

機関番号：12501
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790939
 研究課題名（和文） 誘導性 IL-21 産生 T 細胞/濾胞ヘルパー T 細胞の分化制御機構の解明
 研究課題名（英文） The mechanisms of IL-21 production and follicular B helper T cell (Tfh cell) differentiation
 研究代表者
 須藤 明 (SUTO AKIRA)
 千葉大学・大学院医学研究院・助教
 研究者番号：50447306

研究成果の概要（和文）：

本研究では、自己免疫疾患発症に関与する IL-21 の産生制御機構を解析し、転写因子 c-Maf が IL-21 のプロモーターおよびエンハンサー領域に結合することにより、IL-21 の産生を誘導することを明らかにした。さらに抑制性副刺激分子 BTLA が、生体内での主要な IL-21 産生細胞である濾胞ヘルパー T 細胞(Tfh 細胞)に高発現し、Tfh 細胞からの IL-21 産生を抑制し、IL-21 依存性の液性免疫を抑制していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we addressed the mechanisms underlying the regulation of IL-21 production in CD4+ T cells. We found that transcription factor c-Maf directly induced IL-21 production in CD4+ T cells by activating IL-21 promoter and enhancer. We also found that BTLA, a third inhibitory co-receptor expressed on B cells and T cells, was highly expressed on follicular B helper T cells (Tfh cells). Moreover, we found that BTLA signaling suppressed IL-21 production from Tfh cells and subsequent Tfh cell-mediated IgG responses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：IL-21, c-Maf, BTLA, 濾胞ヘルパー T 細胞, Tfh 細胞

1. 研究開始当初の背景

IL-21 は、自己免疫疾患への関与が示唆されている IL-17 産生 CD4 陽性 T 細胞(Th17 細胞)や、T 細胞依存的な抗体産生に重要な役割を果たしている濾胞ヘルパー T 細胞(Tfh 細胞)から産生され、その自己増殖因子として機能することが報告されている。我々は、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を IL-6+抗 IL-4 抗体+抗 IFN- γ 抗体の存在下で抗原刺激すると IL-21 を大量に産生する細胞(誘導性 IL-21 産

生 T 細胞)を誘導できることを明らかにした(J Exp Med 2008)。また誘導性 IL-21 産生 T 細胞は、抗原+抗原提示細胞で刺激すると、CXCR5、ICOS、抑制性副刺激分子 B and T lymphocyte attenuator (BTLA)を高発現し、Tfh 細胞類似のフェノタイプを獲得することを見出した。最近、Nurieva らは同様の方法で in vitro で誘導した Tfh 様細胞をマウスに移入すると胚中心の形成と抗体産生が促進されることを報告しており(Immunity 2008)、

誘導性 IL-21 産生 T 細胞が生体内で成熟し、Tfh 細胞として機能することが示唆された。しかし、誘導性 IL-21 産生 T 細胞/Tfh 細胞の分子レベルでの分化制御機構は不明であった。

他方、研究協力者である渡辺は BTLA 欠損マウスを作製し、BTLA 欠損マウスでは多発性硬化症モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)が重症化すること (Nat Immunol. 2003)、加齢 BTLA 欠損マウスでは自己抗体の産生が亢進し、シェーグレン症候群様の病態を呈すること (Arthritis Rheum. 2008) を報告した。これらの事実より、Tfh 細胞に発現する BTLA が自己免疫疾患の発症制御に関与している可能性が推測されるが、Tfh 細胞の分化/活性化における BTLA の役割も不明であった。

2. 研究の目的

そこで、本申請研究では、誘導性 IL-21 産生 T 細胞/Tfh 細胞の分化制御機構、IL-21 産生機構、及び抗体産生制御における BTLA の役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 誘導性 IL-21 産生 T 細胞の IL-21 産生制御因子の解明

naïve CD4陽性 T 細胞を、neutral 条件(IL-2+抗 IL-4 抗体+抗 IFN- γ 抗体)または IL-21 産生 T 細胞誘導条件(IL-6 または IL-21+抗 IL-4 抗体+抗 IFN- γ 抗体)で抗 CD3/CD28 抗体で刺激し、遺伝子発現プロファイル DNA マイクロアレイ法で比較検討する。誘導性 IL-21 産生 T 細胞で発現の高い転写因子について、Real-Time PCR法にて特異的発現を確認する。レトロウイルスによる過剰発現系をもちいて、これらの転写因子の IL-21 産生における役割を検討する。

(2) Tfh 細胞の分化、IL-21 産生、抗体産生誘導における BTLA の役割

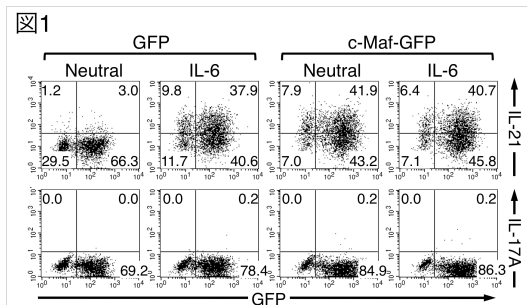
- ① Tfh 細胞の機能における BTLA の役割の解明: BTLA 欠損マウスと野生型マウスの脾臓及びリンパ節における Tfh 細胞の分化、胚中心 B 細胞の分化と抗体産生能を比較する。
- ② Tfh 細胞のサイトカイン産生における BTLA の役割の解明: BTLA 欠損 CD4 陽性 T 細胞を抗原提示細胞の存在下で IL-6、抗 IL-4 抗体、抗 IFN- γ 抗体とともに抗原で刺激し (Tfh 細胞誘導条件)、サイトカインの産生を検討する。

4. 研究成果

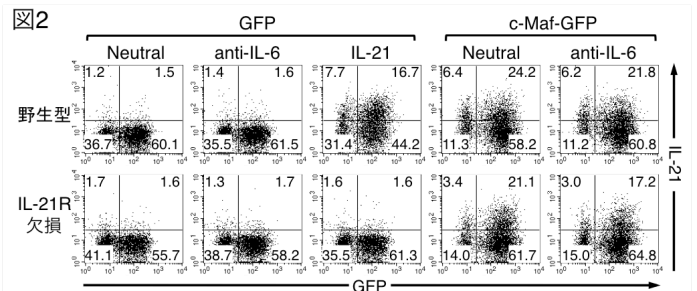
(1) 誘導性 IL-21 産生 T 細胞の IL-21 産生制御因子の解明

誘導性 IL-21 産生 T 細胞の遺伝子発現プロファイル解析により、これまで Th2 細胞特異的転写因子と考えられていた c-Maf が高発現し

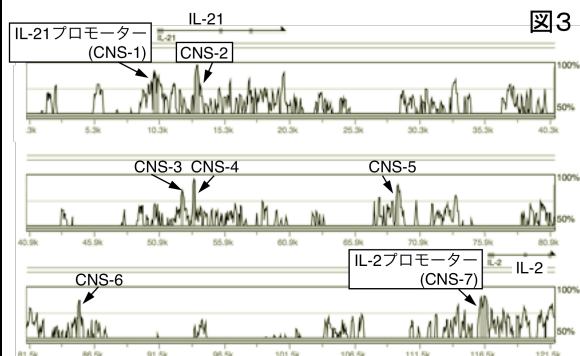
ていることが明らかとなった。そしてレトロウイルスを用いて c-Maf を発現させた CD4 陽性 T 細胞を抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で刺激すると、IL-21 産生細胞の分化が強く誘導されることが明らかとなった(図1)。



さらに、IL-21 は IL-21 産生 T 細胞の自己増殖因子として機能するため、IL-21 受容体欠損マウスの CD4 陽性 T 細胞においても同様の検討を行ったが、c-Maf による IL-21 産生誘導は野生型マウスと同レベルに認められた(図2)。以上より、c-Maf は直接 IL-21 の産生を誘導していることが示唆された。

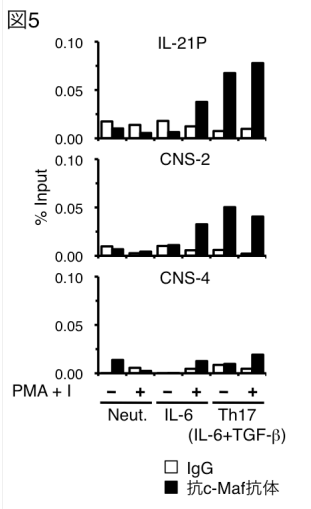
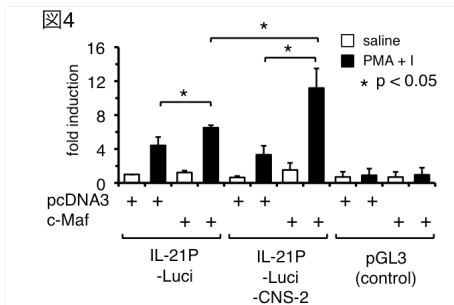


IL-21 遺伝子はマウスでは3番染色体、ヒトでは4番染色体上に IL-2 遺伝子と隣り合わせで存在している。そしてマウスとヒトの IL-21-IL-2 遺伝子座の相同性を検索したところ、保存された非コーディング領域(conserved non-coding sequence, CNS)が7個存在することが明らかとなった(図3)。



これらの CNS で Maf 認識配列 (Maf responsive element, MARE)を検索したところ、IL-21 遺伝子のプロモーター領域に相当する CNS-1 に2カ所の MARE が、IL-21 遺伝子のイントロン2に存在する CNS-2 に2カ所の MARE が予測された。そこで我々は c-Maf が

IL-21 プロモーター(IL-21P)と CNS-2 の活性化を誘導するか否かをレポーターアッセイを用いて解析した(図 4)。その結果、IL-21 プロモーターは PMA+ionomycin(PMA+I)刺激により活性化されたが、c-Maf は PMA+I による IL-21 プロモーターの活性化を有意に増強した。さらに IL-21 プロモーターの下流に CNS-2 を挿入したレポーターベクターでは、c-Maf による活性化がより強く促進された。さらに CD4 陽性 T 細胞において c-Maf が IL-21 プロモーターや CNS-2 エンハンサーに結合しているか否かをクロマチン免疫沈降法で検討したところ、c-Maf は、IL-6 刺激下で IL-21 プロモーターや CNS-2 エンハンサーに結合していることが明らかとなった(図 5)。以上より、c-Maf は、CD4 陽性 T 細胞において直接 IL-21 プロモーターや CNS-2 エンハンサーに結合し、IL-21 の転写を促進していることが示唆された。

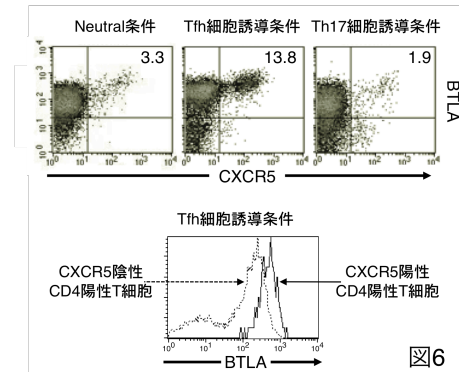


(2) TFH 細胞の分化、IL-21 産生、抗体産生誘導における BTLA の役割

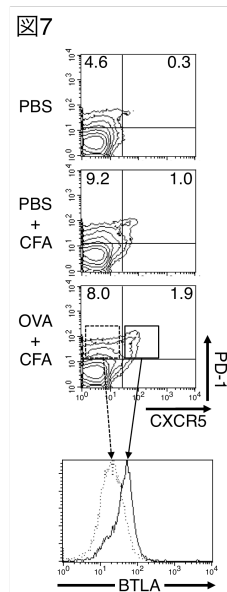
近年、IL-6 或は IL-21 により誘導される IL-21 産生 CD4 陽性 T 細胞は、抗原提示細胞の存在下で Tfh 細胞様の形質を示すことが報告された。

そこで、Tfh 細胞における BTLA の機能を明らかにするため、卵白アルブミン(OVA)特異的 TCR を発現する D011.10 マウスから採取したナイーブ CD4 陽性 T 細胞を抗原提示細胞の存在下で IL-6、抗 IL-4 抗体、抗 IFN- γ 抗体と

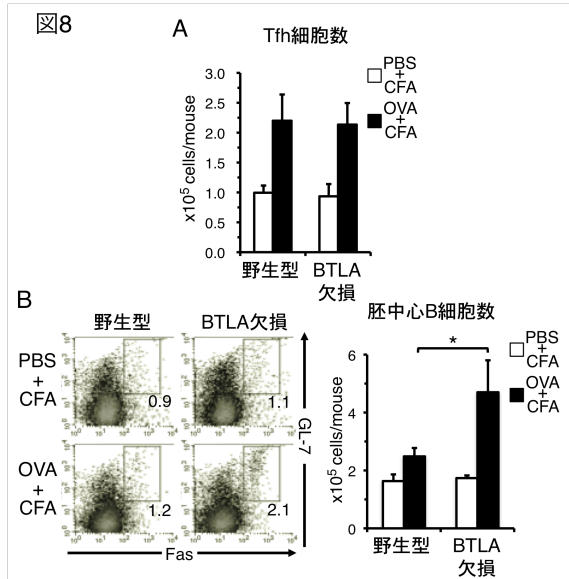
ともに OVA で刺激し (Tfh 細胞誘導条件)、in vitro で Tfh 様細胞の分化を誘導した。Tfh 細胞誘導条件下では、neutral 条件下または Th17 細胞誘導条件下と比較して、CXCR5 陽性細胞の増加を認め、誘導された CXCR5 陽性細胞では BTLA の発現が亢進していた(図 6)。



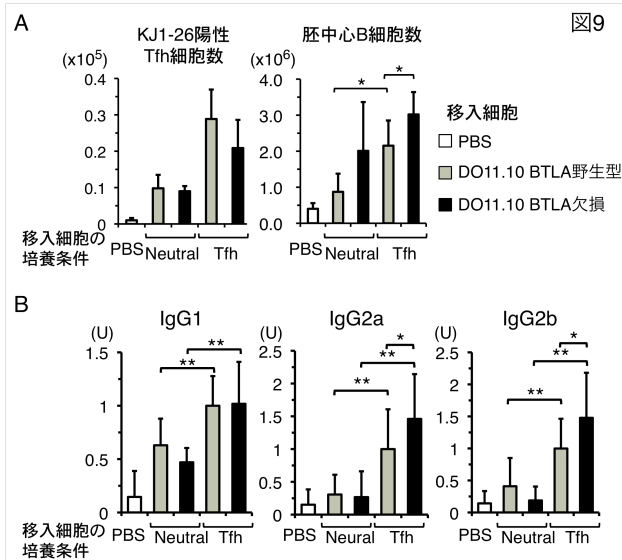
次にマウスを OVA と完全フロイントアジュバンド(CFA)で免疫し、in vivo で Tfh 細胞 (CXCR5+ PD-1+ CD4+ T 細胞)を誘導し BTLA の発現を解析したところ、Tfh 細胞では BTLA の発現が亢進していることが確認された(図 7)。以上の結果より、in vitro で誘導された Tfh 様細胞および in vivo で誘導された Tfh 細胞ともに BTLA の発現が亢進していることが明らかとなった。



次に Tfh 細胞分化における BTLA の役割を明らかにするため BTLA 欠損マウスおよび野生型マウスを OVA と CFA で免疫し、脾臓における Tfh 細胞の分化を比較した。その結果、BTLA 欠損マウスにおいても Tfh 細胞の分化は野生型マウスと同等に認められた(図 8A)。一方、BTLA 欠損マウスでは Tfh 細胞依存的に分化することが知られている胚中心 B 細胞 (GL-7+ Fas+ B 細胞)の数が野生型マウスに比して増加していた(図 8B)。このことから、BTLA は Tfh 細胞の分化には影響しないが、Tfh 細胞の機能を抑制している可能性が示唆された。

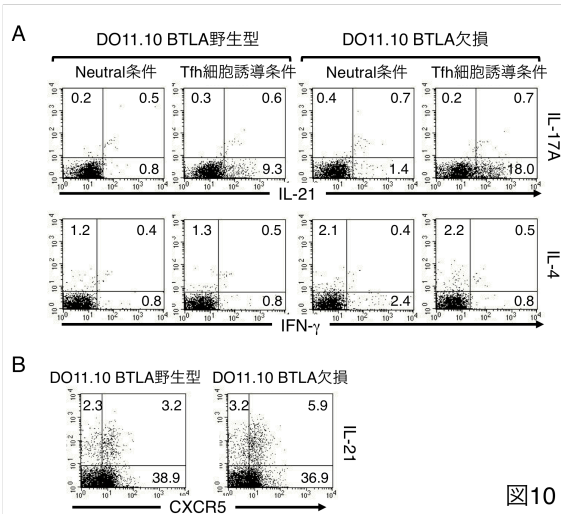


そこで次に BTLA 欠損 Tfh 細胞が胚中心 B 細胞の増加を誘導するか否かを検討した。Tfh 細胞誘導条件下で培養した DO11.10 BTLA 欠損 CD4 陽性 T 細胞と DO11.10 BTLA野生型 CD4 陽性 T 細胞を野生型マウスに移入し、その後 OVA と不完全フロイントアジュバンド (IFA) で免疫し、Tfh 細胞と胚中心 B 細胞の分化および抗原特異的 IgG の産生を比較した (図 9)。その結果、移入した細胞の Tfh 細胞への分化は、DO11.10 BTLA 欠損 Tfh 様細胞移入群と DO11.10 BTLA野生型 Tfh 様細胞移入群で同様であったが、胚中心 B 細胞数は DO11.10 BTLA 欠損 Tfh 様細胞移入群で有意に増加していた (図 9A)。また、抗原特異的 IgG2a および IgG2b の産生も DO11.10 BTLA 欠損 Tfh 様細胞移入群で有意に増加していた (図 9B)。これらの結果より、Tfh 細胞に発現する BTLA が胚中心 B 細胞の増殖抑制と抗原特異的 IgG2 の産生抑制に関与していることが明らかとなった。

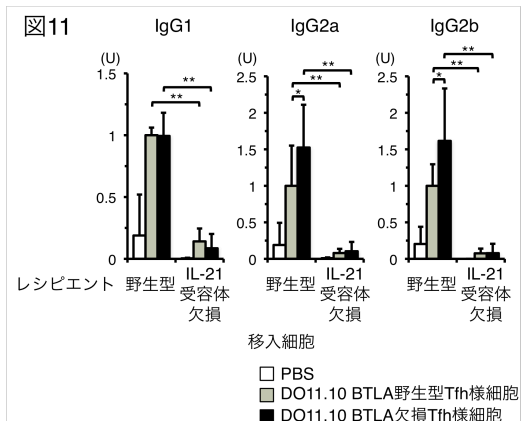


次に Tfh 様細胞のサイトカイン産生における BTLA の役割を明らかにするため、DO11.10

BTLA 野生型 CD4 陽性 T 細胞と DO11.10 BTLA 欠損 CD4 陽性 T 細胞を Tfh 細胞誘導条件下で培養し、各種サイトカインの産生を細胞内サイトカイン染色法で比較した (図 10)。その結果、DO11.10 BTLA欠損 CD4 陽性 T 細胞では、IL-21 産生細胞数が DO11.10 BTLA 野生型 CD4 陽性 T 細胞に比較して約 2 倍に増加していた。さらに Tfh 細胞誘導条件下で培養した細胞における CXCR5 の発現と IL-21 の産生を検討したところ、DO11.10 BTLA欠損 CD4 陽性 T 細胞では CXCR5 陽性分画における IL-21 の産生が増加していた。以上の結果より、BTLA は、Tfh 様細胞による IL-21 産生を抑制していることが明らかとなった。



最後に BTLA 欠損 Tfh 様細胞移入による抗原特異的 IgG の産生亢進が IL-21 に依存するか否かを、IL-21 受容体欠損マウスをレシピエントとした細胞移入実験により検討した。その結果、DO11.10 BTLA欠損 Tfh 様細胞を IL-21 受容体欠損マウスに移入した場合は、野生型マウスに移入した場合と比較して、IgG の産生が著しく減少した。これらの結果より、BTLA は Tfh 細胞からの IL-21 産生を抑制し、IL-21 依存性の液性免疫を抑制していることが明らかとなった。



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 5 件) 全て査読有り

1. Suto A, Kashiwakuma D, 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 helper T cells and subsequent humoral immune responses. *J Immunol.* 185:2730-2736, 2010.
2. Suto A, Hiramatsu Y, Kashiwakuma D, Kanari H, Kagami S, Ikeda K, Hirose K, Watanabe N, Grusby MJ, Iwamoto I, Nakajima H. c-Maf activates the promoter and enhancer of IL-21 gene while TGF- β inhibits c-Maf-induced IL-21 expression in CD4+ T cells. *J Leukoc Biol.* 87:703-712, 2010.
3. Kanari H, Kagami S, Kashiwakuma D, Oya Y, Furuta S, Ikeda K, Suto A, Suzuki K, Hirose K, Watanabe N, Okamoto Y, Yamamoto S, Iwamoto I, Nakajima H. Role of Th2 cells in IgG4-related lacrimal gland enlargement. *Int Arch Allergy Immunol.* 152:s47-53, 2010.
4. Iwata A, Watanabe N, Oya Y, Owada T, Ikeda K, Suto A, Kagami S, Hirose K, Kanari H, Kawashima S, Nakayama T, Taniguchi M, Iwamoto I, Nakajima H. Protective roles of B and T lymphocyte attenuator (BTLA) in NKT cell-mediated experimental hepatitis. *J Immunol.* 184:127-133, 2010.
5. Sutherland AP, Van Belle T, Wurster AL, Suto A, Michaud M, Zhang D, Grusby MJ, von Herrath M. IL-21 is required for the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes.* 58:1144-1155, 2009.

[学会発表] (計 2 件)

1. D. Kashiwakuma, A. Suto, Y. Hiramatsu, K. Ikeda, S. Kagami, K. Hirose, N. Watanabe, I. Iwamoto, H. Nakajima. B and T lymphocyte attenuator suppresses IL-21 production from follicular helper T Cells. 14th Internal Congress of Immunology. August 26, 2010, Kobe, Japan
2. Y. Hiramatsu, A. Suto, D. Kashiwakuma, S. Kagami, K. Ikeda, K. Hirose, N. Watanabe, M. Grusby, I. Iwamoto, H. Nakajima. c-Maf activates the promoter and enhancer of IL-21 gene while TGF- β inhibits c-Maf-induced IL-21 production in CD4+ T cells. 14th Internal Congress of Immunology. August 24, 2010, Kobe, Japan

[図書] (計 1 件)

1. 須藤 明, 中島裕史 IL-21 産生と濾胞ヘルパーT細胞分化の制御機構 *細胞工学* 28:1124-1127, 2009 秀潤社

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/allergy/kenkyugyouseki.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須藤 明 (SUTO AKIRA)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号 : 50447306

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし