慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	制御性T細胞のエピジェネティック制御機構の解明と免疫疾患への応用
Sub Title	The role of TET proteins in stability and function of regulatory T cells.
Author	中司, 寛子(Nakatsukasa, Hiroko)
Publisher	
Publication year	2017
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2016.)
JaLC DOI	
Abstract	制御性T細胞(Treg)は免疫寛容に重要なT細胞であり, その安定性はマスター遺伝子であるFoxp3のDNA脱メチル化が関与すると報告されたが, 未だその制御機構には不明な点が多い。本研究では, DNA脱メチル化酵素であるTet2/3がT細胞およびTregにおいてDNA脱メチル化を制御することでその分化や安定性, 機能に重要な役割を担うことを明らかとした。さらに, 人工的にFoxp3遺伝子の部位特異的DNA脱メチル化を誘導することに成功した。 Regulatory T cells (Tregs) play a pivotal role in regulating immune responses and maintaining immunological tolerance. Although DNA demethylation has been proposed to be essential for the stable expression of Foxp3, a master regulator of Treg, actual contribution of DNA demethylating enzymes (Tet family proteins) in Treg stability and function remain to be elucidated. In this study, we analyzed T cell- or Treg-specific Tet2/3-deficient mice and found that Tet2/3 play important roles in the differentiation, stability and function of T cells and Tregs through regulating DNA demethylation. Furthermore, we have successfully induced region-specific demethylation in Foxp3 gene locus.
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2015～2016 課題番号：15K19135 研究分野：免疫学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K19135seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２９ 年　 ６ 月　 ５ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2015～2016
課題番号：１５Ｋ１９１３５

研究課題名（和文）制御性T細胞のエピジェネティック制御機構の解明と免疫疾患への応用

研究課題名（英文）The role of TET proteins in stability and function of regulatory T cells.

研究代表者
中司　寛子（Nakatsukasa, Hiroko）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特別研究員（ＰＤ）

研究者番号：９０７４９３３４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,100,000円

研究成果の概要（和文）：制御性T細胞(Treg)は免疫寛容に重要なT細胞であり、その安定性はマスター遺伝子であるFoxp3のDNA脱メチル化が関与すると報告されたが、未だその制御機構には不明な点が多い。本研究では、DNA脱メチル化酵素であるTet2/3がT細胞およびTregにおいてDNA脱メチル化を制御することでその分化や安定性、機能に重要な役割を担うことを明らかとした。さらに、人工的にFoxp3遺伝子の部位特異的DNA脱メチル化を誘導することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Regulatory T cells (Tregs) play a pivotal role in regulating immune responses and maintaining immunological tolerance. Although DNA demethylation has been proposed to be essential for the stable expression of Foxp3, a master regulator of Treg, actual contribution of DNA demethylating enzymes (Tet family proteins) in Treg stability and function remain to be elucidated. In this study, we analyzed T cell- or Treg-specific Tet2/3-deficient mice and found that Tet2/3 play important roles in the differentiation, stability and function of T cells and Tregs through regulating DNA demethylation. Furthermore, we have successfully induced region-specific demethylation in Foxp3 gene locus.

研究分野：免疫学

キーワード：制御性T細胞　エピジェネティクス　自己免疫疾患　TET

１．研究開始当初の背景

(1) 制御性 T 細胞(Treg)は免疫寛容に重要なヘルパーT 細胞のサブセットであり、近年、自己免疫疾患等の新規治療法として、体外で増殖させた誘導性 Treg（iTreg)を投与する Treg 導入療法が試みられている。しかし、iTreg は胸腺由来 Treg（nTreg)と比べてマスター遺伝子である Foxp3 の発現が不安定であるため、安定化 Treg 誘導方法の確立は重要かつ緊急な課題である。近年、Treg の分化状態の安定性は Foxp3 の発現自体ではなく、Foxp3 遺伝子の TSDR (Treg 特異的脱メチル化領域)の DNA 脱メチル化というエピジェネティックな制御を受けていることが報告された。さらに、iTreg は nTreg とは異なるエピゲノム状態を呈することが報告されている。この差異が Foxp3 の安定性に関与すると考えられているが、未だそのエピジェネティック制御機構には不明な点が多い。

(2) Tet (Ten-eleven translocation)ファミリータンパク質(Tet1, Tet2, Tet3)は DNA 脱メチル化に関与することが報告されている。これまで、Tet2 および Tet3 が胸腺 Foxp3^{+} Treg に高発現すること、Tet1 および 2 が TSDR に結合することが報告されているが、Tet の TSDR 脱メチル化における機能、つまり Treg の安定化への役割は明らかとなっていない。

２．研究の目的

(1) Tet ファミリー蛋白の T 細胞および Treg 特異的欠損マウスを作製し、これらマウスの解析により T 細胞および Treg における Tet の機能を解明し、エピジェネティック制御機構を明らかとする。

(2) TSDR 特異的に DNA 脱メチル化を誘導することで iTreg の安定化を試みる。さらにこれを用いて、新規免疫疾患治療法の開発に向けた基盤研究をすることを目的とする。

３．研究の方法

(1) Tet 欠損マウスの作製と表現型の解析

①T 細胞および Treg における Tet の機能を解析するため、Tet2$^{f/f}$、Tet3$^{f/f}$ マウスと Cd4-Cre（T 細胞特異的)、Foxp3-Cre マウス（Treg 特異的）を交配し、T 細胞または Treg 特異的な Tet2, Tet3 両欠損マウスを作製した。

②Treg の発生/誘導および機能における Tet の関与の検討するため、野生型マウス(WT)、T 細胞特異的 Tet2/3 両欠損マウス(CD4CreDKO)、および Treg 特異的 Tet2/3 両欠損マウス(Foxp3CreDKO)の胸腺、脾臓、リンパ節を採取し、胸腺由来の nTreg の割合をフローサイトメトリーにて測定した。また、末梢二次リンパ組織より未分化なナイーブ CD4^{+} T 細胞をセルソーターにて分離し、TGF-β存在下で培養することで iTreg を誘導し、iTreg の誘導における Tet の関与を検討した。

③免疫疾患病態における Tet の役割を明らかとするため、CD4CreDKO マウス、および Foxp3CreDKO マウスを長期間飼育し、自己免疫疾患や炎症性疾患を自然発症するか観察した。また、これらのマウスを用いて自己免疫疾患および炎症性疾患を誘導し、病態モデルにおける Tet の役割を検討した。

(2) Tet 欠損マウスを用いた Treg における Tet の機能解析

①Treg のエピジェネティクス制御における Tet の関与を検討するため、WT マウスおよび Foxp3CreDKO マウスから分離した nTreg、およびナイーブ CD4^{+} T 細胞より誘導した iTreg より DNA を精製し、TSDR における DNA メチル化状態を LC/MS/MS および Bisulfite-seq により解析した。

②Treg の安定性に対する Tet の関与を検討するため、WT マウスおよび Foxp3CreDKO マウスから分離した nTreg、およびナイーブ CD4^{+} T 細胞より誘導した iTreg を in vitro で培養することにより Foxp3 の発現安定性を比較した。また、Foxp3 発現消失は特に炎症状態やリンパ球減少状態において確認されるため、WT マウスおよび Foxp3CreDKO マウスから分離した nTreg を単独、もしくは congenic WT Treg (CD45.1^{+})と共に T 細胞が欠損した Rag2$^{-/-}$マウスもしくは CD3ε$^{-/-}$マウスに移入し、数週間後ホストマウスより各組織を摘出し、WT 由来、KO 由来 Treg の Foxp3 発現を解析し、それぞれ Foxp3 の発現が維持されているかどうかを検討した。

③Treg の機能における Tet の役割を解析するために、WT および Foxp3CreDKO マウスから分離した nTreg をエフェクターT 細胞と in vitro において共培養し、エフェクターT 細胞の増殖／分裂抑制機能を比較した。また、in vivo における Treg 機能の評価として、炎症性腸疾患モデルを用いた。T 細胞が欠損した Rag2$^{-/-}$マウスに WT エフェクターT 細胞（CD45Rb^{hi}）を移入することで腸炎を誘導できるが、本モデルに WT および Foxp3CreDKO マウスより分離した nTreg を共移入することで腸炎の抑制効果を比較した。

(3) TSDR 特異的人工脱メチル化酵素の作製

近年 TALE 法や CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子改変技術が注目されている。いずれも遺伝子配列を特異的に認識することを特徴としているが、これらを応用し、TSDR 特異的に DNA 脱メチル化を誘導することで iTreg の安定化を試みた。さらに、誘導した安定化 iTreg の機能解析を行った。

①CRISPR/Cas9 システムを用いた CRISPR-Tet の作製を行った。ヌクレアーゼ活性を欠失させた変異型 Cas9 は crRNA 構造を模倣したガイド RNA（gRNA）依存的に DNA に安定に結合することが知られている。このような変異 Cas9(dCas9)と DNA 脱メチル化酵素の融合タンパクおよび gRNA を発現するベクターを作製、セルラインに導入し、TSDR の脱メチル化

を確認した。
②CRISPR-Tet を用いた安定化 Treg の作製
dCas9-Tet およびガイド RNA を発現するベクターを iTreg を誘導時に導入し、TSDR のメチル化状態および安定性の解析を行った。

４．研究成果

(1) T 細胞特異的 Tet2/3 両欠損マウス(CD4CreDKO)の作製、解析を行ったところ、DKO マウスは早期（生後 75 日前後）に死亡することがわかった。この CD4CreDKO マウスは T 細胞の活性化を伴う二次リンパ節腫大を引き起こし、さらに抗体産生に関与する濾胞 B 細胞の増加および抗体産生亢進が認められた。さらに、本マウスは肺、肝臓、腎臓、大腸等に炎症細胞浸潤を認め、全身性に炎症をきたすことが明らかとなった。

(2) Treg 特異的 Tet2/3 両欠損マウス(Foxp3CreDKO)の作製、解析を行ったところ、Foxp3CreDKO マウスは CD4CreDKO マウスと比べると長寿だが、平均して生後 150 日程度で死亡することがわかった。Foxp3CreDKO マウスも高齢(５カ月齢以上)になると CD4CreDKO マウスと同様に T 細胞の活性化を伴う二次リンパ節腫大を引き起こし、濾胞 B 細胞の増加および抗体産生亢進が認められた。また、Foxp3CreDKO マウスから単離した Treg を解析したところ、WT Treg に比して Tet2/3 欠損 Treg は TSDR の部分的メチル化、および脱メチル化の指標である 5hmC の減少が認められ、Treg において Tet2/3 が TSDR の脱メチル化に関与することが明らかとなった。

WT マウスおよび Foxp3CreDKO マウスの胸腺、脾臓、リンパ節を採取し、胸腺由来の nTreg の割合を測定したところ、WT と Foxp3CreDKO マウスでは有意な差はみとめられず、nTreg の発生に Tet は関与しないことが明らかとなった。また、in vitro における iTreg の誘導においても Tet は関与しないことが明らかとなった。しかし、Foxp3CreDKO マウスから単離した Treg は、WT Treg に比して脱メチル化の指標である 5hmC の減少、および TSDR の部分的メチル化が認められ、Treg において Tet2/3 が TSDR の脱メチル化に関与することが明らかとなった。

次に Tet2/3 欠損 Treg 安定性を検討したところ、in vitro においては WT Treg と Tet2/3 欠損 Treg で差は認められなかった。しかしながら、Rag2$^{-/-}$マウスもしくは CD3ε$^{-/-}$マウスといったリンパ球減少性のマウスに Treg を移入したところ、Tet2/3 欠損 Treg は WT Treg に比して著しくその Foxp3 発現を失い、不安定化していることが明らかとなった。

続いて Tet2/3 欠損 Treg の抑制機能の評価を行った。in vitro におけるエフェクターT 細胞の分裂／増殖抑制能は WT Treg と TET2/3 欠損 Treg で差異は認められなかった。しかしながら、in vivo での炎症性腸疾患モデルマウスにおいては、WT Treg の移入により病態が抑制されたのに対し、Tet2/3 欠損 Treg では病態を抑制することができず、Tet2/3 は Treg の抑制機能発現に重要であることが示唆された。

