

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 26 日現在

機関番号：38005

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860342

研究課題名(和文) Th17細胞の病原性を決定する転写制御機構の解析

研究課題名(英文) Mechanism of transcriptional regulation of differentiation of pathogenic Th17 cells

研究代表者

石川 裕規 (Ishikawa, Hiroki)

沖縄科学技術大学院大学・免疫シグナルユニット・准教授

研究者番号：30648621

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)：本研究では、自己免疫反応に関与するヘルパーT細胞の分化制御機構を理解するために、IL-23サイトカインによる病原性Th17細胞誘導機構を調べた。まず、Th17細胞においてIL-23刺激により発現が増加する遺伝子として、転写因子HLX-1を見出した。T細胞特異的HLX-1ノックアウトマウス(HLX-1 TKOマウス)の解析により、HLX-1はTh17細胞におけるいくつかのTh17誘導性遺伝子の発現に関与することが示された。さらに、HLX-1 TKOマウスは、実験的自己免疫性脳脊髄炎の症状の緩和が認められた。これらの結果は、HLX-1が病原性Tヘルパー細胞の分化に関与することを示唆する。

研究成果の概要(英文)：CD4 T cells are a key player to mediate adaptive immune responses. Upon detection of the target antigen, naive CD4+ T cells differentiate into T helper (Th) subsets including Th1, Th2, and Th17 cells. Each of these Th subsets differentially controls protective immune responses against different pathogens as well as harmful immune responses leading to allergy and autoimmune diseases. Here we found that HLX1 expression was induced in Th17 cells as well as Th1 cells. HLX1 induction was mediated by STAT4 and STAT3 transcription factors in Th1 and Th17 cells, respectively. Th17-dependent experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) was ameliorated in the mice with HLX1-deficient T cells. Th1 and Th17 cells lacking HLX1 showed impaired expression of cell surface antigens whose signal has been shown to modulate T cell receptor signaling. These results suggest that HLX1-dependent regulation of gene expression is important in Th1 and Th17 differentiation and function.

研究分野：免疫学

キーワード：ヘルパーT細胞 転写制御

1. 研究開始当初の背景

免疫系は病原体を生体内より排除する重要な生体防御機構である一方で、その制御異常は自己組織に対する免疫応答を誘導し、様々な難治性自己免疫疾患を引き起こす。多くの自己免疫疾患の発症には、免疫応答の司令塔である CD4 ヘルパー T 細胞のサブセットのひとつ Th17 細胞が中心的な役割を果たすことが示されている。Th17 細胞は、IL-17 を発現するヘルパー T 細胞と定義され、抗原刺激を未だ受けていない Naive CD4 T 細胞が、抗原刺激を受ける際に、IL-6、TGF- β 、IL-1 β といったサイトカインの刺激を受けることにより誘導される。重要なことに、これらのサイトカインにより誘導された Th17 細胞が病原性を発揮する Th17 細胞となり自己免疫疾患を引き起こすためには、さらなる IL-23 による刺激が必要となる。このように病原性 Th17 細胞の運命決定に重要な IL-23 シグナル伝達経路は、自己免疫疾患に対する予防・治療のための理想的なターゲットであり、その分子機構の解明は重要な課題であると考えられる。

2. 研究の目的

これまでに IL-23 は、Th17 細胞の維持、病原性の獲得、可塑性に関与することが示唆されているが、それらを制御する分子メカニズムはほとんど示されていない。私たちは、IL-23 刺激により Th17 細胞において発現が変動する遺伝子を探索した結果、転写因子 HLX1 の発現が IL-23 刺激により増強されることを見出した。この HLX1 はヘルパー T 細胞サブセットのひとつ Th1 細胞において発現誘導されることおよび、HLX1 の過剰発現が IFN- γ の発現を促進することが報告されているが、その分子機構および生理的意義はよく分かっていない。そこで本研究では、HLX1 ノックアウトマウスを作製し、その Th1 および Th17 細胞分化における役割・機能を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) IL-23 誘導性遺伝子の探索

CD4T 細胞において IL-23 の刺激により発現が誘導される遺伝子を同定するために、抗 CD3 および抗 CD28 抗体により活性化させたマウスナイーブ CD4T 細胞を、TGF- β と IL-6 存在下で培養し Th17 細胞を誘導した。その Th17 細胞に IL-23 刺激を加え 24 時間培養した後、RNA を回収し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、Th17 細胞において IL-23 刺激により 70 遺伝子の発現が上昇することが見いだされた。また、それらの遺伝子の中には二つの転写因子が含まれていた。本研究で

は、それらのうち、より高い発現上昇を見せた HLX1 に焦点を当て研究を行うこととした。

(2) HLX1 欠損マウスの作製

HLX1 の欠損マウスは胎生致死であり T 細胞の解析に用いることができないため、HLX1 のコンディショナル KO マウスを作製した KOMP より購入した HLX1 ターゲティングベクターを ES 細胞への導入した後、キメラマウスを取得した。続いてこのキメラマウスを FLP マウスと交配した後に、CD4-Cre マウスと交配し、T 細胞特異的 HLX1 KO マウス (HLX1 T-KO マウス) を得た。このマウスの T 細胞における HLX1 の欠損は、抗 HLX1 抗体を用いたウエスタンブロット解析により確認された。

(3) HLX1 の Th17 細胞分化における役割の解析

HLX1 の生体内 Th17 細胞分化における役割を明らかにするために、HLX1 T-KO マウスに、Th17 細胞依存的に起こることが知られている実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) モデルを用いた。具体的には、HLX1 T-KO マウスにミエリンタンパク (MOG) ペプチドを完全フロイントアジュバントで免疫して、EAE を誘導した。

また、In vitro における Th1 および Th17 細胞の分化における HLX1 の役割を調べるために、HLX1 欠損 T 細胞を Th1 および Th17 細胞分化を促進するサイトカイン存在下で培養した後に、マイクロアレイ解析に用いた。さらに、HLX1 が結合するゲノム DNA 領域を同定するために、抗 HLX1 抗体を用いた免疫沈降-シークエンス解析を行った。

4. 研究成果

(1) Th17 細胞における HLX1 の発現誘導

まず、各種ヘルパー T 細胞における HLX1 の発現を比較したところ、HLX1 は既に知られていた Th1 細胞においてだけでなく、TGF- β と IL6 により誘導される Th17 においても発現が誘導され、さらにその発現は IL-23 の刺激により増強されることが示された。また、高い病原性を持つと報告されている IL-1 β 、IL-6、IL-23 により誘導される Th17 においてはより高い HLX1 の誘導が見られた。次に、HLX1 の発現誘導に関わるサイトカインを明らかにするために、Th1 および Th17 分化に関与するサイトカインそれぞれの HLX1 発現誘導能を調べた。その結果、IL-6 および IL-23 は HLX1 の発現を促進したのに対して、TGF- β は HLX1 の発現を抑制した。

Th1 細胞における HLX1 の発現は STAT4 転写因子によって誘導されることが報告されている。しかしながら、STAT4 の発現の RNAi により抑制は Th17 細胞における HLX1 の発現誘導に影響を与えなかった。このことは、Th17 細胞における HLX1 の発現は Th1 の場合とは

異なる転写メカニズムにより制御されることを示唆した。そこで、Th17細胞の分化に関わるSTAT3とROR γ t欠損T細胞を用いて、これらの因子のHLX1発現誘導への関与を調べた。その結果、STAT3欠損細胞ではHLX1の誘導が完全に損なわれたのに対して、ROR γ t欠損細胞では正常なHLX1発現が見られた。これらの結果は、Th17細胞におけるHLX1の発現は、IL-6およびIL-23によるSTAT3の活性化に依存して誘導されることを示唆している。

(2) HLX1の自己免疫応答における役割

HLX1のT細胞分化における役割を明らかにするために、HLX1 T-KOマウスを作製した。HLX1 T-KOマウスのリンパ節および脾臓におけるCD4T細胞の割合は、野生型マウスと同等であり、HLX1がCD4T細胞の産生に必須ではないことが示された。HLX1の生体内Th17細胞分化における役割を調べるために、HLX1 T-KOマウスに、Th17細胞依存的な実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を誘導した。HLX1 T-KOマウスは野生型マウスと同様にEAEを発症したが、EAE誘導後期において病状スコアの優位な低下が認められた。しかしながら、EAE誘導マウスの脳・脊髄に浸潤した細胞におけるTh17細胞およびTh1細胞の割合は、HLX1 T-KOマウスと野生型マウスの間で違いはなかった。これらの結果は、T細胞のHLX1発現は、EAEの発症に関与するが、そのメカニズムは単純にTh1細胞およびTh17細胞の産生を制御することではないことを示唆している。

(3) HLX1によるCD4T細胞分化制御

HLX1のTh1およびTh17細胞分化における機能および役割を調べるために、HLX1欠損および野生型CD4T細胞をTh1およびTh17細胞分化を促進するサイトカイン存在かにおいて活性化させた。FACS解析の結果、HLX1欠損T細胞は、野生型T細胞と同程度のTh1細胞およびTh17細胞の誘導が認められた。この結果は、EAE誘導マウスにおける結果と矛盾せず、HLX1がTh1およびTh17細胞におけるIFN γ およびIL-17の発現誘導には関与しないことを示唆した。次に、HLX1のTh1およびTh17細胞において誘導される遺伝子群の発現制御における役割を調べるために、Th1およびTh17細胞誘導条件で培養したHLX1欠損T細胞のマイクロアレイ解析を行った。その結果、HLX1の欠失は、Th1およびTh17細胞に特徴的な遺伝子の多く(Tbx21, IFN γ , IL-17a, IL-17f, rorc, IL-23R)の発現に影響を与えなかったが、IL-1RL1、NKレセプターを含むいくつかの遺伝子発現の優位な低下を起こした。Th1およびTh17細胞におけるHLX1の転写制御機構をさらに調べるために、HLX1抗体を用いたクロマチン免疫沈降-シーケンシング(ChIP-Seq)解析を行った。この解析の結果、HLX1が結合するいくつかのゲノム

DNA領域が同定された。興味深いことに、HLX1結合領域には、HLX1欠損により著しい発現低下が認められたIL-1RL1のプロモーター領域も含まれていた。これらの結果は、HLX1はTh1およびTh17細胞において、いくつかの免疫関連遺伝子の発現を制御することを示唆している。

以上の結果より、転写因子HLX1がTh1およびTh17細胞分化においていくつかの免疫関連遺伝子の発現を直接制御することにより、これらの細胞の自己免疫応答誘導活性を制御することが示唆された。

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

石川裕規 HLX1 regulates differentiation and function of CD4 T helper cells. 22nd East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, 恩納, 沖縄, 2015

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<https://groups.oist.jp/ja/isu>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 裕規 (Ishikawa, Hiroki)
沖縄科学技術大学院大学・免疫シグナルユニット・准教授

研究者番号：30648621

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし