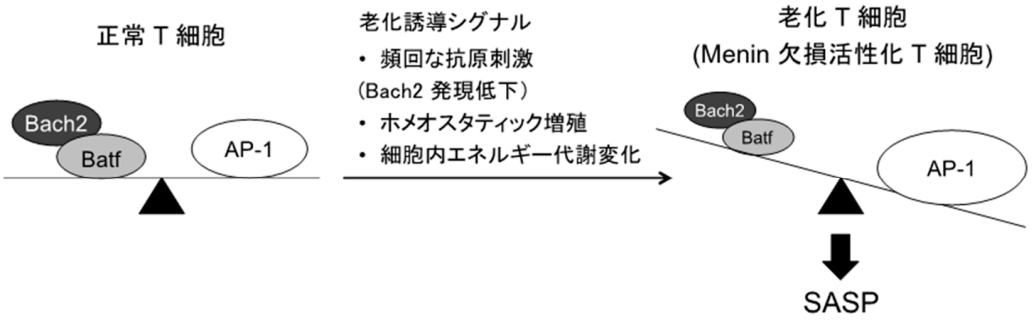
126　T細胞SASPの代謝・エピゲノム制御機構の解明	桑原　誠

【目的】老化 T 細胞は senescence-associated secretory phenotype（SASP）様の形質を獲得し、炎症性サイトカイン、炎症性ケモカイン、血管新生誘導因子、細胞外マトリックスリモデリング因子などを高発現する。しかしながら、T 細胞 SASP 制御機構の全容は解明されていない。本研究では、Bach2-Batf 複合体による T 細胞 SASP 制御を明らかにすることを目的とした。

【方法】T 細胞特異的 *Menin* KO/*Bach2* TG、*Menin* KO/*Batf* KO、*Bach2* KO/*Batf* KO マウスを作製し、活性化 T 細胞における SASP 因子の誘導を検討した（*in vitro*）。メタボリックプロファイリングを行い、細胞内エネルギー代謝変化と T 細胞老化の関与を検討した。

【結果】*Menin* 欠損によって誘導される SASP は *Bach2* の過剰発現および *Batf* の欠損によって抑制された。従って、Bach2-Batf 複合体は T 細胞 SASP を制御していることが示された。また、*Menin* 欠損活性化 T 細胞ではグルタミン代謝が活性化しており、ヒストン H3K27me2/3 の脱メチル化を介して T 細胞 SASP が誘導されていることがわかった。

Bach2-Batf 複合体による T 細胞 SASP 制御機構



126. T 細胞 SASP の代謝・エピゲノム制御機構の解明

桑原　誠

愛媛大学 大学院医学系研究科 免疫学講座

Key words : T 細胞老化，SASP，Bach2，Batf，グルタミン代謝

緒　言

老化 T 細胞は、sensescence-associated secretory phonotype（SASP）様の形質を獲得し、炎症性サイトカイン、炎症性ケモカイン、血管新生誘導因子、細胞外マトリックスリモデリング因子などを高産生する。T 細胞 SASP によって誘発される前炎症状態は、加齢に伴う自己免疫疾患、発がん、心血管疾患、神経変性疾患の増加や易感染性と密接に関連している［1］。

私たちは、腫瘍抑制因子 *Menin* を欠失した T 細胞が活性化後のごく早期に SASP をはじめとした老化細胞様の形質を獲得することを見いだした。*Menin* 欠損 T 細胞における SASP 誘導メカニズムを解析した結果、転写抑制因子 Bach2 の発現低下が T 細胞 SASP を引き起こすことが明らかとなった［2］。Bach2 は DNA 結合型の転写抑制因子であるが、単独では DNA 結合能を持たない。そこで、Bach2 と会合して DNA 結合活性を付与する転写調節因子を探索し、Batf ファミリー分子を新たに同定した［3］。Bach2-Batf 複合体は AP-1 コンセンサス DNA 配列に結合し、AP-1 依存的な転写活性化を抑制していることがわかった。しかしながら、Bach2-Batf 複合体の SASP 制御における役割は未だ明らかとなっていない。そこで本研究では、T 細胞 SASP における Bach2-Batf 複合体による SASP 制御について代謝・エピゲノム調節の側面から解明を試みた。

