

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 6 月 8 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790476

研究課題名（和文） Super Th1 細胞の新たな機能に関する研究

研究課題名（英文） The expression of “non-Th1” cytokines by “super Th1 cells”

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 細胞を抗原、IL-2、IL-18 で共刺激すると、IL-13 産生能力を有する “super Th1 細胞” が誘導される。super Th1 細胞における *Il13* 遺伝子の発現には GATA-binding protein 3 (Gata3) の発現が不可欠であるが、これだけでは Th1 細胞からの IL-13 産生の開始には十分ではない。IL-13 の産生誘導には Gata3 の発現とともに TCR からのシグナルが必要である。又、super Th1 細胞が Th17 細胞に匹敵する IL-22 産生能力を有すること、抗 CD3 抗体、IL-2、IL-18 の共刺激によって、Th1 細胞に *Rorc* 遺伝子 (Th17 のマスターレギュレーターである *Ror γ t* をコードする) の強い発現が誘導されることが明らかになった。これらのことから、Th1 細胞は外来刺激に反応してサイトカインプロファイルを変化させる能力を有していることが示された。

研究成果の概要（英文）：We previously demonstrated that Th1 cells gain the capacity to produce IL-13 in response to antigen, IL-2 and IL-18, and based on their unique function, we designated these activated Th1 cells as “super Th1 cells”. In this project, we showed that when costimulated with anti-CD3, IL-18 and IL-4, the GATA-binding protein 3 (Gata3), which is not originally expressed in Th1 cells, is induced in T-bet-expressing Th1 cells and that Gata3 is essentially required for *Il13* gene expression in super Th1 cells. However, Gata3 induction is not satisfactory, and additional TCR-signaling is prerequisite for triggering IL-13 production by Gata3 plus T-bet-expressing Th1 cells. In addition, we revealed that super Th1 cells simultaneously produce IL-22, the amount of which is comparable to that of Th17 cells. Furthermore, we confirmed that when stimulated with anti-CD3, IL-2 and IL-18, Th1 cells strongly increased the expression of *Rorc* gene, which encodes *Ror γ t*, “Th17-master regulator”. These findings suggest that Th1 cells have the capacity to alter their cytokine profile in response to external stimuli.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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 T helper (Th) 2 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いた。我々のグループでは動物モデルを用いて、その発症が、微生物成分で刺激された細胞由来のInterleukin (IL) -18の刺激を抗原刺激とともに受けたTh1細胞から、IFN- γ に加えIL-13を産生するSuper Th1細胞が誘導されることが原因であることを明らかにしてきた。しかしながら、IL-18刺激で何故Th1細胞からTh2サイトカインのIL-13の産生が誘導されるのか、そのメカニズムは不明なままであった。

そこで、本研究計画代表者は平成20～21年度研究活動において、super Th1細胞からのIL-13産生の分子機構に関する研究を行い、以下のことを明らかにした。

(1) super Th1細胞における*I113*遺伝子の転写活性化にはTh1細胞を抗原+IL-18で再刺激することが必要であるが、この際微量のIL-4が存在している必要がある。

(2) これらの刺激を受けたTh1細胞では転写因子NFAT/Stat6/NF- κ B活性化され、その結果Th2細胞特異的転写因子GATA-binding protein 3 (Gata3)の発現がTh1細胞に誘導される。

(3) *I113*遺伝子上のCGREモチーフへのGata3の結合が確認されたことから、発現誘導されたGata3の*I113*遺伝子への結合がsuper Th1細胞における*I113*遺伝子の活性化において重要であると考えられた。

しかしながら、Gata3の発現誘導だけでsuper Th1細胞からのIL-13産生に対して必要かつ十分であるのかについてはいまだ明らかでなく、又、Th1細胞、Th2細胞、super Th1細胞の各細胞における*I14-I113*遺伝子座のクロマチン構造の差異についても不明であった。

加えて、マイクロアレイを用いてIL-18刺激の有無で発現に差のある遺伝子をスクリーニングしたところ、super Th1細胞では*I122* mRNAの発現が上昇していることが明らかになった。IL-22は皮膚疾患の発症に重要な役割を演じることから、super Th1細胞からのIL-22産生にも焦点を当てる必要が存在していた。

2. 研究の目的

(1) super Th1細胞における*I113*遺伝子活性化のメカニズムに関する検討

Th1細胞をTCR刺激とともにIL-18で刺激する時にIL-4が加わると*I113*遺伝子が活性化される。この*I113*遺伝子の活性化には、Gata3の発現が誘導され、Gata3が*I113*遺伝子上のCGREモチーフに結合することが重要であることがすでに明らかになっている。そこで、TCR刺激、Gata3発現、IL-13の3者の関係性

に焦点を当てて、Super Th1細胞における*I113*遺伝子活性化のメカニズムを検討することを目的とした。

(2) super Th1細胞における*I14-I113*遺伝子座のクロマチン修飾に関する解析

一般的に、Th2細胞では*I14-I113*遺伝子座が“transcriptionally permissive”な状態に、*Ifng*遺伝子が“transcriptionally repressive”な状態に、Th1細胞ではこの逆の状態になっていることが知られており、これは各遺伝子座のヒストンH3の修飾状態と相関している。そこで、super Th1細胞における*Ifng*遺伝子や*I14-I113*遺伝子座のヒストン修飾がTh1型なのかTh2型なのかを検討することを目的とした。

(3) super Th1細胞からのIL-22産生に関する解析

マイクロアレイによる発現遺伝子のスクリーニングによって、super Th1細胞では*I122*遺伝子の発現の上昇が示唆された。そこで、実際にsuper Th1細胞からIL-22が産生されているのかについてタンパクレベルで検討する。又、IL-22を産生するヘルパーT細胞サブセットとしてはTh17細胞が知られていることから、本現象がTh17細胞の混入によるものではなく、IL-18で刺激されたTh1細胞によるものであることを確認する。加えて、super Th1細胞におけるTh17関連遺伝子の発現についても検討し、本現象との関連性についても考察することを目的とする。

(4) super Th1細胞から産生されるIL-22の病理学的意義

IL-22は皮膚疾患との関連が示唆されている。そこで、活性化型IL-18が皮膚において恒常的に産生されている環境では、super Th1細胞からIL-22産生の誘導が観察されるのかどうか、そしてその産生されたIL-22が皮膚疾患の発症に関与するのかどうか検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) super Th1細胞における*I113*遺伝子活性化のメカニズムに関する検討

TCR刺激、Gata3誘導、IL-13の3者の関係に焦点を当てて、super Th1細胞における*I113*発現のメカニズムを検討する。TCR刺激の非存在下でも、IL-2+IL-18+IL-4の複合刺激によってTh1細胞にGata3の発現を誘導できる。そこで、種々のサイトカインの組み合わせでTh1細胞を刺激し、その時のGata3発現とIL-13産生をFACSによってモニターする。この細胞をさらにTCR刺激しIL-13産生を再びFACSでモニターすることによって、IL-13産生に対するGata3発現とTCR刺激の必要性を

検討する。

IL-13 は IL-4 と同様のシグナル経路 (Stat6 経路) を有することから、産生された IL-13 が Gata3 発現を誘導する positive feedback 因子となりうるのかについて検討する。これには、野生型と *I113* 欠損マウスの naïve CD4⁺ T 細胞から Th1 細胞を分化させた後 super Th1 細胞誘導刺激を行い、これらの 2 系統の細胞の Gata3 発現を FACS で検討する。IL-13 の必要性については、外来性 IL-13 を添加することによって、その再確認を行う。

(2) super Th1 細胞における *I14-I113* 遺伝子座のクロマチン修飾に関する解析

Ifng 遺伝子座、*I14-I113* 遺伝子座におけるヒストン修飾に関しては、メチル化もしくはアセチル化ヒストンに対する抗体を用いて、ChIP assay を行う。

(3) super Th1 細胞からの IL-22 産生に関する解析

まず ELISA 法によって、super Th1 細胞からの IL-22 の産生を確認する。次に、TCR 刺激した Th1 細胞、TCR+IL-18 で刺激した Th1 細胞、TCR 刺激した Th17 細胞を抗 IFN- γ 抗体、抗 IL-22 抗体で細胞内染色することによって、IL-22 が混入した Th17 細胞ではなく Th1 細胞から産生されていることを確認する。又、*Rorc*、*Ahr* といった Th17 関連遺伝子の発現については、リアルタイム PCR 法を用いる。

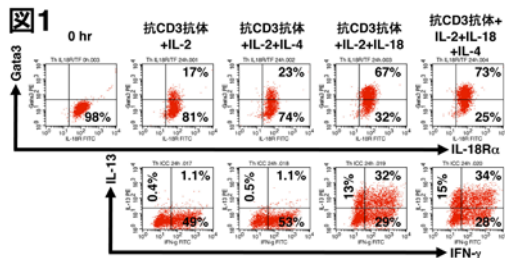
(4) super Th1 細胞から産生される IL-22 の病理学的意義

皮膚ケラチノサイト特異的な caspase-1 トランスジェニック (Tg) マウスでは、活性化型 IL-18 の産生が亢進している。そこで、このマウスを用いて、IL-18 が恒常的に産生されている環境で、CD4⁺ T 細胞からの IL-22 産生が増大しているかを確認し、この現象と皮膚病変との関係について考察する。

4. 研究成果

(1) super Th1 細胞における *I113* 遺伝子活性化のメカニズムに関する検討

TCR 刺激 (抗 CD3 抗体刺激) の存在下で (この時 Th1 細胞から微量の内源性 IL-4 が産生される)、IL-2、IL-2+IL-4、IL-2+IL-18、IL-2+IL-18+IL-4 の組み合わせで Th1 細胞を

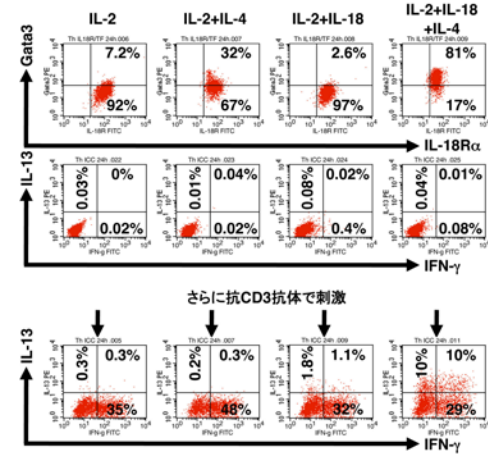


刺激すると、IL-2+IL-18 刺激と

IL-2+IL-18+IL-4 刺激によって Gata3 の発現が誘導された。この時、Th1 細胞からの IL-13 の産生は Gata3 発現の有無に相関していた (図 1)。

次に TCR 刺激の非存在下で同様の組み合わせのサイトカイン刺激を行うと、IL-2+IL-18+IL-4 の刺激によってのみ Gata3 の発現が誘導された (図 2A 上)。この時、*I113* 上の CGRE motif への Gata3 の結合は確認されたが (図 2B)、IL-13 の産生は観察されなかった (図 2A 中)。しかし、この Gata3 発現

図 2A



細胞をさらに TCR 刺激すると IL-13 の産生が確認された (図 2A 下)。

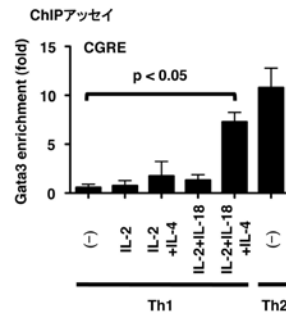


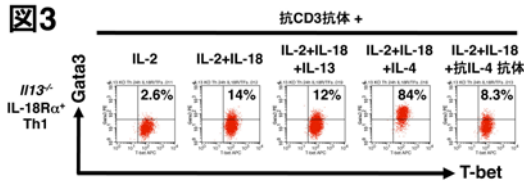
図 2B

以上のことから、super Th1 細胞からの IL-13 産生の誘導には Gata3 の発現誘導だけでは不十分であり、Gata3 を発現している Th1 細胞に TCR からの刺激が加わることで *I113* 遺伝子の

活性化が誘導されると考えられた。

以前の研究によって、IL-18 で刺激された Th1 細胞における Gata3 の発現誘導には、TCR 刺激を受けたことによって Th1 細胞から産生される微量の内源性 IL-4 とそのシグナル伝達分子 Stat6 が重要な役割を果たすことを明らかにしている。IL-4 と同様に IL-13 もシグナル伝達分子として Stat6 を用いることから、super Th1 細胞から産生された IL-13 がさらに Gata3 の発現を誘導する “positive feedback” 因子となりうるかどうか検討した。*I113* 欠損 Th1 細胞では、野生型に比べて内在

性IL-4の産生が減少しており、その結果、super Th1細胞誘導刺激を行っても野生型Th1細胞のようにGata3の発現が強く誘導されなかったが、外来性IL-4を添加するとGata3の発現レベルは回復した。しかし、この時、外来

