

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07026

研究課題名（和文）低濃度レチノイン酸環境下で機能する新規炎症性ヘルパーT細胞の分化誘導機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of novel inflammatory helper T cells differentiation at low concentration of retinoic acid

研究代表者

大岡 嘉治（Ohoka, Yoshiharu）

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：60303971

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）：新規に同定された炎症性ヘルパーT細胞サブセットであるTh9細胞の分化は、レチノイン酸シグナルにより負に制御されていることが示唆されている。本研究では、Th9細胞の分化制御機構にリガンド依存のコリプレッサーが関与していることを想定し、探索を行った。その結果、Th9細胞には、リガンド依存のコリプレッサー：NRIPが特異的に発現していることを見出し、実際にIL-9遺伝子の発現抑制に関与していることを明らかにした。さらに、NRIP遺伝子のTh9細胞における制御機構について検討したところ、NRIP遺伝子の発現はTh9細胞分化誘導に必要なTGF- β シグナルとレチノイン酸を必要とする事が判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Th9細胞は主にIL-9を産生する新規に同定されたヘルパーT細胞サブセットで、気管支喘息等のアレルギー性気道炎症の病態に関与していることや腫瘍免疫への関与が報告されている。Th9細胞の分化制御にレチノイン酸による負の制御機構が関与することは知られていたが、その詳細な機構は明らかではなかった。本研究において、リガンド依存のコリプレッサー：NRIPがTh9細胞のレチノイン酸による負の分化制御機構に関与していることを見出し、NRIP遺伝子の発現制御機構の一端を明らかにした。これらの研究成果はアレルギーや自己免疫疾患の新たな病態の解明や治療薬開発の分子基盤の構築にも貢献することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Th9 cells are a newly identified inflammatory helper T cell subset that primarily produce IL-9 and have been reported to be involved in the pathogenesis of allergic airway inflammation such as bronchial asthma and in tumor immunity. It has been suggested that Th9 cell differentiation is negatively regulated by retinoic acid signaling. In this study, we explored the involvement of ligand-dependent repressors in the negative regulatory mechanism of Th9 cell differentiation. As a result, we found that ligand-dependent repressor: NRIP is specifically expressed in Th9 cells and is actually involved in the repression of IL-9 gene expression. Furthermore, we investigated the regulatory mechanism of the NRIP gene expression in Th9 cells. We found that NRIP gene expression requires TGF- β signaling, which are involved in the induction of Th9 cell differentiation and retinoic acid.

研究分野：免疫学 生化学 分子生物学

キーワード：NRIP Th9 レチノイン酸 リガンド依存のコリプレッサー TGF-

1. 研究開始当初の背景

免疫系においてビタミン A の代謝物であるレチノイン酸は、リンパ球に小腸特異的ホーミング能を賦与する他、Th1 細胞、Th2 細胞、末梢型制御性 T 細胞 (pTreg) や Th17 細胞の分化の促進や抑制に関与することが明らかになり、免疫系の恒常性維持に欠かせない制御因子として認識されている。我々のグループは、ビタミン A を欠乏させたマウスにおいて経口免疫寛容の破綻が生じ、食物アレルギー反応が発症すること、この免疫寛容の破綻には、従来の Th2 細胞とは性状が異なる、IL-13 を特異的に高産生する新規の炎症性ヘルパー T 細胞が関与することを見出し、Th13 細胞と命名した。(Yokota-Nakatsuma A., Takeuchi H., Ohoka Y., et al. *Mucosal Immunol.* 2014 7 (4): 786-801)。また、最近、CD4 陽性 T 細胞特異的にレチノイン酸受容体 RAR α を欠失させたマウスでは、IL-9 を高産生する新規の炎症性ヘルパー T 細胞サブセット Th9 細胞の分化が亢進し気管支喘息が悪化することが報告されている (Schwartz D.M., et al. *Immunity* 2019 50: 106-120)。これらの知見は、定常濃度のレチノイン酸存在下では、レチノイン酸受容を介する負のシグナルが炎症性ヘルパー T 細胞である Th9 細胞や Th13 細胞の分化を抑制しており、何らかの要因でレチノイン酸濃度が低下すると、これらの細胞の分化が亢進し様々なアレルギー疾患を引き起こす分子機構が存在することを示唆しているが、その詳細については明らかではなかった。

2. 研究の目的

レチノイン酸受容を介する負の遺伝子発現制御に関しては、従来から種々の細胞において複数のリガンド依存的なコリプレッサーが関与することが報告されている。IL-9 や IL-13 遺伝子の発現制御領域には複数のレチノイン酸応答配列 (Retinoic acid-responding element; RARE) が存在することから、IL-9 や IL-13 遺伝子の発現制御においても、Th9 細胞や Th13 細胞に特異的に発現するリガンド依存的なコリプレッサーが関与している可能性が考えられる。本研究では、Th9 細胞の分化に関わるレチノイン酸受容体を介する負の制御機構を明らかにする為、Th9 細胞に特異的に発現するリガンド依存的なコリプレッサーを同定し、その発現制御機構や Th9 細胞分化における役割を解明することを目的とする。本研究の成果は、新規のアレルギー疾患発症機序の解明や、その治療に役立つ新たな創薬ターゲットの分子基盤の構築に貢献するものと期待される。

3. 研究の方法

(1) マウス脾臓から調整したナイーブ CD4 陽性 T 細胞を、Th2 細胞や Th9 細胞分化条件、レチノイン酸受容体アゴニスト、アンタゴニスト存在、非存在下で分化させ、リガンド依存的 (Ligand-Dependent) コリプレッサー (以下 LD-コリプレッサーと記述) NRIP、PRAME、TRIM24 等の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法を用いて比較検討し、Th9 細胞で特異的に機能している LD-コリプレッサーを同定する。また、Th2 細胞や Th9 細胞の分化方向性の決定に重要な役を果たしている転写因子 GATA3、IRF4、Smad3 等の遺伝子発現へのレチノイン酸受容体アゴニスト、アンタゴニストの影響をリアルタイム PCR 法を用いて解析する。

(2) 同定した LD-コリプレッサーの siRNA を Th9 細胞に導入、LD-コリプレッサー遺伝子の発現をノックダウンすることにより、レチノイン酸による IL-9 遺伝子の発現抑制および IL-9 産生抑制が解除されるかどうか検討する。

(3) 同定した LD-コリプレッサーの遺伝子発現調節領域を精査し、遺伝子発現に関与する転写因子を検索する。また、遺伝子発現調節領域をクローニング、レポーターベクター作製し、関与が予想される転写因子、レチノイン酸受容体、GATA3、IRF4、Smad3 などの種々の転写因子の発現ベクターと共にマウス T 細胞リンパ腫細胞株 EL-4 細胞等に共発現させレポーターアッセイを行い、その転写調節機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) マウス脾臓から調整したナイーブ CD4 陽性 T 細胞を、Th9 細胞分化条件、レチノイン

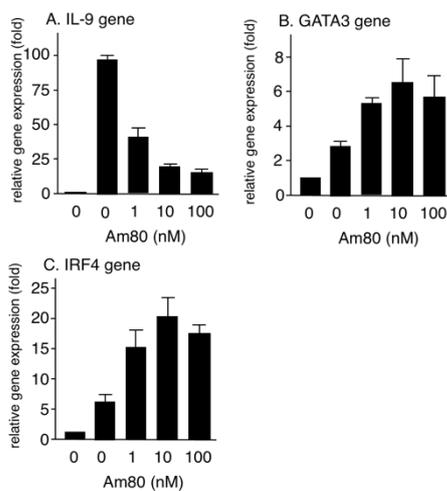


図1. レチノイン酸受容体リガンドAm80のIL-9 (A)、GATA3 (B) およびIRF-4 (C) 遺伝子の発現への影響

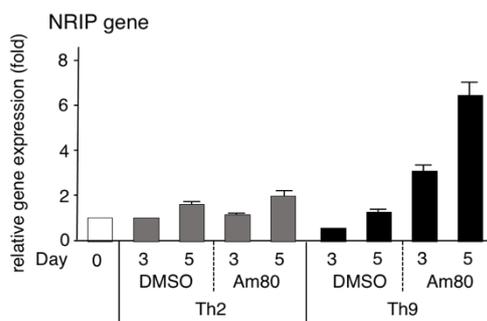


図2. Th2細胞およびTh9細胞におけるNRIP遺伝子の発現

ン酸受容体アゴニスト Am80 存在下で培養すると、Am80 濃度依存的に IL-9 遺伝子の発現は抑制されたが、分化方向性決定に関与する転写因子 GATA3、IRF4 の遺伝子発現はむしろ促進した。これらの結果から、レチノイン酸シグナルは IL-9 遺伝子の発現を特異的に抑制するが、分化の方向性の決定には関与していないことが明らかになった (図1)。次に、Th2 細胞分化条件 (IL-4) および Th9 細胞分化条件 (IL-4 + TGF- β) において Am80 存在、非存在下、LD-コリプレッサーとして知られている NRIP、PRAME、TRIM24 等の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法を用いて比較検討した。その結果、LD-コリプレッサー NRIP 遺伝子の発現が Th9 細胞特異的に Am80 に依存して顕著に発現誘導され、Th2 細胞ではほとんど誘導されないことが明らかになった (図2)。また、Th2 細胞および Th9 細胞分化条件の違いは TGF- β の有無であることから、NRIP 遺伝子の発現にはレチノイン酸シグナルと共に TGF- β シグナルが必要であることが示唆された。

(2) NRIP が Th9 細胞において IL-9 遺伝子の発現抑制に関与している LD-コリプレッサーであることを明らかにするために、NRIP 遺伝子に対する siRNA を Th9 細胞に導入し NRIP 遺伝子発現を抑制することでレチノイン酸シグナルによる IL-9 遺伝子発現抑制が解除されるかどうか検討した。その結果、siRNA 導入により NRIP 遺伝子発現を抑制された Th9 細胞では、Am80 による IL-9 遺伝子発現の抑制が顕著に解除された。

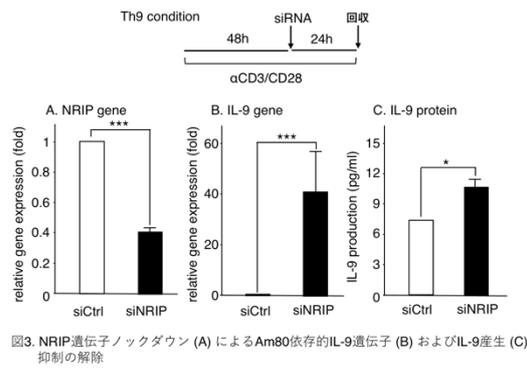


図3. NRIP遺伝子ノックダウン (A) によるAm80依存的IL-9遺伝子 (B) およびIL-9産生 (C) 抑制の解除

また、ELISA 法を用いて測定した IL-9 産生量も遺伝子と同様にレチノイン酸シグナルによる産生抑制が解除された (図3)。以上の結果から、Th9 細胞においてレチノイン酸シグナルにより IL-9 の発現抑制に参与する LD-コリプレッサーは NRIP であることが強く示唆された。

(3) マウス T 細胞リンパ腫細胞株 EL-4 細胞における LD-コリプレッサー NRIP 遺伝子の発現を検討したところ、Th9 細胞と同様にレチノイン酸受容体リガンド Am80 によって発現誘導されることを見出した。さらに、Am80 による NRIP 遺伝子発現の誘導は Th9 細胞分化

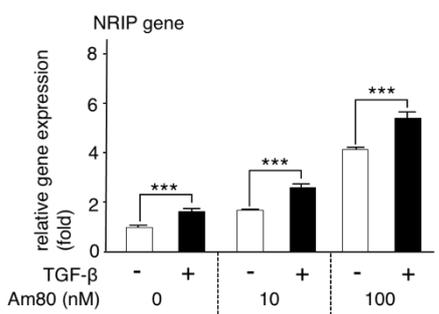


図4. EL-4細胞におけるNRIP遺伝子発現に対するレチノイン酸受容体リガンドAm80およびTGF-βの相乗効果

化誘導に必要な TGF-β 添加により顕著に増強された (図4)。LD-コリプレッサーの第1エクソン上流部の遺伝子発現調節領域の転写因子結合配列を検討したところ、複数の Smad 結合配列が存在することが明らかになった。そこで、EL-4 細胞に TGF-βシグナル下流で機能する転写因子 Smad3 を発現させるところ、Am80 による NRIP 遺伝子の発現が顕著に増強されることが明らかになった (図5)。NRIP 遺伝子の第1エクソン上流部の遺伝子発現調節領域をクローニング、レポーターベクターを構築し、Smad3 発現ベクターと共に EL-4 細胞に発現させたところ顕著なレポーター活性の亢進が観察された (data not shown)。以上の結果は、Th9 細胞における NRIP 遺伝子発現制御に、TGF-βシグナル下流で機能する転写因子 Smad3 とレチノイン酸シグナルの相互作用が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

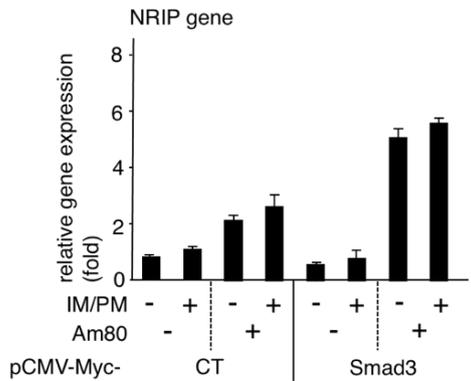


図5. EL-4細胞におけるSmad3強制発現によるNRIP遺伝子発現の亢進

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 1. Iwashita S, Suzuki T, Kiriya Y, Dohmae N, Ohoka Y, Song SY, Nakashima K.	4. 巻 40(6)
2. 論文標題 Overcoming off-targets: assessing Western blot signals for Bcnt/Cfdp1, a tentative component of the chromatin remodeling complex.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biosci Rep	6. 最初と最後の頁 BSR20194012
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1042/BSR20194012	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中妻彩、Kim Ka-Min、永田翔子、大岡嘉治
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎モデルマウスにおけるCD70陽性IL-13産生ヘルパーT細胞の解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松本大生、中妻彩、大岡嘉治
2. 発表標題 新規炎症性ヘルパーT細胞Th9の分化に関するレチノイン酸シグナルの解析とリガンド依存性コリプレッサーの探索
3. 学会等名 第60回 日本薬学会中国四国支部学術大会 松山（オンライン大会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中妻彩、大西秀汰、大西紅、寺西愛、大岡嘉治
2. 発表標題 新規IL-13高3生炎症性ヘルパーT(Th)細胞とTh17/22細胞の比較検討
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会、広島（オンライン開催）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
研究協力者	中妻 彩 (Nakatsuma Aya) (30446075)	徳島文理大学・薬学部・講師 (36102)	

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
---------	---------