

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08523

研究課題名(和文) Th9細胞の分化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms regulating Th9 cell differentiation

研究代表者

八木 良二 (YAGI, Ryoji)

千葉大学・大学院医学研究院・特任准教授

研究者番号：20392152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々が同定したTh9細胞の分化を調節する転写因子について、in vivoにおける役割を検証するため、in vivo Th9細胞分化誘導評価系の構築を行なった。OVA抗原とアジュバンドを用いてin vivoでTh9細胞の分化を誘導させ、その指標となるIL-9産生を細胞内染色法で検出することに成功した。さらにより詳細にIL-9細胞の分化誘導の違いを検出するため、in vivoで分化誘導したTh9細胞を、in vitroにおいて抗原提示細胞存在下で抗原刺激し、細胞培養液中のIL-9の濃度を測定することで、in vivoにおけるTh9細胞の分化誘導の程度を詳細に評価することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Naive CD4 T cells can differentiate into several T helper (Th) cell subsets, Th1, Th2, Th17, regulatory T cells and follicular T cells. Recently Th9 cells have been added into Th cell subsets. Th9 cells are known to induce proliferation of mast cells and secretion of mucus from goblet cells and also to be involved in allergic diseases. IL-4 and TGF $\beta$  are required for Th9 cell differentiation from naive CD4 T cells in vitro. However, the molecular mechanism of Th9 cell differentiation and the function of Th9 cells in vivo are not understood yet. To understand the mechanism, we focused on a responsible gene which we found previously, we generated the gene conditional KO mice. Furthermore we established an in vivo model to assess a role of the gene on Th9 cell differentiation.

研究分野：Immunology

キーワード：Th9 IL-9 cytokine CD4T cells transcription factor

1. 研究開始当初の背景

ヘルパーT(Th)細胞は、産生するサイトカインおよびその細胞の機能によって、いくつかのサブセットに分けることができる(William Paul et al. Science 327: 1098-102, 2010 改変)(図1)。Th細胞のサブセットの1つであるTh9細胞の分化誘導には、T細胞レセプター(TCR)を介した抗原認識に加え、IL-4とTGFβからのシグナルが必須である。これはTh2細胞分化の誘導条件にTGFβを加えたもので、Th9細胞とTh2細胞は分化誘導の制御メカニズムを共有していることが示唆される。Th9細胞の機能は、産生するIL-9によって特徴付けられ、マスト細胞の増殖や杯細胞からの粘液分泌を促すことで、細胞外感染微生物の排除に働く。また、近年Th9細胞が癌疾患にも関与することが報告され、Th9細胞が産生するIL-21がCD8T細胞およびNK細胞を活性化し、これらの細胞から産生されるIFNγが癌細胞の排除に関与している(Yong Lu et al. J Clin Invest. 122:4160-71, 2012, Sergio A Quezada et al. Nat. Immunol. 15:703-705, 2014)。一方で、過剰に誘導されたTh9細胞は、Th2細胞のようにアレルギー疾患の増悪に関与していることがいくつかのグループから報告されており(Mark Kaplan. Immunol Rev. 252:104-15, 2013)、Th9細胞の分化を人為的にコントロールできれば、「癌」や「アレルギー」の治療に応用できることが示唆される。

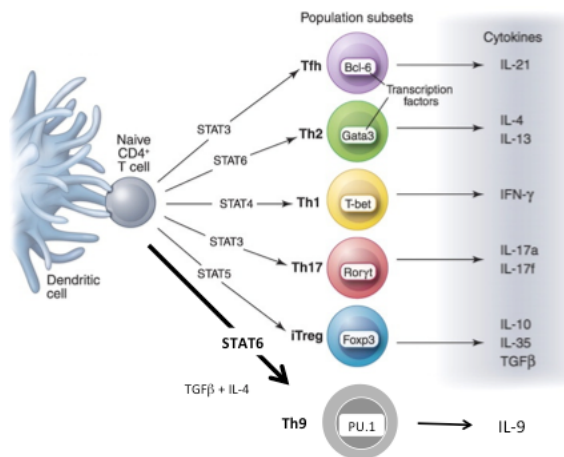


図1 ヘルパーT細胞分画とそのマスター転写因子

2. 研究の目的

日本人の約30%以上が何らかのアレルギー疾患を煩っており、癌は死因のトップである。この2つの疾患「アレルギー」と「癌」に深く関与することが報告されているTh9細胞に着目し、Th9細胞の分化制御メカニズムを明らかにすることを目的とする。これまで、Th9細胞のマスター遺伝子であると報告されている転写因子PU.1を欠損させたマウスから、ナイーブCD4T細胞を単離し、Th9細胞分化条件で培養したところ、そのIL-9産生細胞の割合は、野生型マウスと比較して、25%程度

IL-9産生細胞の割合が減少するものの、半分以下にまで減少することはなかった(図2)。つまり、PU.1以外にIL-9産生を制御するパスウェイ・メカニズムが存在することが示唆された。そこで、Th9細胞の分化を制御する新規転写因子を同定するために、Th2細胞とTh9細胞からmRNAを抽出し、マイクロアレイにより網羅的に遺伝子発現を比較した。その結果、発現量の異なる遺伝子群の中から転写因子GFI1を見出した。Gfi1mRNAの発現量をRT-PCRで解析したところ、Th2細胞で高く、Th9細胞で低いことが分かった(図3)。このことから、IL-4によるGFI1遺伝子の発現上昇をTGFβが抑制していること、そして、GFI1は転写抑制因子として知られていることから、GFI1の発現量がTh9細胞で低く抑制されることで、IL-9の転写が誘導されるのではないかと考えた。次に、この仮説を検証するため、Th9細胞の分化誘導条件下で、レトロウイルスベクターを用いてGFI1を野生型CD4T細胞に強制発現させたところ、IL-9産生を著しく抑制した。また、GFI1欠損CD4T細胞をTh9細胞の分化誘導条件下で培養したところ、野生型と比較して、IL-9産生細胞の割合を著しく増加させた。これらのデータからGFI1がTh9細胞の分化を制御していることがわかった。本申請研究において、これまでの研究結果を発展させ、生理学的なTh9細胞の分化制御におけるGFI1の役割の解明するため、*in vivo*におけるGFI1の役割を明らかにする。

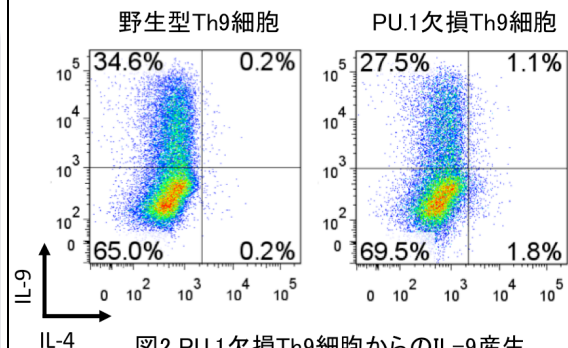


図2 PU.1欠損Th9細胞からのIL-9産生

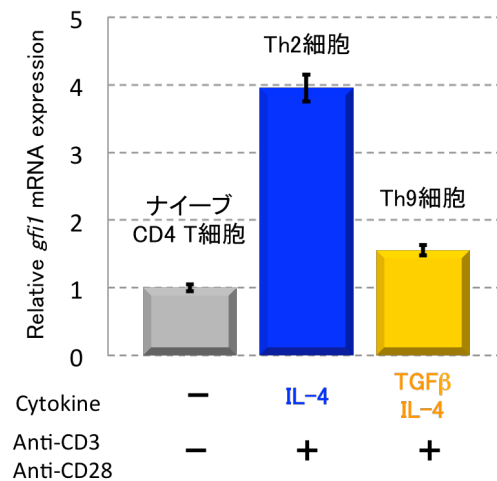


図3 GFI1 mRNA発現量の比較

### 3. 研究の方法

*In vivo* Th9 細胞を検出するマウス実験モデルの構築：これまで *in vivo* で Th9 細胞もしくは Th2 細胞を検出可能であることが報告されている *Nippostrongylus brasiliensis* 感染実験、*Schistosoma mansoni* 感染実験などを試したが IL-9 産生 CD4T 細胞を検出できたものの、IL-9 産生について、遺伝子改変マウスと野生型マウスとを比較して評価するためには、さらに良いモデルを探す必要があった。そこで、アスペルギウス惹起による気道炎症モデル (Jerome Kerzerho et al. J Allergy Clin Immunol. 131: 1048 - 1057, 2013) に注目した。なぜなら、このモデルでは、細胞内染色で IL-9 を検出できること、また、感作後 4 週目頃から IL-9 と同時に TGFβ も上昇しており、TGFβ が Th9 細胞分化を誘導する因子であることと論理的に一致し、信頼性が高いこと、そしてこの論文の last author である Dr. Akbari Omid といつでも相談できることなどの長所が挙げられるからである。図 4 にその方法を示す。抗原を投与されたマウスが十分に惹起・感作されているか確認するため、IL-9 だけでなく TGFβ も測定した。バックアップとして、ova 惹起の気道炎症モデルも検討した(図 5)。これらは私が以前所属していた米国 NIH の William Paul 博士の研究室で使われていたモデルを改変したものである。ova 特異的な TCR を持つ OTII Tg マウスから単離したナイーブ CD4T 細胞をレシピエントマウスである CD45.1 コンジュニックマウスに移入し、ova を適当なアジュバンド (Alum, Papain または LPS など) と一緒にマウスに投与した後、ova を定期的に経鼻投与した。アジュバンドの種類・濃度、また ova の投与回数・濃度などの条件を検討し、*in vivo* における Th9 細胞の分化誘導条件を探索した。また、*in vitro* で CD4T 細胞からの IL-9 産生量は、刺激後 Day3 がピークに達することから (Cuiyan Tan et al. J Immunol. 185:6795-801 2010)、Th9 細胞が早期に分化誘導される可能性も考慮し、図 6 に ova 惹起の急性炎症モデルを加えた。これら 3 種類の実験モデルで、感作後に肺組織・顎下リンパ節・気管支肺リンパ節から単離した CD4T 細胞を *in vitro* で抗原刺激し、CD4 と細胞内の IL-9 を多重染色することで、Th9 細胞を同定した。

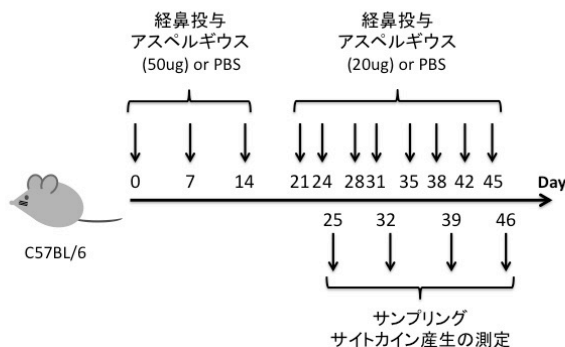


図4 アスペルギウス惹起による気道炎症モデル

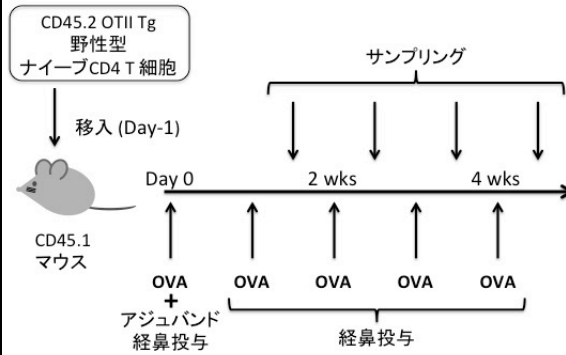


図5 ova惹起の気道炎症モデル

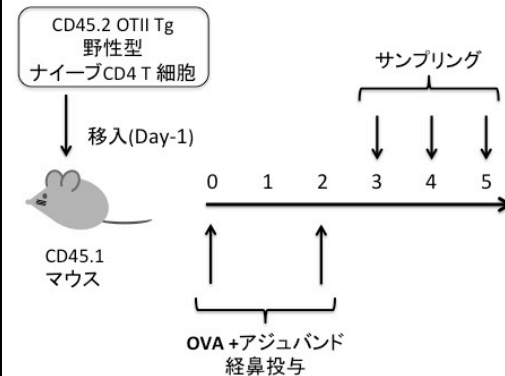


図6 ova惹起の急性炎症モデル

### 4. 研究成果

アスペルギウス惹起による気道炎症モデル、ova 惹起の気道炎症モデル、ova 惹起の急性炎症モデルのすべてにおいて、*in vivo* で IL-9 産生 CD4T 細胞を分化誘導することに成功した。これらの中で最短で評価することができる ova 惹起の急性炎症モデルに着目し、さらに IL-9 産生細胞を検出しやすいように改良を重ね、免疫後に単離した脾臓、およびリンパ節の細胞を *in vitro* において ova ペプチドで刺激し、抗原特異的な IL-9 産生を ELISA により検出したり、同じ細胞を細胞内染色することで、細胞あたりの IL-9 産生量を測定したりすることができた。GFI1 欠損マウスでは、これまで蓄積させた *in vitro* の結果と一致して、*in vivo* で Th9 細胞に分化誘導させたときも、IL-9 産生細胞数、および細胞あたりの IL-9 産生量が亢進していた。アジュバントの種類によって、IL-9 産生細胞数の増減が確認され、本申請研究は、新たなプロジェクトの創生にも寄与している。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. “Bcl11b, a novel GATA3-interacting protein, suppresses Th1 while limiting Th2 cell differentiation”

Fang Difeng, Cui Kairong, Hu Gangqing, Gurram Rama Krishna, Zhong Chao, Oler Andrew J., Ryoji Yagi, Zhao Ming, Sharma

Suveena, Liu Pentao, Sun Bing, Zhao Keji, Zhu Jinfang  
*J Exp Med*, Vol.215, pp.1449-1462, (2018)  
(査読有)  
DOI: 10.1084/jem.20171127

2. “Histone demethylases UTX and JMJD3 are required for NKT cell development in mice”, Daniel Northrup\*, **Ryoji Yagi**\*, Kairong Cui, William R. Proctor, Chaochen Wang, Katarzyna Placek, Lance R. Pohl, Rongfu Wang, Kai Ge, Jinfang Zhu, and Keji Zhao, *Cell Biosci*, Vol. 7 (2017), (査読有)  
DOI: 10.1186/s13578-017-0152-8
3. “IL-7R $\alpha$  Expression Regulates Murine Dendritic Cell Sensitivity to Thymic Stromal Lymphopoietin”, Laura Kummola, Zsuzsanna Ortutay, Xi Chen, Stephane Caucheteux, Sanna Hämäläinen, Saara Aittomäki, **Ryoji Yagi**, Jinfang Zhu, Marko Pesu, William E. Paul, Ilkka S. Junttila, *J Immunol*, Vol. 198, pp.3909-3918, (2017) (査読有)  
DOI: 10.4049/jimmunol.1600753
4. Th2 細胞における転写因子 GATA3 の役割、**八木良二**、臨床免疫・アレルギー科、Vol.64、pp.103-106、2015 (査読無)

[学会発表] (計 7 件)

1. **Yagi, R.**, Zhu, J., and Nakayama, T. Role of Th2-associated transcription factors in Th9 cell differentiation. 7th International Workshop of Kyoto T Cell Conference (国際学会), 2017 年 3 月 16 日, 京都大学医学部・芝蘭会館 (京都府京都市)
2. Sarkar, H. M., **Yagi, R.**, Nakajima, T., Nakayama, T., and Zhu, J. Role of a novel immune signaling molecule in Th2-type response. 第 45 回日本免疫学会総会・学術集会, 2016 年 12 月 7 日, 沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市)
3. **八木良二**, リンパ組織形成のメカニズム, 千葉大学リンパ浮腫研究シンポジウム 2016. 2016 年 3 月 5 日, 千葉大学医学部附属病院大講堂 (ガーネットホール) (千葉県千葉市)
4. Sarkar, H. M., **Yagi, R.**, Nakajima, T., Kimura, M., Nakayama, T., and Zhu, J. Roles of IL-2 on Th9 cell Differentiation. 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会,

2015 年 11 月 18 日～2015 年 11 月 20 日,  
札幌コンベンションセンター  
(北海道札幌市)

5. **八木良二**, Th9 細胞の役割と分化メカニズム, 第 158 回日本獣医学会学術集会 微生物学分科会 (免疫) シンポジウム (招待講演), 2015 年 9 月 7 日～2015 年 9 月 9 日, 北里大学獣医学部 (青森県十和田市)
6. **Ryoji Yagi**, Role of the transcription factor GATA3 in helper T cell and innate lymphoid cell development, Immunology 2015 AAI Annual Meeting (招待講演) (国際学会), 2015 年 5 月 8 日～2015 年 5 月 12 日, New Orleans (U.S.A)
7. Motoko Y. Kimura, Miho Shinzawa, Ruth Etzensperger, **Ryoji Yagi**, Koji Hayashizaki, Akemi Igi, Toshinori Nakayama and Alfred Singer, Molecular basis for acquisition of Helper function during thymocyte development, Venice Thymus Meeting 2015 (国際学会), 2015 年 4 月 9 日～2015 年 4 月 13 日, Venice (Italy)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等  
千葉大学大学院 医学研究院 免疫発生学  
<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/meneki/>

6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
**八木 良二** (YAGI, Ryoji)  
千葉大学・大学院医学研究院・特任准教授  
研究者番号: 20392152
- (2) 研究分担者
- (3) 連携研究者
- (4) 研究協力者  
Murshed Sarkar  
千葉大学・医学薬学府・先端医学薬学専攻  
博士課程教育リーディングプログラム  
「免疫システム調節治療学推進リーダー養成プログラム」