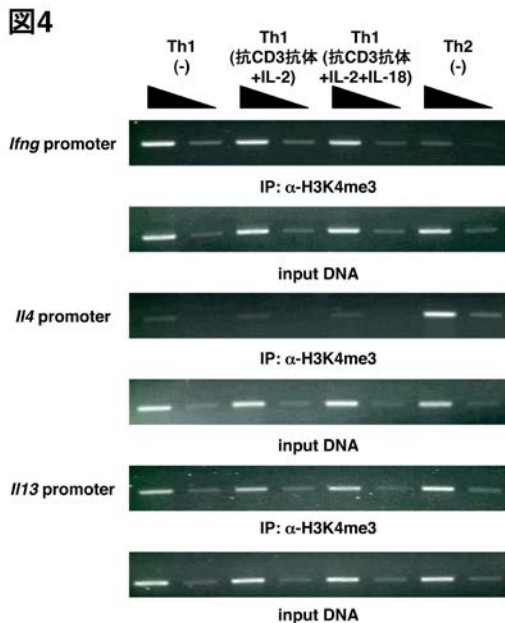


性IL-13の添加を行っても、Gata3発現の回復は見られなかった (図3)。

以上のことより、super Th1細胞におけるGata3発現にはIL-13ではなくIL-4が必要であることが明らかになった。

(2) super Th1細胞における *I14-I113* 遺伝子座のクロマチン修飾に関する解析

次に、ChIP assayによって *Ifng* 遺伝子座と *I14-I113* 遺伝子座におけるヒストンH3の修飾状態 (メチル化: H3K4me3、アセチル化: H3K9/14Ac) の検討を行った。再刺激を行っていないTh2細胞では、*I14* 遺伝子プロモーターのH3K4me3、H3K9/14Acは亢進しており、*Ifng* 遺伝子プロモーターのH3K4me3、H3K9/14Acは減弱していた。これとは逆に、再刺激を行っ



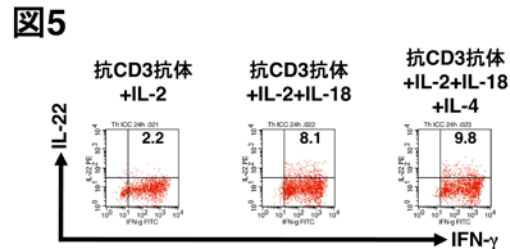
ていないTh1細胞では、*I14* 遺伝子プロモーターのH3K4me3、H3K9/14Acは弱く、*Ifng* 遺伝子プロモーターのH3K4me3、H3K9/14Acの亢進が見られた。*I113* 遺伝子プロモーターにおけるH3K4me3、H3K9/14AcはTh2細胞でいくぶん強いものの、Th1細胞でもある程度のH3K4me3、

H3K9/14Acが観察され、*I14* 遺伝子や *Ifng* 遺伝子のようにTh1-Th2細胞間の明確な差異は検出されなかった。再刺激を行ったTh1細胞におけるヒストン修飾を検討したところ、IL-18刺激の有無にかかわらず、*Ifng*、*I14*、*I113* の各遺伝子座のH3K4me3、H3K9/14Acは再刺激を行っていないTh1細胞のものと同じな差は見られなかった (図4)。

これらのことから、Th1細胞の *I113* 遺伝子座は元来ある程度の転写が許容された状態にあり、ここにGata3が結合することによって *I113* 遺伝子の転写活性化のスイッチが“ON”の状態になると考えられた。

(3) super Th1細胞における *I122* 遺伝子の発現に関する解析

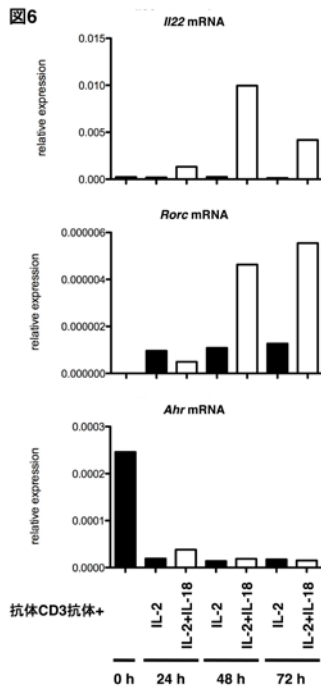
まず、再刺激したTh1細胞からのIL-22産生をELISA法によって検討した。TCR刺激のみだとTh1細胞からのIL-22産生量は低かったが、TCR+IL-18の再刺激を行ったTh1細胞 (super



Th1細胞) からのIL-22産生量は非常に大きく、Th17細胞からの産生量に匹敵するものであった。しかし、Th17細胞とは異なり、super Th1細胞からのIL-17産生は全く観察されなかった。次に、このIL-22がTh17細胞の混入ではなく実際にTh1細胞から産生されたものであることを示すために、細胞内染色を行った。Th1細胞をTCR刺激しただけではIL-22産生細胞の顕著な出現は見られなかった。しかしIL-18の同時刺激を行うと、強いIL-22産生を示す細胞が多数出現し、その大部分はIFN-γとIL-22の同時産生を示していた (図5)。これらのことからTh1細胞はIL-22産生能力を有しており、IL-18はその能力を誘導・増強する作用を有していると考えられた。

各Thサブセットには“master regulator”と呼ばれる固有の発現パターンを示す転写因子が発現し、これらがサイトカイン産生パターン等の各Thサブセットの特徴を形成している。super Th1細胞にはTh1細胞と同様にTh1特異的転写因子T-betが発現しているがTh2特異的転写因子Gata3も発現しており、このGata3の発現によってTh2細胞から産生されると考えられていたIL-13の産生がTh1細胞に誘導される。そこで、IL-22を産生するヘルパー

T細胞サブセットとして知られているTh17細胞に特異的に発現する転写因子 (Rorytと



Ahr) の super Th1細胞における発現について検討した。Th1細胞をIL-18刺激すると、Rorc (Rorytをコードする遺伝子) mRNAの発現上昇が確認されたが、Ahr mRNAの発現はむしろ低下していた。又、Rorcの発現は時間依存的に上昇し、これはIl22 mRNAの発現のタイムコースと関連していた (図6)。

以上のことから、super Th1細胞におけるIl22遺伝子の発現にはRorc遺伝子の発現が関与している可能性が示唆された。

(4) super Th1細胞から産生されるIL-22の病理学的意義

フローサイトメトリー解析によってsuper Th1細胞からのIFN- γ とIL-22の同時産生を確認できたことから、Th1細胞も元来IL-22産生能力を有しており、IL-18はその能力を誘導・増強する作用を有していると考えられた。そこで、皮膚ケラチノサイト特異的なcaspase-1トランスジェニック (Tg) マウスを用いて、このIL-22産生の病理学的意義について考察した。このTgマウスは高IL-18血症、高IgE血症を示し、その皮膚には肥厚やアトピー性皮膚炎症状が認められた。次に、同Tgマウスの皮膚におけるIl22 mRNAの発現を検討するために、Tgマウスの皮膚組織のtotal RNAからcDNAを作製し、real-time PCR法に用いてIl22 mRNAを定量した。しかし、野生型からもTgマウスからもIl22 mRNAの発現は検出できなかった。

*in vitro*で分化誘導し再刺激したTh17細胞でも、Il22 mRNAのコピー数はIl17 mRNAに比べて非常に低かった。今回用いた *in vivo*実験の系は、トランスジーン導入によって高値を示すIL-18を利用してsuper Th1細胞を誘導するという“受動的な実験系”であった。故に

、皮膚に存在する少数のsuper Th1細胞由来のIl22 mRNAはコピー数がかなり低く、その結果、Il22 mRNAの検出はreal-time PCR法を用いても非常に困難であったと考えられた。

そこで、次の *in vivo*実験の系としては、マウスの皮膚バリアをSDSによって破壊した後、SpAを塗布し皮膚炎を誘導するモデルを用いた“能動的な実験系”を用いることを考えている。

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 Nakahira M, Nakanishi K. Requirement of GATA-binding protein 3 for Il13 gene expression in IL-18-stimulated Th1 cells. *Int Immunol.* 査読有 Vol.23 No.12 2011 761-72.

DOI: 10.1093/intimm/dxr087

② 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 Vol.22 No.7 2010 561-70.

DOI: 10.1093/intimm/dxq040

[学会発表] (計 4 件)

① 中平 雅清、中西 憲司 Requirement of GATA-binding protein 3 for Il13 gene expression in IL-18-stimulated Th1 cells. 第34回日本分子生物学会年会 (2011年12月14日) パシフィコ横浜 (神奈川県)

② 中平 雅清、中西 憲司 IL-18で刺激したTh1細胞におけるIl13遺伝子の発現にはGATA3が必要である

(Requirement of GATA binding protein 3 for Il13 gene expression in IL-18-stimulated Th1 cells). 第40回日本免疫学会学術集会 (2011年11月27日) 幕張メッセ (千葉県)

③ 中平 雅清、中西 憲司 Requirement of GATA-binding protein 3 for Il13 gene expression in IL-18-stimulated Th1 cells. 第76回日本インターフェロン・サイトカイン学会-第19回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム2011 (2011年11月27日) 全日空ゲートタワーホテル大阪 (大阪府)

④ Masakiyo Nakahira, Kenji Nakanishi Involvement of Gata3 in transcriptional regulation of Il13 gene expression in

IL-18-stimulated Th1 cells. 14th International Congress of Immunology (2010年8月23日) 神戸ポートピアホテル、神戸国際展示場

6. 研究組織

(1) 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