本研究では、T 細胞特異的 *Menin* 欠損-*Bach2* トランスジェニックマウスの解析から、Menin-Bach2 経路が OPN、IL-6、IL-10 などの SASP 因子の発現を抑制していることが明らかになった。また、*Menin*-*Batf* 二重欠損および *Bach2*-*Batf* 二重欠損活性化 CD4 T 細胞では SASP 因子の誘導が抑制された。これらの結果から、Bach2-Batf 複合体は T 細胞 SASP を制御していることが明らかになった。さらに、*Menin* 欠損活性化 T 細胞ではグルタミン代謝が亢進しており、ヒストン脱メチル化酵素 Utx による抑制性ヒストン H3K27me2/3 の脱メチル化により老化 T 細胞形質の獲得が制御されていることがわかった。

方　法

Menin-flox、*Bach2*-flox、*Batf*-flox、*Utx*-flox, *Bach2*-transgenic（TG）、マウスを *CD4*-*Cre* TG（CD4 プロモーター支配下に Cre 遺伝子を配したシステム）マウスと交配し、T 細胞特異的遺伝子改変マウスを作製した。WT および T 細胞特異的遺伝子改変マウスの脾臓由来ナイーブ CD4 T（$CD44^{low}$ $CD62L^{high}$ $CD25^{negative}$）細胞を IL-2（10 ng/ml）存在下で anti-TCR-β mAb（3 μg/ml）および anti-CD28 mAb（10 μg/ml）により 2 日間刺激した。TCR 刺激した細胞を新しいプレートに移し、IL-2（10 ng/ml）存在下で 5 日間培養した。刺激培養 7 日目 の活性化 CD4 T 細胞における細胞表面抗原を染色した。また、この細胞を anti-TCR-β mAb（3 μg/ml）で再刺激（ 2 μM Monensin 存在下、6 時間）して細胞内サイトカインを染色した。刺激培養 7 日目 の活性化 CD4 T 細胞を anti-TCR-β mAb（3 μg/ml）で再刺激（16 時間）し、ELISA を実施した。

結　果

1. Menin-Bach2 経路による T 細胞 SASP の制御

T 細胞特異的 *Menin* 欠損（KO）ナイーブ CD4 T 細胞は TCR 刺激によって活性化すると、老化した T 細胞の一般的特徴である CD27/CD62L の発現低下、PD-1 の発現上昇、OPN、IL-6、IL-10 産生亢進（SASP 因子）が確認された（図 1b、c、d）。*Menin* KO 活性化 T 細胞では、Bach2 の発現が減弱することから（図 1a）、T 細胞老化制御における Bach2 の役割を検討した。*Menin* KO-*Bach2* TG naïve CD4 T 細胞では、*Menin* KO 活性化 CD4 T 細胞における T 細胞老化形質（CD27/CD62L 発現低下、PD-1 発現上昇、OPN、IL-6、IL-10 産生亢進）が抑制された（図 1b、c、d）。したがって、Menin-Bach2 経路は T 細胞老化形質の一部を抑制していることが明らかになった。

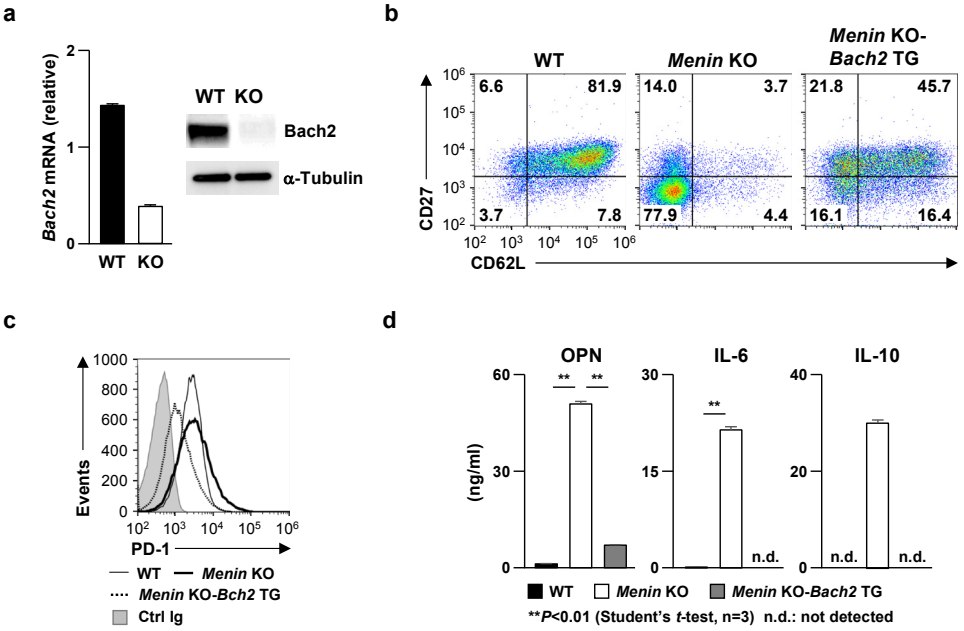


図 1. Menin-Bach2 経路は T 細胞老化形質の獲得を制御する

WT、*Menin* KO、*Menin* KO-*Bach2* TG ナイーブ CD4 T 細胞を TCR 刺激により活性化し、IL-2 存在下で培養した。初期刺激から 7 日目の活性化 CD4 T 細胞を用いて T 細胞老化形質を解析した。a）WT、*Menin* KO（KO）活性化 CD4 T 細胞における Bach2 の発現、b）CD62L/CD27 の FACS 解析（CD28low CD27low : 老化 T 細胞集団）、c）PD-1 の FACS 解析、d）活性化 CD4 T 細胞を TCR 再刺激し、OPN、IL-6、IL-10 産生を ELISA 法により測定した（$^{**}P < 0.01$、Student's *t*-test、n = 3）。

2. Bach2-Batf 経路による T 細胞 SASP の制御

続いて、Menin-Bach2 経路による T 細胞老化制御における Batf の関与を検討した。*Menin* KO 活性化 CD4 T 細胞における CD27/CD28 発現低下、OPN、IL-6、IL-10（SASP 因子）産生亢進は *Batf* 欠損により抑制された（図 2a、b、c）。また、*Bach2* KO 活性化 T 細胞における OPN、IL-6、IL-10 産生増加は *Batf* 欠損により有意に減少した（図 2a、b、c）。これらの結果から、Bach2-Batf 複合体は T 細胞 SASP の誘導を抑制していることが示された。