(3) TSDR 特異的人工脱メチル化酵素の作製
CRISPR/dCas9 システムを用いた CRISPR-Tet 発現ベクターの作製を試みた。

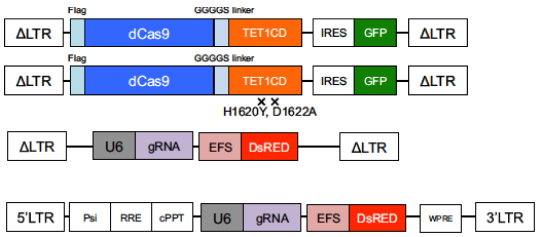

図1．dCas9-TetおよびgRNA発現ベクターの作製

Tet1 の酵素活性部位および dCas9 を発現するベクターと、Foxp3 の CNS2 領域をターゲットとするガイド RNA を発現するベクターをそれぞれ作製し、iTreg 誘導時に導入した（図１）。CRISPR-Tet 導入 iTreg の DNA メチル化状態を解析したところ、Foxp3 遺伝子 CNS2 領域の部分的脱メチル化を誘導することができた（図２）。

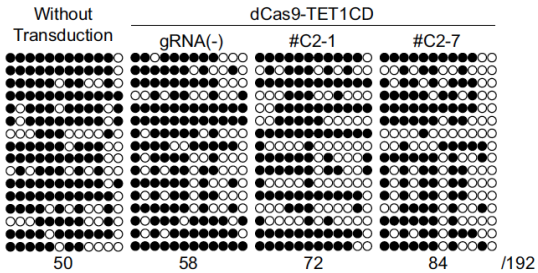

図２．Foxp3-CNS2領域の脱メチル化状態

以上の結果から、Tet2/3 は T 細胞および Treg において、DNA 脱メチル化というエピジェネティック制御を行うことでその分化や機能に重要な働きをすることが明らかとなった。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 8 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, and Yoshimura A. Notch-mediated conversion of activated T cells into stem cell memory-like T cells for adoptive immunotherapy. ***Nat Commun.*** in press 査読有
(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.*** May 8;10:24.(2017) 査読有
DOI: 10.1186/s13072-017-0129-1.
(3) Kanamori M, Nakatsukasa H, Okada M, Lu Q, and Yoshimura A. Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. ***Trends Immunol.*** 37(11): 803-811 (2016) 査読有
DOI: 10.1016/j.it.2016.08.012.
(4) Sekiya T, Nakatsukasa H, Lu Q, and Yoshimura A. Roles of transcription factors and epigenetic modifications in differentiation and maintenance of regulatory T cells. ***Microbes Infect.*** 18(6): 378-86 (2016). 査読有
DOI: 10.1016/j.micinf.2016.02.004.

〔学会発表〕（計 8 件）
(1) 中司　寛子 他、TET2 and TET3 regulate stability and homeostasis of regulatory T cells、第 19 回武田科学振興財団生命科学シンポジウム「慢性炎症：機序と制御」、平成 29 年 1 月 20 日、武田薬品研修所（大阪府吹田市）
(2)中司　寛子 他、TET2 and TET3 regulate Treg stability through Treg-specific DNA demethylation, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology “TGF-ß in Immunity, Inflammation and Cancer”、平成 29 年 1 月 11 日、タオス（アメリカ）
(3) 中司　寛子 他、TET2 and TET3 play essential roles in Treg-specific DNA demethylation and Treg stability, International Congress of Immunology 2016、平成 28 年 8 月 24 日、メルボルン（オーストラリア）
(4) 中司　寛子 他、制御性 T 細胞の DNA 脱メチル化による制御、第 1 回 Clinical Immunology/Inflammation Seminar in Shinanomachi、平成 28 年７月９日、慶應義塾大学（東京都新宿区）
(5) 中司寛子 他、第２回病因研究会別府シンポジウム、制御性 T 細胞のヒドロキシメチル化による制御、平成 28 年２月６日、別府湾ロイヤルホテル（大分県速見郡）

〔図書〕（計 3 件）
(1) 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 細胞のエピゲノム改変によるその制御、実験医学増刊、羊土社、 34(10)145-152 (2016).
(2) 中司　寛子、金森　光広、岡田　匡央、吉村　昭彦、iTreg を用いた免疫疾患治療法、臨床免疫･アレルギー科、科学評論社、65(3) 255-261(2016).

６．研究組織
(1)研究代表者
中司　寛子（NAKATSUKASA, Hiroko）
慶應義塾大学・医学部・日本学術振興会特別研究員(PD)
研究者番号： 90749334