

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670234

研究課題名(和文) T細胞分化制御のシステムバイオロジー

研究課題名(英文) Systemic Biology of T cell differentiation

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

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)：ヘルパーT細胞は免疫制御の中心を担う細胞である。近年、Th1、Th2以外に多くのサブタイプ(Th9、Th17、iTreg等)が存在していることが知られるようになってきた。本研究ではTGFβのシグナル伝達経路を中心にヘルパーT細胞各サブタイプへの分化制御機構の解明を行った。まずTGFβとIL-4によるTh9分化にはSmad2/3に依存し、さらにIRF4との共同作用が必要であることを明らかにした。さらに消化管におけるiTregの誘導には樹状細胞からのTGFβが重要であること、TGFβの産生には腸内細菌によるTLR2-AP1経路とSmad3経路が重要であることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Helper T cells have been thought to play a central role in not only acquired immune responses but also in immune regulation. Recently, several subsets such as Th9, Th17 and iTreg have been discovered in addition to Th1 and Th2. Differentiation of each helper T cell subset is extremely complicated. Thus, we have tried to define the mechanism of helper T cell differentiation by focusing on TGF-beta signaling. We discovered Th9 differentiation by TGF-beta and IL-4 is Smad2/3 dependent and required for IRF4 transcription factor. We also found that TGF-beta from dendritic cells plays important role in iTreg differentiation in the gut. We showed that the TLR2-AP-1 pathway as well as the Smad3 pathway are critical for TGF-beta production by intestinal microflora.

研究分野：分子免疫学

キーワード：サイトカイン シグナル伝達 転写因子 ヘルパーT細胞 制御性T細胞 TGFβ モデル化

1. 研究開始当初の背景

免疫応答には自然免疫と獲得免疫があり、抗原特異性を有する獲得免疫系のT細胞やB細胞は自然免疫系の細胞から抗原を受けとり活性化される。T細胞にはヘルパーT細胞と細胞障害性T細胞(CTL)が存在する。ヘルパーT細胞は免疫の司令塔と言われ、各種サイトカインを放出して、実行部隊であるB細胞、CTL、自然免疫系の細胞群に指令を出す。ここでマクロファージや樹状細胞などの自然免疫系の細胞はIL-6やIL-12, IL-23などを産生してヘルパーT細胞の分化を決定付け、さらに分化したヘルパーT細胞からのサイトカインは自然免疫系の細胞を活性化あるいは抑制する。このように複数の細胞群が多彩なサイトカインを介してキャッチボールのように情報交換を行っている様子からサイトカインネットワークと呼ばれる。

免疫システムは正負のシグナルがバランスを保って進行することで恒常性が維持される。一方でこのバランスにはある程度の弾性があり、免疫シグナルの強度が免疫応答の性質を決定する。ヘルパーT細胞には免疫を正に推進するエフェクターT細胞と負に制御する抑制性T細胞Tregが存在する。エフェクターT細胞はTh1, Th2, Th9, Th17などが知られており、炎症性サイトカイン(IFN γ , IL-4, IL-9, IL-17など)を産生し免疫応答を推進する。TregはIL-10やTGF β などの抗炎症性サイトカインを産生し免疫寛容の維持に働く。またTGF β は誘導性Treg(iTreg)を誘導する。このように正負の細胞とサイトカイン類を介した免疫応答制御は極めて複雑なネットワークを形成しており、シグナルや分子の還元論的な解析のみでは制御系の全貌を理解することは困難である。

2. 研究の目的

ヘルパーT細胞は、各サブタイプが様々なサイトカインを産生すると共に、様々なサイトカインで分化や増殖が促進されたり抑制されたりするので、各サブタイプへの分化は非常に複雑である。本研究ではサイトカインによるTh分化の制御機構を明らかにする。ナイーブT細胞はT細胞受容体刺激時にTGF β が存在することで、抑制性T細胞のマスタ遺伝子である*Foxp3*が誘導されiTregに分化する。あるいはIL-4が共存する場合にTh9と呼ばれるIL-9産生性Th細胞に分化する。iTregは主に消化管に大量に存在し腸内細菌、特にクロストリジウム属菌によって誘導されることが知られている。しかしながらどの

ようなメカニズムでTGF β とIL-4がTh9が誘導されるのか、あるいはクロストリジウム属がiTreg誘導を行うのかは明らかではない。本研究では本研究ではTGF β のシグナルを中心にSmad2/3欠損マウスを利用してTregやTh9分化誘導のメカニズムの解明をめざした。またThサブセットのバランスを決定するメカニズムを明らかにするためにヘルパーT細胞各サブタイプへの分化のシミュレーションモデル化を試みる。

3. 研究の方法

(1)TGF β によって活性化される主な転写因子はSmad2とSmad3である。Smad3はDNAに直接結合しうるもののSmad2は他の転写因子と会合することで転写調節を行う。したがってSmad2とSmad3は機能的に異なる可能性が考えられる。しかしSmad3欠損マウスは重篤な自己免疫疾患は発症しない。そこでSmad2とSmad3の機能的相違を解明するためにT細胞特異的および樹状細胞特異的Smad2欠損(cK0)マウスを作製した。

(2)消化管におけるiTreg誘導機構を解明するためにプロバイオテックスとしても用いられている*Clostridium Butyricum*(CB)菌の芽胞をマウスに2週間投与した。Tregの抗炎症作用はマウスにデキストラン硫酸を投与して誘導性腸炎を観察した。以前より消化管にはiTregを誘導するCD103陽性の粘膜樹状細胞(LPDC)が存在することが知られている。LPDCを単離しTGF β の発現を調べた。

(3)サイトカインの各サブタイプの影響により、Th0から各サブタイプへの分化や各細胞の増殖の反応速度を増加(促進)したり減少(抑制)したりするという簡略化したシミュレーションモデルを用いた。このモデルでサブタイプ相互の関係を明らかにした上で、細胞内シグナル伝達系の反応をモデル化する詳細なモデルの構築を行う。

4. 研究成果

(1)近年になって新しく発見されたIL-9産生T細胞(Th9)の分化にもTGF β が必要であることが報告されている。IL-9はアレルギー性喘息やアトピー性皮膚炎、寄生虫感染に関わっているサイトカインである。Th9細胞はIL-4およびTGF β の刺激によって分化が誘導される。一旦分化したTh2細胞からもTGF β の刺激によって分化可能であることが知られている。しかしながらTh9分化においてSmad2/3の必要性は明らかにされておらず、IL-9産生の詳しいメカニズムはわかって

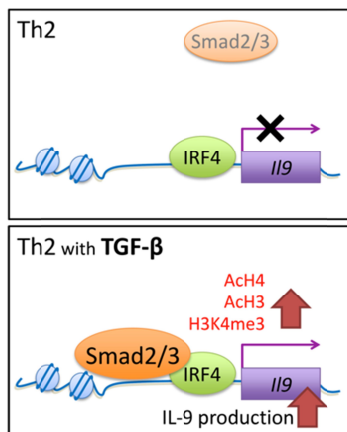
いない。

TGF- β 依存性 IL-9 産生は Smad2 欠損 Smad3 へテロ (Smad2^{-/-}Smad3^{+/-}) マウス T 細胞ではほぼ完全に IL-9 産生能が失われていた。さらに Smad2 や Smad3 単独欠損マウス T 細胞では部分的にしか減少しないことから、Smad2/3 は IL-9 産生において必要不可欠であり、Smad2 と Smad3 は互いに重複性をもっていることが考えられた。IL-9 promoter 上のヒストン修飾をクロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) を用いて解析を行ったところ、Th9 において遺伝子転写促進性のヒストン H3 アセチル化 (AcH3) やヒストン H3 リジン K4 トリメチル化 (H3K4me3) が Th2 と比較し増加していることが確認された。さらに Smad2^{-/-}Smad3^{+/-}Th9 では AcH3 および H3K4me3 が大幅に減弱しており、TGF- β は Smad2/3 を介して IL-9 promoter 上において転写促進性のヒストン修飾を誘導していることが示された。

次に Smad2/3 がどのような分子と協調して働いているかを調べた。転写因子である IRF4 が Th9 分化に必要不可欠であることは既に報告されている。Th9 において IRF4 と Smad2/3 が IL-9 promoter 上の同じ領域に結合しており、さらに免疫沈降法によって両者が互いに結合していることが確認された。IRF4KO マウスを使った実験では IRF4KO Th9 において IL-9 promoter 上に Smad2/3 がリクルートできず、Smad2/3 のリクルートは TGF- β および IRF4 に依存していることが明らかになった (図参照)。

IL-9 はアレルギー性喘息の病態悪化に関与していることから、T 細胞特異的 Smad2/3 欠損マウスモデルを行った。WT と比較し

cK0 マウスにおいて肺胞洗浄液中の浸潤細胞数と肺組織における粘液産生細胞数の現象が確認された。さらに喘息マウスより脾臓を採取し、OVA で脾細胞を刺激したところ、cK0 マウス脾細胞において IL-9 の発現が著明に減少していた。よって cK0 マウスでは T 細胞由来の IL-9 産生低下によって喘息症状が軽度になっていることが考えられた。



以上より、TGF- β -Smad2/3 シグナルは Th9 分化に必要不可欠であり、IRF4 と協調して IL-9 産生に働いていることが明らかになった (図 3)。免疫抑制性サイトカインとして知られる TGF- β -Smad2/3 シグナルが炎症性の細胞である Th9 分化に関わっていることは新たな発見である。

(2) iTreg は主に消化管に大量に存在し腸内細菌、特にクロストリジウム属菌によって誘導されることが知られている。しかしながらどのようなメカニズムでクロストリジウム属が TGF- β 産生、ひいては iTreg 誘導を行うのかは明らかではない。本研究では樹状細胞におけるクロストリジウム属による TGF- β の産生機構と iTreg 誘導機構の解明をめざした。

Clostridium Butyricum (CB) 菌の芽胞をマウスに 2 週間投与したところ iTreg の増加と DSS 誘導性腸炎の抑制が見られた。このときに TGF- β 抗体を投与すると iTreg の増加や DSS 腸炎抵抗性は見られなくなった。よって CB は TGF- β を介して iTreg を誘導していると考えられた。次にどの細胞が TGF- β を産生するのかを調べたところ CB 処理によって LPDC において TGF- β の発現が 30-50 倍に増強された。この発現量は単離された腸上皮細胞の 10 倍以上であった。さらに試験管内でも単離 LPDC においては CB に反応して TGF- β の発現上昇を認めた。

CB はグラム陽性菌でありその主な樹状細胞活性化菌体成分はペプチドグリカン (PGN) である。PGN は TLR2 を活性化する。実際に試験管内で LPDC や骨髄由来樹状細胞 (BMDC) は PGN 刺激で TGF- β 産生が促進され、TLR2 欠損 DC ではこのような誘導はみられなかった。これらの結果から CB は TLR2 を介して TGF- β の産生を誘導し iTreg を増加させていると考えられた。

次に TLR2 のどのシグナルが TGF- β 産生に重要なのかを調べるために各種シグナルの阻害剤の効果を検討した。この結果 ERK 阻害剤が強力に TGF- β 産生を抑制した。ERK 系の下流の転写因子は c-Fos がよく知られている。c-Fos は c-Jun とのダイマーで AP-1 転写因子を形成する。実際に TGF- β プロモーターの転写開始点上流 1.3kb 付近に AP1 結合領域が存在し、ChIP アッセイの結果 TLR2 刺激によって AP1 がこの領域にリクルートされることがわかった。さらに c-fos 欠損マウスより作製した樹状細胞では PGN による AP1 結合領域付近のヒストンアセチル化の減弱と TGF- β 産生の減少が認められた。

さらに阻害剤のスクリーニングからTGFの産生にはTGFのシグナルが必要であることが明らかとなった。すなわちTGFはTGFによるオートクライン誘導機構が存在することがわかった。そこでTGFの主要な下流の転写因子であるSmad2とSmad3のTGF遺伝子転写への寄与を調べた。PGNやTGFによるTGF産生はSmad3欠損樹状細胞で著しく減少し、Smad2欠損では逆に増加した。TGFプロモーターにルシフェラーゼをつないだレポーター遺伝子の解析ではSmad3はレポーターを活性化したがSmad2にはその能力がなかった。ChIPアッセイではSmad3は転写開始点付近にリクルートされSmad2はその近傍の少し離れた場所にリクルートされていた。p300ヒストンアセチル転移酵素はSmad3と結合するがSmad2とは結合しないことが知られている。p300はSmad3と同一にリクルートされSmad2欠損によってそのリクルートが増加した。以上の結果より、TGF産生にはSmad3を介したオートクライン誘導が必須でありその過程はSmad2によって抑制される事が明らかとなった。

本研究によってTGF転写のエピジェネティック制御が明らかになった。Smad2欠損樹状細胞はiTregを誘導することからSmad2欠損樹状細胞は腸炎や自己免疫疾患の治療に応用できる可能性がある。さらにこの知見を応用した免疫疾患の治療の可能性も示唆された。

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 12 件) **すべて査読有り**

1. Okamoto S, Fujiwara H, Nishimori H, Matsuoka K, Fujii N, Kondo E, Tanaka T, Yoshimura A, Tanimoto M, Maeda Y. Anti-IL-12/23 p40 Antibody Attenuates Experimental Chronic Graft-versus-Host Disease via Suppression of IFN- γ /IL-17-Producing Cells. *J Immunol*. 2015 Feb 1;194(3):1357-63. doi: 10.4049/jimmunol.1400973.
2. Morita R, Suzuki M, Kasahara H, Shimizu N, Shichita T, Sekiya T, Kimura A, Sasaki K, Yasukawa H, Yoshimura A. ETS transcription factor ETV2 directly converts human fibroblasts into functional endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Jan 6;112(1):160-5. doi: 10.1073/pnas.1413234112.

3. Fukaya T, Someya K, Hibino S, Okada M, Yamane H, Taniguchi K, Yoshimura A. Loss of Sprout4 in T cells ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by negatively regulating IL-1 β receptor expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 May 9;447(3):471-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.04.012. Epub 2014 Apr 13.
4. Kimura A, Abe H, Tsuruta S, Chiba S, Fujii-Kuriyama Y, Sekiya T, Morita R, Yoshimura A. Aryl hydrocarbon receptor protects against bacterial infection by promoting macrophage survival and reactive oxygen species production. *Int Immunol*. 2014 Apr;26(4):209-20. doi: 10.1093/intimm/dxt067.
5. Abe H, Kimura A, Tsuruta S, Fukaya T, Sakaguchi R, Morita R, Sekiya T, Shichita T, Chayama K, Fujii-Kuriyama Y, Yoshimura A. Aryl hydrocarbon receptor plays protective roles in ConA-induced hepatic injury by both suppressing IFN- γ expression and inducing IL-22. *Int Immunol*. 2014 Mar;26(3):129-37. doi: 10.1093/intimm/dxt049.
6. Takasato F, Morita R, Shichita T, Sekiya T, Morikawa Y, Kuroda T, Niimi M, Yoshimura A. Prevention of allogeneic cardiac graft rejection by transfer of ex vivo expanded antigen-specific regulatory T-cells. *PLoS One*. 2014 Feb 3;9(2):e87722. doi: 10.1371/journal.pone.0087722.
7. Nishimoto S, Kotani H, Tsuruta S, Shimizu N, Ito M, Shichita T, Morita R, Takahashi H, Amagai M, and Yoshimura A. Psoriasis-Th17 cells carrying TCR recognizing epidermal autoantigen induce psoriasis-like skin inflammation" *J Immunol* 2013;191(6):3065-72. doi: 10.4049/jimmunol.1300348.11.
8. Tamiya T, Ichiyama K, Kotani H, Fukaya T, Sekiya T, Shichita T, Honma K, Yui K, Matusyama T, Nakao T, Fukuyama S, Inoue H, Nomura M and Yoshimura A Smad2/3 and IRF4 Play a Cooperative Role in IL-9-Producing T Cell Induction *J Immunol* 2013;191(5):2360-71. doi: 10.4049/jimmunol.1301276.
9. Carow B, Reuschl AK, Gavier-Widén D, Jenkins BJ, Ernst M, Yoshimura A, Chambers BJ,

10. Rottenberg ME. Critical and Independent Role for SOCS3 in Either Myeloid or T Cells in Resistance to Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathog.* 2013 Jul;9(7):e1003442. doi: 10.1371/journal.ppat.1003442.

11. Hayashi A, Sato T, Kamada N, Mikami Y, Matsuoka K, Hisamatsu T, Hibi T, Roers A, Yagita H, Ohteki T, Yoshimura A, Kanai T. A Single Strain of Clostridium butyricum Induces Intestinal IL-10-Producing Macrophages to Suppress Acute Experimental Colitis in Mice. *Cell Host Microbe.* 2013 Jun 12;13(6):711-22. doi: 10.1016/j.chom.2013.05.013.

12. Hanada T, Weitzer S, Mair B, Bernreuther C, Wainger BJ, Ichida J, Hanada R, Orthofer M, Cronin SJ, Komnenovic V, Minis A, Sato F, Mimata H, Yoshimura A, Tamir I, Rainer J, Kofler R, Yaron A, Eggan KC, Woolf CJ, Glatzel M, Herbst R, Martinez J, Penninger JM. CLP1 links tRNA metabolism to progressive motor-neuron loss. *Nature.* 2013 Mar 28;495(7442):474-80. doi: 10.1038/nature11923.

13. 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 Feb 15;190(4):1778-87. doi: 10.4049/jimmunol.1202495.

〔学会発表〕(計 5 件)

1) KASHIWAGI Ikko, YOSHIMURA Akihiko
TGF- β 1 Expression Is Triggered by Gram-positive Bacterium Clostridium butyricum and Promoted by Autocrine Effect Mediated by Smad3 in Dendritic Cells
日本免疫学会 平成26年12月12日 京都国際会議場(京都市)

2) TAMIYA Taiga, YOSHIMURA Akihiko
Epigenetic histone modifications and gene expression patterns are different in short-cultured Th17 and long-cultured Th17 cells
日本免疫学会 平成26年12月11日 京都国際会議場(京都市)

3) Yamada Satoshi, YOSHIMURA Akihiko, ATSUMI Toru, MURAKAMI Masaaki
Computer model analysis of the difference between F759 and wild type mice in rheumatoid-like arthritis emergence
日本免疫学会 平成26年 12月10日京都国際会議場(京都市)

4) Satoshi Yamada, Akihiko Yoshimura
Computer model of rheumatoid arthritis 第42回日本免疫学会学術集会
平成25年12月12日 幕張メッセ(千葉市)

5) 山田訓, 吉村昭彦 リウマチのコンピュータモデル 第36回日本分子生物学会年会 平成25年12月5日 神戸国際展示場(神戸市)

〔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
<http://new2.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
山田 訓 (YAMADA SATOSHI)
岡山理科大学・工学部・教授
研究者番号: 20393506