

学 位 論 文 要 旨

氏 名 井上 卓

論 文 名 T細胞におけるヒストン H3K27 脱メチル化酵素 Utx の低下は
接触性皮膚炎を重症化する

学位論文要旨

【目的】

アレルギー性接触性皮膚炎 (ACD) の病態には、エフェクターおよび制御性 T (Treg) 細胞などの抗原特異的 T 細胞の活性化が深く関わっている。抗原特異的 T 細胞の分化や機能は、DNA メチル化やヒストン修飾を介してエピジェネティックに調節されている。特に、ヒストン H3K27 メチル化は T 細胞分化・機能を決定する上で重要な働きを持つことが示されているが、ACD の発症における T 細胞のヒストン H3K27 メチル化の変化の影響は明らかになっていない。哺乳類では、2 種類のヒストン H3K27 脱メチル化酵素、Utx と Jmjd3 が存在する。そこで本研究では、Utx または Jmjd3 を T 細胞特異的に欠損させたノックアウトマウスを実験に用いて ACD 発症中の T 細胞におけるヒストン H3K27 脱メチル化酵素の役割について解析を行った。

【方法】

Cd4 プロモーターの制御下にある Cre リコンビナーゼトランスジェニックマウスを、Utxflox / flox マウスまたは Jmjd3flox / flox マウスと交配させて、T 細胞特異的 Utx 欠損 (Utx KO) マウスおよび Jmjd3 欠損 (Jmjd3 KO) マウスを作成し実験に用いた。コントロール (WT) マウスには、C57BL/6 マウスを用いた。皮膚炎の解析には、8~13 週齢のマウスを用いた。ACD の発症には急性反応を防ぐため、0.15% と低濃度の 2-4-ジニトロフルオロベンゼン (DNFB) を使用した。剃毛した腹部に DNFB を塗布して感作し、感作から 5、10、15 日目に DNFB を計 3 度標的的部位 (耳介もしくは背部) に反復塗布する事で ACD を誘導した。耳介に再刺激を与え耳介腫脹量の推移を評価する事で接触性皮膚炎の炎症反応を定量的に評価し、集積した免疫細胞の解析を行った。また、剃毛した背部を再刺激しその所属リンパ節を回収する事で CD4+ T 細胞 (Th) サブセットの分化と産生サイトカインの解析、および所属リンパ節から皮膚組織への組織移行性を検討した。また、マウス脾臓由来ナイーブ CD4+ T 細胞を用いて、in vitro Th 細胞分化誘導アッセイを行い、Th 分化に対する影響を解析した。本研究における動物実験は、愛媛大学医学部の動物実験の倫理委員会によって承認されている (05K033-1, 16, 05K034-1, 16)。

【結果】

WT マウスと比較して、Utx KO マウスは 2 回目の反復塗布以後より重度の耳介炎症を呈した

が、Jmjd3 KO マウスの症状は同等であった。このため、Utx KO マウスにおける T 細胞の動態に着目した。Utx KO マウスの耳介組織において、表皮から真皮にかけて炎症性細胞の有意な集積の増加が確認された。Utx KO マウスの耳介皮膚では、好中球、好酸球浸潤が増加し、 $\alpha\beta$ T 細胞の浸潤は低下していた。一方、CD4+ T 細胞における Ifng、Il13、Csf2 などの炎症性サイトカインの mRNA 発現は Utx KO マウスにおいて有意に増加していた。CD8+ T 細胞における炎症性サイトカインの mRNA 発現は、WT マウスと Utx KO マウス間で差は認められなかった。Utx KO マウスにおいて、所属リンパ節の Th 細胞の割合、絶対数は WT マウスよりも有意に減少していた。特に、エフェクターメモリー T 細胞数は、顕著に減少していた。CD8+ T 細胞数の違いはわずかであった。所属リンパ節における、炎症性サイトカインの mRNA を測定したところ、Utx KO マウスでは Ifng、Csf2 の発現は有意に高かったが、Il17a、Il17f および IL22 の発現は有意に低かった。また、Il17a および IL17f mRNA の発現が低いことに一致して、Th17 細胞分化のマスター転写因子である Rorc の発現も有意に低下していた。Th1 細胞分化のマスター転写因子である Tbx21 と Th2 細胞分化のマスター転写因子である Gata3 の発現は WT マウスと Utx KO マウスの間で同等であった。皮膚向性ケモカイン受容体 Ccr4 は Th 細胞が所属リンパ節から皮膚へと移行するため必要であるが、in vitro で培養された Th 細胞上に発現する Ccr4 は Th2 細胞において増強し、Th17 細胞においては減弱していた。この結果は、Utx KO Th2 細胞は、皮膚に移行しやすい可能性を示唆している。炎症を抑制する Treg 細胞に着目すると、Utx KO マウスの所属リンパ節における Treg 細胞は分化頻度、絶対数ともに低下していた。さらに、抗炎症性サイトカインである Il10 や Treg 細胞のマスター転写因子である Foxp3 の mRNA 発現も有意に低下していた。また in vitro においても Utx KO Treg 細胞の Ccr4 の発現が有意に低下した。

【結語】

以上の結果から、“抗原特異的 CD4+ T 細胞における Ifng、Csf2、Il13 などの炎症性サイトカインの発現増強”、“Th2 細胞における Ccr4 発現の増強”、“Treg 細胞への分化能の低下”、“Treg 細胞における Ccr4 発現の低下”の 4 つの要因により、Utx KO マウスにおける ACD による炎症の増悪が誘導された可能性が示された。本研究では、T 細胞における Utx の欠損は ACD を重症化させることを見出し、その原因を明らかにするため、Utx KO Th 細胞に着目して解析を行なった。その結果、T 細胞において Utx は、Treg 細胞への分化を促進し炎症性サイトカインの発現を抑制すること、また、Th 細胞における皮膚向性ケモカイン Ccr4 の発現を制御することが示された。今後は、Jmjd3 KO マウスを用いて同様の研究を行い、Jmjd3 KO マウスが ACD の重症化を呈さなかった原因を Treg 細胞への分化や Ccr4 の発現に着目し検証する予定である。

キーワード（3～5）	H3K27脱メチル化酵素 アレルギー接触性皮膚炎 Utx 制御性T細胞 Ccr4
------------	--