

令和元年5月31日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08747

研究課題名(和文) 転写調節因子I $\kappa$ Bとその結合因子による免疫応答の制御機構研究課題名(英文) Regulation of Immune Responses by the transcription regulator I $\kappa$ B and its binding protein

研究代表者

山崎 創 (YAMAZAKI, Soh)

東邦大学・医学部・准教授

研究者番号：70315084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：免疫の司令塔と呼ばれるヘルパーT細胞の一種であるTh17細胞は、多発性硬化症をはじめとする自己免疫疾患の発症に関与することから近年注目を集めているが、その分化誘導機構については不明な点が多かった。転写因子JunBは、これまでに皮膚のバリア維持機構や骨髄系細胞の機能調節に重要であることは知られていたが、免疫細胞における役割は不明だった。JunBを欠損するナイーブCD4陽性細胞がTh17細胞の分化不全を示すことを明らかにし、さらに、JunB欠損マウスがヒトの多発性硬化症の動物モデルである自己免疫性の脳脊髄炎を全く発症しなくなることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性硬化症をはじめ、リウマチ関節炎や乾癬などの自己免疫疾患は治療戦略はもとより、病態の発症メカニズムについても詳細が不明だった。今回の発見に基づき、JunBのはたらきを阻害するというアプローチにより自己免疫疾患を抑えるという新しい治療法の可能性が開けた。

研究成果の概要(英文)：Although IL-17-producing T helper (Th17) cells are associated with autoimmune diseases such as multiple sclerosis, development of the cells has not been fully understood. While the transcription factor JunB is known to be involved in barrier function of skin and regulation of myeloid cells, its role in immune cells was not known. We elucidated that Junb-deficient naive CD4+ T cells were incapable of differentiating into Th17 cells, and that mice deficient in JunB are totally resistant to EAE, an animal model for human multiple sclerosis.

研究分野：免疫学 生化学

キーワード：I $\kappa$ B JunB Th17 自己免疫疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は以前、NF- $\kappa$ B の結合因子である I $\kappa$ B $\zeta$ を同定し、この分子が、自然免疫応答に重要な炎症性サイトカインや抗菌タンパク質の発現調節に重要な役割を果たすことを示してきた (Yamazaki et al. J.Biol.Chem. 276, 27657-27662 (2001), Yamamoto et al. Nature 430, 218-222 (2004), Yamazaki et al. J.Biol.Chem. 280, 1678-1687 (2005), Motoyama et al. J.Biol.Chem. 280, 7444-7451 (2005), Yamazaki et al. J.Biol.Chem. 283, 32404-32411 (2008), Yamazaki et al. J.Biochem. 157, 399-410 (2015)など)。I $\kappa$ B $\zeta$ の機能解析をさらに進める目的で、質量分析法よりの結合因子を探索し、AP-1 転写因子 JunB を同定した。JunB については、胎盤形成や骨形成、皮膚の恒常性維持に重要であることがそれまでに知られていたが、免疫細胞における役割は不明であった。そこで、JunB の欠損マウスを作成して、まず自然免疫応答における JunB の役割を検討したが、軽微な表現型しか観察されなかった。一方、I $\kappa$ B $\zeta$ については、他の研究グループから、自然免疫応答だけでなく、獲得免疫で重要な役割を担うヘルパーT 細胞の分化に関与することが報告された。

2. 研究の目的

本研究では、ヘルパーT 細胞を中心に、獲得免疫応答における JunB の役割を解明し、そこでの I $\kappa$ B $\zeta$ と JunB の機能的な相関を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

全身性あるいは CD4<sup>+</sup>細胞特異的に JunB を欠損するマウスを作成し、これら由来のナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞を用いて in vitro で各種ヘルパーT 細胞サブセットへの分化誘導をおこない、コントロールマウス由来の細胞と比較する。特に JunB が転写因子であることに着目し、JunB の欠損により影響を受ける標的遺伝子の網羅的解析を通じて、JunB が関与する免疫応答を理解する。また、T 細胞依存的な病態モデルを誘導し、病態形成における JunB の役割を明らかにする。

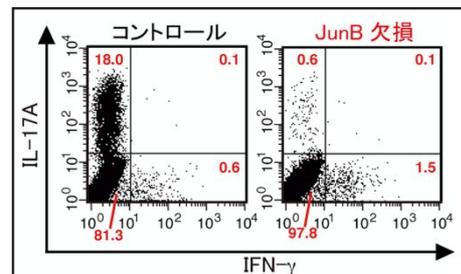


図1) コントロールマウス (*JunB*<sup>+/+</sup>マウス) および JunB 欠損マウス (*JunB*<sup>-/-</sup>; *Meox2*<sup>Cre</sup>マウス) 由来のナイーブ CD4<sup>+</sup>陽性T細胞をTh17細胞への分化条件下 (IL-6 + TGF- $\beta$ 1) で3日間培養した後、分泌阻害剤の存在下にPMAとionomycinで4時間刺激し、フローサイトメトリー解析によりIL-17AとIFN- $\gamma$ の産生を検討した。JunB欠損マウス由来のナイーブCD4<sup>+</sup>陽性細胞はTh17細胞への分化能を失っていた。

4. 研究成果

JunB 欠損マウス由来のナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞を用いて in vitro で各種ヘルパーT 細胞サブセットへの分化誘導実験を実施したところ、Th17 細胞 (IL-17A 産生性 CD4<sup>+</sup> T 細胞)への分化が障害されていた (図1)。また、RNA-seq 解析による網羅的な遺伝子発現解析では、IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-23 受容体, ROR $\gamma$ t, ROR $\alpha$ をコードする遺伝子などの Th17 細胞に特異的な遺伝子の発現が顕著に低下していた。一方、JunB を欠損させても、ナイーブT細胞やT細胞受容体を活性化して生存を維持しただけのサブセット(Th0 細胞)における遺伝子発現には影響がなかった。また、JunB 欠損 CD4<sup>+</sup> T 細胞は Th1 や Th2 などの他のヘルパーT 細胞サブセットには正常に分化した (図2)。

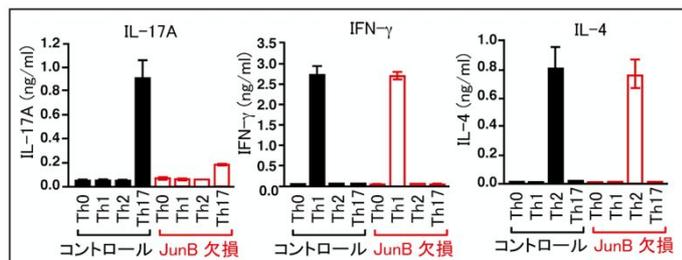


図2) コントロールおよびJunB欠損マウス由来のナイーブCD4<sup>+</sup>陽性T細胞を各分化条件下で3日間培養し、よく洗った後にPMAとionomycinで24時間刺激し、培養上清中に放出された各ヘルパーTサブセットのマーカースイトカイン (IL-17A, IFN- $\gamma$ , IL-4)の濃度をELISA法により評価した。JunBの欠損によりTh17細胞分化は障害されるが、Th1細胞とTh2細胞への分化はほとんど影響を受けなかった。

次に、Th17 細胞が主要な責任細胞としてはたらく実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)モデルを誘導したところ、JunB 欠損マウスでは一例も発症が認められなかったことから、Th17 細胞分化における JunB の重要性が in vivo でも明らかになった (図3)。JunB は、c-Jun, JunD とともに Jun ファミリーを形成しており、生理機能によっては役割が redundant であることが知られている。そこで、JunB をコードする遺伝子を単独で欠損させるだけで Th17 細胞分化がほぼ完全に障害される理由を探ったところ、JunB の発現が c-Jun や JunD と比べて高いことと、Th17 関連遺伝子の転写活性化能が高いことが明らかになった。

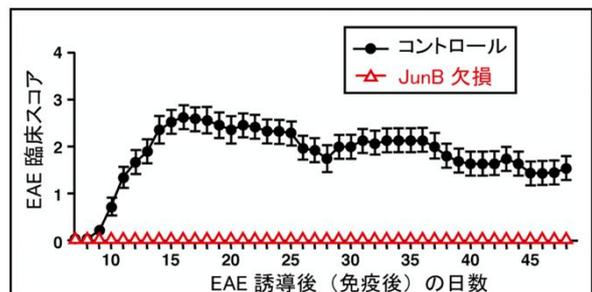


図3) コントロールおよびJunB欠損マウスに、髄鞘構成タンパク質 myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)の部分配列ペプチド (MOG<sub>35-55</sub>ペプチド)を免疫してEAEを誘導した。JunB欠損マウスでは一例も発症が認められなかった。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

1. Necroptosis of intestinal epithelial cells induces type 3 lymphoid cell-dependent lethal ileitis  
Shindo R., Ohmuraya M., Komazawa-Sakon S., Miyake S., Deguchi Y., Yamazaki S., Nishina T., Yoshimoto T., Kakuta S., Koike M., Uchiyama Y., Konishi H., Kiyama H., Mikami T., Moriwaki K., Araki S., and Nakano H.  
*iScience* in press [DOI: 10.1016/j.isci.2019.05.011] 査読有り
2. Development of novel methods that monitor necroptosis and the release of DAMPs at the single cell resolution  
Nakano H., Murai S., Yamaguchi Y., Shirasaki Y., Nakabayashi O., and Yamazaki S.  
*Cell Stress* 3, 66-69 (2019)  
[DOI: 10.15698/cst2019.02.177] 査読有り
3. A murine model of acute lung injury identifies growth factors to promote tissue repair and their biomarkers  
Kurosawa T., Miyoshi S., Yamazaki S., Nishina T., Mikami T., Oikawa A., Homma S., and Nakano H.  
*Genes Cells* 24, 112-125 (2019)  
[doi: 10.1111/gtc.12659] 査読有り
4. The AP-1 transcription factor JunB is required for Th17 cell differentiation  
Yamazaki S., Tanaka Y., Araki H., Kohda A., Sanematsu F., Arasaki T., Duan X., Miura F., Katagiri T., Shindo R., Nakano H., Ito T., Fukui Y., and Sumimoto H.  
*Sci. Rep.* 7, 17402 (2017)  
[doi: 10.1038/s41598-017-17597-3] 査読有り
5. Critical contribution of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) to electrophile-induced interleukin-11 production  
Nishina T., Deguchi Y., Miura R., Yamazaki S., Shinkai Y., Kojima Y., Okumura K., Kumagai Y., and Nakano H.  
*J. Biol. Chem.* 292, 205-216 (2017)  
[doi: 10.1074/jbc.M116.744755] 査読有り
6. Depletion of myeloid cells exacerbates hepatitis and induces an aberrant increase in histone H3 in mouse serum  
Piao X., Yamazaki S., Komazawa-Sakon S., Miyake S., Nakabayashi O., Kurosawa T., Mikami T., Tanaka M., Van Rooijen N., Ohmuraya M., Oikawa A., Kojima Y., Kakuta S., Uchiyama Y., Tanaka M., and Nakano H.  
*Hepatology* 65, 237-252 (2017)  
[doi: 10.1002/hep.28878] 査読有り
7. Short form FLICE-inhibitory protein promotes TNF $\alpha$ -induced necroptosis in fibroblasts derived from *CFLARs* transgenic mice.  
Shindo R., Yamazaki S., Ohmuraya M., Araki K., and Nakano H.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 480, 23-28 (2016)  
[doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.015] 査読有り
8. The nuclear protein I $\kappa$ B $\zeta$  forms a transcriptionally active complex with nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p50 and *Lcn2* promoter via the N- and C-terminal ankyrin repeat motifs.  
Kohda A., Yamazaki S., and Sumimoto H.  
*J. Biol. Chem.* 291, 20739-20752 (2016)  
[doi: 10.1074/jbc.M116.719302] 査読有り

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 「AP-1 転写因子 JunB によるエフェクターCD4<sup>+</sup>T 細胞の分化・機能調節」山崎 創 2019 年 2 月 2 日(土)第 16 回 Osteoimmunology Forum (ファイザー株式会社)(丸ビルホール 6 コンファレンススクエア (東京都千代田区丸の内 2-4-1 丸ビル 8 階))
2. 「A crucial role of JunB in attenuating epithelial damage-induced colitis through induction of regulatory T cells」Soh Yamazaki, Takaharu Katagiri, Hideki Sumimoto, Hiroyasu Nakano 2018 年 12 月 10 日(月)~12 日(水) 第 47 回日本免疫学会学術集会(福岡国際会議場)
3. 「腸管上皮バリアにおける転写因子 JunB の役割」片桐 翔治, 山崎 創, 三上 哲夫, 遠藤 昌吾, 住本 英樹, 亀田 秀人, 中野 裕康 2018 年 9 月 24 日(月)~26 日(水) 第 91 回日本生化学会大会(国立京都国際会館)
4. 「転写因子 JunB によるエフェクターCD4<sup>+</sup>T 細胞の調節」山崎 創 2018 年 5 月 28 日(月) Expert Seminar of Immunology(ブリストルマイヤーズスクイブ・小野薬品工業)(セルリアンタワー東急ホテル 39 階)
5. 「RIPK3-dependent necroptosis of intestinal epithelial cells results in ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> innate lymphoid cells-dependent lethal ileitis」Ryodai Shindo, Masaki Ohmuraya, Sachiko Komazawa-Sakon, Sanae Miyake, Soh Yamazaki, Takashi Nishina, Manolis Pasparakis, Kimi Araki, Hiroyasu Nakano 2018 年 5 月 22 日(火)~23 日(水) Australia-Japan Meeting on Cell Death (東京大学 弥生講堂一条ホール)
6. 「The AP-1 transcription factor JunB is essential for development of Th17 cells」Soh Yamazaki, Yoshihiko Tanaka, Yoshinori Fukui, Hideki Sumimoto 2017 年 12 月 12 日(火)~14 日(木) 第 46 回日本免疫学会学術集会(仙台国際センター)
7. 「ROR $\gamma$ t-positive cells mediate RIPK3- and MLKL-dependent lethal ileitis in neonatal mice」Ryodai Shindo, Soh Yamazaki, Hiroyasu Nakano 2017 年 12 月 12 日(火)~14 日(木) 第 46 回日本免疫学会学術集会(仙台国際センター)
8. 「肝特異的 cFLIP 低発現マウスを用いた肝障害モデルの解析」山崎 創, 朴 雪花, 駒澤-左近 幸子, 三宅 早苗, 中林 修, 田中 稔, 大村谷 昌樹, 及川 彰, 角田 宗一郎, 内山 安男, 田中 正人, 中野 裕康 2017 年 7 月 24 日(月)~25 日(火) 第 26 回日本 Cell Death 学会学術集会(東京都大田区産業プラザ PiO)
9. 「ROR $\gamma$ t 陽性細胞は RIPK3 および MLKL 依存性に小腸炎を誘導する」進藤 綾大, 大村谷 昌樹, 駒澤 幸子, 三宅 早苗, 山崎 創, 仁科 隆史, 小西 博之, 木山 博資, 三上 哲夫, 荒木 喜美, 中野 裕康 2017 年 7 月 24 日(月)~25 日(火) 第 26 回日本 Cell Death 学会学術集会(東京都大田区産業プラザ PiO)
10. 「II 型肺胞上皮細胞の障害と再生に関する解析」三好 嗣臣, 黒澤 武介, 仁科 隆史, 山崎 創, 本間 栄, 中野 裕康 2017 年 7 月 24 日(月)~25 日(火) 第 26 回日本 Cell Death 学会学術集会(東京都大田区産業プラザ PiO)
11. 「アポトーシス細胞は腸内細菌非依存的に Reg3 $\beta$  を産生し腸管の恒常性を維持する」進藤 綾大, 大村谷 昌樹, 駒澤 幸子, 三宅 早苗, 山崎 創, 仁科 隆史, 小西 博之, 木山 博資, 三上 哲夫, 荒木 喜美, 中野 裕康 2016 年 9 月 25 日~27 日 第 89 回日本生化学会大会(仙台国際センター / 東北大学川内北キャンパス)
12. 「細胞死制御因子 cFLIP の肝細胞特異的欠損マウスを用いた肝障害モデルにおけるクッパー細胞および骨髄由来細胞の役割」朴 雪花, 山崎 創, 駒澤-左近 幸子, 三宅 早苗, 中林 修, 田中 稔, 大村谷 昌樹, 及川 彰, 角田 宗一郎, 内山 安男, 田中 正人, 中野 裕康 2016 年 9

月 25 日～27 日 第 89 回日本生化学会大会(仙台国際センター / 東北大学川内北キャンパス)

13. 「転写因子 NF- $\kappa$ B とそのパートナータンパク質 I $\kappa$ B $\zeta$ による転写活性化複合体の形成機構」神田朗, 山崎 創, 住本 英樹 2016 年 7 月 7 日～9 日 第 27 回日本生体防御学会学術総会(九州大学病院キャンパス内コロボステーション 視聴覚ホール)

〔図書〕(計 2 件)

1. AP-1 転写因子 JunB による Th17 細胞分化の制御  
山崎 創  
臨床免疫・アレルギー科 70 (3), 275-282 (2018)
2. 肝炎の制御における骨髄由来細胞の役割  
山崎 創, 朴 雪花, 中野 裕康  
臨床免疫・アレルギー科 68 (5), 455-462 (2017)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://tohobiochemi.jp/index.html>

[https://www.toho-u.ac.jp/press/2017\\_index/20171228-851.html](https://www.toho-u.ac.jp/press/2017_index/20171228-851.html)

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者：なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者：

研究協力者氏名：片桐 翔治

ローマ字氏名：KATAGIRI, Takaharu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。