berghei* infection in mice is partially dependent on IL-17 from macrophages. *Eur J Immunol*. 2013 Jul 10. doi: 10.1002/eji.201343493

4. Carow B, Reuschl AK, Gavier-Widén D, Jenkins BJ, Ernst M, Yoshimura A, Chambers BJ, Rottenberg ME. Critical and Independent Role for SOCS3 in Either Myeloid or T Cells in Resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*. 2013 Jul;9(7):e1003442. doi: 10.1371/journal.ppat.1003442.

5. Hanada T, Weitzer S, Mair B, Bernreuther C, Wainger BJ, Ichida J, Hanada R, Orthofer M, Cronin SJ, Komnenovic V, Minis A, Sato F, Mimata H, Yoshimura A, Tamir I, Rainer J, Kofler R, Yaron A, Eggan KC, Woolf CJ, Glatzel M, Herbst R, Martinez J, Penninger JM. CLP1 links tRNA metabolism to progressive motor-neuron loss. *Nature*. 2013 Mar 28;495(7442):474-80. doi: 10.1038/nature11923.

6. Zhang H, Neuhöfer P, Song L, Rabe B, Lesina M, Kurkowski MU, Treiber M, Wartmann T, Regnér S, Thorlacius H, Saur D, Weirich G, Yoshimura A, Halangk W, Mizgerd JP, Schmid RM, Rose-John S, Algül H. IL-6 trans-signaling promotes pancreatitis-associated lung injury and lethality. *J Clin Invest*. 2013 Mar 1;123(3):1019-31. doi: 10.1172/JCI64931.

7. Sekiya T, Kashiwagi I, Yoshida R, Fukaya T, Morita R, Kimura A, Ichinose H, Metzger D, Chambon P, Yoshimura A. Nr4a receptors are essential for thymic

regulatory T cell development and immune homeostasis. *Nature Immunol.* 2013 Jan 20. 2013 Mar;14(3):230-7. doi: 10.1038/ni.2520.

8. Hayashi A, Sato T, Kamada N, Mikami Y, Matsuoka K, Hisamatsu T, Hibi T, Roers A, Yagita H, Ohteki T, Yoshimura A, Kanai T. A Single Strain of *Clostridium butyricum* Induces Intestinal IL-10-Producing Macrophages to Suppress Acute Experimental Colitis in Mice. *Cell Host Microbe.* 2013 Jun 12;13(6):711-22. doi: 10.1016/j.chom.2013.05.013.

9. Tamiya T, Ichiyama K, Kotani H, Fukaya T, Sekiya T, Shichita T, Honma K, Yui K, Matusyama T, Nakao T, Fukuyama S, Inoue H, Nomura M and Yoshimura A Smad2/3 and IRF4 Play a Cooperative Role in IL-9-Producing T Cell Induction *J Immunol* 2013 Sep 1;191(5):2360-71. doi: 10.4049/jimmunol.1301276.

10. Nishimoto S, Kotani H, Tsuruta S, Shimizu N, Ito M, Shichita T, Morita R, Takahashi H, Amagai M, and Yoshimura A. PsoriasisTh17 cells carrying TCR recognizing epidermal autoantigen induce psoriasis-like skin inflammation" *J Immunol* 2013 Sep 15;191(6):3065-72. doi: 10.4049/jimmunol.1300348.

11. Muto G, Kotani H, Kondo T, Morita R, Tsuruta S, Kobayashi T, Luche H, Fehling HJ, Walsh M, Choi Y, Yoshimura A. TRAF6 is essential for maintenance of regulatory T cells that suppress Th2 type autoimmunity. *PLoS One.* 2013 Sep 13;8(9):e74639. doi: 10.1371/journal.pone.0074639.

12. Venken K, Seeuws S, Zabeau L, Jacques P, Decruy T, Coudenys J, Verheugen E, Windels F, Catteuw D, Drennan M, Van Calenbergh S, Lambrecht BN, Yoshimura A, Tavernier J, Elewaut D. A bidirectional crosstalk between iNKT cells and adipocytes mediated by leptin modulates susceptibility for T cell mediated hepatitis. *J Hepatol.* 2013 Aug 20. doi:pii: S0168-8278(13)00597-7. 10.1016/j.jhep.2013.08.008.

13. Shirakabe K, Shibagaki Y, Yoshimura A, Koyasu S, Hattori S. A proteomic approach for the elucidation of the specificity of ectodomain shedding. *J Proteomics.* 2014 Jan 20. pii: S1874-3919(14)00024-4. doi: 10.1016/j.jprot.2014.01.012

14. Mikami Y, Mizuno S, Nakamoto N, Hayashi A, Sujino T, Sato T, Kamada N, Matsuoka K, Hisamatsu T, Ebinuma H, Hibi T, Yoshimura A, Kanai T. Macrophages and Dendritic Cells Emerge in the Liver during Intestinal Inflammation and Predispose the Liver to Inflammation. *PLoS One.* 2014 Jan 2;9(1):e84619. doi: 10.1371/journal.pone.0084619.

15. Kimura A, Abe H, Tsuruta S, Chiba S, Fujii-Kuriyama Y, Sekiya T, Morita R, Yoshimura A. Aryl hydrocarbon receptor protects against bacterial infection by promoting macrophage survival and reactive oxygen species production. *Int Immunol.* 2014 Apr;26(4):209-20. doi: 10.1093/intimm/dxt067.

Koike K, Ueda S, Yamagishi S, Yasukawa H, Kaida Y, Yokoro M, Fukami K, Yoshimura A, Okuda S. Protective role of JAK/STAT signaling against renal fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction.

Clin Immunol. 2014 Jan;150(1):78-87. doi: 10.1016/j.clim.2013.11.003.

16. Abe H, Kimura A, Tsuruta S, Fukaya T, Sakaguchi R, Morita R, Sekiya T, Shichita T, Chayama K, Fujii-Kuriyama Y, Yoshimura A Aryl hydrocarbon receptor plays protective roles in ConA-induced hepatic injury by both suppressing IFN- $\gamma$  expression and inducing IL-22.

Int Immunol. 2014 Mar;26(3):129-37. doi: 10.1093/intimm/dxt049.

17. Takasato F, Morita R, Schichita T, Sekiya T, Morikawa Y, Kuroda T, Niimi M, Yoshimura A.

Prevention of allogeneic cardiac graft rejection by transfer of ex vivo expanded antigen-specific regulatory T-cells.

PLoS One. 2014 Feb 3;9(2):e87722. doi: 10.1371/journal.pone.0087722. eCollection 2014.

### (3-2) 知財出願

特許出願件数 (平成 25 年度)

合計	1	国内	1	件
----	---	----	---	---

CREST 研究期間累積件数

合計	1	国内	1	件
----	---	----	---	---