

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08409

研究課題名(和文) Bach2-IL-7経路によるTpath2分化とアレルギー性気道炎症制御の解明

研究課題名(英文) Bach2 regulates antigen-independent Th2 responses and chronic type2 airway inflammation.

研究代表者

桑原 誠 (Kawahara, Makoto)

愛媛大学・医学系研究科・講師

研究者番号：00568214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：IL-33受容体陽性(IL-33R+) Th2細胞はIL-7/IL-33依存性に誘導・活性化され、抗原非依存的(IL-7/IL-33 依存的)なTh2サイトカインや炎症因子の産生を介して、2型気道炎症の慢性化を引き起こす。私たちは、転写抑制因子Bach2の発現低下がIL-33R+ Th2細胞の増加につながることを、T細胞特異的Bach2欠損マウス肺の解析から見出した。Bach2はIL-7受容体の発現調節を介して、IL-33R+Th2細胞の誘導を制御していることが明らかになった。これらの結果から、Bach2の発現変動が抗原非依存的なTh2免疫応答と気道炎症の慢性化を制御していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Bach2はT細胞のアイデンティティを維持するガードアン転写因子であるという考えが提唱されている。抗原特異性はT細胞アイデンティティの一つである。今回、Bach2の発現低下や欠損がTh2細胞の抗原非依存的免疫応答の亢進や、気道炎症の慢性化につながる可能性が明らかになってきた。T細胞におけるBach2の適切な発現は、肺恒常性の維持に必要であり、その異常はT細胞アイデンティティの破綻を引き起こし、呼吸器疾患の発症につながることを予想される。今後、肺T細胞におけるBach2の詳細な役割解析が、喘息や難治性肺疾患の新規治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：IL-7 and IL-33-dependent (antigen-independent) production of IL-5 and IL-13 from the IL-33 receptor Th2 (IL-33R+ Th2) cells play an important role in the pathogenesis of chronic type 2 airway inflammation. We previously reported that T cell-specific Bach2-deficient mice had a lot of IL-33R+ CD4 T cells in the lung, and spontaneously developed type 2 lung inflammation. Here, we investigate the role of Bach2 in antigen-independent Th2 responses. We found that the expression of IL-33R in Th2 cells was induced in an IL-7-dependent manner, and Bach2 inhibited IL-7-dependent induction of IL-33R. Furthermore, Bach2 inhibited IL-7R expression and IL-7-signaling in Th2 cells. From these results, we concluded that Bach2 controls antigen-independent Th2 response by regulating the IL-7R expression.

研究分野：免疫学

キーワード：Bach2 IL-7 抗原非依存性Th2免疫応答

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2 型気道炎症の病態形成には抗原特異的 2 型ヘルパー (Th2) 細胞が中心的な役割を担っている。Th2 細胞の亜集団の一つである IL-33 受容体陽性 Th2 (IL-33R+ Th2) 細胞は、肺環境に存在する IL-7 と IL-33 依存性に Th2 免疫応答を遷延し、気道炎症を慢性化させる。IL-33 は炎症、ウイルス感染、呼吸による物理的なストレスなどにより、肺環境で持続的に分泌される。また、IL-7 は生体内で豊富に存在することに加え、肺の炎症部位で形成される三次リンパ組織からも産生される。このため、特異的抗原量が低下したとしても、IL-33R+ Th2 細胞が IL-7/IL-33 依存性に活性化し、Th2 型の炎症が持続することになる。これらの知見から、Th2 細胞の IL-7/IL-33 反応性の増強が、抗原非依存性 (IL-7/IL-33 依存性) の Th2 免疫応答と気道炎症の慢性化を制御していることが示唆される。しかしながら、Th2 細胞における IL-7/IL-33 反応性の制御機構はほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、Th2 細胞の IL-7/IL-33 依存的免疫応答の制御機構を明らかにすることを目的に実験を行った。最終的には、慢性気道炎症の新基治療法開発への展開を目指す。

### 2. 研究の目的

Th2 細胞の IL-7/IL-33 反応性の増強が IL-33R+ Th2 細胞を誘導し、その抗原非依存性免疫応答の遷延が気道炎症を慢性化させる。本申請研究では、Th2 細胞の IL-7/IL-33 反応性の制御機構を明らかにし、慢性気道炎症の新規治療法のシーズの提案を目指すことを目的に研究を実施した。特に、Th2 細胞における転写抑制因子 Bach2 の発現変動による、Th2 細胞の抗原非依存性免疫応答制御に着目し、研究を実施した。

私たちは、Bach2 が Th2 細胞の分化を抑制していることを明らかにした (Kawahara et al. Nat. Commun. 2016)。その研究過程で、T 細胞特異的に Bach2 を欠損させたマウスでは、肺に IL-33R+ Th2 細胞が増加し、慢性気道炎症を自然発症することを見出した。T 細胞特異的 Bach2 欠損マウスの肺に存在する IL-33R+ Th2 細胞は IL-33 依存性に IL-5/IL-13 を産生することに加え、炎症性サイトカイン、マトリックスメタロプロテアーゼ、増殖因子、TGF- $\beta$ 3 の発現も上昇した。また、Bach2-tdRFP マウス (Bach2 遺伝子座に tdRFP をノックインしたレポーターマウス) の肺 CD4 T 細胞を RFP の発現を指標に分離し、IL-33 で刺激すると、RFP 陰性細胞で IL-33R、IL-5、IL-13 の発現が増加することがわかった。これらの知見から、T 細胞における Bach2 の欠失あるいは発現低下が、IL-33R+ Th2 細胞を誘導し、抗原非依存性の Th2 免疫応答を活性化させることで、気道炎症の慢性化を引き起こす可能性が示唆された。また、私たちは、IL-7 が Th2 細胞の IL-33R の発現制御を介して、IL-33 反応性を増強する役割があることを見出した。そこで本申請研究では、Bach2 による Th2 細胞の IL-7/IL-33 反応性調節を介した、2 型気道炎症の慢性化制御機構の解明を目的に研究を実施した。具体的には、Bach2 による Th2 細胞の IL-7 受容体 (IL-7R) 発現制御、IL-33R+ Th2 細胞の誘導における IL-7 の役割解析を中心に解析を行った。

### 3. 研究の方法

Bach2 の IL-33R+ Th2 細胞の誘導と抗原非依存的 Th2 免疫応答における役割を解析するために、T 細胞特異的 Bach2 欠損マウスを用いた。また、in vitro IL-33R+ Th2 細胞誘導系を確立し、IL-33R+ Th2 細胞の誘導機構を解析した。具体的には、in vitro で分化誘導した Th2 細胞を静止状態にし (細胞洗浄後、サイトカインフリーの完全培地で 24 時間培養) IL-7 と IL-33 のコンビネーションで刺激し (24 時間) IL-33R+ Th2 細胞を誘導した。

### 4. 研究成果

本申請研究を実施し、Bach2 が IL-7R の発現調節を介して、Th2 細胞の IL-7 反応性を制御すること、IL-7 は Th2 細胞の代謝状態を活性化し、IL-33R+ Th2 細胞を誘導することが明らかになった。また、の研究過程で、解糖系-メバロン酸経路が Th2 細胞分化の制御に関与することを新たに見出した。以下に ③について述べる。

#### Bach2 による Th2 細胞の IL-7R 発現制御

クロマチン免疫沈降法-シーケンス (ChIP-Seq.) 解析から、Bach2 が *Il7ra* 遺伝子座に結合することがわかった。さらに、Bach2 欠損 Th2 細胞では、*Il7ra* 遺伝子座のヒストン H3K27ac (転写活性化の指標) のレベルが野生型よりも上昇しており、その一部は Bach2 結合領域と一致していた。また、Bach2 トランスジェニック Th2 細胞の表面に発現する IL-7R は、野生型 Th2 細胞に比べて著しく低下していたことから、Bach2 が Th2 細胞の IL-7R の発現を直接抑制していることが示唆された。一方、野生型 Th (non Th2) 細胞、野生型 Th2 細胞、Stat6 欠損 Th2 細胞の IL-7R の発現は野生型 Th2 細胞で高く、non Th2 細胞と Stat6 欠損 Th2 細胞で低いことから、IL-7R の発現が IL-4/Stat6 経路で制御されることがわかった。さらに、*Il7ra* 遺伝子座の Bach2 結合領域における転写活性化の指標となるヒストンアセチル化 (H3K27ac, H3K9ac) も IL-4/Stat6 に依存していることが明らかになった。

私たちは、Bach2 が転写因子 Batf と複合体を形成し、Th2 サイトカイン遺伝子座の AP-1 結合領域への結合を介して、AP-1 に拮抗することで、AP-1 依存的な Th2 サイトカインの発現を抑制していることを報告している (Kawahara et al. Nat. Commun. 2016)。また、Bach2 の発現は、持続的な抗原刺激と IL-4 刺激により低下し、最終分化した Th2 細胞では Bach2 発現が顕著に減少することを明らかにしている。これらの知見から、私たちは、Bach2 による IL-7R の発現制御を次のように考えている。まず、抗原刺激と IL-4 刺激により Bach2 の発現が低下すると Th2 細胞分化が誘導される。Th2 細胞分化の亢進にともない、Bach2 発現が著しく低下する。続いて、Bach2 による *Il7ra* 遺伝子座の抑制状態が解除され、IL-7R の発現が誘導される。以上より、Bach2 は、*Il7ra* 遺伝子座のエピジェネティック制御と、AP-1 依存的な Th2 サイトカインの抑制を介して、IL-7R の発現を調節していることが示唆された。

#### IL-7 による IL-33R+ Th2 細胞分化制御

まず、Bach2 による Th2 細胞の IL-7 反応性の制御について解析したところ、Th2 細胞の IL-7 シグナルの活性化が Bach2 トランスジェニック CD4 T 細胞で抑制された。このことから、Bach2 は IL-7 受容体の発現制御を介して、IL-7 反応性を調節していることが明らかになった。次に、IL-33R+ Th2 細胞の誘導における IL-7 の役割を解析した。In vitro IL-33R+ Th2 細胞誘導系において、IL-7 シグナル阻害剤 (Jak 阻害剤、Stat 阻害剤、mTOR 阻害剤) で IL-33R の発現、IL-5/IL-13 産生が抑制され、IL-7 は IL-33R+ Th2 細胞の誘導を制御することがわかった。IL-7 刺激した Th2 細胞では、*Il1rl1* (IL-33Ra をコードする遺伝子) や Th2 サイトカイン遺伝子座などの IL-33R+ Th2 細胞関連遺伝子座のヒストンアセチル化レベルが上昇した。近年、細胞内代謝が細胞の運命決定を制御していることが明らかになっている。代謝産物はエピゲノム制御因子の活性を制御している。例えば、アセチル-CoA はタンパク質やヒストンのアセチル化の基質として機能している。私たちは、IL-7 が Th2 細胞の代謝状態を調節し、IL-33R+ Th2 細胞の誘導を制御している可能性を実証するための実験を行った。解糖系阻害剤により IL-33R+ Th2 細胞の誘導が抑制されたことから、IL-7 依存的な解糖系の促進が IL-33R+ Th2 細胞の誘導に関与していることが示唆された。解糖系の促進はアセチル-CoA をハブにして、TCA サイクルや脂質代謝を活性化する。今後、IL-7 依存的な細胞内代謝変化を網羅的に解析し、IL-33R+ Th2 細胞の誘導を制御する代謝経路を明らかにする予定である。特定の代謝経路の同定ができた場合、代謝酵素阻害剤などの低分子化合物が抗原非依存的 Th2 免疫応答や気道炎症の慢性化の抑制に応用できる可能性が考えられる。

#### 解糖系-メバロン酸経路は Th2 細胞の分化を制御する

私たちは、解糖系-メバロン酸経路が Th2 細胞の分化を制御することを明らかにした (Toriyama et al. Commun. Biol.2020, Yagi et al. BBRC 2020)。具体的には、3-ホスホグリセリン酸を2-ホスホグリセリン酸に異性化する反応(解糖系 7 番目の反応)を調節する酵素、Pgam1 の T 細胞特異的欠損マウスを作製し、Pgam1 の T 細胞における役割を研究した。Pgam1 欠損 CD4 T 細胞の Th2 細胞分化が抑制された。これに加え、Th1 細胞、Th17 細胞の分化も Pgam1 欠損により低下した。さらに、T 細胞特異的 Pgam1 欠損マウスでは、Th2 細胞依存性の卵白アルブミン誘発性気道炎症や Th17 細胞依存性の実験的自己免疫性脳脊髄炎の病態が減弱した。これらの結果から、解糖系は Th1/Th2/Th17 細胞分化の誘導に重要であることが明らかになった (Toriyama et al. Commun. Biol.2020)。また、解糖系の代謝産物であるピルビン酸は、ピルビン酸デヒドロゲナーゼによりアセチル-CoA に変換される。アセチル-CoA は TCA サイクル、脂質代謝を活性化する。私たちは、脂質代謝の中でも、メバロン酸経路が Th2 細胞の分化を制御することを明らかにした (Yagi et al. BBRC 2020)。具体的には、メバロン酸経路の律速酵素 HMG-CoA リダクターゼの阻害剤やこの経路の下流のファルネシル化の阻害剤で Th2 細胞の分化が抑制されること突き止めた。これらの研究成果より、解糖系-メバロン酸経路が Th2 細胞分化の誘導に関与することが示唆された。今後、これらの経路が IL-33R+ Th2 細胞の誘導に関与する可能性について解析する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Nomura Shunsuke, Takahashi Hirota, Suzuki Junpei, Kuwahara Makoto, Yamashita Masakatsu, Sawasaki Tatsuya	4. 巻 9
2. 論文標題 Pyrrothiogatain acts as an inhibitor of GATA family proteins and inhibits Th2 cell differentiation in vitro	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17335
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-53856-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Fu Yongyao, Koh Byunghee, Kuwahara Makoto, Ulrich Benjamin J., Kharwadkar Rakshin, Yamashita Masakatsu, Kaplan Mark H.	4. 巻 203
2. 論文標題 BATF-Interacting Proteins Dictate Specificity in Th Subset Activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1989 ~ 1998
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1900128	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nabe Shogo, Yamada Takeshi, Suzuki Junpei, Toriyama Koji, Yasuoka Toshiaki, Kuwahara Makoto, Shiraishi Atsushi, Takenaka Katsuto, Yasukawa Masaki, Yamashita Masakatsu	4. 巻 109
2. 論文標題 Reinforce the antitumor activity of CD8+ T cells via glutamine restriction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3737 ~ 3750
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13827	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Junpei, Yamada Takeshi, Inoue Kazuki, Nabe Shogo, Kuwahara Makoto, Takemori Nobuaki, Takemori Ayako, Matsuda Seiji, Kanoh Makoto, Imai Yuuki, Yasukawa Masaki, Yamashita Masakatsu	4. 巻 9
2. 論文標題 The tumor suppressor menin prevents effector CD8 T-cell dysfunction by targeting mTORC1-dependent metabolic activation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3296 ~ 3307
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-05854-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamashita Masakatsu, Kuwahara Makoto	4. 巻 30
2. 論文標題 The critical role of Bach2 in regulating type 2 chronic airway inflammation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 397 ~ 402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxy020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Toriyama Koji, Kuwahara Makoto, Kondoh Hiroshi, Mikawa Takumi, Takemori Nobuaki, Konishi Amane, Yorozyua Toshihiro, Yamada Takeshi, Soga Tomoyoshi, Shiraiishi Atsushi, Yamashita Masakatsu	4. 巻 3
2. 論文標題 T cell-specific deletion of Pgam1 reveals a critical role for glycolysis in T cell responses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01122-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yagi Yuichiro, Kuwahara Makoto, Suzuki Junpei, Imai Yasushi, Yamashita Masakatsu	4. 巻 530
2. 論文標題 Glycolysis and subsequent mevalonate biosynthesis play an important role in Th2 cell differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 355 ~ 361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.08.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Makoto Kuwahara
2. 発表標題 Transcriptional repressor Bach2 controls antigen-independent Th2 responses by regulating glycolysis
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto Kuwahara
2. 発表標題 The transcriptional repressor Bach2 controls antigenindependent Th2 cell response
3. 学会等名 14th World Congress on Inflammation Sydney 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto Kuwahara
2. 発表標題 The critical role of Bach2 in preventing antigen-independent innate-type Th2 response
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto Kuwahara, Maya Izumoto, Masakatsu Yamashita
2. 発表標題 The transcriptional repressor Bach2 controls pathogenic Th2 differentiation via two distinct pathway
3. 学会等名 第67回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Makoto Kuwahara, Tomohiro Kurosaki, Masakatsu Yamashita
2. 発表標題 The critical role of Bach2 in regulating antigen-independent Th2 responses.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

愛媛大学大学院医学系研究科免疫学・感染防御学  
<https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/immunology/index.php/main/sample-page-3/>  
愛媛大学大学院医学系研究科免疫学・感染防御学  
<https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/immunology/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	山下 政克  (Yamashita Masakatsu)		
研究協力者	武森 信暁  (Takemori Nobuaki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------