

Bach2 による慢性炎症のエピゲノム制御機構の解明

愛媛大学大学院 医学系研究科 免疫学講座

山下 政克

1、はじめに

細胞老化をきたした細胞は、単に増殖を停止するだけではなく、IL-6 や IL-8 をはじめとした様々な液性因子を分泌し、炎症反応を引き起こす。この形質は senescence-associated secretory phenotype (SASP) と呼ばれ、炎症の誘発・慢性化に深く関与している。しかしながら、SASP の分子機構は未だ不明な点が多く、特に、炎症に必須の細胞集団である免疫細胞を用いた研究はほとんどおこなわれていない。

T 細胞分化の場である胸腺は、成人後退縮し、新たな T 細胞の供給が著しく減少するため、T 細胞は、免疫担当細胞の中でも細胞老化の影響を顕著に受ける。しかしながら、T 細胞免疫老化の分子機構は、ほとんど解析が進んでいない。そのような状況の中、昨年、京都大学の湊教授らのグループが、白血病の発症に伴って増加する老化 T 細胞を同定し、Tsen と名付けた¹。Tsen は、PD-1 を細胞表面マーカーとして発現し、炎症性因子オステオポンチンを産生することで、ガンの増殖を促進する。Tsen の分化には転写因子 C/EBP α が必要であるとされているが、現在のところ、Tsen の詳細な分化制御機構については明らかになっていない。

申請者らは T 細胞免疫老化と慢性炎症の関係に着目し、免疫反応の司令塔である CD4 T 細胞での免疫細胞老化のエピゲノム解析を行なって、(1) CD4 T 細胞の老化を腫瘍抑制因子 Menin が制御していること、(2) Menin 標的遺伝子の一つが転写調節因子 Bach2 であり、Bach2 の発現低下が SASP の一因となることを見出した(論文リバイス中)。Bach2 と同じファミリーに属する Bach1 は、MEF において酸化ストレスで誘導される細胞老化を抑制するが²、このメカニズムが他の細胞にも存在するのかについては、明らかになっていない。また、ごく最近、*C. elegans* において転写因子 SKN-1 (哺乳類の転写因子 Nrf の ortholog) が免疫老化に関与しているという報告がなされた³。この論文では、SKN-1 の過剰な活性化は、酸化ストレス耐性の誘発を介して免疫老化を引き起こすことが報告されている。Bach2 は、Nrf のパートナーである small Maf と結合し、Nrf 依存的な転写活性化を抑制することが知られている。そこで、これらの知見と、申請者らが得た研究結果を基盤として、Bach2 による SASP のエピゲノム制御機構を解明する研究を通して、CD4 T 細胞免疫老化が炎症の慢性化に及ぼす影響を明らかにすることで、慢性炎症性疾患の新規治療戦略の提唱を目指したいと考えた。

2、方法

理化学研究所 IMS・大阪大学 IFREC の黒崎智博博士から Bach2-flxed マウスを分与していただき、CD4-Cre Tg マウスと交配することで T 細胞特異的 Bach2 欠損マウスを作製し、*in vitro*、*in vivo* での解析をおこなった。*In vitro* の解析では、CD4 T 細胞機能の解析に焦点を絞り、サイトカイン産生能、炎症性因子の発現、T_H サブセットへの分化能について、DNA マイクロアレイや ChIP シーケンスによる網羅的な解析をおこなった。また、*in vivo* 解析では、OVA 誘発アレルギー性気道炎症モデルを用いて、気道炎症の病態形成における Bach2 の役割について解析した。

In vitro サイトカイン産生能と炎症性因子の発現解析：野生型 (WT)、T 細胞特異的 Bach2 欠損 (T-Bach2 KO) マウスからナイーブ CD4 T 細胞を単離し、固層化抗 TCR β 抗体と抗 CD28 抗体で刺激し、16 時間後の培養上清に含まれるサイトカインを ELISA 法で測定した。また、サイトカインおよび炎症性因子 mRNA の発現を刺激後、0.5、1、2、4、8 時間で経時的に測定した。

In vitro T_H サブセットへの分化能の解析：WT、T-Bach2 KO のナイーブ CD4 T 細胞を単離し、T_H1、T_H2、T_H9、T_H17、iTreg 分化条件下で培養した後、細胞内染色法で解析をおこなった。

ChIP シーケンス：WT、T-Bach2 KO のナイーブ CD4 T 細胞を単離し、neutral 条件下で 5 日間培養後、抗 Bach2 抗体や抗ヒストン H3K27ac/H3K4me3 抗体を用いてクロマチン免疫沈降後、Illumina 社の次世代シーケンサー GAIIx でシーケンスをおこなった。

OVA 誘発アレルギー性気道炎症モデル：WT/T-Bach2 KO マウスを OVA/alumn で免疫した 10 日後に、ONA を点鼻により 3 回投与することで気道炎症を誘発した。最終点鼻の 24 時間後に、気道肺胞洗浄

(BAL)をおこない、洗浄液 (BALF) 中の浸潤細胞を計測した。また、肺への細胞浸潤を H&E 染色で、粘液産生と杯細胞の過形成を PAS 染色で検討した。気道過敏性の測定は、メサコリンに対する感受性の変化を指標に検討した。

3、結果

Bach2 のアレルギー性気道炎症病態形成における役割を解析する目的で、T-Bach2 KO マウスを OVA/alumn で感作後、点鼻でチャレンジしたところ、70%のマウスが 1 回目の点鼻後に死亡した。さらに、感作をおこなっていない T-Bach2 KO マウスでもほぼ同じ割合でマウスが死亡した。そこで、SPF 飼育下の 6 週齢の WT マウスと T-Bach2 KO マウスで BAL おこない、BALF 中の細胞を解析したところ、T-Bach2 欠損マウスの BALF 中には非常に多くの好酸球が存在することが明らかとなった。肺 H&E 染色の結果、T-Bach2 KO マウスの細気管支周囲には多くの炎症細胞の浸潤が確認できた。また、PAS 陽性の細胞が多数確認され、杯細胞の過形成に伴う粘液産生の亢進も起こっていることが分かった (図 1)。メサコリン反応性を指標にして気道過敏性の亢進についても検討したが、これも T-Bach2 KO マウスで亢進が認められた。さらに、T-Bach2 KO マウスの気管支周囲では、上皮下繊維の増生や平滑筋肥大も一部に見られ、慢性炎症の病態像を呈していた。T-Bach2 Ko マウスにおいて血中 IgE 抗体価が著しく上昇していた。これらは、いずれも T_H2 型のアレルギー気道炎症の特徴であったことから、肺 CD4 T 細胞の T_H 細胞サブセットについて解析したところ、T-Bach2 KO マウスでは、肺 CD4 T 細胞の約 5%が IL-5/IL-13 を産生する T_H2 細胞であった (WT では、0.1%程度)。以上の結果より、T-Bach2 KO マウスでは、アレルギー性気道炎症が自然発症すると考えられた。

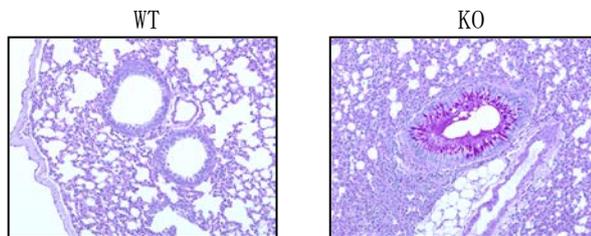


図 1. T-Bach2 KO マウス細気管支における杯細胞の過形成 (PAS 染色)

そこで、T-Bach2 KO マウスからナイーブ CD4 T 細胞を単離し、サイトカイン産生能について検討した。Bach2 KO ナーブ CD4 T 細胞は、WT 細胞に比べ、TCR 刺激後に非常に多くの T_H1/T_H2 サイトカインを産生した。さらに、刺激後、Bach2 KO ナーブ CD4 T 細胞のサイトカイン mRNA の転写は、WT に比べてレベルが高いだけでなく、減弱しにくく、遷延した発現様式を示した。次に、Bach2 欠損ナイーブ CD4 T 細胞の T_H サブセット分化能について検討したところ、Bach2 KO CD4 T 細胞は、no-skewing 条件下において、IL-4-産生、IFN- γ -産生、IL-4/IFN- γ -ダブル産生細胞に分化しやすいことが分かった。また、IL-4-産生細胞への分化亢進は抗 IL-4 抗体で阻害されたが、IFN- γ -産生細胞への分化亢進は抗 IFN- γ 抗体や抗 IL-12 抗体では抑制されなかった。また、各 T_H サブセット完全分化条件下では、それぞれのサブセットへの分化亢進や低下はほとんど認められなかったが、Bach2 KO T_H のいずれのサブセットも WT に比べ、IFN- γ の産生が増加していた。さらに、Bach2 KO CD4 T 細胞から Foxp3 陽性 iTreg 細胞への分化は著しく低下するとともに、分化してきた Foxp3 陽性細胞も IFN- γ の産生能を持つことが分かった。

次に、Bach2 の作用メカニズムを明らかにするため、ChIP シーケンス解析と DNA マイクロアレイ解析をおこなった。DNA マイクロアレイ解析の結果、Bach2 KO T_H 細胞において、WT 細胞に比べ 2 倍以上発現が変動する遺伝子のうち 2/3 の遺伝子が発現上昇し、1/3 が低下することが分かった。また、4 倍変動の遺伝子を比べた場合 3/4 の遺伝子が Bach2 欠損 T_H 細胞において発現が上昇する変化であった。そこで、ChIP シーケンス解析により、Bach2 KO T_H 細胞のヒストン H3K27ac の変化を網羅的に解析したところ、多くの遺伝子座においてアセチル化レベルの上昇が確認できたこと、H3K4me3 レベルの変化は、アセチル化に比べ軽微なものであったことから、Bach2 はヒストンのアセチル化修飾を抑制することにより、転写を負に制御している可能性が示唆された。

しかしながら、Bach2 は単独では DNA 結合能を持たないとされる転写抑制因子である。そこで、Bach2 のパートナー分子を明らかにするため、ChIP シーケンスにより T_H 細胞内における Bach2 結合部位の網羅的な同定を試みた。解析の結果、Bach2 は、これまで報告されていた small Maf 結合部位 (MARE) に加え、AP-1、T-bet、Ets や Runx の結合配列の近傍に多く結合しうることが明らかとなった。

4、考察

本申請研究により、Bach2 発現の低下が慢性アレルギー性炎症の発症につながりうることが明らかとなった。しかしながら、T 細胞における Bach2 欠損の他の炎症疾患に及ぼす影響については、まだ解析が進んでいない。特に、*in vitro* においてのみの検討ではあるが、Bach2 欠損ナイーブ CD4 T 細胞において iTreg 細胞の分化が低下していたこと、ごく最近、Bach2 null マウスを用いた研究で、Bach2 null マウスにおける炎症性大腸炎の自然発症が報告されている⁴ことなどから、自己免疫疾患の発症と Bach2 の関係については、今後、重点的に解析すべき課題であると考えている。

私たちのこれまでの研究から、Bach2 発現は、CD4 T 細胞の老化に伴い低下することが分かっている（論文リバイス中）。この結果は、免疫系の老化に伴い CD4 T 細胞で bach2 発現が低下することが、加齢に伴う炎症反応の増加の一因である可能性を示唆している。今後、Bach2 の発現を維持する方法を同定することで、アレルギー性炎症疾患の治療だけでなく、加齢に伴う炎症性形質の増大を制御する方法論の開発をおこなえると考えている。

5、参考論文

1. Shimatani K, Nakashima Y, Hattori M, Hamazaki Y, Minato N. PD-1+ memory phenotype CD4+ T cells expressing C/EBPalpha underlie T cell immunodepression in senescence and leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(37): 15807-15812.
2. Dohi Y, Ikura T, Hoshikawa Y, Katoh Y, Ota K, Nakanome A, *et al.* Bach1 inhibits oxidative stress-induced cellular senescence by impeding p53 function on chromatin. *Nat Struct Mol Biol* 2008, **15**(12): 1246-1254.
3. Papp D, Csermely P, Soti C. A role for SKN-1/Nrf in pathogen resistance and immunosenescence in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathog* 2012, **8**(4): e1002673.
4. Roychoudhuri R, Hirahara K, Mousavi K, Clever D, Klebanoff CA, Bonelli M, *et al.* BACH2 represses effector programs to stabilize T-mediated immune homeostasis. *Nature* 2013.