

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390075

研究課題名(和文) TGF β / β -cateninシグナルによるT細胞応答・恒常性の制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of T cell response and homeostasis by the TGF β /beta-catenin signals

研究代表者

山下 政克 (Yamashita, Masakatsu)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00311605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：TGF β で発現が制御され、Th2型アレルギー炎症を抑制する分子として転写因子Sox4を見いだしました。T細胞特異的Sox4トランスジェニックマウス、T細胞特異的Sox4ノックアウトマウスの解析を行い、Sox4がTh2型アレルギー炎症を抑制していることをin vitro、in vivoの両方で確認しました。今回の実験から、Sox4はTh2型アレルギーのマスター転写因子GATA3に直接結合し、その機能を阻害することでTh2細胞の分化を抑制していることも新たに見いだされました。

研究成果の概要(英文)：Sox4 is a transcription factor that regulates various developmental processes. We found that Sox4 was induced by TGF β and negatively regulated the transcription factor Gata3, the master regulator of Th2 cell development and allergic inflammation, by two distinct mechanisms. First, Sox4 bound to GATA3, preventing its binding to GATA3 consensus DNA sequences. Second, Sox4 bound to the promoter region of the gene encoding IL-5, a Th2 cytokine, and preventing binding of GATA3 to this promoter. Th2 driven airway inflammation was modulated by alterations in Sox4 expression. Thus, Sox4 acts as a downstream target of TGF β to inhibit GATA3 function and Th2-dependent allergic inflammation.

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：分子病態学 免疫 アレルギー 老化

1. 研究開始当初の背景

申請者は、末梢 CD4 T 細胞の活性化、機能分化と機能維持機構 (メモリー CD4 T 細胞維持機構) について一貫して研究を行ってきた。その研究過程で、TGFβ 刺激で b-catenin シグナル経路が活性化し、末梢 CD4 T 細胞の反応性を制御していることを新たに見出した。そこで本申請研究では、この新規知見の生理的意義を研究するため、“TGFβ 刺激で活性化する b-catenin シグナル経路の T 細胞応答と恒常性維持における役割”について解析したいと考えた。

b-catenin は、Wnt 刺激によって安定化・核内移行し、Tcf7 や Lef1 と複合体を形成して転写を活性化することが良く知られている。Wnt/b-catenin シグナル伝達経路は進化上広く保存されており、発生や形態形成など多くの生命現象で重要な役割を担っているとともに、癌をはじめとした様々な疾患の発症に密接に関わっている。しかしながら、免疫細胞において Wnt/b-catenin シグナルは、T 細胞や B 細胞の初期分化への関与が報告されているものの、末梢 T 細胞における役割や免疫疾患発症への関与についてはほとんど解析が行われてはいない。そこで、末梢 CD4 T 細胞において b-catenin を活性化する液性因子を探索し、TGFβ をその候補として同定した。さらに、ごく最近、NFAT の活性化を b-catenin が制御している可能性、活性化 T 細胞特異的 b-catenin 欠損マウス (b-catenin flox/flox X OX40 Tg) では皮膚炎が自然発症することを世界に先駆けて見出した。

これらの知見をもとに、本申請研究では、TGFβ / b-catenin シグナル伝達経路の T 細胞応答と恒常性維持における役割について、CD4 T 細胞の分化・維持と活性化 T 細胞特異的 b-catenin 欠損マウスにおける皮膚炎の病因解析を中心に検討する。

2. 研究の目的

b-catenin シグナルは、主として Wnt によって活性化される広く保存されたシグナル伝達経路であるが、T 細胞における b-catenin シグナルの活性化メカニズム及びその役割は、ほとんどわかっていない。申請者らは、(1) CD4 T 細胞において TGFβ 刺激により b-catenin シグナルが活性化すること、(2) 安定化型 b-catenin が T 細胞の活性化を抑制すること、(3) 活性化 T 細胞特異的 b-catenin 欠損マウスでは皮膚炎が自然発症することを世界に先駆けて見出した。そこで、本申請研究では、CD4 T 細胞機能分化・維持における b-catenin の役割と b-catenin 欠損マウスでの皮膚炎自然発症の原因解析を中心に、TGFβ/b-catenin シグナル伝達経路による T 細胞応答と恒常性の維持機構について検討する。

3. 研究の方法

TGFβ / b-catenin シグナル伝達経路の CD4 T 細胞応答と恒常性維持における役割について、活性化 T 細胞特異的 b-catenin 欠損 (b-catenin flox/flox X OX40 Cre Tg) マウスおよび T 細胞特異的 b-catenin 欠損 (b-catenin flox/flox X CD4 Cre Tg) マウスを用いて検討した。In vitro では、TGFβ による Th2 細胞分化、Th2 サイトカイ

ン産生における TGF / -catenin シグナル伝達経路の役割、*in vivo* では、アレルギー性気道炎症における役割を中心に解析を行った。

4. 研究成果

(1) 活性化 T 細胞以外での OX40 の発現については、あまり解析が行われていないため、-catenin flox/flox X OX40 Tg マウスで認められる皮膚炎の自然発症が、本当に T 細胞に -catenin が発現していないことによるものなのかを確認する実験をまず行った。-catenin flox/flox マウスと CD4 Cre Tg マウスと交配することで T 細胞特異的 -catenin 欠損マウスを作製して皮膚炎の発症について検討したが、残念ながら皮膚炎の自然発症は認められなかった。また、TGF / -catenin シグナルによる CD4 T 細胞の分化・機能制御に着目して解析を進め、*in vitro* では、TGF 刺激により -catenin タンパクが安定化すること、恒常活性化型 -catenin を活性化 CD4 T 細胞に遺伝子導入することにより、Th2 サイトカインの産生が抑制されることを見いだしたが、-catenin 欠損 CD4 T 細胞で Th2 サイトカインの産生が上昇しなかった。さらに、TGF シグナル、TGF の Th2 サイトカイン産生抑制作用も -catenin の欠損では影響を受けなかった。

そこで、研究の方針を変更し、TGF により発現が調節され、Th2 サイトカイン産生やアレルギー性炎症の制御に関与する分子の探索を行い、転写因子 Sox4 を見いだした。Sox4 の発現は、TGF により誘導されるとともに、Sox4 のノックダウンにより TGF による Th2 サイトカイン産生抑制が、部分的に

に解除された。そこで、T 細胞特異的 Sox4 Tg マウス、T 細胞特異的 Sox4 欠損マウスを作製し解析を行ったところ、Sox4 による Th2 サイトカイン産生抑制とアレルギー性気道炎症の発症抑制が確認された。(Kuwahara et al. Nature Immunology, 2012)

(2) TGF / Sox4 経路による Th2 サイトカイン産生制御の分子機構を解析する過程で、IFN の存在下では、TGF は IL-4 と協調的に働き Th1 細胞の分化を誘導することがわかった。この IFN / IL-4/TGF によって誘導される Th1 細胞の遺伝子発現パターンは、細胞表面に CD103 を選択的に発現する、転写因子 Eomes を高発現するなど、IL-12 によって誘導される通常の Th1 細胞と大きく異なっていたため、この細胞を alternative Th1 (aTh1) 細胞と名付けた。解析の結果、aTh1 細胞は、IEL と性質が似ていることがわかった。(Tofukuji et al. J. Immunol. 2012)

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 3 件)

Kuwahara M, Suzuki J, Tofukuji S, Yamada T, Kanoh M, Matsumoto A, Maruyama S, Kometani K, Kurosaki T, Ohara O, Nakayama T and Yamashita, M.: Menin-Bach2 axis is critical for regulating CD4 T-cell senescence and cytokine homeostasis. *Nat. Commun.* 5: 3555 (2014) 査読あり

Kuwahara M, Yamashita M, Shinoda K, Tofukuji S, Onodera A, Shinnakasu R,

Motohashi S, Hosokawa H, Tumes D, Iwamura C, Lefebvre V and Nakayama T.: The transcription factor Sox4 is a downstream target of signaling by the cytokine TGF- β and suppresses Th2 differentiation. *Nat. Immunol.* 13:778-786 (2012) 査読あり

Tofukuji S, Kuwahara M, Suzuki J, Ohara O, Nakayama T, and Yamashita M.: Identification of a new pathway for Th1 cell development induced by cooperative stimulation with IL-4 and TGF β . *J. Immunol.* 188:4846-4857 (2012) 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

東福寺聡一、桑原誠、鈴木淳平、中山俊憲、小原収、山下政克：TGF は IL-4 を Th1 細胞分化誘導因子へと変換する 第 22 回 Kyoto T Cell Conference (2012/7/6-7) 京都

桑原誠、鈴木淳平、東福寺聡一、中山俊憲、小原収、山下政克：HMG box 型転写因子 Sox4 は TGF 刺激で誘導され、Th2 細胞分化を抑制する 第 22 回 Kyoto T Cell Conference (2012/7/6-7) 京都

TOFUKUJI Soichi, KUWAHARA Makoto, SUZUKI Junpei, OHARA Osamu, NAKAYAMA Toshinori, YAMASHITA Masakatsu.: TGF converts IL-4 into a Th1 cell inducer. 第 40 回日本免疫学会総会・学

術集会 (2011/11/27-29) 幕張市

KUWAHARA Makoto, IWAMURA Chiaki, SHINODA Kenta, TOFUKUJI Soichi, SUZUKI Junpei, NAKAYAMA Toshinori, YAMASHITA Masakatsu.: Sox4 acts as a downstream target of TGF and suppresses Th2 type immune responses. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会 (2011/11/27-29) 幕張市

山下政克、東福寺聡一、鈴木淳平、桑原誠：Th2 細胞分化・機能の調節を介した気道炎症制御 第 48 回日本小児アレルギー学会 (2011/10/28-30) 福岡

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 政克 (Yamashita Masakatsu)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00311605

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし