

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893032

研究課題名(和文) 相反する生理作用を示すIL-6とIL-27の共通シグナル伝達分子の新たな作動機構

研究課題名(英文) Asymmetric action of STATs drive transcriptional outputs and cytokine specificity.

## 研究代表者

平原 潔 (Kiyoshi, Hirahara)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・客員准教授

研究者番号：00707193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、IL-6、IL-27に対するCD4 T細胞の反応をモデルとして用いて、サイトカインの多様な生理作用のメカニズムを規定する複数のSTATsの分子機構を解明した。その結果、STAT1は、IL-6、IL-27の特異性を規定している一方、STAT3は、遺伝子発現自体を規定していることを明らかにした。さらに、STAT1のDNA結合の大部分が、STAT3依存的に起こっていることを明らかにした。以上の研究成果は、2015年に国際的学術雑誌Immunityで発表された。

研究成果の概要(英文)：Interleukin-6 (IL-6) and IL-27 signal through a shared receptor subunit and employ the same downstream STAT transcription proteins, but yet are ascribed unique and overlapping functions. To evaluate the specificity and redundancy for these cytokines, we quantified their global transcriptomic changes and determined the relative contributions of STAT1 and STAT3 using genetic models and ChIP-seq approaches. We found an extensive overlap of the transcriptomes induced by IL-6 and IL-27 and few examples in which the cytokines acted in opposition. Using STAT-deficient cells and T cells from patients with gain-of-function STAT1 mutations, we demonstrated that STAT3 is responsible for the overall transcriptional output driven by both cytokines, whereas STAT1 is the principal driver of specificity. STAT1 cannot compensate in the absence of STAT3 and, in fact, much of STAT1 binding to chromatin is STAT3 dependent. Thus, STAT1 shapes the specific cytokine signature superimposed upon STAT3's action.

研究分野：医歯薬学

キーワード：免疫学 遺伝子 シグナル伝達 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

サイトカインは、生体内の免疫系システムにおいて細胞間の情報伝達を行う重要なタンパク質の一群であり、非常に多様な細胞応答を引き起こされる。サイトカインによる生理作用は、細胞内の様々な細胞内情報伝達経路の活性化によって引き起こされる。細胞内情報伝達経路において、Signal transducers and activators of transcription (STATs)は、情報の増幅を担う重要な転写因子群の一つであり、7種類 (STAT1-4, 5a, 5b, 6) がこれまでに同定されている (O'Shea JJ et al. *Immunity* 36: 542-50, 2012)。一方、サイトカインは、現在までに 200 種類以上同定されており、中でも STATs を活性化するサイトカインは、40 種類以上あることが知られている。一般的に、あるサイトカインによって最も強く活性化される STAT がそのサイトカインの情報伝達に最重要と考えられている (以下、“One-cytokine One-STAT model” と記す。図 1a)。例えば、CD4 T 細胞において、インターロイキン(IL-)12 は、STAT4 の活性化を介して T helper 1 (Th1) 細胞を誘導する。IL-4 による Th2 細胞への誘導は、STAT6 依存性である。しかし、“one-cytokine one-STAT 仮説”では、同定されているサイトカイン数と STATs 数の間に絶対的な数の不一致があり、生体におけるサイトカインの生理作用の多様性を説明できない。それでは、生体内でのサイトカインの多様性を保つために重要なメカニズムは何なのだろうか？われわれは CD4 細胞および IL-6, IL-27 の 2 つのサイトカインをモデルシステムとして採用し、様々なサイトカインによって活性化される複数の STATs の機能的均衡が、サイトカインの生理作用の多様に重要であるという仮説の証明に取り組んだ。

2. 研究の目的

- (1) サイトカインの多様な生理作用と細胞内情報伝達経路の関係については不明な点が多い。
- (2) 相反する生理作用を示す IL-6 と IL-27 が、複数の STATs で制御される新規機序を解明する。
- (3) ヒト免疫疾患 (STAT1 mutation) における新たな免疫低下の機序を解明する。

3. 研究の方法

(1) IL-6, IL-27 により誘導される遺伝子発現変動の定量的評価

相反する生理作用を有する IL-6 と IL-27 をモデルサイトカインとし、同サイトカインの受容体を発現しているヘルパーT細胞をモデル細胞として用いた。サイトカインの生理作

