

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：82610

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890297

研究課題名(和文) Schnurri-3 を介した免疫応答制御機構の解明

研究課題名(英文) Role of Schnurri-3 for immune response

研究代表者

関 陽一 (SEKI, YOICHI)

独立行政法人国立国際医療研究センター・免疫制御研究部・上級研究員

研究者番号：80637059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000 円、(間接経費) 690,000 円

研究成果の概要(和文)：Schnurri-3 (Shn-3)はT細胞の活性に伴い発現が誘導される分子である。T細胞特異的Shn-3欠損マウスにTh2免疫応答を起こす抗原を免疫した所、それに伴うTh2サイトカインおよびIgの産生がコントロールマウスに比べ低下していた。一方、Shn-3欠損CD4T細胞をTh17細胞分化誘導条件下で培養を行ったところ、Shn-3欠損T細胞ではTh17分化が優位に促進された。さらにT細胞特異的Shn-3欠損マウスにEAEを誘導した所、臨床スコアがコントロールマウスに比べ優位に悪化した。これらの結果より、Shn-3は機能型ヘルパーT細胞の分化において重要な働きがある分子である事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Schnurri-3 (Shn-3) is an essential molecule for the early stage of Th2 differentiation for regulation of IL-4 production by AP-1. Upon immunization with antigen, T cell-specific Shn-3 conditional knockout (Shn-3 TKO) mice had low IgE production compared to immunized control mice. Moreover, when CD4+CD62L+ naive T cells were cultured under condition to promote Th17 differentiation, Shn-3-deficient CD4+T cells differentiated to a Th17 phenotype more frequently than control CD4+T cells. Furthermore, Shn-3-TKO mice exhibited intense exacerbation of development and progression of T cell-mediated autoimmune disease EAE. These data suggest that Schnurri-3 plays an important role in determining the phenotype of helper T cells during an immunoresponse.

研究分野：14

科研費の分科・細目：6913

キーワード：免疫学 シグナル伝達 Schnurri-3 ヘルパーT細胞

1. 研究開始当初の背景

ウイルスや細菌等から身を守る免疫応答の要として存在するヘルパーT細胞の分化には、T細胞レセプター(TCR)およびサイトカインレセプターからのシグナルの存在が重要な働きを担っている。これまでに申請者は Schnurri-3 (Shn-3)がT細胞の活性化後にその発現が誘導され、Th2細胞分化の促進に寄与し、Th2型の免疫応答に関与する分子であることを明らかにしてきた。一方、Shn-3は様々な免疫細胞において発現している事が分かっており、T細胞以外の免疫細胞においても何らかの働きがあると考えられるが、その役割についてはいまだ不明のままである。一方、理研などのマイクロアレイのデータベースより、Shn-3は様々な免疫細胞において発現している事が明らかとなっているが、その役割についてはいまだ不明のままである。また、ショウジョウバエのShn、哺乳類のShn2が発生・分化に重要であるTGF- β シグナルに寄与することが報告されているが、TGF- β シグナル2におけるShn-3の役割は明らかとなっていない。近年、TGF- β シグナルは新しく発見されたヘルパーT細胞であるTh17、Th9または誘導性制御性T(iTreg)細胞の分化に必要であること、またB細胞におけるIgAのクラススイッチに必要なことが明らかとなっていることから、T細胞やB細胞において発現が確認されるShn-3がこれらの細胞におけるTGF- β シグナルにも関与することが示唆される。

2. 研究の目的

上記の背景をふまえ、本研究では、ヘルパーT細胞におけるShn-3の更なる役割を解明しつつ、Shn-3のTGF- β シグナルへの関与を検討する。さらに、Cre-Loxpシステムを用い、様々な免疫細胞特異的Shn-3欠損マウスを作製し、T細胞以外の様々な免疫細胞におけるShn-3の役割を解明し、生体防御反応におけるShn-3の役割を明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験使用動物

Schnurri-3のexon4をloxP配列で挟んだ遺伝子改変マウスを作成し、CD4-creトランスジェニックマウスと交配する事でT細胞特異的Shn-3欠損マウスを樹立した。コントロールマウスとしてCD4-creトランスジェニックマウスを使用した。両マウスともC57BL/6マウスに10回戻し交配したマウスを使用した。

(2) 末梢リンパ組織からのnaïve CD62L⁺CD4T細胞の単離精製

脾臓細胞からのnaïve CD62L⁺CD4T細胞細胞の単離精製にはMiltenyi biotecのNaive CD4⁺ T Cell Isolation Kit (130-104-453)を使用した。実験に使用したCD62L⁺CD4T細胞

は90%以上の精製率の細胞を使用した。

(3) ヘルパーT細胞分化誘導法

CD62L⁺CD4T細胞を抗CD3抗体(5 μ g/ml: plate coated)と抗CD28抗体(2 μ g/ml: soluble)で刺激を行い、Th1分化環境: mrIL-12 (10ng/ml)、抗IL-4抗体(10 μ g/ml: soluble)、Th2分化環境: mrIL-4 (10ng/ml)、抗IL-12抗体(10 μ g/ml)、抗IFN γ 抗体(10 μ g/ml)、Th17分化環境: mrIL-6 (20ng/ml)、mrIL-23 (10ng/ml)、hrTGF β (2.5ng/ml)、抗IL-4抗体(2 μ g/ml)、抗IFN γ 抗体(2 μ g/ml)の環境化で培養を行った。その後、細胞内サイトカイン染色法により産生しているサイトカインの検出を行った。

(4)非リンパ組織 CD4T細胞からのサイトカイン産生の検出

非リンパ組織からリンパ球を精製、分離し、1x10⁶細胞をモネンシン: 2 μ Mの存在下でPMA (Phorbol 12-Myristate 13-acetate): 10ng/ml、ionomycin: 1 μ g/mlで4時間刺激を行い、4%パラホルムアルデヒドで固定を行い、0.5%Traiton-Xを含む細胞透過処理溶液で透過処理を行い、その後抗サイトカイン抗体を用いて細胞内染色を行い、非リンパ組織CD4T細胞からのサイトカイン産生を検出した。

(5) OVA免疫とOVA特異的Igの検出

コントロールマウスとT細胞特異的Shn-3欠損マウスおよびB細胞特異的Shn-3欠損マウス(各8~9匹)にAlumと卵白アルブミン(OVA: 1mg/ml)を等量混和し、200 μ l/マウスで腹腔内注射により免疫を行う。免疫16日後にOVAのみで再免疫を行う。免疫0、11または14、19日に血清を回収し、OVA特異的な血清中のIgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgA、IgEをELISAにより検出を行った。

(6)S. mansoni egg 投与

マウスに凍結融解を繰り返す事で非活性化状態のS. mansoni eggs (D. Jankovic 博士, NIH, Bethesda, MD, からの贈与)を5x10³ eggs/マウスで腹腔内投与を行い、6週間後に脾臓細胞をsoluble egg antigen (SEA, D. Jankovic 博士, NIH, Bethesda, MD, からの贈与) 0, 1, 5, 20 mg/mlでin vitroにおける再刺激を行い、培養3日後の培養上清中のサイトカインをELISAにより検出した。

(7) 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)

野生型マウスおよびT細胞特異的Shn-3欠損マウスにMOG₃₅₋₅₅ペプチド100 μ gとCFAを200 μ l/マウスで等量混和し、エマルジョン化したペプチドを左右の背中と両脇腹に各50 μ lずつ皮下注射を行う。

Pertussis Toxin (PTx)を感作当日と2日後の2回200ng/PBS 200ml/マウスで投与する。MOGペプチド感作後7日より、臨床スコアを観察する。臨床スコアは以下の通りとした。

0: 正常、1: 尾の先が垂れる、2: 尾の完全下垂、3: 片後肢麻痺、4: 両後肢麻痺、5: 前肢麻痺を含む両後肢麻痺、6: 死亡

4. 研究成果

1) T細胞特異的 Shn-3 欠損マウスに Th2 免疫応答を起こす抗原 (Figure.1A) や寄生虫卵抗原 (Figure.1B) を免疫し、これら抗原に対する免疫応答を解析したところ、T細胞特異的 Shn-3 欠損マウスでは野生型マウスに比べ IL-4 や IL-5 などの Th2 サイトカインの産生および抗原特異的 IgG1 および IgE の産生などの Th2 免疫応答が顕著に減少していた。

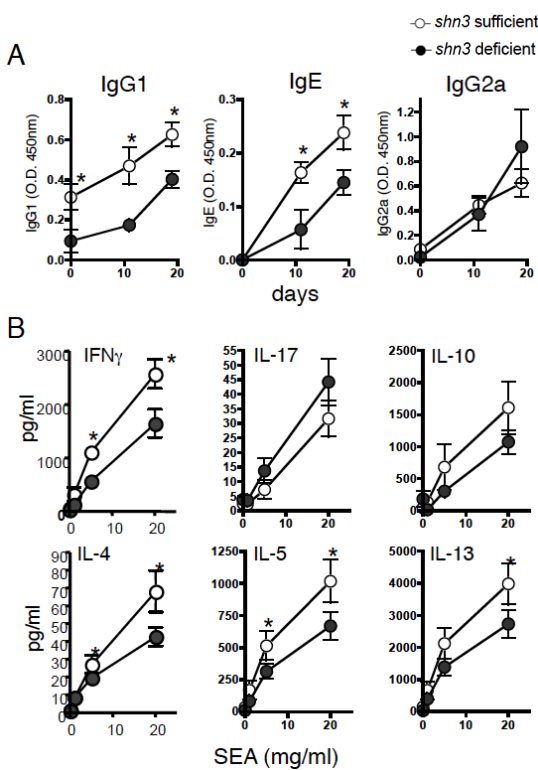


Figure 1. Impaired Th2 responses by T cell specific *shn-3*-deficient mice

(A) Antigen-specific IgG1, IgG2a and IgE in the serum from *shn-3*-sufficient (○, n = 4) or deficient (●, n = 4) mice immunized with OVA in alum (day 0). Mice were re-immunized with OVA in PBS at day 16. Serum from each mouse was obtained and examined 0, 11 and 19 days after immunization by ELISA. (B) *In vitro* recall response by CD4 T cells from *shn-3*-sufficient (○, n = 8) or -deficient (●, n = 8) mice immunized with inactivated *S. mansoni* eggs. Mice were injected intraperitoneally with inactivated *S. mansoni* eggs and splenocytes were collected 6 weeks later. Splenocytes were then re-stimulated for 3 days with soluble SEA (0, 5, or 20mg/ml) and the amount of secreted

cytokines was determined by ELISA using culture supernatant. Data are from four (A) or eight (B) independent experiments. **P* < 0.05 (Student's t-test, mean and s.e.m.).

2) また、Shn-3 欠損 CD4T 細胞では AP-1 の DNA 結合能が減少している事が原因で初期刺激における IL-4 産生の減少が示唆されていた事から、Shn-3 欠損 CD4T 細胞における AP-1 遺伝子である *c-jun*, *Junb* の mRNA の発現量を定量的 PCR を用いて検討を行ったが、野生型 CD4T 細胞と Shn-3 欠損 CD4T 細胞との間でこれら遺伝子の mRNA の発現量に差は認められなかった (Figure 2)。これらの事から、Shn-3 は AP-1 分子の安定性を高めることで IL-4 産生を促進する可能性が示唆された。

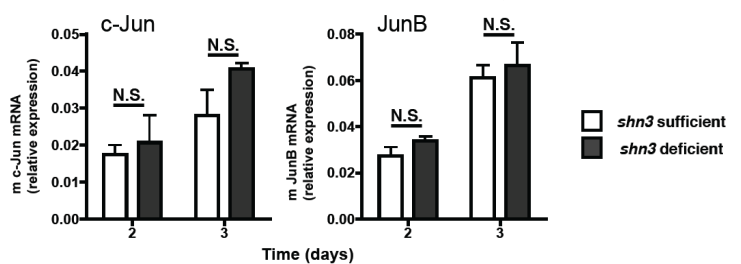


Figure 2. Reduced expression of AP-1 components by activated *shn-3*-deficient CD4⁺ T cells

Expression of *c-jun* and *junb* mRNA by *shn-3*-sufficient or deficient CD4 T cells. *shn-3* sufficient (open bars) or deficient (closed bars) CD4 T cells were stimulated anti-CD3 plus anti-CD28 mAbs and mRNA was isolated after 2 or 3 days stimulation. *c-jun* and *junb* mRNA level was determined by real time PCR.

3) さらに T 細胞における Shn-3 の役割の解明のため、非免疫時における肺や腸管などの非リンパ系組織中の CD4T 細胞がどのようなサイトカイン産生しているかを確認したところ、T細胞特異的 Shn-3 欠損マウスでは、自己免疫疾患の発症に深く関与する IL-17 産生 CD4T 細胞 (Th17) の割合がコントロールマウスと比べ優位に増加していた。そこでナイーブ CD4T 細胞を Th17 細胞分化誘導条件下で培養を行ったところ、Shn-3 欠損 CD4T 細胞では野生型 CD4T 細胞に比べ、優位に Th17 分化が促進された (Figure 3)。

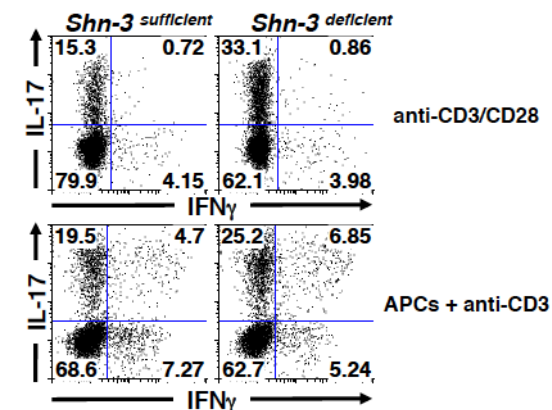


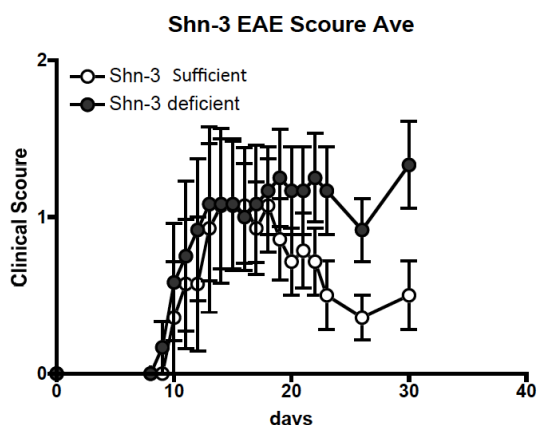
Figure 3. Enhanced Th17 differentiation in Schnurri-3 deficient CD4⁺T cells under the Th17 induction condition

CD4⁺CD62L^{hi} naive T cells from *Shn3* sufficient and *Shn3* deficient mice were stimulated plate-bound anti-CD3 (5μg/ml) plus anti-CD28 (2μg/ml) or APCs plus soluble anti-CD3 (1μg/ml) with Th17 culture condition. (A) After 3 days, IFNγ- and IL-17-producing cells were analyzed by intracellular cytokine staining.

4) Th17 分化誘導条件の培養において *Shn-3* 欠損 CD4T 細胞では Th17 分化の促進が認められた事から、Th17 がその発症に大きく関与する実験的自己免疫性脳脊髄炎(Experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)を用いて検討を行った。すると T 細胞特異的 *Shn-3* 欠損マウスは EAE 誘導後、コントロールマウスに比べ臨床スコアが優位に悪化した (Figure 4)。

Figure 4. Enhanced EAE clinical score in T cell specific Schnurri-3 deficient mice.

5) Th17 分化に重要な TGF- β , IL-6, IL-23 について検討したところ、CD4T 細胞において *Shn-3* はこれらサイトカンに対して影響を及ぼさなかった。一方、T 細胞が産生する IL-2 は Th17 分化抑制因子である事が報告されている。*Shn-3* 欠損 CD4T 細胞は野生型 CD4T 細胞に比べて、抗原刺激時における IL-2 産生



が低い事から、これが原因で Th17 細胞分化が促進しているのではないかと仮説を立て、IL-2 または抗 IL-2 抗体を Th17 分化誘導条件下に加え培養した。すると予想通り、*Shn-3* 欠損 CD4T 細胞の IL-17 分化を制御する事が出来た。これら結果より、CD4T 細胞において *Shn-3* は IL-2 産生を制御する事で Th17 分化を制御している事が明らかとなった (Figure 5)。

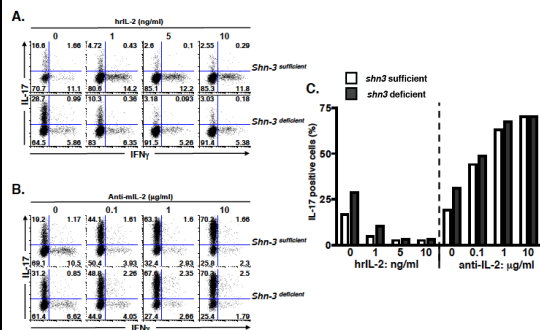


Figure 5. Enhanced Th17 differentiation in Schnurri-3 deficient CD4⁺T cells is dependent on IL-2.

CD4⁺CD62L^{hi} T cell from *Shn3* sufficient CD4^{cre} and *Shn3* deficient mice were stimulated with anti-CD3 plus anti-CD28, in the presence of various concentrations of hIL-2 (A) or various concentrations of anti-mouse IL-2 (B). After 7 days IFN-gamma- and IL-4-producing cells were analyzed by intracellular cytokine staining. (C) The percentage of IL-4+ cells at day 7 of stimulation with the (A), (B) culture condition.

6) B 細胞における *Shn-3* の役割を検討するため、B 細胞特異的 *Shn-3* 欠損マウスを作成し、OVA/Alum 免疫後における血清中の IgG1, IgG2b, IgG2c, IgM, IgA, IgE 産生について ELISA を用い検討したが、コントロールマウスと B 細胞特異的 *Shn-3* 欠損マウスの間に有為な差は認められなかった。

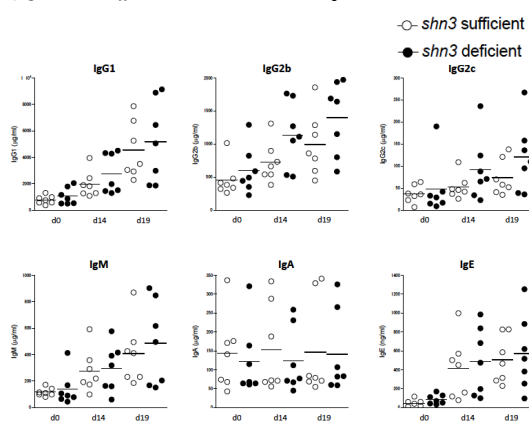


Figure 6. Immune globulin production by B cell specific *shn-3*- deficient mice

Antigen-specific IgG1, IgG2b, IgG2c, IgM, IgA and IgE in the serum from *shn-3*-sufficient (○, n = 6~8) or deficient (●, n = 6~8) mice immunized with OVA in alum (day 0). Mice were re-immunized with OVA in PBS at day 16. Serum from each mouse was obtained and examined 0, 14 and 19 days after immunization by ELISA.

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) Katayama H, Mori T, Seki Y, Anraku M, Iseki M, Ikutani M, Iwasaki Y, Yoshida N, Takatsu K, Takaki S.: Lnk prevents inflammatory CD8+ T cell proliferation and contributes to intestinal homeostasis, Eur J Immunol, 2014, impress

2) Yamamoto M, Seki Y, Iwai K, Ko I, Martin A, Tsuji N, Miyagawa S, Love RB, Iwashima M.: Ontogeny and localization of the cells produce IL-2 in healthy animals, Cytokine, 2013, 61, 831-841

[学会発表](計 4 件)

1) SEKI Yoichi, KATAYAMA Hiroko, MORI Taizo, ISEKI Masanori, TAKAKI Satoshi: Lnk/Sh2b3 Adaptor Protein Prevents the Accumulation of Inflammatory CD8 + T Cells and Intestinal Villous Atrophy, 第 42 回 日本免疫学会学術集会、2013 年 12 月 11~13 日、千葉

2) 関 陽一、山本 睦美、岩島 牧夫: Schnurri-3 はナイーブ CD4T 細胞における初期の IL-4 産生に必要である, 第 36 回 日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3~6 日、神戸

3) 関 陽一、山本 睦美、岩島 牧夫: Schnurri-3 is required for early IL-4 production in CD4 T cells, JSICR-MMCB 2013, 2013 年 5 月 20~21 日、東京

4) 関 陽一、山本 睦美、岩島 牧夫: Schnurri-3 is required for early Th2 differentiation of CD4 T cells, 第 41 回 日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 5~7 日、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関 陽一 (SEKI YOICHI)

国立国際医療研究センター研究所

免疫制御研究部・上級研究員

研究者番号: 80637059