

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 16 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22790925

研究課題名（和文） Th17 細胞分化における Ikaros ファミリー分子の役割の解明

研究課題名（英文） The roles of Ikaros family proteins in Th17 cell differentiation

研究代表者

高取 宏昌（TAKATORI HIROAKI）

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30568225

研究成果の概要（和文）：本研究ではマウス各ヘルパーT細胞分画における Helios の発現制御機構、並びにその役割を解析した。その結果、マウス CD4 陽性 T 細胞において TGF- β シグナルが Helios の発現を誘導すること、一方 IL-6/Stat3 シグナルは Helios の発現を抑制することを明らかにした。また、Helios を過剰発現した Treg 細胞では Treg 細胞の機能分子である CD103 や GITR の発現が亢進することを明らかにした。以上より、Helios は TGF- β の下流で Treg 細胞の機能分子の発現に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： We have recently shown that Helios, an Ikaros family of transcription factor, is highly expressed in CCR6⁺CD4⁺CD45RO⁺ T cells as compared with that in CCR6⁺CD4⁺CD45RO⁻ T cells. However, the role of Helios in T cell differentiation remains largely unknown. Therefore, in this study, we examined the role of Helios in the differentiation of murine CD4⁺ T cells. We first examined the effect of various cytokines on the expression of Helios in TCR-stimulated murine splenic CD4⁺ T cells and found that TGF- β induced Helios expression in CD4⁺ T cells. In contrast, IL-6 inhibited Helios expression in a Stat3-dependent manner. Retroviral-mediated expression of Foxp3 in the absence of TGF- β did not induce Helios expression in CD4⁺ T cells. On the other hand, enforced expression of Helios up-regulated activation markers of regulatory T cells (Tregs) such as CD103 and GITR in Foxp3⁺ Tregs. These results suggest that TGF- β may enhance Treg function through the induction of Helios expression in a Foxp3-independent fashion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：ヘルパーT細胞分化、Ikaros ファミリー分子、Helios、制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患は遺伝的素因を持つ個体にウイルス感染などの環境要因が加わることにより発症すると考えられているが、その分子基盤は依然不明である。

本研究者は、近年、自己免疫疾患や炎症性疾患の発症・増悪因子としての役割が示唆される IL-17A を選択的に産生するヒト CCR6 陽性 T 細胞における遺伝子発現を網羅的に解析する過程で、CCR6 陽性 CD4 陽性 T 細胞に Ikaros ファミリーに属する Helios が高発現していることを見出した。しかし、ヘルパー T 細胞分化における Ikaros ファミリー分子の役割の詳細は依然不明であった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、マウス各ヘルパー T 細胞分画における Ikaros ファミリー分子の発現制御機構及びその役割を解析し、自己免疫疾患や炎症性疾患の新規治療法開発の基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

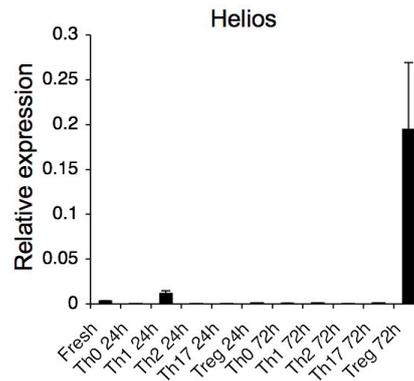
(1) 野生型マウス脾臓由来のナイーブ CD4 陽性 T 細胞を Th0 (サイトカイン添加なし)、Th1 (IL-12 添加)、Th2 (IL-4 添加)、Th17 (IL-6+TGF- β 添加)、Treg (TGF- β 添加) の各分化誘導条件下で TCR 刺激 (aCD3/aCD28 抗体刺激) した際の Ikaros ファミリー分子の発現を real-time PCR 法及び細胞内染色法にて解析した。

(2) T 細胞特異的 Stat3 欠損 (CD4Cre Stat3fl/fl; Stat3-cKO) マウスと野生型 (Stat3fl/fl; WT) マウスのナイーブ CD4 陽性 T 細胞を TGF- β と IL-6 の存在下および非存在下で TCR 刺激し、Helios の発現を real-time PCR 法及び細胞内染色法にて解析した。

(3) Foxp3 遺伝子の制御下で hCD2 を発現するノックインマウス (hCD2-Foxp3 レポーターマウス) の CD4 陽性 T 細胞にレトロウイルスを用いて Helios を過剰発現させ、抗 hCD2 抗体を用いて Foxp3 陽性細胞を単離した後、Treg 細胞の機能分子の発現を real-time PCR 法により解析した。

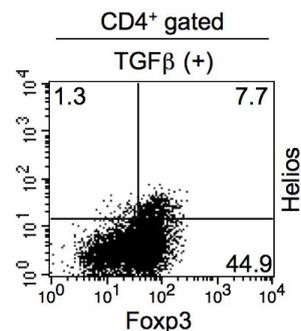
4. 研究成果と考案

(1) Helios は Foxp3 陽性 CD4 陽性 T 細胞 (Treg 細胞) に発現している。野生型 CD4 陽性 T 細胞を Th0、Th1、Th2、Th17、Treg の各分化誘導条件下で培養したところ、Helios mRNA の発現は、TGF- β を添加した Treg 条件下で著明に誘導されることが明らかとなった (図 1a)。



(図 1a) 各培養条件下における Helios の発現レベル

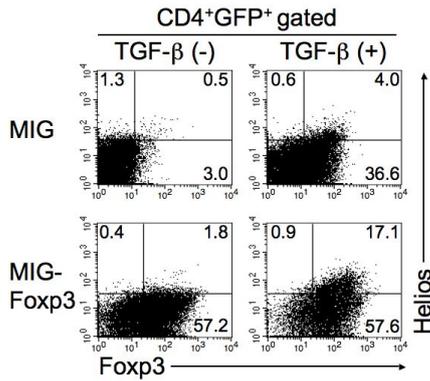
Treg 条件下における Helios の発現誘導を細胞内染色法を用いて蛋白レベルで検討したところ、Helios 蛋白は Treg 条件下で確かに誘導されること、そしてその発現は Foxp3 陽性 CD4 陽性 T 細胞 (Treg 細胞) に主に認められることが明らかとなった (図 1b)。



(図 1b) Treg 条件下における Foxp3 と Helios の発現

(2) TGF- β による Helios の発現誘導は Foxp3 非依存的である。

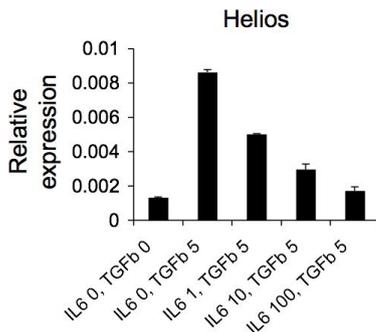
Treg 条件下における Helios の発現誘導が Foxp3 依存性か否かを明らかにするため、レトロウイルス発現系を用いて野生型マウス由来 CD4 陽性 T 細胞に Foxp3 を発現させた際の Helios の発現を検討した。その結果、TGF- β の非存在下では Foxp3 陽性細胞においても Helios の発現亢進は認められなかった (図 2)。一方、TGF- β の存在下では Foxp3 陽性細胞に Helios の高発現を認めた (図 2)。



(図2) Fcgp3 強制発現の Helios の発現に対する影響

(3) IL-6 は TGF-β による Helios の発現誘導を抑制する。

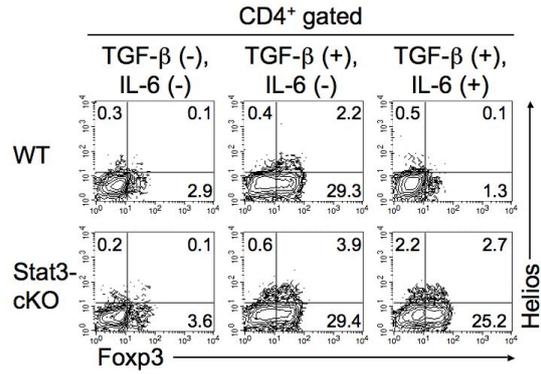
次に TGF-β による Helios の発現誘導に対する IL-6 の作用を real-time PCR 法にて検討した。その結果、IL-6 は TGF-β による Helios の発現誘導を用量依存的に抑制することが明らかとなった (図3)。



(図3) TGF-β による Helios の発現誘導に対する IL-6 の作用

(4) IL-6 による Helios の発現抑制は Stat3 依存的である。

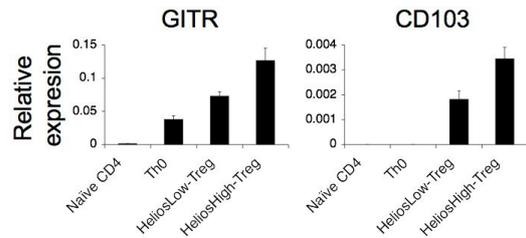
IL-6 による Helios の発現抑制における Stat3 の役割を明らかにするため、T 細胞特異的 Stat3 欠損 (Stat3-cKO) マウスと野生型 (WT) マウスのナイーブ CD4 陽性 T 細胞を TGF-β と IL-6 の存在下および非存在下で培養し Helios の発現を比較した。その結果、IL-6 は、野生型 CD4 陽性 T 細胞では TGF-β による Helios の発現誘導を抑制したが、T 細胞特異的 Stat3 欠損 CD4 陽性 T 細胞では抑制しなかった (図4)。



(図4) 野生型および T 細胞特異的 Stat3 欠損マウス由来 CD4 陽性 T 細胞を TGF-β と IL-6 の存在下および非存在下で培養した際の Fcgp3 と Helios の発現

(5) Helios は Treg 細胞の機能分子の発現を増強する。

次に Treg 細胞における Helios の役割を明らかにするため、hCD2-Fcgp3 レポーターマウスの CD4 陽性 T 細胞に Treg 条件下で Helios を高発現させた Treg 細胞 (Helios^{high} Treg) とコントロール Treg 細胞 (Helios^{low} Treg) を作製し、各 Treg 細胞における機能分子の発現を real-time PCR 法で解析した。その結果、Helios^{high} Treg 細胞では、GITR と CD103 の mRNA 発現が Helios^{low} Treg 細胞に比して亢進していることが明らかとなった (図5)。



(図5) Helios^{high} Treg 細胞と Helios^{low} Treg 細胞における GITR と CD103 の発現

本研究では、マウス CD4 陽性 T 細胞における Helios の役割を解析し、① Helios は TGF-β シグナルにより発現誘導され、その発現は IL-6/Stat3 シグナルにより抑制されること、② Helios を過剰発現した Treg 細胞では機能分子の発現が亢進することを明らかにした。近年、Helios はマウス胸腺由来の中樞性 Treg 細胞 (nTreg 細胞) に発現していることが報告されたが、本研究により、in vitro で分化

させた誘導性 Treg 細胞 (iTreg 細胞) においても発現していることが明らかとなった。さらに、hCD2-Foxp3 レポーターマウスを用いた解析により、Helios は Treg 細胞の機能分子の発現に関与していることが明らかとなった。現在、Helios^{high} Treg 細胞と Helios^{low} Treg 細胞の抑制能の詳細を解析中である。

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 3 件)

① Iida K, Suzuki K, Yokota M, Nakagomi D, Wakashin H, Iwata A, Kawashima H, Takatori H, Nakajima H. STAT4 is required for IFN- β -induced MCP-1 mRNA expression in murine mast cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 155: Suppl 1:71-6, 2011. 査読有
DOI: 10.1159/000327300

② Kashiwakuma D, Suto A, Hiramatsu Y, Ikeda K, Takatori H, Suzuki K, Kagami S, Hirose K, Watanabe N, Iwamoto I, Nakajima H., B and T lymphocyte attenuator suppresses IL-21 production from follicular Th cells and subsequent humoral immune responses. *J Immunol.* 185(5); 2730-6, 2010. 査読有
DOI:10.4049/jimmunol.0903839

③ Wei L, Vahedi G, Sun HW, Watford WT, Takatori H, Ramos HL, Takahashi H, Liang J, Gutierrez-Cruz G, Zang C, Peng W, O'Shea JJ, Kanno Y., Discrete roles of STAT4 and STAT6 transcription factors in tuning epigenetic modifications and transcription during T helper cell differentiation. *Immunity.* 32(6); 840-51, 2010. 査読有
DOI:10.1016/j.immuni.2010.06.003

[学会発表] (計 6 件)

① 池田啓、高取宏昌ら、膠原病ならびにリウマチ性疾患患者の Quality of Life 調査、日本リウマチ学会学術集会、2011 年 7 月 19 日、兵庫県神戸市

② 中込大樹、高取宏昌ら、リウマチ性疾患の画像 ACR/EULAR 分類基準による関節リウマチ分類における関節超音波検査併用の影響、日本リウマチ学会学術集会、2011 年 7 月 18 日、兵庫県神戸市

③ 加々美新一郎、高取宏昌ら、自己免疫性血小板減少性紫斑病に対してリツキシマブが有効であった IgG4 関連疾患の 1 例、日本アレルギー学会春期臨床大会、2011 年 5 月 14 日、千葉県千葉市

④ 中込大樹、高取宏昌ら、肥満細胞内 Fc ϵ RI シグナルにおける NF- κ B1 の役割、日本免疫学会総会、2011 年 11 月 29 日、千葉県千葉市

⑤ 中込大樹、高取宏昌ら、黄色爪症候群を合併した関節リウマチの 1 例、日本リウマチ学会学術集会、2010 年 4 月 22 日、兵庫県神戸市

⑥ 栗本遼太、高取宏昌ら、18F-FDG-PET にて診断しえた皮膚/筋症状を伴わない好酸球筋膜炎の 1 例、日本リウマチ学会学術集会、2010 年 4 月 22 日、兵庫県神戸市

[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

<http://www.m.chiba-u.jp/class/gene/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高取 宏昌 (TAKATORI HIROAKI)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 30568225

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号: