

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：38005

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19164

研究課題名(和文) Th17細胞分化における新たなエピジェネティック制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of epigenetic regulatory mechanisms of Th17 differentiation

研究代表者

石川 裕規 (Ishikawa, Hiroki)

沖縄科学技術大学院大学・免疫シグナルユニット・准教授

研究者番号：30648621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Th17細胞の機能的多様性を生み出す分子メカニズムを理解するために、本研究では、エピジェネティック制御因子ZFP57およびAP1転写因子JunBの機能を調べた。ZFP57は、生体内で誘導されるTh17細胞に特異的に発現していた。しかしながら、T細胞特異的ZFP57欠損マウスはEAEの誘導に異常は認められなかった。一方、T細胞特異的JunB欠損マウスは、EAEに完全に耐性であり、病原性Th17細胞の産生も著しく損なわれていた。しかしながら、JunB欠損は腸にある非病原性Th17細胞の蓄積には影響を与えなかった。これらの結果は、JunBが病原性Th17細胞の産生に必須であることを示している。

研究成果の概要(英文)：IL-17-producing Th17 cells comprise heterogeneous subsets exhibiting distinct pathogenicity. Although pathogenic and non-pathogenic Th17 subsets share a common Th17 transcriptional program composed of BATF, IRF4, STAT3, and ROR γ t, transcriptional regulatory mechanisms specific to each of these distinct Th17 subsets remain largely unknown. Here we show that an AP-1 transcription factor, JunB, is essential for induction of ROR γ t by facilitating DNA-binding of BATF, IRF4 and STAT3 at the Rorc locus in IL-23-dependent pathogenic Th17 cells, but not in TGF- β 1-dependent non-pathogenic Th17 cells. Indeed, JUNB deficient T cells lose their ability to induce Th17-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and colitis, but gut-resident Th17 cells are probably generated in a JUNB-independent manner. The selective requirement of JUNB for pathogenic Th17 differentiation suggests that the JUNB-dependent pathway may be a specific therapeutic target for autoimmune diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：Th17細胞 分化 病原性

1. 研究開始当初の背景

IL-17 サイトカインの発現を特徴とする Th17 細胞は自己免疫疾患の発症に深く関与する。*In vitro* において、抗原刺激により活性化させたナイーブ CD4 陽性 T 細胞を、IL-6、TGF-β および IL-23 サイトカイン存在下において培養することにより、IL-17 を発現する Th17 細胞を誘導できる。これまでの研究の多くは、この *in vitro* 誘導 Th17 細胞を解析することで、Th17 細胞分化を制御するいくつかの重要な因子を同定してきた。しかしながら、*in vitro* Th17 細胞分化誘導系は、生体内でおこる Th17 細胞分化を再現できているわけではない。例えば、生体内で産生される Th17 細胞は、*in vitro* Th17 細胞と異なり、細胞表面抗原、サイトカイン発現および病原性の有無で区別される不均一な細胞集団からなる。さらには、生体内では一旦 Th17 細胞になった後に、IL-17 の発現を停止し他の T ヘルパーサブセットへ運命転換する細胞も認められている²。

これまでの Th17 細胞の研究において、ROR γ t に代表されるいくつかの転写因子が同定されたことにより、Th17 細胞の分化における IL-17 の発現誘導を制御する分子機構が明らかになってきている。しかしながら、上述の生体内で見られる Th17 細胞群の多様性および運命可塑性を説明する分子機構は未だよく分かっていない

2. 研究の目的

Th17 細胞群の多様性および運命可塑性に関わる転写およびエピジェネティック制御メカニズムを明らかにすることを目的とし、エピジェネティック制御因子 ZFP57 および転写因子 JunB の Th17 細胞における機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) T 細胞特異的 *Zfp57* および *Junb* 欠損マウスの作製

ZFP57 および JunB はマウスの発生に必要

であることが報告されているため、これらの遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスを作製した。それぞれの遺伝子のターゲティングベクターは KOMP より購入した。これらのベクターを導入した ES 細胞を用いてキメラマウスを作製したのち、FloX 遺伝子座を持つ *Zfp57*^{fl/fl} および *Junb*^{fl/fl} を得た。これらのマウスを、CD4^{cre} マウスと交配し、T 細胞特異的 ZFP57 および JunB ノックアウトマウス (*Cd4*^{cre} *Zfp57*^{fl/fl} および *Cd4*^{cre} *Junb*^{fl/fl}) を作製した。

(2) ZFP57 および JunB の Th17 細胞分化における機能の解析

JunB の生体内 Th17 細胞分化における機能を理解するために、*Cd4*^{cre} *Zfp57*^{fl/fl} および *Cd4*^{cre} *Junb*^{fl/fl} に、Th17 細胞に依存する実験的自己免疫性脳髄炎を誘導した。また、*In vitro* における Th17 分化における ZFP57 および JunB の役割を明らかにするために、これらの遺伝子を欠損した T 細胞を Th17 細胞誘導サイトカイン存在下で培養し、マイクロアレイ解析を行った。さらに、これらの分子が結合する DNA 領域を同定するためそれぞれに対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降-シーケンス解析を行った。

4. 研究成果

まず *in vitro* および実験的自己免疫性脳髄炎 (EAE) を発症したマウスより単離した Th17 細胞のマイクロアレイ解析を行った。その結果、ES 細胞特異的のエピジェネティック制御因子 ZFP57 が生体内で産生される Th17 細胞において高く発現していることを見出した。一方、*in vitro* で誘導した各種ヘルパー T 細胞および *in vivo* で誘導した Th1 細胞などでは ZFP57 の発現は、検出されなかった。ZFP57 の Th17 細胞における機能を明らかにするために、T 細胞特異的 ZFP57 欠損マウス (*Cd4*^{cre} *Zfp57*^{fl/fl}) を作製した。このマウスにおける T 細胞の発生および腸局在 Th17 細胞の分化は

正常に認められた。さらに、野生型マウスと同様の EAE に対する感受性を示した。EAE マウスにおける T 細胞の挙動を調べたところ、ZFP57 欠損マウスのリンパ節および脳脊髄における Th17 細胞の蓄積は野生型マウスと比べて同程度であった。今後は、Th17 細胞における ZFP57 の機能を明らかにするために、他の自己免疫疾患モデルを用いて解析を行う予定である。

Th17 細胞の病原性を制御する分子機構を理解するために、病原性 Th17 細胞の分化に必須なサイトカインである IL-23 の機能に関わる転写因子の探索を行った。具体的には、IL-23 によって発現が誘導される遺伝子をレポーターとして、転写因子の RNAi スクリーニングを行った。その結果、AP1 転写因子 JunB の発現抑制によって、IL-23 による遺伝子発現誘導が著しく損なわれることが見出された。

JunB の生理的機能を明らかにするために、T 細胞特異的 JunB 欠損マウス ($Cd4^{cre} Junb^{fl/fl}$) を作製した。 $Cd4^{cre} Junb^{fl/fl}$ マウスにおいて、T 細胞の発生は正常であった。さらに、定常状態の腸に局在する Th17 細胞も野生型と同様に認められた。しかしながら、 $Cd4^{cre} Junb^{fl/fl}$ マウスは EAE に完全に耐性であり、脳脊髄への Th17 細胞の浸潤は全く認められなかった。

In vitro において、IL-6、IL-1 β 、IL-23 存在下で活性化された T 細胞は病原性の高い Th17 細胞 (Th17(23)細胞) に分化する。一方、TGF- β と IL-6 存在下では、病原性の低い Th17 細胞 (Th17(β)細胞) が誘導される。*In vivo* の結果に矛盾せず、JunB 欠損によって、病原性の高い Th17(23)細胞の分化誘導は著しく損なわれたが、病原性の低い Th17(β)細胞の分化はあまり影響を受けなかった。

JunB の Th17 細胞分化における機能を理解するために、JunB 欠損細胞を用いたマイクロアレイ解析および ChIP-seq 解析を行った。その結果、Th17(23)細胞誘導条件においては、

JunB が BATF および IRF4 の DNA 結合を制御し、Th17 細胞の分化に必須な転写因子 ROR γ t の発現を促進することが明らかになった。一方、Th17(β)細胞分化誘導条件では、JunB 非依存的に BATF と IRF4 は ROR γ t の発現を誘導することが示唆された。さらに、ヒストンのメチル化についても調べたところ、JunB は Th17(23)細胞分化条件特異的に、特定のヒストン修飾に関与することが示唆された。以上の結果は、JunB が Th17 細胞のなかでも病原性の高い細胞の産生に重要であることを示唆している。

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2件)

1. Hasan, Z., Koizumi, S., Sasaki, D., Yamada, H., Arakaki, N., Fujihara, Y., Okitsu, S., Shirahata, S., and Ishikawa, H., JunB is essential for IL-23-dependent pathogenicity of Th17 cells., *Nat. commun.* 15628, 2017.
2. 石川裕規, AP1 転写因子 JunB による Th17 細胞の病原性の制御. 生化学 (日本生化学会) Vol. 90, 230-233.

[学会発表](計5件)

1. 石川裕規, JUNB is required for generation of pathogenic Th17 cells. 第2回 JST-SICORP 国際ワークショップ・第6回オルソオルガノジェネシス検討会、2016年12月7-9日、沖縄科学技術大学院大学シーサイドハウス
2. 石川裕規、JunB facilitates IL-23-dependent pathogenic Th17 differentiation. 第45回日本免疫学会総会・学術集会、2016年12月5-7日、沖縄コンベンションセンター
3. 石川裕規、JunB による Th17 細胞病原性制御、第2回デザイン生命工学研究会、2017年3月21日、神戸大学統合研究拠点コンベンションホール
4. H. Ishikawa, JunB-dependent generation of pathogenic Th17 cells. 24th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, 2017 Oct. 17-18. Biwako Hotel, Otsu.
5. 小泉真一、石川裕規、転写因子による制御性 Th17 細胞の機能制御、第3回デザイ

ン生命工学研究会、2018年3月9-10日、
今帰仁村コミュニティセンターホール

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川裕規 (Hiroki Ishikawa)

沖縄科学技術大学院大学・准教授

研究者番号：30648621