

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2012

課題番号：22249009

研究課題名（和文） サイトカインによる炎症と抗炎症のバランス制御機構の解明

研究課題名（英文） Regulatory Mechanisms of the Balance between Inflammation and Anti-inflammation by Cytokines

研究代表者

吉村 昭彦（YOSHIMURA AKIHIKO）

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：90182815

研究成果の概要（和文）：

サイトカインは自然免疫系の細胞や獲得免疫系の細胞を制御する。我々はサイトカインのなかで特に TGF- $\beta$  を中心に病原性の Th17 と抑制性 T 細胞 Treg の産生のメカニズムを明らかにした。Treg のマスター遺伝子 Foxp3 は Smad2, Smad3 経路によって誘導され、一方 Th17 は Smad に依存しない経路によって誘導された。Smad 非依存性の経路として JNK-c-jun によって Eomesodermin という遺伝子が転写抑制される経路を発見した。またサイトカインシグナルの制御因子 SOCS1 が Treg の恒常性維持や抑制機構に必須の役割を果たすことも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Cytokines play essential roles in regulation of innate and adaptive immunity. The transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) has been shown to play pivotal roles in T-cell homeostasis, Th17 and Treg differentiation, and immune suppression. In this study, we demonstrated that both Smad2 and smad3 were redundantly essential for the induction as well as maintenance of Foxp3 by TGF- $\beta$ . However, ROR $\gamma$ t, the master regulator of Th17 differentiation, was induced by a Smad2/3 independent mechanisms. We found that the TGF- $\beta$ -JNK/c-Jun pathway suppressed the expression of Eomesodermin (Eomes) is involved in Th17 differentiation. SOCS1, a negative regulator of cytokine signaling, has been shown to be necessary for suppressing excess immune responses. We have also shown that SOCS1 is critical for regulatory T cells (Tregs) integrity and suppressor functions *in vivo*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	16,100,000	4,830,000	20,930,000
2011 年度	14,300,000	4,290,000	18,590,000
2012 年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
総計	37,500,000	11,250,000	48,750,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：

サイトカイン シグナル伝達 チロシンキナーゼ 転写因子 ヘルパーT細胞 抑制性T細胞 TGF-

## 1. 研究開始当初の背景

免疫反応は通常は微生物等の異物の侵入、あるいは損傷した組織（死細胞など）によって開始され、その排除、修復が終了すれば終息に向かう。免疫担当細胞には寿命があるので異物（抗原）からの刺激がなくなれば自然と収まりそうなものである。しかし実際には細胞の寿命による制御だけでは全く不十分で、積極的な制御系がないと時には個体が死亡するほどの劇症型の全身性の組織破壊に発展する。

通常の生体応答は必要に応じて起動され、必要がなくなればもとの状態にもどる、つまりホメオスターシスが維持されている。ホメオスターシスは正の反応と負の応答（制御）がバランスを保って進行することによって実現されている。正負の応答はいくつかのメカニズムによって保証されているが、ヘルパー T 細胞が最も重要でかつよく理解されている。正の応答を担うエフェクター T 細胞には Th1, Th2, Th17 の 3 種類がある。負の応答を担うのが抑制性 T 細胞（Treg）であり、胸腺由来の nTreg と末梢で TGF $\beta$  によって誘導される iTreg が知られている。しかしこれらの細胞の分化誘導のメカニズムと制御機構は十分解明されていない。本研究では Th17 と iTreg 分化を規定する TGF $\beta$  の作用機構を解明すること、またサイトカインシグナルがどのように Treg の分化や機能維持に貢献しているかを明らかにすることを目的としている。

## 2. 研究の目的

TGF $\beta$  は免疫において IL-10 とともに抗炎症性サイトカインとして知られており、その機能は多岐にわたることがわかっている。TGF $\beta$  の KO マウスの解析から TGF $\beta$  が炎症性腸疾患の抑制や自己免疫疾患の抑制に必須であることは明白であるにもかかわらず、TGF $\beta$  がどのような分子機構で免疫抑制に寄与するかは解明されていなかった。しかし、ここ数年抑制性 T 細胞の分野で大きなブレイクスルーがなされた。すなわち T 細胞受容体刺激時に TGF $\beta$  が存在することで、抑制性 T 細胞のマスター遺伝子である *Foxp3* が誘導されることが示された。一方で TGF $\beta$  は IL-6 とともに Th17 を誘導することが知られている。我々は TGF $\beta$  のシグナルを中心に Smad2/3 欠損マウスを利用して Treg や Th17 分化誘導のメカニズムの解明をめざす

一方で、最近 Treg の可塑性が問題となっている。SOCS1 は Treg で高い発現を保っており、サイトカインシグナルをブロックすることから Treg をサイトカインの攻撃から守っている可能性が考えられる。もしこのような機構が存在するならば、逆にサイトカインシグナルを制御し nTreg の安定性を増すことも可能と考えられる。そこで nTreg における SOCS1 の機能解明を行った。

## 3. 研究の方法

(1) Smad2 と Smad3 の機能的相違を解明するために T 細胞特異的 Smad2 欠損 (cKO) マウスを作製した。また Smad3 欠損 (KO) マウスと交配し Smad2/3 両欠損マウスを作製した。  
(2) Smad2/3 両欠損した T 細胞においても Th17 のマスター因子 ROR $\gamma$ t が誘導されたことから TGF $\beta$  によって発現が上下する遺伝子数個を選び、T 細胞に強制発現することで Th17 細胞への分化に影響を与えるものを選択する。さらにそのシグナルを解明する。  
(3) LckCre マウスと交配し T 細胞特異的 SOCS1 欠損マウスを作製した。GFP で標識された SOCS1 欠損 nTreg を単離し、Rag2 欠損マウスへ移入することで Foxp3 の安定性や腸炎の抑制能（あるいは誘導能）について検討を行った

## 4. 研究成果

(1) T 細胞特異的 Smad2 欠損 (cKO) マウスを作製した。Smad2-cKO マウスと Smad3-KO マウスは正常に発育し自然発症的な重篤な障害は認められなかった。しかし Smad2/3 両欠損マウスは生後一ヶ月以内に肝炎を含む炎症性疾患で死亡した。したがって予想外に Smad2 と Smad3 は両者が重複して T 細胞の活性化を抑制することを見いだした。TGF $\beta$  の重要な免疫抑制作用のひとつは Th1 や Th2 分化の抑制である。試験管内ではナイーブ T 細胞を Th1 に分化誘導するときに TGF $\beta$  を加えると分化が抑制され Foxp3 陽性細胞が増える。このとき Smad2 単独、Smad3 単独欠損の T 細胞では部分的に Th1 抑制と Foxp3 誘導の低下が認められた。また Smad2/3 両欠損 T 細胞では Th1 の抑制がほとんど見られないことから TGF $\beta$  による Th1 抑制には Smad2/3 のシグナルが重要であることがわかる。また Foxp3 の誘

導にも Smad2 と Smad3 両者が必要であることがわかった。

(2)次に TGF による Th1 の抑制は Foxp3 に依存するのかわかした。Foxp3 欠損 scurfy マウスを用いた検討を行った。Foxp3 欠損マウス由来の T 細胞の Th1 への誘導は依然として TGF で抑制され、かつ Foxp3 欠損マウスの致死的な自己免疫疾患は TGF の頻回投与によって抑制されたことから、TGF の免疫抑制作用には Foxp3 以外の機構も重要であることが示唆された。

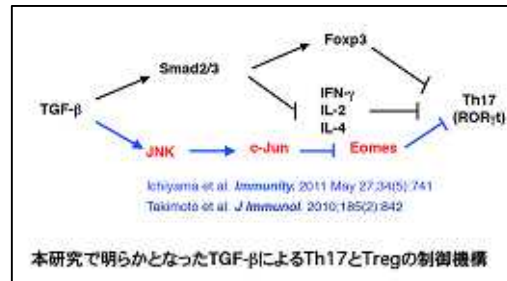
(3)Th17 分化誘導条件 (TGF + IL-6) では ROR t は Smad2/3 両欠損マウスでも正常に誘導された。ROR t の誘導は Smad2/3 非依存的であると結論できた。以上の T 細胞における TGF シグナルの機能について図にまとめた。

次に TGF の Smad 非依存経路を明らかにすべく野生型と同様に Smad2/3 両欠損した T 細胞で TGF によって発現が上下する遺伝子数個を選択した。これらを T 細胞に強制発現することで Th17 細胞への分化に影響を与えるものを選択した。これらのなかで Eomesodermin (Eomes) 遺伝子が Th17 細胞では発現を抑えられ、他の Th1 細胞や Th2 細胞では抑えられないことを突き止めた。そこで、Eomes を未熟な T 細胞に人為的に発現させたところ、Th17 細胞の誘導が著しく減少した。逆に Eomes の発現を抑えた T 細胞では TGF を加えなくても ROR t や IL-17 が誘導された。ROR t や IL-17 遺伝子のプロモーター解析から Eomes は、Th17 分化に最も重要な ROR t や IL-17A の遺伝子のプロモーターに結合して発現を抑制していることが分かった。

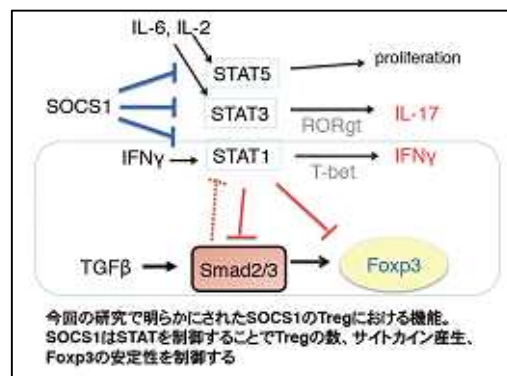
次に、T 細胞でどのようなシグナルが Eomes の発現をコントロールしているのかわかした。様々なシグナル阻害薬を検討したところ、JNK の阻害剤が TGF による Eomes の発現抑制を解除することが分かった。また JNK を阻害することで IL-17A の発現も抑制されることも分かった。逆に (JNK1 もしくは JNK2) を T 細胞に過剰に発現させると Eomes の発現量が少なくなり、TGF がなくても Th17 細胞分化が誘導されていた。最後に JNK 阻害剤を実験的自己免疫性脳脊髄炎モデル (EAE) に適用したところ JNK 阻害剤は症状を著しく改善した。

JNK は c-Jun と呼ばれる転写因子を介して機

能を発揮することが知られている。詳細な検討から、やはり c-Jun が Eomes を作る遺伝子の発現を低下させることが明らかとなった。すなわち、TGF → JNK → c-Jun → Eomes の抑制 → Th17 細胞分化誘導というメカニズムがあることが示された (下図参照)。



(4) SOCS1 の nTreg における役割を解明するために、in vitro、in vivo でその抑制能を検討した。まず Foxp3Cre マウスと交配し Treg 特異的 SOCS1 欠損マウスを作製したところ皮膚炎や肝炎などの自己免疫疾患様の症状を呈した (文献 2)。SOCS1 の nTreg における役割を解明するために、in vitro、in vivo でその抑制能を検討した。RAG2 欠損マウスへの naive T 細胞とそれぞれの nTreg の移入実験では、SOCS1 欠損 Foxp3 陽性 nTreg を移入した方が腸炎の抑制効力が劣っていた。そこで、RAG2 欠損マウスへそれぞれの nTreg のみを移入して、nTreg の運命を検討した。GFP でマーキングした Foxp3 陽性 T 細胞 (>99% Foxp3 陽性) を移入した所、4 週後に WT nTreg は約 60% が Foxp3 陽性を維持しているのに対して、SOCS1 欠損 nTreg は 40% にまで Foxp3 陽性率が低下した。SOCS1 欠損 nTreg を移入した Rag 欠損マ



ウスでは Foxp3 陽性、陰性どちらの分画からも IFN や IL-17 の産生が認められた。

これらの結果から、SOCS1 が nTreg において Foxp3 の安定性およびサイトカイン産生抑制に寄与することが明らかとなった (図参照)

#### 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 11 件 ) **すべて査読有り**

Sekiya T, Kashiwagi I, Yoshida R, Fukaya T, Morita R, Kimura A, Ichinose H, Metzger D, Chambon P, Yoshimura A. Nr4a receptors are essential for thymic regulatory T cell development and immune homeostasis. *Nature Immunol.* 2013 14(3):230-7.

Hasegawa E, Sonoda KH, Shichita T, Morita R, Sekiya T, Kimura A, Oshima Y, Takeda A, Yoshimura T, Yoshida S, Ishibashi T, Yoshimura A. IL-23-Independent Induction of IL-17 from  $\gamma\delta$ T Cells and Innate Lymphoid Cells Promotes Experimental Intraocular Neovascularization. *J Immunol.* 2013 190(4):1778-87.

Shichita T, Hasegawa E, Kimura A, Morita R, Sakaguchi R, Takada I, Sekiya T, Ooboshi H, Kitazono T, Yanagawa T, Ishii T, Takahashi H, Mori S, Nishibori M, Kuroda K, Akira S, Miyake K, and Yoshimura A Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain *Nature Medicine* 2012 18(6):911-7.

Sekine Y, Yamamoto C, Kakisaka M, Muromoto R, Kon S, Ashitomi D, Fujita N, Yoshimura A, Oritani K, Matsuda T. Signal-transducing adaptor protein-2 modulates fas-mediated T cell apoptosis by interacting with caspase-8. *J Immunol.* 2012;188(12):6194-204.

Sugiyama Y, Kakoi K, Kimura A, Takada I, Kashiwagi I, Wakabayashi Y, Morita R, Nomura M, Yoshimura A. Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the suppression of iNOS synthesis in macrophages by regulating IRF3 and STAT1 pathways. *Int Immunol.* 2012 24(4):253-65.

Saeki K, Kanai T, Nakano M, Nakamura Y, Miyata N, Sujino T, Yamagishi Y, Ebinuma H, Takaishi H, Ono Y, Takeda K, Hozawa S, Yoshimura A, Hibi T. CCL2-Induced Migration and SOCS3-Mediated Activation of Macrophages Are Involved in Cerulein-Induced Pancreatitis in Mice. *Gastroenterology.* 2012;142(4):1010-1020.

Sekiya T, Kashiwagi I, Inoue N, Morita R, Hori S, Waldmann H, Rudensky AY, Ichinose H, Metzger D, Chambon P, Yoshimura A. The nuclear orphan receptor Nr4a2 induces Foxp3 and regulates differentiation of CD4(+) T cells. *Nature Commun.* 2011 2:269. doi:10.1038/ncomms1272

Ichiyama K, Sekiya T, Inoue N, Tamiya T, Kashiwagi I, Kimura A, Morita R, Muto G, Shichita T, Takahashi R, Yoshimura A. Transcription Factor

Smad-Independent T Helper 17 Cell Induction by Transforming-Growth Factor- $\beta$  Is Mediated by Suppression of Eomesodermin. *Immunity.* 2011 27;34(5):741-54.

Ishizaki T, Tamiya T, Taniguchi K, Morita R, Kato R, Okamoto F, Saeki K, Nomura M, Nojima Y, Yoshimura A. miR126 positively regulates mast cell proliferation and cytokine production through suppressing Spred1. *Genes Cells.* 2011 16(7):803-814.

Takahashi R, Nishimoto S, Muto G, Sekiya T, Tamiya T, Kimura A, Morita R, Asakawa M, Chinen T, Yoshimura A. SOCS1 is essential for regulatory T cell functions by preventing loss of Foxp3 expression as well as IFN- $\gamma$  and IL-17A production. *J Exp Med.* 2011;208(10):2055-67.

Takahashi H, Kouno M, Nagao K, Wada N, Hata T, Nishimoto S, Iwakura Y, Yoshimura A, Yamada T, Kuwana M, Fujii H, Koyasu S, Amagai M. Desmoglein 3-specific CD4+ T cells induce pemphigus vulgaris and interface dermatitis in mice. *J Clin Invest.* 2011;121(9):3677-88.

Joshi S, Pantalena LC, Liu XK, Gaffen SL, Liu H, Rohowsky-Kochan C, Ichiyama K, Yoshimura A, Steinman L, Christakos S, Youssef S. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A. *Mol Cell Biol.* 2011 31(17):3653-69.

Wakabayashi Y, Tamiya T, Takada I, Fukaya T, Sugiyama Y, Inoue N, Kimura A, Morita R, Kashiwagi I, Takimoto T, Nomura M, Yoshimura A. Histone 3 lysine 9 (H3K9) methyltransferase recruitment to the interleukin-2 (IL-2) promoter is a mechanism of suppression of IL-2 transcription by the transforming growth factor- $\beta$ -Smad pathway. *J Biol Chem.* 2011 ;286(41):35456-65.

Nakagawa R, Yoshida H, Asakawa M, Tamiya T, Inoue N, Morita R, Inoue H, Nakao A, Yoshimura A. Pyridone 6, a pan-JAK inhibitor, ameliorates allergic skin inflammation of NC/Nga mice via suppression of Th2 and enhancement of Th17. *J Immunol.* 2011 ; 187(9):4611-20.

15Takimoto T, Wakabayashi Y, Sekiya T, Inoue N, Morita R, Ichiyama K, Takahashi R, Asakawa M, Muto G, Mori T, Hasegawa E, Shizuya S, Hara T, Nomura M, Yoshimura A. Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF-beta-mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development. *J Immunol.* 2010; 185(2):842-55.

Lu LF, Boldin MP, Chaudhry A, Lin LL, Taganov KD, Hanada T, Yoshimura A, Baltimore D, Rudensky AY. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell.* 2010;142(6):914-29.

Yan C, Cao J, Wu M, Zhang W, Jiang T, Yoshimura A, Gao H. Suppressors of cytokine signaling 3 inhibits LPS-induced IL-6 expression in osteoblasts by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein {beta} activity. *J Biol Chem.* 2010;285(48):37227-39.

〔学会発表〕(計 15 件)

国際学会招待 主なもののみ

YOSHIMURA Akihiko and SEKIYA Takashi  
“The nuclear orphan receptor Nr4a family is essential for nTreg development and immune homeostasis” JST-CREST Symposium  
"Frontiers in Immunology and Inflammation"  
Feb 12th -13th ,2013,Hitotsubashi Memorial Hall  
Tokyo

Akihiko Yoshimura, Takatoshi Chinen and Takashi Sekiya: Suppression of intestinal inflammation by signals of IL-10, TGF-beta and novel factors  
keystone symposium *Emerging Topics in Immune System Plasticity: Cellular Networks, Metabolic Control, and Regeneration.* January 15-20, 2013, Santa Fe, New Mexico, USA

Akihiko Yoshimura: The IL-23-IL-17 axis in the brain inflammation after stroke  
The 34th Naito Conference October 16 to 19, 2012, at Chateraise Gateaux Kingdom  
SAPPORO

Akihiko Yoshimura: Suppression of intestinal inflammation by PGE2, IL-10 and SOCS1  
International Symposium on Immune Tolerance and Mucosal Immunology Oct 9-11, 2012.Chengdu, China

Akihiko Yoshimura, Kenji Ichiyama  
Role of TGF-β-Smad2/3 signaling in helper T cell function and differentiation  
20<sup>th</sup> International Rheumatoid symposium  
Kobe 7/19 2011.

Akihiko Yoshimura, Tamiya Taiga, and Takatoshi Chinen  
Regulation of innate immune tolerance by PGE2 and SOCS1 in the intestine  
Joint international meeting of JSICR-MMCB  
May 25-27, 2011 Osaka

Akihiko Yoshimura, Kenji Ichiyama  
Role of TGF-beta-Smad2/3 signaling in helper T cell function and differentiation  
Keystone symposium “TGF-beta” Snowbird, USA 2011.1/8-12

Akihiko Yoshimura, Takashi Shchita, Fumie Konoeda  
Role of IL-23 and IL-17-producing gdT cells in the delayed phase of brain ischemia  
China Treg/Th17 Shanghai China 2010.7/17-7/20

Akihiko Yo shimura

T cell differentiation and cytokine network in immunological diseases  
第19回国際リウマチシンポジウム  
2010.4/23 神戸

Akihiko Yoshimura

SOCS1 is necessary for innate immune tolerance to intestinal flora by regulating prostaglandin- mediated immunosuppression  
World Immune Regulation Meeeting –IV  
Davos, Switzerland. 2010.4/1

〔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

<http://new.immunoreg.jp/>

6 . 研究組織

(1) 吉村 昭彦 (YOSHIMURA AKIHIKO)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号 : 90182815

(2) 研究分担者 なし :

(3) 連携研究者 なし