

平成 22 年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790379

研究課題名（和文） Super Th1 細胞誘導の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism underlying Super Th1 cell induction

研究代表者

中平 雅清 (NAKAHIRA MASAKIYO)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：60454758

研究成果の概要（和文）： Th1 細胞から誘導された Super Th1 細胞が IL-13 を産生するメカニズムについて転写因子 GATA3 の発現に焦点を当てて研究を行った。まず、Super Th1 細胞からの IL-13 産生は転写レベルで制御されていることを明らかにした。次に、IL-4 存在下で TCR、IL-2、IL-18 の共刺激を行うと、Th1 細胞に Gata3 の発現が誘導されること、この Gata3 が Super Th1 細胞において *I113* 遺伝子の転写活性化に必要であることを明らかにした。さらに ChIP assay を用いた解析では Gata3 が *I113* 遺伝子上の CGRE モチーフに結合することを確認し、これによって Super Th1 細胞における *I113* 遺伝子発現が誘導されると考えられた。

研究成果の概要（英文）： In this project, I studied the mechanism underlying IL-13 production in Th1 cell-derived Super Th1 cell by focusing on the expression of Gata3 transcription factor. I first revealed that IL-13 production in Super Th1 cells is regulated at the level of transcription. I next demonstrated that Gata3 is induced in Th1 cells by costimulation of TCR, IL-2, and IL-18 in the presence of IL-4 and that Gata3 is necessary to activate *I113* transcription in Super Th1 cells. Moreover, ChIP assay verified that Gata3 binds to a CGRE motif on *I113* gene, which might induce *I113* expression in Super Th1 cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学

キーワード：免疫学、アレルギー・ぜんそく、シグナル伝達、発現制御

## 1. 研究開始当初の背景

従来、アレルギー性疾患は、アレルゲン特異的 Th2 細胞とアレルゲン/IgE で活性化

された肥満細胞が原因であると考えられてきた。実際、小児アレルギーの病態は Th2/IgE で誘導されることが多い。これと

は異なり、成人の場合はその発症は Th2/IgE 非依存のかつ感染で増悪することから小児とは異なる病態であると考えられており、我々のグループは、その発症が、Th1 細胞が抗原と微生物成分で刺激された細胞由来の IL-18 の刺激を受け、IFN- $\gamma$  に加え新たに IL-13 を産生する Super Th1 細胞に分化することが原因であることを明らかにした。Th1 型気管支喘息の病態は、IFN- $\gamma$  の作用で気道過敏性亢進が、IL-13 の作用で気道周囲繊維化が誘導されるというものであった。加えて、我々のグループは、同細胞が原因で感染に伴いアトピー性皮膚炎が増悪することを、実験的に証明した。即ち、SDS を皮膚に塗布し、次に黄色ブドウ球菌由来のプロテイン A (SpA) を塗布すると、皮膚から内因性 IL-18 の産生が誘導され、遂には Super Th1 細胞が誘導される。この病態は、IL-18 中和抗体の投与で Super Th1 細胞の誘導を阻害すると阻止される。しかしながら、IL-18 刺激で何故 Th1 細胞から Th1 サイトカインの IFN- $\gamma$  と Th2 サイトカインの IL-13 の産生が同時に誘導されるのか、未だ全く不明なままであった。

## 2. 研究の目的

(1) 現在までに、少なくとも 4 種類の T helper 細胞サブセットが知られており、そのどれもがそのサブセット特異的な転写因子 (master regulator) を発現していることが知られている。そこで、Super Th1 細胞の最も大きな特徴である IL-13 産生を制御している責任転写因子の同定を第一の目的とした。(2) Super Th1 細胞は Th1 細胞を抗原+IL-18 で共刺激することによって誘導される。そこで、この共刺激が (1) で同定した転写因子の発現を Th1 細胞でどのように誘導しているのかについて、そのシグナル伝達経路を明らかにすることを目的とした。又、同転写因子が Th1 細胞に IL-13 産生を誘導するメカニズムについて明らかにすることも目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) BALB/c マウス、もしくは実験によっては特定の遺伝子をノックアウトした BALB/c バックグラウンドのマウスから naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞を単離し in vitro で Th1/Th2 細胞を誘導し、抗 CD3 抗体とサイトカインによって再刺激を行い実験に用いた。(2) サイトカイン産生量の評価には ELISA 法を、single cell レベルでのサイトカイン産生の評価には細胞内サイトカイン染色の FACS 解析を行った。(3) 各遺伝子発現の評価には real-time PCR 法を用いた。(4) 転写因子タンパク質の発現については

細胞内染色後に FACS による解析を行い、同転写因子の *Il13* 遺伝子座への結合の評価には ChIP assay を用いた。

(5) *Il13* 発現に対する責任転写因子の必要性については、siRNA を transfection することによって mRNA をノックダウンし、その効果を (2)、(3)、(4) の手法を用いて検討した。

## 4. 研究成果

(1) Th1 細胞を抗 CD3 抗体、IL-2、IL-18 で再刺激すると、抗 CD3 抗体+IL-2 刺激の時に比べて、Th1 細胞は高い IFN- $\gamma$  産生を示し、同時に IL-13 の産生 (Super Th1 細胞の誘導) が観察された。その IL-13 産生量は時間の経過にしたがい徐々に上昇し、再刺激した Th2 細胞から産生される IL-13 の量に匹敵するようになった。又、細胞内サイトカイン染色後に FACS で解析すると、IL-18 共刺激を行った Th1 細胞では IFN- $\gamma$  +IL-13<sup>+</sup>、IL-13<sup>+</sup> のサイトカイン産生を示す population の出現が見られた。これらのことから、Super Th1 細胞からの IL-13 産生には、TCR、IL-2、IL-18 の共刺激が必要であることが明らかになった。

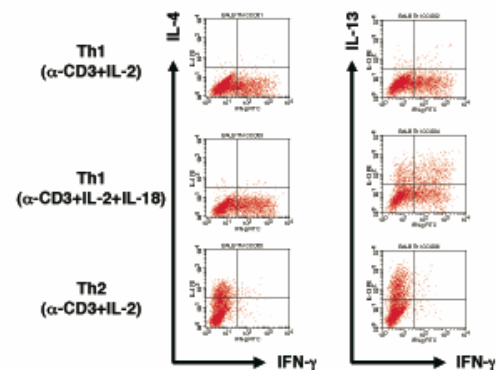


図1 Super Th1細胞の誘導

(2) Th2 細胞における IL-13 産生は転写レベルで制御されており、その転写制御には転写因子 Gata3 が重要な役割を果たすことが知られている。そこで、Super Th1 細胞における *Il13* 遺伝子の発現を検討した。IL-18 存在下で再刺激した Th1 細胞では IL-13 mRNA の有意な発現を認め、(1) で得られた結果に相関して、時間経過に依存した発現の上昇が観察された。*Il13* 遺伝子の発現に相関して、再刺激した Th1 細胞では *Gata3* 遺伝子の発現が mRNA、タンパクの両レベルで確認され、IL-18 共刺激を受けた細胞では IL-18 刺激が無いものに比べて、刺激後 24 時間で *Gata3* タンパク質の発現が上昇していた。又、*Gata3* タンパク質の発現レベルに相関して、*Il13* 遺伝子発現の制御に重要な *Il13* 遺伝子上の配列 (CGRE) に *Gata3* タンパク質の結合が確認され

た。これらのことから、TCR、IL-2、IL-18 の共刺激によって Th1 細胞に発現誘導された Gata3 が Super Th1 細胞における *I113* 遺伝子発現を制御していることが示唆された。

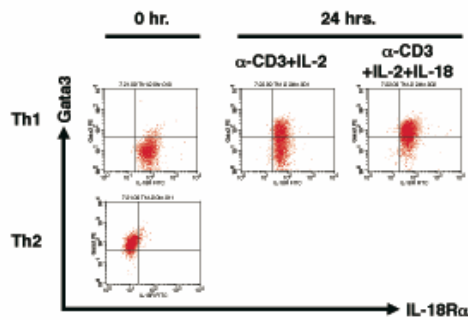


図2 Super Th1細胞におけるGata3の誘導

(3) Th2 細胞において、IL-4 刺激が *Gata3* 遺伝子発現の誘導に重要であることが知られている。そこで、Super Th1 細胞における *Gata3* 遺伝子発現に対する IL-4 の役割について検討した。Th1 細胞に IL-4 レセプター (IL-4R) が発現していることを確認した上で、野生型と IL-4 欠損 (*IL4<sup>gfp/gfp</sup>*) の Th1 細胞を抗 CD3 抗体+サイトカインで再刺激して、*Gata3* と IL-13 の mRNA 発現を比較した。*IL4<sup>gfp/gfp</sup>* Th1 細胞を抗 CD3 抗体+IL-12+IL-18 で再刺激しても、野生型 Th1 細胞のような *Gata3* mRNA と IL-13 mRNA の発現上昇は見られなかった。しかしこの再刺激条件に外因性 IL-4 を添加すると、*Gata3* と *I113* 遺伝子の発現は劇的に回復した。又、抗 IL-4 抗体と抗 IL-4R 抗体の添加によって、野生型 Th1 細胞における *Gata3* と *I113* 遺伝子の発現は強く抑制された。これらのことから、Super Th1 細胞における *Gata3* と *I113* 遺伝子の発現には IL-4R シグナルが必要であり、TCR、IL-4R、IL-18R シグナルが相乗的に *Gata3* 遺伝子の発現を誘導すると考えられた。

(4) (2)、(3)に記したように、Super Th1 細胞では *Gata3* 遺伝子の発現と *I113* 遺伝子の発現が相関していたことから、転写因子 *Gata3* が Super Th1 細胞における *I113* 発現制御に必要であることが示唆された。そこで、siRNA の細胞への導入によって *Gata3* mRNA をノックダウンし、*I113* 遺伝子発現に対する *Gata3* の必要性を証明した。企図した通り、siRNA のトランスフェクションにより、*Gata3* mRNA の減少とそれに伴う *Gata3* タンパク質の減少が見られた。この減少効果は外因性 IL-4 の添加を行っても回復しなかったことから、siRNA の直接的な抑制作用と考えられた。*Gata3* ノックダウン後の *I113* 遺伝子発現を検討すると、*Gata3* mRNA の減少に相関して IL-13 mRNA の減少が観察され、細胞内サイトカイン染色後の FACS 解析でも、*Gata3* ノックダウンによって IFN- $\gamma$ +IL-13<sup>+</sup>、IL-13<sup>+</sup>の

サイトカイン産生を示す population の劇的な減少が確認された。これらのことから、*Gata3* は Super Th1 細胞において *I113* 遺伝子発現を直接的に制御していると考えられた。

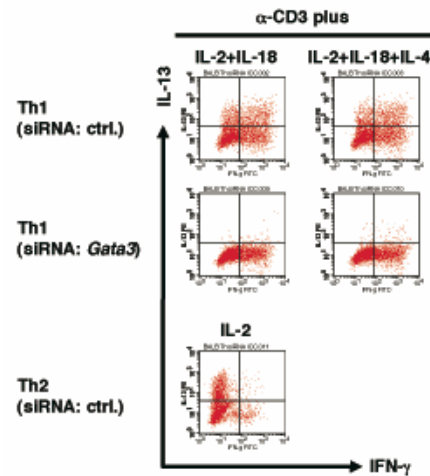


図3 Gata3ノックダウンによるSuper Th1細胞誘導の抑制

(5) Th2 細胞では、IL-4R の下流で Stat6 が *Gata3* 遺伝子発現に対して重要な役割を果たしている。そこで、Super Th1 細胞における *Gata3* と *I113* 遺伝子の発現に対する Stat6 の役割について検討した。予想されたとおり、野生型の Th1 細胞では再刺激後に *Gata3* 遺伝子の発現誘導が見られるのに対し、*Stat6<sup>-/-</sup>* Th1 細胞では見られず、又、この *Stat6<sup>-/-</sup>* Th1 細胞における *Gata3* 遺伝子発現誘導の欠失は外因性 IL-4 の添加によってもその回復が見られなかった。両 Th1 細胞間の *Gata3* 遺伝子の発現の違いに相関して、TCR、IL-2、IL-18 の共刺激による *I113* 遺伝子の発現誘導も *Stat6<sup>-/-</sup>* Th1 細胞では観察されなかった。加えて、再刺激後、*Stat6<sup>-/-</sup>* Th1 細胞では、*Gata3* タンパク質誘導が見られず、IFN- $\gamma$ +IL-13<sup>+</sup>、IL-13<sup>+</sup>のサイトカイン産生を示す population も劇的に減少していた。又、TCR、IL-18R の各シグナル経路における重要な転写因子、NFAT と NF $\kappa$ B の阻害剤を用いてそのシグナル伝達を遮断すると、*Gata3* とともに *I113* 遺伝子の発現も強く阻害された。これらのことより、TCR、IL-18R、IL-4R の下流で NFAT、NF $\kappa$ B、Stat6 が相乗的に作用して *Gata3* 遺伝子の発現を誘導すると考えられた。

(6) Th 分化において、IL-4 と IL-12 はそれぞれ反対に作用することから、Super Th1 細胞誘導に対する IL-12 の効果を検討した。Super Th1 細胞誘導刺激時に IL-12 を共存させると、*Gata3* 遺伝子の発現誘導が強く阻害され、これに相関して *I113* 遺伝子の発現も強く阻害された。これとは逆に、IL-12 の添加によって、*Tbx21* 遺伝子の発現誘導が観察

された。これらのことから、Super Th1 細胞の誘導に際して IL-4 と IL-12 は逆の作用を持っており、IL-4 は誘導促進を、IL-12 は誘導阻害を行うと考えられた。

現在までに少なくとも 4 種類の Th サブセットの存在が知られており、そのうちいくつかのサブセットではそのサイトカイン産生において可塑性が存在すること、その可塑性の獲得には異なるサブセットに発現する転写因子の発現が必要であるという報告が存在する。しかしながら、Th1 細胞が他のサブセットに特異的なサイトカインの産生能力を獲得するという報告は、我々が報告した IL-18 による Th1 細胞から Super Th1 細胞への誘導以外にほとんど存在しない。それ故、Super Th1 細胞からの IL-13 産生誘導の分子メカニズムを明らかにした本研究は非常に意義深いものである。本研究によって、Th1 細胞から Super Th1 細胞への誘導には Th2 細胞特異的転写因子 Gata3 の発現誘導が必要であることが示された。その発現誘導には TCR、IL-2R、IL-18R シグナルとともに、その誘導の方向付けに IL-4R シグナルが重要な役割を有しており、IL-12 R シグナルはその誘導に対して拮抗作用を示すことも明らかになった。これは分化した Th1 細胞の運命決定に際して、細胞周囲のサイトカイン環境が重要な役割を有していることを示しており、本研究成果は免疫現象の可塑性というものを考える上においても、又、Super Th1 細胞によって引き起こされるアレルギー疾患の病態の理解においても大きな意味を持つと考えられる。

#### 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 2 件)

① Kuroda-Morimoto M, Tanaka H, Hayashi N, Nakahira M, Imai Y, Imamura M, Yasuda K, Yumikura-Futatsugi S, Matsui K, Nakashima T, Sugimura K, Tsutsui H, Sano H, Nakanishi K. Contribution of IL-18 to eosinophilic airway inflammation induced by immunization and challenge with *Staphylococcus aureus* proteins. *Int Immunol*. 査読有 2010 in press

② Yoshimoto T, Yasuda K, Tanaka H, Nakahira M, Imai Y, Fujimori Y, Nakanishi K. Basophils contribute to T(H)2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4+ T cells. *Nat Immunol*. 査読有 Vol. 10 No.7 2009 pp706-712.

[学会発表] (計 1 件)

① 中平 雅清、中西 憲司 Super Th1 細胞における IL-13 発現制御機構第 39 回 日本免疫学会総会・学術集会 2009 年 12 月 3 日大阪国際会議場

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中平 雅清 (MASAKIYO NAKAHIRA)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：60454758