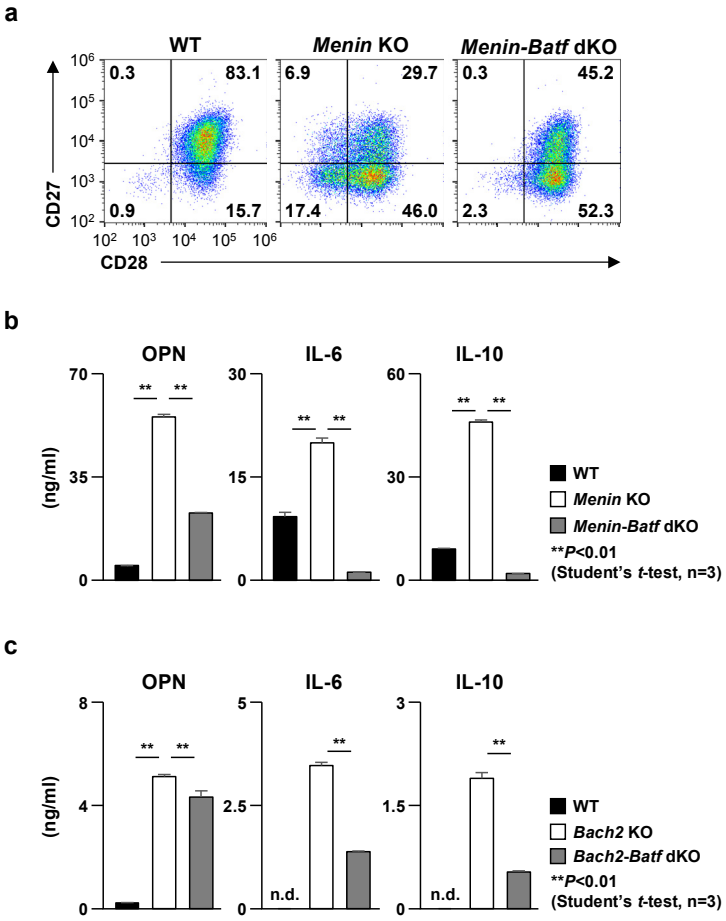


図 2. Bach2-Batf 複合体は T 細胞 SASP を抑制する

WT、*Menin* KO、*Menin* KO-*Batf* KO（*Menin-Batf* dKO）、*Bach2* KO-*Batf* KO（*Menin-Batf* dKO）ナイーブ CD4 T 細胞を TCR 刺激により活性化し、IL-2 存在下で培養した。初期刺激から 7 日目の活性化 CD4 T 細胞を用いて T 細胞老化形質を解析した。a）CD28/CD27 の FACS 解析（CD28low CD27low：老化 T 細胞集団）、b）および c）活性化 CD4 T 細胞を TCR 再刺激し、OPN、IL-6、IL-10 産生を ELISA 法により測定した（$^{**}P < 0.01$、 Student's *t*-test、n = 3）。

3. 細胞内代謝変化調節を介した SASP 制御

私たちは *Menin* KO 活性化 CD8 T 細胞の老化形質獲得にグルタミン代謝が関与していることを明らかにした（現在論文投稿中）。メタボリックプロファイリングの結果から *Menin* KO 活性化 CD8 T 細胞ではグルタミン代謝経路が活性化していた。T 細胞老化におけるグルタミン代謝の役割を検討するために、完全培地（4 mM glutamine） に比べてグルタミン濃度を低下させた培地（0.05 mM glutamine：ウシ血清に由来する glutamine 量）を用いたところ、*Menin* 欠損による T 細胞老化形質が誘導されなかった。また、グルタミン代謝産物である α-ketoglutaric acid（α-KG）をグルタミン低濃度培地に添加すると、T 細胞老化形質が誘導された。Alpha-KG はクエンサンサイクルの代謝中間産物であるだけでなく、ヒストン脱メチル化酵素 Utx（ヒストン H3K27me2/3 の脱メチル化酵素）の補因子として機能することが知られている。そこで、グルタミン代謝を介したヒストン H3K27me2/3（抑制性ヒストンマーク）の脱メチル化が T 細胞老化形質の獲得に関与しているかを検討した。グルタミン代謝が活性化している *Menin* KO 活性化 CD8 T 細胞ではヒストン H3K27me2/3（抑制性ヒストンマーク）レベルが低下していた。また、*Menin* 欠損による OPN、IL-6、IL-10 産生亢進（SASP）は Utx 欠損によって抑制された。これらの結果から、T 細胞老化形質の獲得（SASP）に Glutamin-α-KG 経路による H3K27me2/3 の脱メチル化が関与していることが示唆された。

考　察

私たちは、これまでに、Bach2-Batf 複合体が Th2 サイトカイン遺伝子座の AP-1 結合配列に結合し、AP-1 複合体の活性を阻害し、Th2 細胞分化および Th2 サイトカイン産生を抑制していることを報告している［3］。また、AP-1 複合体は SASP 因子を誘導することが知られている［1］。従って、Bach2-Batf 複合体は AP-1 機能阻害を介して T 細胞 SASP を抑制していると考えられる。Bach2-Batf 複合体による OPN 発現抑制は部分的であった（図 2c）。最近、転写因子 C/EBPβ が OPN の発現を誘導していることが報告された［5］。また、C/EBP は basic-region leucine zipper（bZIP）を有する転写因子 ATF ファミリーと会合し遺伝子発現を制御することが知られている［6］。私たちは、ATF ファミリーに属する Atf-3 も Bach2 結合候補分子として同定していることから、Bach2-Atf3 複合体が Atf3-C/EBPβ 複合体に拮抗し、OPN の発現を制御している可能性が考えられる。

また、Glutamin-α-KG 経路がヒストン脱メチル化酵素 Utx によるヒストン H3K27me2/3 の脱メチル化を促進し、T 細胞老化形質獲得に関与することがわかった。これまでに、C. elegans において加齢に伴いヒストン H3K27me3 レベルが増加し、ヒストン H3K27 脱メチル化酵素 UTX-1 の欠損により、H3K27me3 の脱メチル化が抑制されることでナイーブエピジェネティック状態が維持されることが報告されている［7］。従って、ヒストン H3K27me3 レベルが老化マーカーの 1 つとして重要であり、持続的なグルタミン代謝の活性化に伴うエピジェネティック変化が細胞老化の一因であると考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、愛媛大学大学院医学系研究科免疫学教室教授の山下政克博士、助教の鈴木淳平博士である。本研究の遂行に協力頂いた両博士に感謝する。Bach2-flox マウスおよび Bach2 TG マウスを分与して頂いた、大阪大学免疫学フロンティア研究センター教授の黒崎知博博士（分化制御）に感謝する。

文　献

1) Haynes L, Lefebvre JS. Age-related Deficiencies in Antigen-Specific CD4 T Cell Responses: Lessons from Mouse Models. Aging Dis. 2011 Oct;2(5):374-81. Epub 2011 Oct 28. PMID: 22396889

2) Kuwahara M, Suzuki J, Tofukuji S, Yamada T, Kanoh M, Matsumoto A, Maruyama S, Kometani K, Kurosaki T, Ohara O, Nakayama T, Yamashita M. The Menin-Bach2 axis is critical for regulating CD4 T-cell senescence and cytokine homeostasis. Nat Commun. 2014 Apr 2; 5:3555. PMID: 24694524 DOI: 10.1038/ncomms4555

3) Kuwahara M, Ise W, Ochi M, Suzuki J, Kometani K, Maruyama S, Izumoto M, Matsumoto A, Takemori N, Takemori A, Shinoda K, Nakayama T, Ohara O, Yasukawa M, Sawasaki T, Kurosaki T, Yamashita M. Bach2-Batf interactions control Th2-type immune response by regulating the IL-4 amplification loop. Nat Commun. 2016 Sep 1; 7:12596. PMID: 27581382 DOI: 10.1038/ncomms12596

4) Flanagan KC, Alspach E, Pazolli E, Parajuli S, Ren Q, Arthur LL, Tapia R, Stewart SA. c-Myb and C/EBPβ regulate OPN and other senescence-associated secretory phenotype factors. Oncotarget. 2017 Dec 5;9(1):21-36. eCollection 2018 Jan 2. PMID: 29416593 DOI: 10.18632/oncotarget.22940

5) Pakos-Zebrucka K, Koryga I, Mnich K, Ljujic M, Samali A, Gorman AM. The integrated stress response. EMBO Rep. 2016 Oct;17(10):1374-1395. Epub 2016 Sep 14. PMID: 27629041 DOI: 10.15252/embr.201642195

6) Jin C1, Li J, Green CD, Yu X, Tang X, Han D, Xian B, Wang D, Huang X, Cao X, Yan Z, Hou L, Liu J, Shukeir N, Khaitovich P, Chen CD, Zhang H, Jenuwein T, Han JD. Histone demethylase UTX-1 regulates C. elegans life span by targeting the insulin/IGF-1 signaling pathway. Cell Metab. 2011 Aug 3;14(2):161-72.

PMID: 21803287 DOI: 10.1016/j.cmet.2011.07.001