用を標的細胞の遺伝子発現変化を指標にして RNA-Seq 法を用いて解析した。IL-6, IL-27 刺激にそれぞれ特異的に反応する遺伝子群、共通に反応する遺伝子群をゲノムワイドに定量化した (図 1A)。

これらの遺伝子群 (1193 個) のうち、わずかに 22 個の遺伝子群が正反対に制御されていた

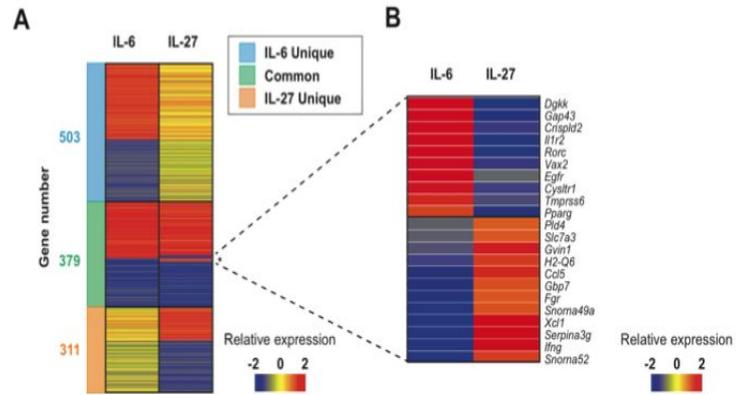


図1

(図 1B)。一つ一つの遺伝子を見ていくと、*Ifng* や *Ccl5*, *Rorc* といった免疫応答に重要な遺伝子がこれらのグループには含まれていた (図 1B)。引き続き、IL-6, IL-27 によりサイトカイン特異的な STAT1, STAT3 の二量体形成 (ホモ二量体・ヘテロ二量体) の時系列的变化を EMSA 法を用いて解析した (図 2)。その結果、サイトカイン刺激後 24 時間では、IL-6 は STAT3-STAT3 のホモダイマーを強く誘導する一方、IL-27 刺激によっては STAT1-STAT1 のホモダイマーが誘導されることが明らかになった。さらに、これらの二量体は刺激後 72 時間の時点で消失することが示された。

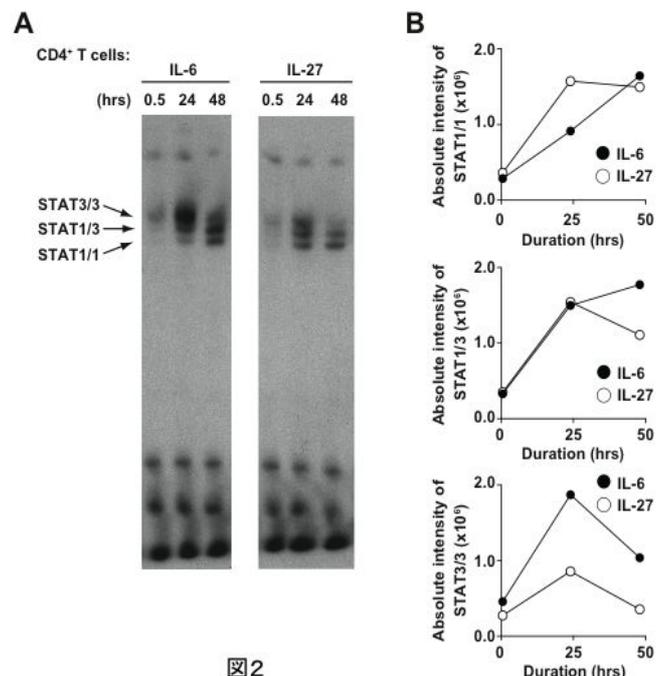


図2

## (2) STAT1, STAT3 協働による遺伝子発現調節機構の解析

続いてわれわれは、経時的な遺伝子発現変化における STAT1、STAT3 の役割を解析する目的で、サイトカイン刺激後 72 時間における STAT1 欠損マウス、STAT3 欠損マウス由来のヘルパー T 細胞を用いたサンプルの RNA-Seq 解析を行った。STAT1 欠損によって、IL-6、IL-27 刺激で誘導される遺伝子群間の特異性が失われた。一方、STAT3 欠損によって、両サイトカインにより誘導される遺伝子発現が著しく損なわれることが明らかとなった (図 3A, 3B)。

これは、相同性のあるシグナル伝達物質が非対称的機能を有することを明解に示した世界初の所見である。さらにわれわれは、経時的な遺伝子発現変化における STAT1、STAT3 の役割を解析する目的で、サイトカイン刺激後、6 時間、24 時間、72 時間のタイムポイントにおける STAT1 欠損マウス、STAT3 欠損マウス由来のヘルパー T 細胞を用いたサンプルの RNA-Seq 解析を行った (図 3C)。サイトカイン刺激後 6 時間の時点では、STAT1 欠損は、IL-27 特異的遺伝子の発現低下の原因となる一方、STAT3 欠損は、IL-6 特異的遺伝子の発現低下を引き起こした。STAT 欠損の影響は、刺激直後はサイトカイン特異的であったが、経時的にもう一方のサイトカインへ影響することが明らかになった (図 3C)。

## (3) STAT1, STAT3 の直接結合による遺伝子発現調節機構の解析

上記結果をふまえ、われわれは、次に IL-6、IL-27 刺激によって誘導される STAT1、STAT3 の機能的二量体が遺伝子発現誘導を調節する機構を解析する目的で、STAT1、STAT3 の

DNA への直接結合を ChIP-Seq 法を用いて解析した。まず、われわれは、全ゲノム上における STAT1、STAT3 の結合変化のダイナミクスについて解析を行った。

その結果、サイトカイン刺激で誘導される STAT1、STAT3 結合変化は、その 60%がサイトカイン刺激で出現する一方、20%はサイトカイン刺激で消失し、残りの 20%はサイトカイン刺激で変化がないという知見を得た (図 4A)。またわれわれは、STAT3 の結合ピーク数は、STAT1 の結合ピーク数と比較すると 2 倍以上存在することを見出だした (図 4B)。これは、IL-6、IL-27 で誘導される遺伝子発現の変化の大部分が STAT3 によって制御されているという (2) の結果を反映している。さらに、われわれは、遺伝子発現調節における STAT1、STAT3 の役割を解析する目的で、(1) で分類したそれぞれの遺伝子群 (IL-6 特異的遺伝子群、共通遺伝子群、IL-27 特異的遺伝子群) における STAT1、STAT3 の結合を定量化した。興味深いことに、IL-6 刺激で発現低下する遺伝子群において、STAT1 結合が STAT3 結合に比較し増強していることが見出だされた (図 4C)。このことは、STAT1 がこれらの遺伝子群について抑制的に作用している可能性を示唆している。さらに、STAT1、STAT3 の結合様式が他方の STAT がなくなることでどのように変化するかについて、それぞれの STAT 欠損 T 細胞を用いて検証した。その結果、IL-6 特異的遺伝子群では、STAT1 欠損状況下においては、STAT3 の結合は増加したのに対して、STAT3 欠損状況下においては、STAT1 の結合は著明に減少した (図 4C)。一方、IL-27 特異的遺伝子群では、STAT3 欠損状況下において、STAT1 の結合は比較的保たれていた (図 4C)。このことは、IL-27 特異的遺伝子群の遺伝子

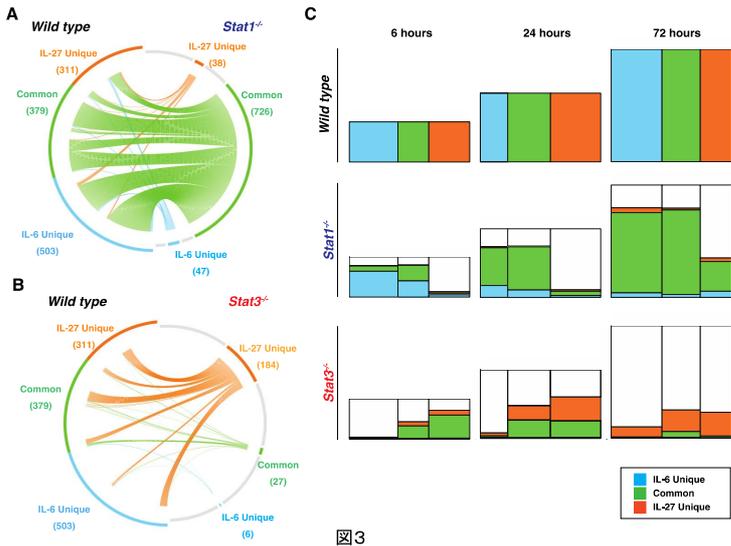


図 3

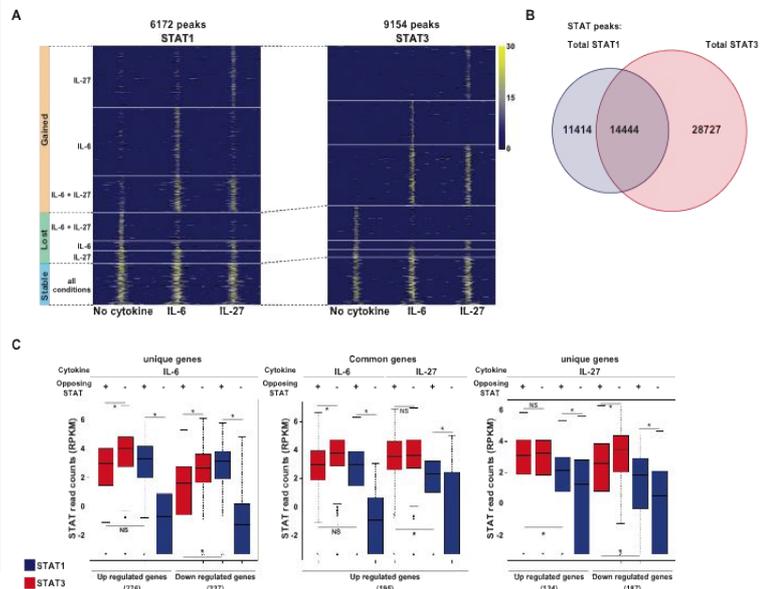


図 4

発現調節は、STAT1-STAT1 の二量体で行われている可能性を示唆している。

#### (4) ヒトにおける“STAT の機能的均衡モデル”破綻による重症の慢性真菌感染症の機序解明

最後にわれわれは、*STAT1* 機能獲得変異（以下 *STAT1* GOF）患者における STAT1 の過剰な活性化が、サイトカインに対する反応をどのように変化させ慢性真菌感染症の重症化の原因となるかについて、“サイトカイン生理作用誘導における STAT の協働機構破綻”という観点から遺伝子発現の網羅的解析を行った。*STAT1* GOF 患者 5 例および健康人 4 例の末梢血から単離した CD45RA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞に IL-6, IL-27 刺激を 72 時間加えた後、回収し RNA-Seq で網羅的遺伝子発現変化を解析した。二群間の遺伝子発現を比較した結果、*STAT1* GOF 患者群において、3,458 個の遺伝子が、新たにそれぞれのサイトカインでの発現変動を呈した（発現変動獲得遺伝子群）一方、573 個の遺伝子群でその発現変化が認められなくなった（発現変動喪失遺伝子群）。それぞれの遺伝子群について、どのような特徴を有する遺伝子が多く認められるかについてネットワーク解析を行った。大変興味深いことに、発現変動獲得遺伝子群および発現変動喪失遺伝子群の両群において、免疫疾患関連遺伝子群が有意に多数存在することが明らかになった。

#### 4. 研究成果

サイトカインは生体内で多様な生理作用を有するが、それぞれのサイトカインにおける生理作用の特異性に関する分子機構は不明な点が多い。今回我々は、炎症性サイトカインと知られる IL-6 と抗炎症性サイトカインである IL-27 を用いて、シグナル伝達物質 STAT によって規定される生理作用の分子機構の解析を行った。IL-6 と IL-27 は共に STAT1, STAT3 を活性化するが、それらの STATs がどのように協調して働いているかは不明であった。今回の我々の研究の結果、IL-6, IL-27 で誘導される遺伝子発現変化はその大部分が STAT3 により制御されている一方、STAT1 は IL-6, IL-27 で誘導される遺伝子群間の特異性を制御していることが明らかになった。つまり、サイトカインの生理機能を規定する上で、STAT1, STAT3 はそれぞれ非対称的機能を有する。さらに、STAT1 の過剰活性化がおこる *STAT1* 機能獲得変異患者検体の解析の結果から、*STAT1* 機能獲得変異患者では免疫疾患関連遺伝子群の発現変動

が認められることを発見した。このことは、非対称的機能を有する STATs が機能的均衡を保つことで免疫恒常性が維持されていることを示唆する。今後は *STAT1*GOF 患者で発現変動している遺伝子群から様々な機能遺伝子の同定を行い、新たな治療戦略の提案をおこなえるよう研究を進める。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

**Hirahara K**, Onodera A, Villario AV, Bonelli M, Sciumè G, Laurence A, Sun HW, Brooks RS, Vahedi G, Shih HY, Gtierrez-Cruz G, Iwata S, Suzuki R, Mikami Y, Okamoto Y, Nakayama T, Holland S, Hunter CA, Kanno Y, and O'Shea JJ.: Asymmetric action of STAT transcription factors drive transcriptional outputs and cytokine specificity. *Immunity*. 査読有、in press

linuma T, Okamoto Y, Yamamoto H, Inamine-Sasaki A, Ohki Y, Sakurai T, Funakoshi U, Yonekura S, Sakurai D, **Hirahara K**, Nakayama T.: Interleukin-25 and mucosal T cells in noneosinophilic and eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 査読有, 114:289-298 (2015) DOI: 10.1016/j.anai.2015.01.013

Endo Y, **Hirahara K**, linuma T, Shinoda K, Tumes DJ, Asou HK, Matsugae N, Obata-Ninomiya K, Yamamoto H, Motohashi S, Oboki K, Nakae S, Saito H, Okamoto Y, Nakayama T.: The Interleukin-33-p38 Kinase Axis Confers Memory T Helper 2 Cell Pathogenicity in the Airway. *Immunity*. 査読有, 42:294-308 (2015) DOI: 10.1016/j.immuni.2015.01.016

Watanabe Y, Onodera A, Kanai U, Ichikawa T, Obata-Ninomiya K, Wada T, Kiuchi M, Iwamura C, Tumes DJ, Shinoda K, Yagi R, Motohashi S, **Hirahara K**, Nakayama T.: Trithorax complex component Menin controls differentiation and maintenance of T helper 17 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有, 111:12829-12834 (2014) DOI: 10.1073/pnas.1321245111

Shih HY, Sciumè G, Poholek A, Vahedi G, **Hirahara K**, Villarino AV, Bonelli M, Bosselut R, Kanno Y, Muljo SA, O'Shea JJ.: Transcriptional and epigenetic networks of helper T and innate lymphoid cells. *Immunol Rev*. 査読有, 261:23-49 (2014) DOI: 10.1111/imr.12208

Bonelli M, Shih HY, Hirahara K, Singelton K, Laurence A, Poholek A, Hand T, Mikami Y, Vahedi G, Kanno Y, O'Shea JJ.: Helper T Cell Plasticity: Impact of Extrinsic and Intrinsic Signals on Transcriptomes and Epigenomes. *Curr Top Microbiol Immunol*. 査読有, 381:279-326 (2014) DOI: 10.1007/82\_2014\_371

Steward-Tharp SM, Laurence A, Kanno Y, Kotlyar A, Villarino AV, Sciume G, Kuchen S, Resch W, Wohlfert EA, Jiang K, Hirahara K, Vahedi G, Sun HW, Feigenbaum L, Milner JD, Holland SM, Casellas R, Powrie F, O'Shea JJ: A mouse model of HIES reveals pro- and anti-inflammatory functions of STAT3. *Blood*. 査読有, 123:2978-2987 (2014) DOI: 10.1182/blood-2013-09-523167

Nakayama S, Poholek AC, Lu KT, Takahashi H, Kato M, Iwata S, Hirahara K, Cannons JL, Schwartzberg PL, Vahedi G, Sun HW, Kanno Y, O'Shea JJ.: Type I IFN induces binding of STAT1 to Bcl6: divergent roles of STAT family transcription factors in the T follicular helper cell genetic program. *J Immunol*. 査読有, 192:2156-2166 (2014) DOI: 10.4049/jimmunol.1300675

Endo Y, Hirahara K, Yagi R, Tumes DJ, Nakayama T: Pathogenic memory type Th2 cells in allergic inflammation. *Trends Immunol*. 査読有, 35:69-78 (2014) DOI: 10.1016/j.it.2013.11.003

Hosokawa H, Tanaka T, Kato M, Shinoda K, Tohyama H, Hanazawa A, Tamaki Y, Hirahara K, Yagi R, Sakikawa I, Morita A, Nagira M, Poyurovsky MV, Suzuki Y, Motohashi S, Nakayama T: Gata3/Ruvbl2 complex regulates T helper 2 cell proliferation via repression of Cdkn2c expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 査読有, 110:18626-18631(2013) DOI: 10.1073/pnas.1311100110.

Roychoudhuri R\*, Hirahara K\*, Mousavi K, Clever D, Klebanoff CA, Bonelli M, Sciume G, Zare H, Vahedi G, Dema B, Yu Z, Liu H, Takahashi H, Rao M, Muranski P, Crompton JG, Punkosdy G, Bedognetti D, Wang E, Hoffmann V, Rivera J, Marincola FM, Nakamura A, Sartorelli V, Kanno Y, Gattinoni L, Muto A, Igarashi K, O'Shea JJ, Restifo NP: BACH2 represses effector programs to stabilize T(reg)-mediated immune homeostasis. \*These authors are contributed equally to this work.

*Nature*

査読有, 498: 506-510 (2013) DOI: 10.1038/nature12199

[学会発表](計9件)

Hirahara K, Wada T, Nakayama T, O'Shea JJ.: Asymmetry of STAT action to define specificity and redundancy of IL-27 and IL-6 signals. 第43回日本免疫学会学術集会 12/10-12 2014, 国立京都国際会館(京都府、京都市).(O/P) 12/11 平原潔「アレルギー性炎症の病態形成における多様なヘルパーT細胞サブセットの役割」特別講演 第10回千葉小児感染・アレルギー懇話会 田辺三菱製薬株式会社, 2014.11.20, 京成ホテルミラマーレ(千葉県、千葉市)(招待講演)

Hirahara K and Nakayama T: Crucial roles for CD4+ helper T cells at the host defense mucosal barriers of the lung. 招待講演 第87回日本生化学大会, 10/15-18 2014, 国立京都国際会館(京都府、京都市)(O)10/15(招待講演) Hirahara K, Nakayama T, Hunter C, Hollnad S, Kanno Y, O'Shea JJ.: Asymmetry of STAT action to define specificity and redundancy of IL-27 and IL-6 signals. *Keystone Symposia Emerging Cytokine Networks(J3)* 1/17-22 2014. Vancouver. (Canada) (O/P) 1/20

Hirahara K: Bach2 represses effector programmes to stabilize Treg-mediated immune homeostasis. 第42回日本免疫学会総会学術集会 12/11-13 2013, 幕張. ムッセ(千葉県、千葉市)(O) 12/13(招待講演)

Hirahara K.: Bach2 represses effector Programmes to stabilize Treg-mediated immune homeostasis. The 3<sup>rd</sup>

CSI/JSI/KAI Joint Symposium on Immunology, 12/1-4 2013. Pohang city (Korea) 12/3(招待講演) 平原潔「CD4 T細胞を介した免疫恒常性の制御およびその破綻による慢性真菌感染症について」招待講演 真菌医学研究センターMonthly セミナー(千葉大学真菌医学研究センター&東京大学医学科学研究所細菌感染生物学社会連帯研究部門・特別推進研究「病原細菌の自然免疫克服戦略の解明とその応用」共催), 2014.10.7, 千葉大学真菌医学研究センター(千葉県、千葉市)(招待講演)

Ito T, Hirahara K, Yano I, Nakayama T.: Anti-tumor effect of BCG-LM via the activation of eosinophils. 第72回日本癌学会学術総会 10/3-5 2013, パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)(P) 10/3 Hirahara K, Kanno Y, Nakayama T and O'Shea JJ.: Asymmetry of STAT Action to Define Specificity and Redundancy of IL-27 and IL-6 Signals. The 2<sup>nd</sup> Symposium of International Immunological Memory and Vaccine Forum 8/25-26 2014, La Jolla (USA) (O) 8/26(招待講演)

〔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〕

千葉大学

<http://www.chiba-u.ac.jp/general/publicity/press/pdf/2015/20150216.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平原 潔(HIRAHARA, Kiyoshi)

千葉大学・大学院医学研究院・客員准教授

研究者番号：00707193