

平成 26 年 5 月 31 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591467

研究課題名(和文)ヘルパーT細胞分化と機能発現において転写因子特にc-Mafが果たす役割の解析

研究課題名(英文) Analysis of the role transcription factors, especially c-Maf, play in the differentiation and functions of T helper cells

研究代表者

佐藤 浩二郎 (Sato, Kojiro)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：10372434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：T細胞特異的c-Mafのトランスジェニック(Tg)マウスの解析の過程で、興味深いことにTgのTh細胞はエフェクター/メモリーの表現型を持つことが明らかとなった。また野生型マウスのTh細胞をRag2欠損マウスに移入することにより強制的にエフェクター/メモリーTh細胞を誘導したところ、この細胞でもc-Maf発現が著増していた。これらの知見に基づいてc-Maf欠損Th細胞のトランスクリプトーム解析を行った。さらにヒト末梢血由来のナイーブ/セントラルメモリー/エフェクターメモリーTh細胞のトランスクリプトーム解析を行い、ここでもMAFの発現がメモリーTh細胞において著増していることが確認された。

研究成果の概要(英文)：In the analysis of T-cell specific c-Maf transgenic (Tg) mice, we observed that Tg Th cells have effector/memory phenotypes. When effector/memory Th cells were induced by transferring WT Th cells into Rag2 deficient mice, these cells also expressed c-Maf at high level. Based on these observations, we performed transcriptome analysis of c-Maf deficient Th cells. We also analyzed human naive/central memory/effector memory Th cells derived from peripheral blood and confirmed that the expression of MAF was also increased significantly in human memory Th cells.

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：c-Maf メモリー Th細胞 リンパ球 IL-17 Th17

1. 研究開始当初の背景

CD4 陽性 T 細胞 (ヘルパー T 細胞, Th 細胞) は免疫系において重要な役割を果たす。申請者らは、関節リウマチ (RA) に見られる骨破壊を引き起こす重要な細胞である破骨細胞というマクロファージ系の細胞の分化を促進する Th サブセットを追求していたが、その過程で Th1, Th2 細胞が破骨細胞分化を強力に阻害し、Th17 細胞が逆に分化を促進することを見いだした。この報告は新規 Th サブセット Th17 の生理的役割を示した最も初期の報告となった (Sato et al., J. Exp. Med 2006)。その後申請者らは *in vitro* でマウス Th1, Th2, Th17 細胞を分化させ経時的にサンプルを回収し、トランスクリプトームによる解析を行った。特に転写因子の発現レベルの増減に注目したところ、Th17 細胞において *Maf* の mRNA が著増していることが明らかとなった。*Maf* がコードする転写因子 c-Maf は従来 Th2 細胞において重要な役割を果たすとされてきたためこれは非常に意外な結果であった。我々は c-Maf のターゲット分子として、Th17 細胞の増殖に必須である IL-23 受容体に着目し、確かに *Il23r* 遺伝子のプロモーター部位に c-Maf 結合配列があること、またその部位に変異を入れると c-Maf 応答性が消失することを Luciferase assay により明らかにした。更に c-Maf トランスジェニック (Tg) マウスの解析を進め、c-Maf Tg マウスより得られる Th 細胞が予想通り IL-17 を高発現することを確認したが、IFN- γ の発現も野生型より高く、しかも Th 細胞のほとんどがナイーブ細胞ではなくエフェクターメモリー細胞の表現型を持つことが明らかとなった (Sato et al., J Biol. Chem. 2011)。

2. 研究の目的

(1) c-Maf 欠損 Th 細胞を持つキメラマウスの作出とその解析: c-Maf 欠損マウスは胎性致死であるためそのままでは Th 細胞の解析が出来ない。そのため Rag-2 欠損マウスとのキメラマウス (後述) を作出し、それに由来する Th 細胞の機能を *in vitro* 及び *in vivo* の両面から解析する。

(2) ヒト末梢血由来 Th 細胞から IL-17 産生細胞及び IFN- γ 産生細胞を分取し、トランスクリプトーム解析を行い特に転写因子の発現プロファイルを得る

3. 研究の方法

c-Maf 欠損造血幹細胞キメラマウスの作出とその解析: c-Maf 欠損マウスは胎性致死であり、そのままでは T 細胞の解析はできない。マウス胎仔の肝臓から造血幹細胞を調整し、X 線照射後の Rag-2 欠損マウスに移入する。これにより得られる c-Maf Th 細胞を Rag2 欠損マウスに移入することで腸炎を惹起し野生型 Th 細胞の場合と比較する。また、この移入によって得られるエフェクター/メモリー Th 細胞のトランスクリプトーム解析を行う。

4. 研究成果

(1) c-Maf 欠損 Th 細胞のトランスクリプトーム解析: c-Maf 欠損ナイーブ Th 細胞およびエフェクター/メモリー Th 細胞と、野生型の対照細胞を用いてトランスクリプトーム解析を行った。c-Maf の転写標的として予想された *Il17a*, *Il21* は確かに c-Maf 欠損マウスにおいて発現が低下していた。他にも重要な転写因子の候補が多数同定された。

(2) 腸炎モデルにおける c-Maf の役割:

c-Maf 欠損 CD45RB^{hi}CD4⁺Th 細胞を Rag2 欠損マウスに移入することで惹起する腸炎モデルを、野生型細胞を移入した場合と比較した。体重減少や腸管病理標本を評価したが個体差が大きく最終的な結論はまだ得られていない。ただし Th 細胞のタンパクレベルの IL-17 発現は c-Maf 欠損により確かに低下していることが確認された。

(3) ヒトナイーブ/メモリー Th 細胞のトランスクリプトーム解析: ヒト末梢血より単離したナイーブ Th 細胞、セントラルメモリー Th 細胞、エフェクターメモリー Th 細胞のトランスクリプトーム解析を行った。ヒトメモリー Th 細胞においても *MAF* の発現が高いことが示された。また興味深いことにこれまでメ

モリー細胞との関連がほとんど言われていなかった転写因子が非常に高いレベルで発現していることが明らかとなり、解析が続いている。

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9件)

Ota M, Yanagisawa M, Tachibana H, Yokota K, Araki Y, Sato K, Mimura T. A significant induction of neutrophilic chemoattractants but not RANKL in synoviocytes stimulated with interleukin 17. **J Bone Miner Metab.** 2014 Feb 21.

[Epub ahead of print] (査読有り)

Wada TT, Araki Y, Sato K, Aizaki Y, Yokota K, Kim YT, Oda H, Kurokawa R, Mimura T. Aberrant histone acetylation contributes to elevated interleukin-6 production in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **Biochem Biophys Res Commun.** 2014 Feb 21;444(4):682-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.195. (査読有り)

Yokota K, Sato K, Miyazaki T, Kitaura H, Kayama H, Miyoshi F, Araki Y, Akiyama Y, Takeda K, Mimura T. Combination of tumor necrosis factor and interleukin 6 induces osteoclast-like cells with bone-resorption activity both in vitro and in vivo. **Arthritis Rheumatol.** 2014 Jan;66(1):121-9. doi: 10.1002/art.38218. (査読有り)

Shimada Y, Asanuma YF, Yokota K, Yoshida Y, Kajiyama H, Sato K, Akiyama Y, Mimura T. Pentraxin 3 is associated with disease activity but not atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus. **Mod Rheumatol.** 2014

Jan;24(1):78-85. doi:

10.3109/14397595.2013.852837. (査読有り)

Sato K. The IL-23/IL-17 axis as a therapeutic target. **Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi.** 2013;36(4):203-8. (査読無し)

Asanuma YF, Shimada Y, Kouzu N, Yokota K, Nakajima K, Sato K, Akiyama Y, Isozaki M, Mikami AS, Kobayashi H, Mimura T. Serum osteoprotegerin concentration is associated with carotid atherosclerotic plaque in patients with rheumatoid arthritis. **Mod Rheumatol.** 2013 Mar;23(2):269-75. doi:

10.1007/s10165-012-0654-5. (査読有り)

Kanemaru K, Nakamura Y, Sato K, Kojima R, Takahashi S, Yamaguchi M, Ichinohe M, Kiyonari H, Shioi G, Kabashima K, Nakahigashi K, Asagiri M, Jamora C, Yamaguchi H, Fukami K. Epidermal phospholipase C 1 regulates granulocyte counts and systemic interleukin-17 levels in mice. **Nat Commun.** 2012 Jul 17;3:963. doi: 10.1038/ncomms1960. (査読有り)

Yoshida Y, Sakamoto M, Yokota K, Sato K, Mimura T. Tocilizumab improved both clinical and laboratory manifestations except for interleukin-18 in a case of multiple drug-resistant adult-onset Still's disease. **Intern Med.** 2011;50(16):1757-60. (査読有り)

Sato K, Miyoshi F, Yokota K, Araki Y, Asanuma Y, Akiyama Y, Yoh K, Takahashi S, Aburatani H, Mimura T. Marked induction of c-Maf protein during Th17 cell differentiation and its implication in memory Th cell development. **J Biol Chem.** 2011 Apr 29;286(17):14963-71. doi: 10.1074/jbc.M111.218867. (査読有り)

〔学会発表〕(計7件)

佐藤浩二郎 “The combination of TNF and IL-6 induces the differentiation of osteoclast-like cells with a bone-resorbing activity both in vitro and in vivo” 第42回日本免疫学会学術集会 2013年12月12日(千葉)

佐藤浩二郎 “Analysis of transcription-factor network in memory Th cells using c-Maf transgenic and c-Maf deficient mice” 第41回日本免疫学会学術集会 2012年12月5日(京都)

佐藤浩二郎 「T細胞性サイトカインと破骨細胞分化」 第40回日本臨床免疫学会総会シンポジウム 2012年9月27日(東京)

佐藤浩二郎 「Th17と炎症」 第33回日本炎症・再生医学会シンポジウム 2012年7月5日(福岡)

Kojiro Sato “THE TRANSCRIPTION FACTOR C-MAF PLAYS AN ESSENTIAL ROLE IN A MEMORY TH-CELL DEPENDENT MODEL OF INFLAMMATION” Annual European Congress of Rheumatology (EULAR 2012) 2012年6月8日(Berlin)

佐藤浩二郎 「ヘルパーT細胞分化メカニズムと自己免疫」 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会 第21回国際リウマチシンポジウム 2012年4月27日(東京)

佐藤浩二郎 “The role transcription factor c-Maf plays in memory Th17 cells” 第40回日本免疫学会総会・学術集会 2011年11月28日(千葉)

〔図書〕(計2件)

佐藤浩二郎 他 ナツメ社 臨床検査データブック 2003-2014 2013 436-437, 442-443

佐藤浩二郎 他 ナツメ社 基礎からわか

る免疫学 2011 163-200

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/riumi/riumi/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 浩二郎(SATO, Kojiro)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号: 10372434

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし