

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07516

研究課題名(和文) 転写因子JunBによるT細胞機能の制御

研究課題名(英文) Regulation of T cell functions by the transcription factor JunB

研究代表者

山崎 創 (Yamazaki, Soh)

東邦大学・医学部・准教授

研究者番号：70315084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：制御性T細胞(Treg細胞)は、種々の免疫応答を抑制するという重要な役割を担うことから、発見以来高い関心を集めているが、生体内でTreg細胞がどのように生成されるかについては十分に理解されていない。本研究を通じて、JunBという転写因子を欠損したマウスでは、IL-2シグナルの活性化が不十分なためにTreg細胞が十分に生成されなくなることを明らかにした。さらに、JunBを欠損しているマウスでは、Treg細胞が減少しているために、ヒト潰瘍性大腸炎の疾患モデルの症状が悪化することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

潰瘍性大腸炎などの炎症性疾患や多くの自己免疫疾患は、治療戦略はもとより、発症・増悪メカニズムについても詳細が明らかでない。本研究により、転写因子JunBがIL-2シグナルの活性化を通じてTreg細胞の誘導に関与し、大腸炎モデルを抑制することが明らかになったので、JunBのはたらきやIL-2シグナルの強度を調節するというアプローチにより、Treg細胞を介して症状を緩和するという新しい治療法の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Regulatory T cells (Treg cells) are known to play important roles in preventing excess immune reactions, how Treg cells are generated in vivo has not been fully elucidated. We revealed that Treg cells are not efficiently developed in mice deficient in the transcription factor JunB due to impairment in activation of IL-2 signaling. We also found that dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis, a mouse model for human ulcerative colitis, was exacerbated in JunB-deficient mice because of the reduction in the Treg cell number. Injection of a high dose of IL-2 into JunB-deficient mice resulted in mitigation of the colitis by expansion of Treg cells.

研究分野：免疫学(腸管免疫、炎症制御)、分子生物学(遺伝子発現調節)

キーワード：AP-1 転写因子 JunB 制御性T細胞 ヘルパーT細胞 大腸炎

1. 研究開始当初の背景

- (1) 転写因子 JunB は、c-Jun や JunD と共に Jun タンパク質ファミリーを形成するが、JunB の単独欠損マウスで得られた知見から、胎盤形成や、骨髄系細胞の増殖調節、骨形成、表皮の恒常性維持などの生理機能に必須な役割を果たすことが明らかにされていた。
- (2) 獲得免疫細胞における JunB の役割は長らく不明であったが、我々を含む複数の研究グループが、Th17 細胞の分化に JunB が必須であることを明らかにした。しかし、Th17 細胞以外の免疫細胞における JunB の役割や、種々の炎症性疾患の病態形成における JunB の役割については不明であった。特に、T 細胞特異的に JunB を欠損するマウスでは、デキストラン硫酸ナトリウム (dextran sulfate sodium, DSS) 誘導性大腸炎の症状が重篤化することを見出していたが、その増悪化のしくみについては不明であった。

2. 研究の目的

- (1) Th17 細胞以外の免疫細胞における JunB の役割を明らかにする。
- (2) 炎症性腸疾患モデルにおける T 細胞の役割を踏まえ、T 細胞で発現する JunB が病態形成にどのように関与するかを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) Cd4-Cre ドライバーマウスを用いて C57BL/6 背景の T 細胞特異的な JunB 欠損マウス (*Junb<sup>fl/fl</sup>Cd4-Cre* マウス) を作出した。
- (2) マウスに CD3 $\epsilon$  に対するアゴニスト抗体を投与することにより小腸炎を誘導したほか、DSS を投与して大腸炎を誘導した。体重の減少や、消化管組織に浸潤した好中球の数、組織中での炎症性サイトカイン遺伝子の発現によって症状を評価した。
- (3) DSS 誘導性大腸炎誘導前後の大腸の粘膜固有層からリンパ球を単離し、フローサイトメトリーにより T 細胞サブセットを解析した。
- (4) マウスの脾臓からナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞を単離し、CD3 と CD28 に対するアゴニスト抗体存在下に *in vitro* で培養をおこなった。サイトカインや抗体を添加することにより、各種ヘルパー T 細胞サブセットへの分化を評価した。
- (5) 野生型および JunB 欠損マウス由来の骨髄細胞を混合してレシピエントマウスに移入し、同じサイトカイン環境下での T 細胞分化における JunB の役割を評価した。
- (6) IL-2 のリコンビナントタンパク質と抗 IL-2 を混合してマウスに投与することにより、持続的で強い IL-2 シグナルの活性化を誘導した。

4. 研究成果

- (1) T 細胞特異的な JunB 欠損マウス (*Junb<sup>fl/fl</sup>Cd4-Cre* マウス) に抗 CD3  $\epsilon$  アゴニスト抗体を投与したところ、コントロールマウス (*Junb<sup>fl/fl</sup>* マウス) と比較して症状が軽減していた (図 1)。これは、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) モデルで観察されたのと同様に、JunB の欠損により病原性 Th17 細胞の分化が障害されたためであると考えられた。これに対し、DSS 誘導性大腸炎モデルでは、T 細胞における JunB の欠損により逆に症状が悪化することが判明した (図 2, 図 3, 図 4)。我々のプロトコールでは、5 日間 2.0% の DSS を含む水をマウスに自由飲水させ、その後、通常の飲料水に切り替えて 11

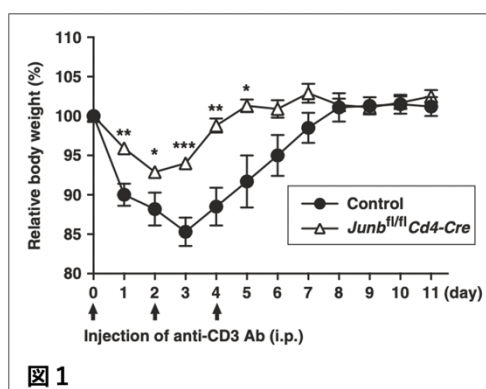


図 1

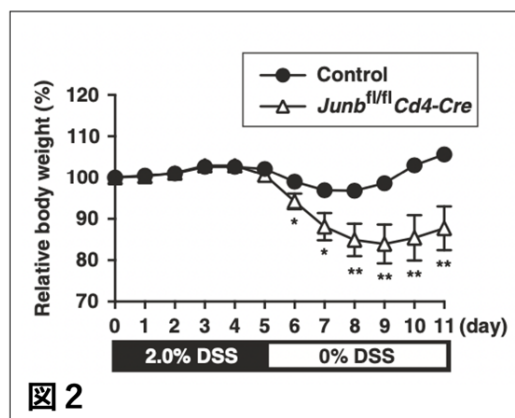


図 2

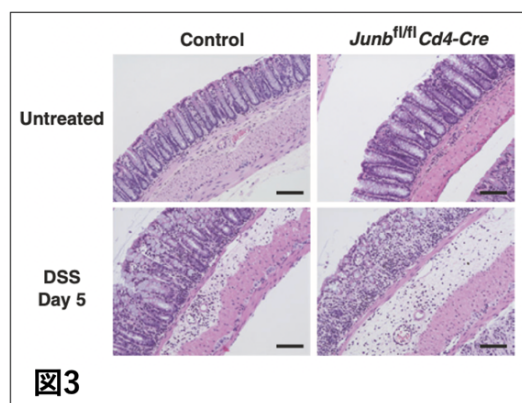


図 3

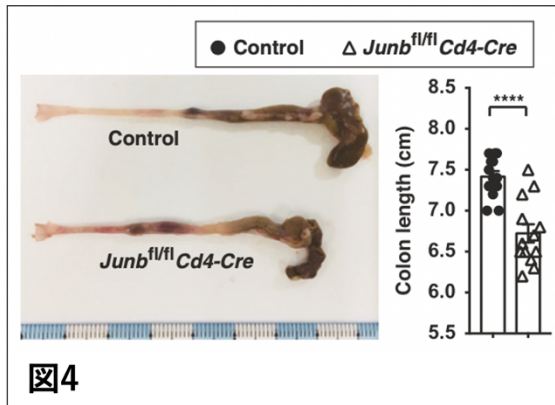


図4

一方、IFN- $\gamma$ 産生性の Th1 細胞は、コントロールマウスと JunB 欠損マウス共に DSS 投与前から一定数が存在し、DSS 投与に伴って増加した。このことから、T 細胞で JunB を欠損させても、病原性 T 細胞が増加するのではないことが明らかになった。

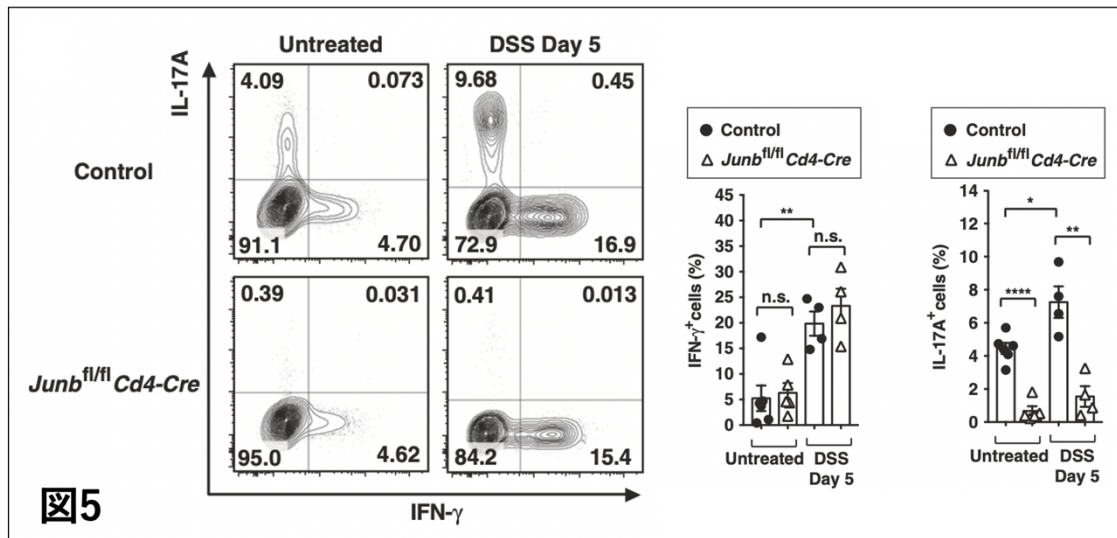


図5

次に、JunB の欠損により他のタイプの T 細胞が影響を受ける可能性を明らかにする目的で、制御性 T 細胞 (Treg 細胞) について検討した。DSS 投与後 5 日目のマウス大腸粘膜固有層から調製したリンパ球を用いて、Treg 細胞のマーカー転写因子である Foxp3 の染色をおこなったところ、JunB 欠損マウスでは Treg 細胞数が減少していることが明らかになった (図 6)。

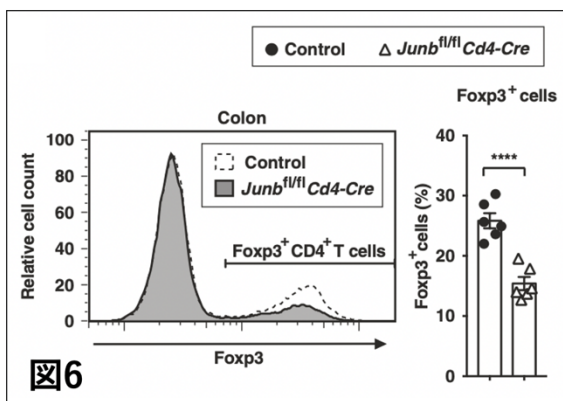


図6

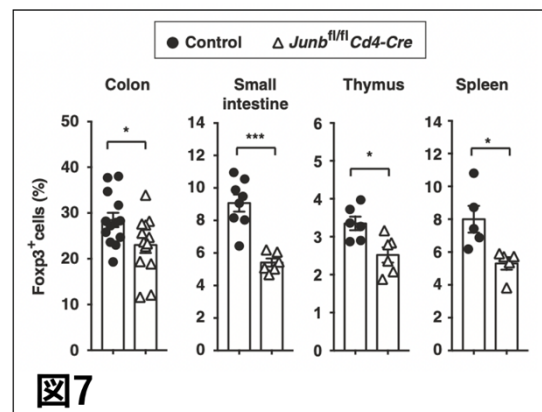


図7

JunB 欠損マウスにおける Treg 細胞の減少は、DSS 投与後の大腸だけでなく、DSS 未投与の大腸、小腸、胸腺、脾臓でも観察された (図 7)。従って、T 細胞で JunB を欠損させることにより、複数のヘルパー T サブセットの分化が障害されることが明らかになった。T 細胞特異的な JunB 欠損マウスでは、病原性 Th17 細胞の分化が障害されることにより、EAE や抗 CD3 抗体誘導性腸炎の症状が軽減する一方で、炎症抑制作用を持つ Treg 細胞の分化障害により DSS 誘導性大腸炎が重篤化すると考えられた。DSS 誘導性大腸炎は、SCID マウスや Rag2 欠損マウスなどの獲得免疫系を欠くマウスの系統でも発症することから、自然免疫系が主要な役割を果たすが、Treg 細胞は自然免疫系の活性化による炎症反応も抑制することが報告されている。



マウスの生体内では、T細胞特異的な JunB 欠損により Treg 細胞数が減少することが明らかになったが、一般的な *in vitro* の Treg 細胞の分化誘導系において、JunB 欠損マウスから調製したナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞は Treg 細胞の分化障害を示さない。Treg 細胞の分化には、TGF- $\beta$  シグナルに加えて、IL-2 シグナルが必須であるため、培養系に IL-2 を添加する 경우가多いが、野生型マウス由来のナイーブ T 細胞の場合は、IL-2 を添加しなくても、自身が産生する IL-2 によって分化条件を維持することができる。一方、IL-2 を添加しない条件下で JunB を欠損するナイーブ T 細胞を培養したところ、Treg 細胞への分化効率が顕著に低下していた (図 8)。

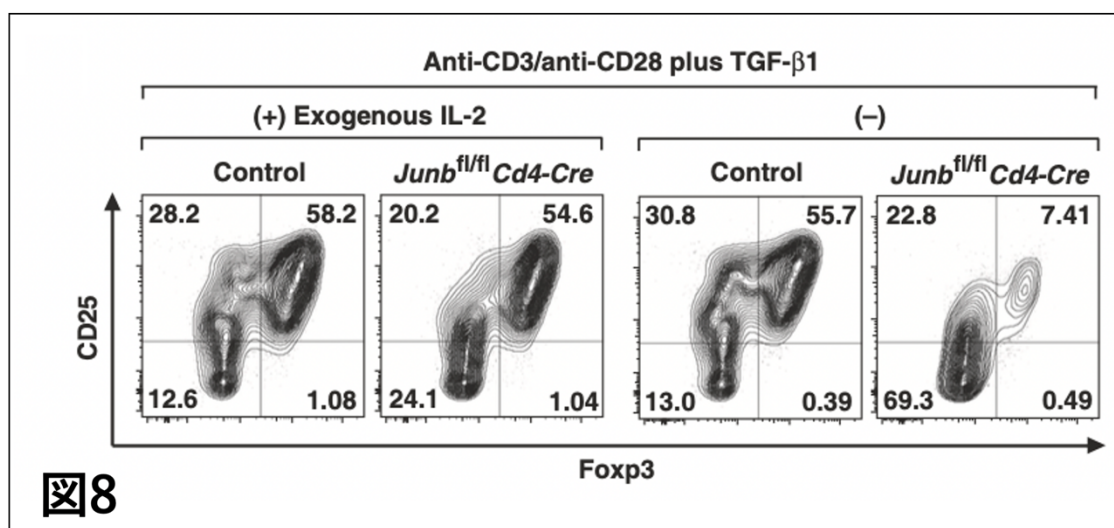


図8

Treg 細胞の表面には、高親和性の IL-2 受容体である CD25 が発現しているが、JunB 欠損 T 細胞では Foxp3 の発現に先立って発現する CD25 の発現増大が障害されていたため、IL-2 のシグナルを受容する活性が低下したことにより Treg 細胞への分化が障害されたと考えられた。さらに、JunB 欠損 T 細胞では IL-2 の産生能自体も低下していたので、我々は、JunB 欠損による Treg 細胞の分化障害は IL-2 シグナルの活性化の低下に起因すると結論づけた。さらに我々は、抗 JunB 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法により、JunB が CD25 遺伝子 (*Il2ra*) の発現制御領域に結合して直接転写活性化を調節していることを示した。

我々はさらに、JunB の欠損による CD25 の発現低下が実際の生体内で Treg 細胞の分化障害を起こしている可能性を検討する目的で、野生型マウスと JunB 欠損マウス由来の骨髄細胞をレシピエントマウスに移入する実験をおこなった (図 9)。この骨髄キメラ実験では、レシピエントマウスの体内で、どちらのマウス由来の造血幹細胞も同等の IL-2 シグナルに暴露されるため、T 細胞側の差異を検討することができる。その結果、胸腺、脾臓、大腸のいずれにおいても、JunB 欠損 T 細胞の Treg 分化不全が認められたので、JunB 欠損による Treg 細胞分化障害における CD25 発現低下の重要性が示された。レシピエントマウスの体内では、野生型細胞と JunB 欠損細胞との間の増殖競争も起きており、それは大腸で最も顕著であった。

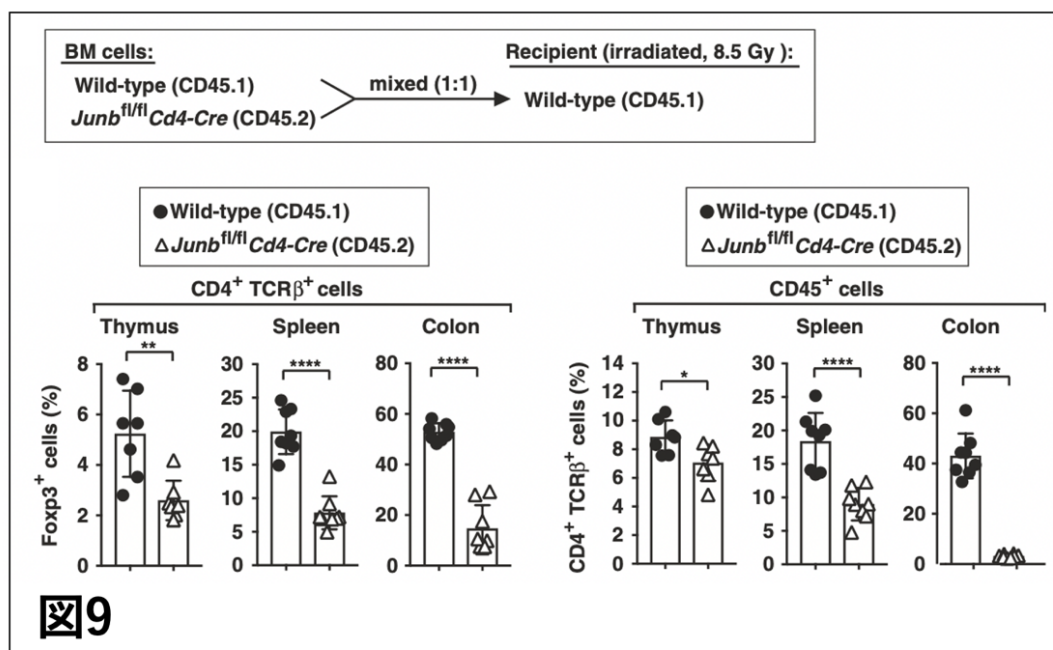


図9

in vitro において、培養液に IL-2 を加えると JunB 欠損による Treg 細胞分化不全が回復することを踏まえ、次に我々は JunB 欠損マウスへの IL-2 投与の実験を実施した。IL-2 と混合して投与するとマウス体内での動態が改善する抗 IL-2 抗体のクローンが報告されていたので、この複合体を JunB 欠損マウスに投与したところ、胸腺、脾臓、大腸すべての組織で Treg 細胞の増加が認められた (図 10)。CD25 の発現は Treg 細胞の分化に伴って Foxp3 によって誘導されるので、JunB 欠損 T 細胞で当初低発現であった CD25 が、強い IL-2 シグナルによって Foxp3 を介して発現するようになり、さらに強い Treg 細胞への分化誘導に寄与したと考えられる。

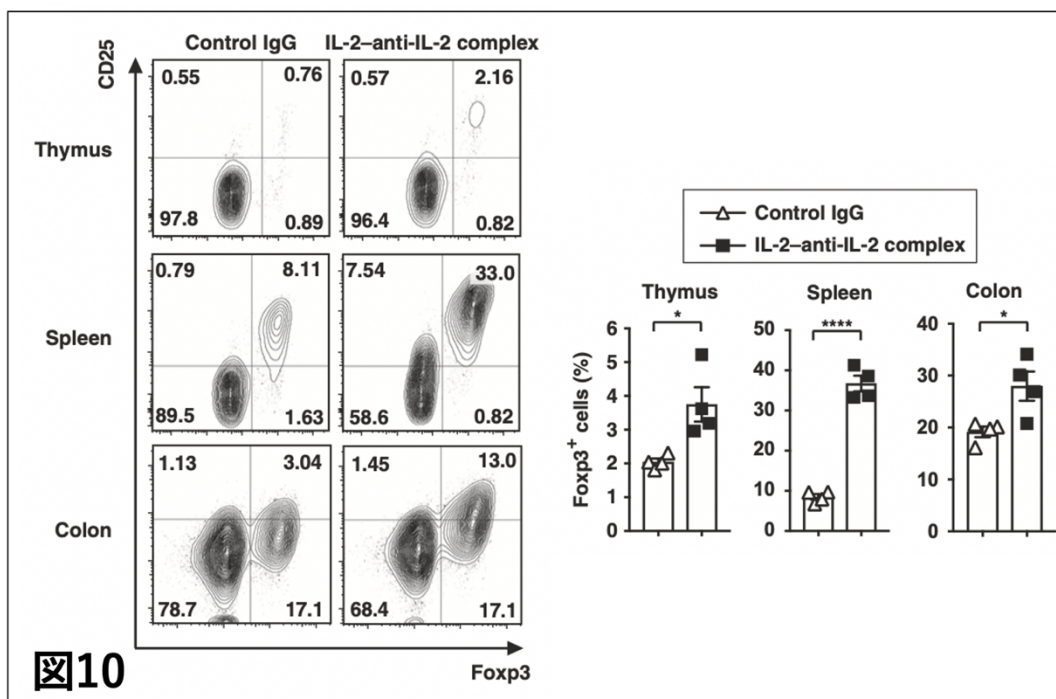


図10

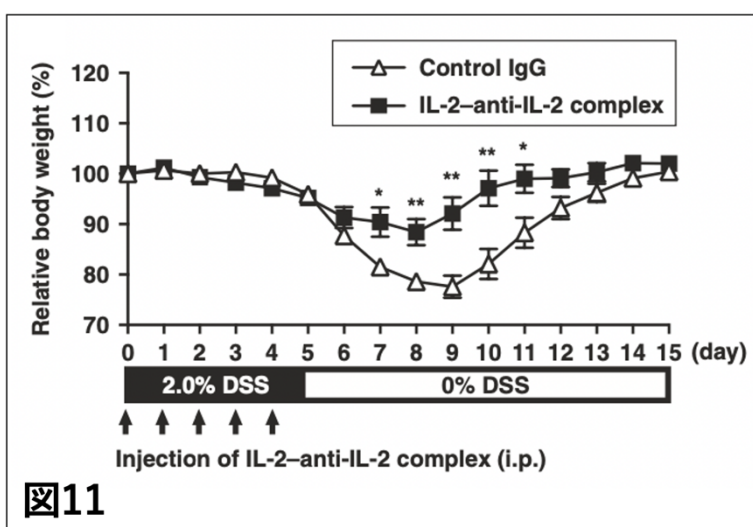


図11

最後に我々は、JunB 欠損マウスに IL-2 を投与することによって Treg 細胞の増加を介して DSS 誘導性大腸炎の症状が軽減するかについて検討した。期待通り、IL-2 免疫複合体を投与した群では、体重減少が軽減することが明らかになった。Treg 細胞だけでなく、Th17 細胞にも炎症抑制作用が報告されていたため、IL-2 免疫複合体を投与した JunB 欠損マウスの大腸について Th17 細胞数を解析したが、変化が認められ

なかったことから、この効果は Treg 細胞に特異的であることが示された。

以上のことから、JunB は IL-2 シグナリングの活性化を介して Treg 細胞の分化を促進することが明らかになった。T 細胞特異的な JunB 欠損マウスで認められた DSS 誘導性大腸炎の増悪化は、Treg 細胞の分化障害に起因するものと考えられた。自然免疫系が主要な役割を果たす炎症疾患モデルを用いたことにより、T 細胞における JunB の新しい役割を明らかにすることができた。

#### 文献

「JunB plays a crucial role in development of regulatory T cells by promoting IL-2 signaling」  
 Katagiri T., **Yamazaki S.\***, Fukui Y., Aoki Y., Yagita H., Nishina T., Mikami T., Katagiri S., Shiraishi A., Kimura S., Tateda K., Sumimoto H., Endo S., Kameda H., and Nakano H.\*  
*Mucosal Immunology* 12, 1104–1117 (2019)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nishina T., Deguchi Y., Ohshima D., Takeda W., Ohtsuka M., Shichino S., Ueha S., Yamazaki S., Kawachi M., Nakamura E., Nishiyama C., Kojima Y., Adachi-Akahane S., Hasegawa M., Nakayama M., Oshima M., Yagita H., Shibuya K., Mikami T., Inohara N., Matsushima K., Tada N., Nakano H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Interleukin-11-expressing fibroblasts have a unique gene signature correlated with poor prognosis of colorectal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22450-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Katagiri T., Kameda H., Nakano H., Yamazaki S.	4. 巻 20
2. 論文標題 Regulation of T cell differentiation by the AP-1 transcription factor JunB	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunological Medicine	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/25785826.2021.1872838	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakabayashi O., Takahashi H., Moriwaki K., Komazawa-Sakon S., Ohtake F., Murai S., Tsuchiya Y., Koyahara Y., Saeki Y., Yoshida Y., Yamazaki S., Tokunaga F., Sawasaki T., Nakano H.	4. 巻 4
2. 論文標題 3.MIND bomb 2 prevents RIPK1 kinase activity-dependent and -independent apoptosis through ubiquitylation of cFLIPL	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Commun Biol	6. 最初と最後の頁 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01603-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shindo Ryodai, Katagiri Takaharu, Komazawa-Sakon Sachiko, Ohmuraya Masaki, Takeda Wakami, Nakagawa Yoshiko, Nakagata Naomi, Sakuma Tetsushi, Yamamoto Takashi, Nishiyama Chiharu, Nishina Takashi, Yamazaki Soh, Kameda Hideto, Nakano Hiroyasu	4. 巻 21
2. 論文標題 Regenerating islet-derived protein (Reg)3 plays a crucial role in attenuation of ileitis and colitis in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100738 ~ 100738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2020.100738	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Katagiri Takaharu, Yamazaki Soh, Fukui Yuto, Aoki Kotaro, Yagita Hideo, Nishina Takashi, Mikami Tetuo, Katagiri Sayaka, Shiraishi Ayako, Kimura Soichiro, Tateda Kazuhiro, Sumimoto Hideki, Endo Shogo, Kameda Hideto, Nakano Hiroyasu	4. 巻 12
2. 論文標題 JunB plays a crucial role in development of regulatory T cells by promoting IL-2 signaling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mucosal Immunology	6. 最初と最後の頁 1104 ~ 1117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41385-019-0182-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shindo Ryodai, Ohmuraya Masaki, Komazawa-Sakon Sachiko, Miyake Sanae, Deguchi Yutaka, Yamazaki Soh, Nishina Takashi, Yoshimoto Takayuki, Kakuta Soichiro, Koike Masato, Uchiyama Yasuo, Konishi Hiroyuki, Kiyama Hiroshi, Mikami Tetuo, Moriwaki Kenta, Araki Kimi, Nakano Hiroyasu	4. 巻 15
2. 論文標題 Necroptosis of Intestinal Epithelial Cells Induces Type 3 Innate Lymphoid Cell-Dependent Lethal Ileitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 536 ~ 551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.05.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Hiroyasu, Murai Shin, Yamaguchi Yoshifumi, Shirasaki Yoshitaka, Nakabayashi Osamu, Yamazaki Soh	4. 巻 3
2. 論文標題 Development of novel methods that monitor necroptosis and the release of DAMPs at the single cell resolution	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Stress	6. 最初と最後の頁 66 ~ 69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15698/cst2019.02.177	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurosawa Takeyuki, Miyoshi Shion, Yamazaki Soh, Nishina Takashi, Mikami Tetuo, Oikawa Akira, Homma Sakae, Nakano Hiroyasu	4. 巻 24
2. 論文標題 A murine model of acute lung injury identifies growth factors to promote tissue repair and their biomarkers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 112 ~ 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12659	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Soh Yamazaki, Shin Yonenahra, Hiroyasu Nakano
2. 発表標題 Mice lacking death ligand-induced cell death develop Pneumocystis pneumonia
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片桐 翔治, 進藤 綾大, 駒澤 幸子, 竹田 若水, 仁科 隆史, 山崎 創, 亀田 秀人, 中野 裕康
2. 発表標題 CタイプレクチンReg3タンパク質による大腸炎の制御
3. 学会等名 日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中林 修, 高橋 宏隆, 村井 普, 大竹 史明, 駒澤 幸子, 土屋 勇一, 佐伯 泰, 吉田 雪子, 山崎 創, 徳永 文稔, 森脇 健太, 澤崎 達也, 中野 裕康
2. 発表標題 cFLIPのコピキチン化による新たなアポトーシス抑制機構の解析
3. 学会等名 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片桐 翔治, 進藤 綾大, 駒澤 幸子, 仁科 隆史, 山崎 創, 亀田 秀人, 中野 裕康
2. 発表標題 CタイプレクチンReg3 は大腸炎に防御的に働く
3. 学会等名 日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 Soh Yamazaki, Takaharu Katagiri, Hiroyasu Nakano
2. 発表標題 JunB facilitates development of regulatory T cells by up-regulating IL-2 signaling
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片桐翔治, 山崎創, 三上哲夫, 遠藤昌吾, 住本英樹, 亀田秀人, 中野裕康
2. 発表標題 JunBはIL-2シグナルを介して、制御性T細胞の分化を調節する
3. 学会等名 第47回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片桐翔治, 山崎創, 三上哲夫, 遠藤昌吾, 住本英樹, 亀田秀人, 中野裕康
2. 発表標題 転写因子JunBはIL-2シグナルを介して制御性T細胞の分化を調節する
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒澤武介, 三好嗣臣, 山崎創, 仁科隆史, 中野裕康, 本間栄
2. 発表標題 急性肺障害モデルを用いた肺胞上皮細胞の増殖因子同定
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山崎 創	4. 発行年 2019年
2. 出版社 臨床免疫・アレルギー科	5. 総ページ数 9
3. 書名 転写因子JunBによる腸管の恒常性維持機構	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------