

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：25893033

研究課題名(和文) Th9細胞による炎症の遷延化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of Th9 cell-mediated chronic inflammation

研究代表者

八木 良二 (YAGI, Ryoji)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：20392152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヘルパーT細胞のサブセットの1つであるTh9細胞が喘息を含むアレルギー疾患に深く関与していることが報告されている。このTh9細胞の分化制御機構を解明することは、ヘルパーT細胞の分化制御機構の理解に繋がるだけでなく、アレルギー疾患の治療にも大きく貢献できることは明確である。私はTh9細胞の分化誘導に転写因子GF11が関与していることを発見した。そこで、その詳細な機構を明らかにするために、GF11によるTh9細胞の分化制御機構の解明とin vivoで誘導するTh9細胞におけるGF11の役割を解明するためのin vivo評価系の構築を行った。

研究成果の概要(英文)：Naive CD4 T cells can differentiate into several T helper (Th) cell subsets, Th1, Th2, Th17, regulatory T cells and follicular T cells. Recently Th9 cells have been added into Th cell subsets. Th9 cells are known to induce proliferation of mast cells and secretion of mucus from goblet cells and also to be involved in allergic diseases. IL-4 and TGF β are required for Th9 cell differentiation from naive CD4 T cells in vitro. However, the molecular mechanism of Th9 cell differentiation and the function of Th9 cells in vivo are not understood yet. To study these questions, we focused on a responsible gene which we found previously and we established an in vivo model to investigate role of the gene on Th9 cell differentiation.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫学 アレルギー・ぜんそく Th9 ヘルパーT細胞 遺伝子発現制御 サイトカイン IL-9

1. 研究開始当初の背景

ヘルパーT(Th)細胞は、その産生するサイトカイン、および、その細胞の機能によって、エフェクターヘルパーT細胞のサブセットに分けられ(図1)、Interleukin-9(IL-9)を産生するTh9細胞は最も新しくヘルパーT細胞のサブセットに加えられた。ナイーブCD4 T細胞からTh9細胞への分化誘導には、T細胞レセプター(TCR)を介した抗原認識に加え、IL-4とTGFからのシグナルが必要である。Th9細胞の機能はその産生するIL-9によって特徴付けられ、マスト細胞の増殖や杯細胞からの粘液分泌を促すことで、細胞外感染微生物の排除に働く。しかしながら、このように生体防御に働く一方、アレルゲンによって活性化されたTh9細胞が産生するIL-9が、アレルギー性炎症の遷延化に関与していることも報告されている。Th9細胞の分化制御メカニズムを解明することができれば、アレルギー性炎症の遷延化を食い止め、完治させる可能性が極めて高い。これまでTh9細胞のマスター転写因子としてPU.1が報告されているが、同じラインのマウスから単離したPU.1欠損CD4 T細胞をTh9細胞分化誘導条件下で培養したところ、およそ20%-30%程度のIL-9産生細胞の割合の低下しか確認できなかった(図2)(未発表)。つまり、PU.1に代わるTh9細胞のマスター転写因子の存在が示唆された。そこで、私はTh9細胞の分化を制御する新しい転写因子の探索を行うため、Th2細胞とTh9細胞を用いてマイクロアレイを行い、発現量の異なる転写因子群から、その候補因子としてgrowth factor independent 1 transcription repressor(GFI1)を見出した。

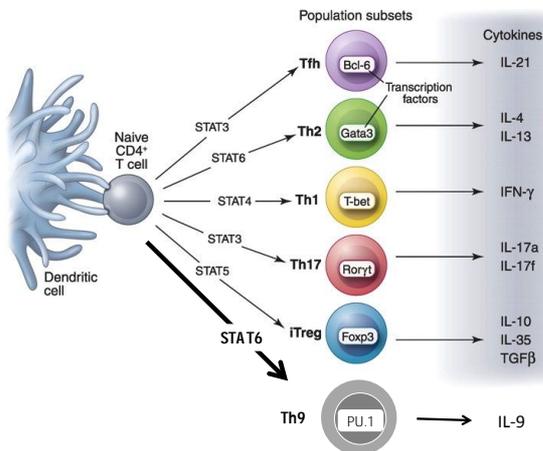


図1 ヘルパーT細胞分画とそのマスター転写因子

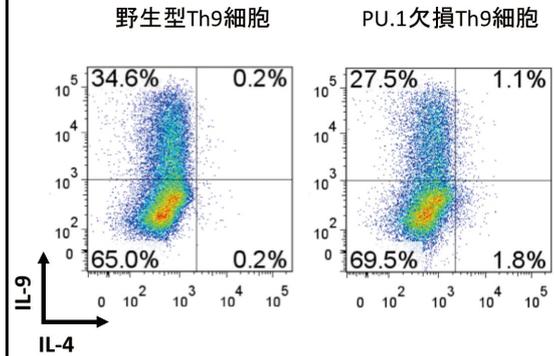


図2 PU.1欠損Th9細胞からのIL-9産生

2. 研究の目的

アレルギー疾患の治療に貢献するため、Th9細胞の分化制御メカニズムを解明する。私はTranscriptional repressor(転写抑制因子)と知られているGFI1がTh9細胞の分化を抑制することを発見した。そして、Th2細胞とTh9細胞でGFI1発現量をRT-PCRを用いて比較すると、確かにマイクロアレイの結果と一致して、Th9細胞で低いことがわかった(図3)。そこで、GFI1がTh9細胞の分化誘導に重要な転写因子であることを明らかにするため、*in vitro*で検証実験を行い、GFI1がTh9細胞の分化を制御していることがわかった。そこで、本申請研究では、(1) *in vivo*でGFI1によるTh9細胞の分化制御を評価するための *in vivo* マウスモデルの構築、そして、より詳細なメカニズムを明らかにするため、(2) *in vitro*でのGFI1によるIL-9産生抑制メカニズムの解明を行う。

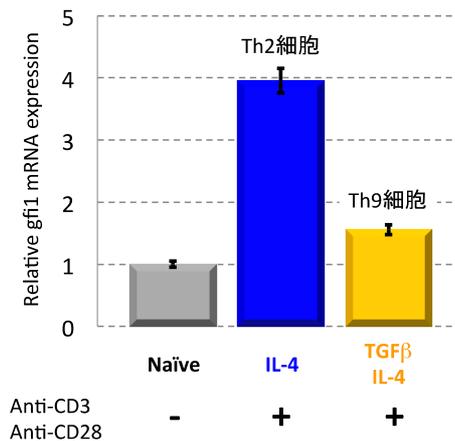


図3 GFI1 mRNA発現量の比較

3. 研究の方法

(1) *in vivo*でGFI1によるTh9細胞の分化制御を評価するための *in vivo* マウスモデルの構築
*in vivo*でTh9細胞の分化過程を評価するマウスモデルを確立するため、ovalbumin

(ova)特異的な TCR を持つ OTII Tg マウスから単離したナイーブ CD4 T 細胞をレシピエントマウス(CD45.1 コンジェニックマウス使用)に移入し、ova を適当なアジュバンド (Alum または LPS) と一緒にマウスに投与した。その後、ova を定期的に経鼻または吸入投与した。アジュバンドの種類・濃度、また ova の投与回数・濃度の条件を検討し、*in vivo* で CD4 T 細胞が Th9 細胞に分化誘導する条件を探索した(図 4)。我々が見出した適切な条件の下で、野生型および GF11 欠損 OTII Tg CD4 T 細胞を用いて、*in vivo* Th9 細胞の分化過程における GF11 の役割を解明した。実際にはリンパ節、脾臓、および肺組織から単離した CD4 T 細胞を PMA と ionomycin もしくは、ova ペプチドを用いて、モネンシンの存在下で *in vitro* で 4 から 6 時間刺激した。その後、細胞内染色にて IL-9 産生細胞を検出した。また、モネンシン非存在下で、刺激した CD4 T 細胞から mRNA を抽出し、IL-9 と Th1 および Th2 サイトカインを RT-PCR で測定した。同時に、Th9 細胞の炎症部位における局在を免疫染色により解析し、Th9 細胞がいつ・どこで炎症反応に携わっているのかについても検討を行った。バックアップとして、上記の CD4 T 細胞の代わりに *in vitro* で分化誘導させた野生型と GF11 欠損 Th9 細胞をレシピエントマウスに移入し、Th9 細胞分化後の GF11 の役割についても条件検討を試みた。

(2) *in vitro* での GF11 による IL-9 産生抑制メカニズムの解明

Th9 細胞分化のメカニズムを明らかにするため、Th9 細胞のマスター遺伝子として知られている転写因子 PU.1 と GF11 の関係を調査した。これまで報告されているように PU.1 cDNA を挿入したレトロウイルスベクターを Th2 細胞に感染させ、PU.1 の強制発現によって IL-9 が産生誘導されるかどうか細胞内染色により確認した。PU.1 の強制発現によって誘導された IL-9 産生が GF11 cDNA を挿入したレトロウイルスベクターによる GF11 の強制発現によってその IL-9 産生が抑制できるかどうか細胞内染色により検証した。GF11 と PU.1 のダブル欠損マウスを作製し、このマウスから単離したナイーブ CD4 T 細胞を Th9 細胞分化誘導条件下で培養し、細胞内染色により GF11 の欠損による IL-9 産生増強に PU.1 が関与しているかどうか調査した。

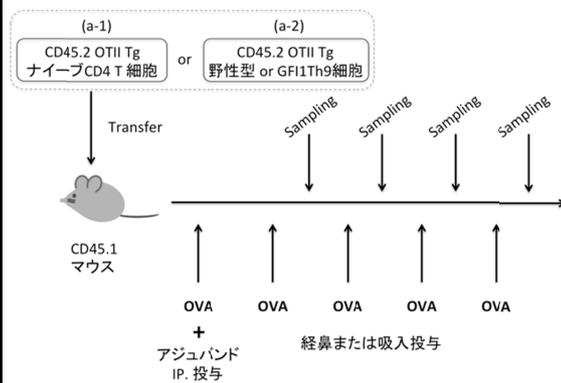


図4 *in vivo* Th9細胞分化誘導の検討

4. 研究成果

(1) *in vivo* で GF11 による Th9 細胞の分化制御を評価するための *in vivo* マウスモデルの構築

これまで CD4 T 細胞からの IL-9 産生が報告されている *in vivo* モデルであるアスペルギウス惹起による気道炎症モデル、および ova 惹起の気道炎症モデルを用いて検討を行った。すべての条件検討が完了し、IL-9 産生細胞を *in vivo* で検出することができたが、まだ改善の余地が認められた。今後これらのマウスモデルを足がかりにして *in vivo* での IL-9 産生細胞をより効率よく検出できるように改良を重ねる予定である(抗原のロット間の差など)。また、マウスの遺伝的背景が Th1/Th2 細胞分化に影響を与えていることが知られていることから、現在使用している GF11 KO マウスの遺伝的背景を Th1 細胞優位な C57BL/6 マウスから Th2 細胞優位な BALB/c に戻し交配することも視野に入れて検討する。

(2) *in vitro* での GF11 による IL-9 産生抑制メカニズムの解明

Th9 細胞のマスター遺伝子としての報告もある転写因子 PU.1 をレトロウイルスベクターに挿入し、Th2 細胞分化誘導条件下で培養した野生型 CD4 T 細胞内に PU.1 を強制発現させた。これまで報告されているように PU.1 強制発現細胞の一部は、IL-9 を産生することを確認した。このときに同時に GF11 を強制発現させたところ、PU.1 で誘導された IL-9 産生を著しく抑制した。つまり、GF11 は PU.1 によって誘導された IL-9 を抑制する能力を持つ。さらに PU.1 欠損マウスと我々の GF11 欠損マウスを用いてダブル KO マウスを作製したところ、PU.1 の非存在化でも GF11 欠損による IL-9 産生細胞の増加に変化はなかった。これらのデータから GF11 は IL-9 産生に対して PU.1 よりもドミナントな因子であること、あるいは PU.1 の下流に位置すること

の2つの可能性があることが分かった。本申請研究でわかったことを活かして、これらの詳細なメカニズムを明らかにしていく。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計4件)

Yagi, R., Nakayama, T., and Zhu, J.: Role of the transcription factor GATA3 in helper T cell and innate lymphoid cell development. Immunology 2015, The American Association of Immunologists, AAI Annual Meeting. 2015年5月9日、(New Orleans・USA)

Yagi, R., Sarkar, H. M., Soh, T., Nakayama, T., and Zhu, J.: IL-9 production is a transient feature of differentiating Th2 cells in response to TGFβ. 第43回日本免疫学会総会・学術集会、2014年12月12日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

Yagi, R.: Role of the transcription factor GATA3 in helper T cell and innate lymphoid cell development. 第43回日本免疫学会総会・学術集会、2014年12月12日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

Yagi, R., and Zhu, J.: Roles of Th2 differentiation-related transcription factors, GATA3, STAT5 and Runx3 in Th9 differentiation. 第42回日本免疫学会総会・学術集会、2013年12月11日、幕張メッセ(千葉県・千葉市)

〔その他〕

ホームページ等

千葉大学大学院 医学研究院 免疫発生学

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/meneki/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

八木 良二 (YAGI Ryoji)

千葉大学・大学院医学研究院・特任准教授

研究者番号：20392152