

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659242

研究課題名（和文） T細胞分化のシステムバイオロジー

研究課題名（英文） Systembiology of T-cell differentiation

研究代表者

吉村 昭彦（YOSHIMURA AKIHIKO）

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：90182815

研究成果の概要（和文）：

ヘルパーT細胞は免疫制御の中心を担う細胞である。近年、Th1, Th2以外に多くのサブタイプ(Th17, iTreg等)が存在していることが知られるようになってきた。ヘルパーT細胞は、各サブタイプが様々なサイトカインを産生すると共に、様々なサイトカインで分化や増殖が促進されたり抑制されたりするので、各サブタイプへの分化は非常に複雑である。そこで、ヘルパーT細胞各サブタイプへの分化を明らかにするとともにモデル化を試みた。まず生化学的な解析からTGF- β によるTh17分化にはSmadに依存しない経路が存在することを明らかにし、さらにTh17の分化抑制に関わる遺伝子としてEomesoderinを見いだした。またJAK阻害剤を用いた検討からJAK特異性の差によってTh17とTh1/2の分化に大きな影響が出ることを見いだした。サイトカインや転写因子の各サブタイプの影響により、各サブタイプへの分化を増減させる簡略化したモデルを作製した。この結果Th17とiTregでTGF- β の濃度依存性やTCRの強度依存性を再現できることがわかった。

研究成果の概要（英文）：

Helper T cells have been thought to play a central role in not only acquired immune responses but also in immune regulation. Recently, several subsets such as Th17 and iTreg have been discovered in addition to Th1 and Th2. Differentiation of each helper T cell subset is regulated by cytokines from other helper T cells. Thus, we have tried to define the mechanism of helper T cell differentiation and to build its computer modeling. WE discovered Smad-independent Th17 differentiation by biochemical analysis, and found that the reduced expression of Eomesodermin (Eomes) is involved in Th17 differentiation. We also discovered modulation of Th17 differentiation by JAK inhibitors due to different specificity of JAK kinase inhibitors to each JAK. Next, we have developed the computer model of the helper T cell differentiation, which contains interactions among subtypes through cytokines and interactions among transcription factors. This model mimicked the TGF- β concentration dependency and the TCR stimulation strength dependency of iTreg and Th17.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：

 サイトカイン シグナル伝達 転写因子 ヘルパーT細胞 抑制性T細胞 TGF- β シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

免疫システムは正負のシグナルがバランスを保って進行することで恒常性が維持される。一方でこのバランスにはある程度の弾性があり、免疫シグナルの強度が免疫応答の性質を決定する。例えば感染の場合は正のシグナルが強く働き病原菌排除を効率的に行うが、食物等非自己であっても反応すべきでない抗原に対しては寛容と呼ばれる状態が成立し免疫反応は抑制される。このような恒常性と可塑性の維持機構が破綻し、免疫過剰な状態となればアレルギー疾患、炎症性疾患や自己免疫疾患につながる。特に消化管や肺等常に常在菌に接する器官では細菌による免疫系の活性化と対応する寛容機構の相互作用によって正常な免疫システムが維持されている。このような免疫系の恒常性や可塑性の維持には免疫の中核とよばれるヘルパーT細胞が主要な役割を果たしている。

ヘルパーT細胞には免疫を正に推進するエフェクターT細胞と負に制御する抑制性T細胞 Treg が存在する。エフェクターT細胞はTh1, Th2, Th17などが知られており、炎症性サイトカイン(IFN, IL-4, IL-17など)を産生し免疫応答を推進する。Tregやそれ以外の環境の細胞から抗炎症物質としてIL-10やTGFなどの抗炎症性サイトカインや副腎皮質ホルモンやプロスタグランジンE2(PGE2)が産生され免疫寛容の維持に働く。このように正負の細胞とサイトカイン類を介した免疫応答制御は極めて複雑なネットワークを形成しており、シグナルや分子の還元論的な解析のみでは制御系の全貌を理解することは困難である。

2. 研究の目的

ヘルパーT細胞は、各サブタイプが様々なサイトカインを産生すると共に、様々なサイトカインで分化や増殖が促進されたり抑制されたりするので、各サブタイプへの分化は非常に複雑である。本研究ではTGFに焦点をあててTh分化の制御機構を明らかにする。TGF1のKOマウスの解析からTGFが炎症性腸疾患の抑制や自己免疫疾患の抑制に必須であることは明白であるにもかかわらず、TGFがどのような分子機構で免疫抑制に寄与するかは解明されていなかった。しかし、ここ数年抑制性T細胞の分野で大きなブレイクスルーがなされた。すなわちT細胞受容体

刺激時にTGFが存在することで、抑制性T細胞のマスター遺伝子である*Foxp3*が誘導されることが示された。一方でTGFはIL-6とともにTh17を誘導することが知られている。TGFのシグナルを中心にSmad2/3欠損マウスを利用してTregやTh17分化誘導のメカニズムの解明をめざす。またThサブセットのバランスを決定するメカニズムを明らかにするためにJAK阻害剤によるTh1, Th2, Th17分化への影響を明らかにする。次にヘルパーT細胞各サブタイプへの分化のシミュレーションモデル化を試みる。

3. 研究の方法

(1) Smad2とSmad3の機能的相違を解明するためにT細胞特異的Smad2欠損(cK0)マウスを作製した。またSmad3欠損(K0)マウスと交配しSmad2/3両欠損マウスを作製した。

(2) Smad2/3両欠損したT細胞においてもTh17のマスター因子ROR γ tが誘導されたことからTGFによって発現が上下する遺伝子数個を選び、T細胞に強制発現することでTh17細胞への分化に影響を与えるものを選択する。さらにそのシグナルを解明する。

(3) JAK阻害剤であるpyridone6やCP690550の免疫疾患モデルへの影響とともに、Th分化への影響を試験管内で調べる。

(4) 第一段階のモデルとして、細胞内シグナル伝達系の反応の詳細はモデル化せず、サイトカインの各サブタイプの影響により、Th0から各サブタイプへの分化や各細胞の増殖の反応速度を増加(促進)したり減少(抑制)したりするという簡略化したモデルを用いた。このモデルでサブタイプ相互の関係を明らかにした上で、細胞内シグナル伝達系の反応をモデル化する詳細なモデルの構築を行う。シミュレーションの開始時点では、Th0細胞だけが存在し、特定のサイトカインを添加した場合の各サブタイプの細胞数の変化とサイトカイン濃度の変化を計算する。

4. 研究成果

(1) T細胞特異的Smad2欠損(cK0)マウスを作製した。Smad2単独、Smad3単独欠損のT細胞では部分的にTh1抑制と*Foxp3*誘導の低下が認められた。またSmad2/3両欠損T細胞ではTh1の抑制がほとんど見られないことからTGFによるTh1抑制にはSmad2/3のシグナルが重要であることがわかる。また*Foxp3*の誘導にもSmad2とSmad3両者が必要であるこ

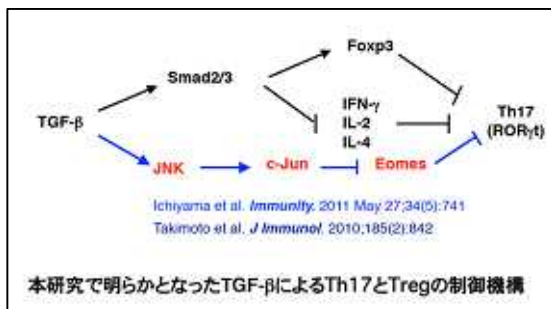
とがわかった。

(2) Th17 分化誘導条件 (TGF-β + IL-6) では RORγt は Smad2/3 両欠損マウスでも正常に誘導された。RORγt の誘導は Smad2/3 非依存的であると結論できた。以上の T 細胞における TGF-β シグナルの機能について図にまとめた。

次に TGF-β の Smad 非依存経路を明らかにすべく野生型と同様に Smad2/3 両欠損した T 細胞で TGF-β によって発現が上下する遺伝子数個を選択した。これらを T 細胞に強制発現することで Th17 細胞への分化に影響を与えるものを選択した。これらのなかで Eomesodermin (Eomes) 遺伝子が Th17 細胞では発現を抑えられ、他の Th1 細胞や Th2 細胞では抑えられないことを突き止めた。そこで、Eomes を未熟な T 細胞に人為的に発現させたところ、Th17 細胞の誘導が著しく減少した。逆に Eomes の発現を抑えた T 細胞では TGF-β を加えなくても RORγt や IL-17 が誘導された。RORγt や IL-17 遺伝子のプロモーター解析から Eomes は、Th17 分化に最も重要な RORγt や IL-17A の遺伝子のプロモーターに結合して発現を抑制していることが分かった。

次に、T 細胞でどのようなシグナルが Eomes の発現をコントロールしているのかを調べた。様々なシグナル阻害薬を検討したところ、JNK の阻害剤が TGF-β による Eomes の発現抑制を解除することが分かった。また JNK を阻害することで IL-17A の発現も抑制されることも分かった。逆に (JNK1 もしくは JNK2) を T 細胞に過剰に発現させると Eomes の発現量が少なくなり、TGF-β がなくても Th17 細胞分化が誘導されていた。最後に JNK 阻害剤を実験的自己免疫性脳脊髄炎モデル (EAE) に適用したところ JNK 阻害剤は症状を著しく改善した。

JNK は c-Jun と呼ばれる転写因子を介して機能を発揮することが知られている。詳細な検討から、やはり c-Jun が Eomes を作る遺伝子の発現を低下させることが明らかとなった。すなわち、TGF-β → JNK → c-Jun → Eomes の抑制



→Th17 細胞分化誘導というメカニズムがあることが示された(図参照)

(3) 本年度はファイザー社の CP-690550 (CP) および Merck 社の pyridone6 を中心に JAK 阻害のヘルパー T 細胞分化に及ぼす影響を調査した。マウス脾臓ナイーブ T 細胞を Th1, Th2, Th17, iTreg 条件下で分化誘導を行った。CP と P6 はいずれも IFN 誘導性の STAT1、IL-4 誘導性の STAT6、IL-2 誘導性の STAT5 の活性化を 5-30nM で抑制したが、IL-6 誘導性の STAT3 の活性化に関しては 100nM 以上を必要とした。これに伴い CP と P6 は Th1 と Th2 の分化を抑制する一方で、Th17 の分化は顕著に促進させた。これらの結果から CP は JAKs および STATs の間で異なる効果を示し、それにより Th 分化に影響を及ぼす事が示唆された。次に、JAK 阻害剤による Th 阻害の生体レベルでの効果をマウス病態モデルで検討した所、CP は関節リウマチモデルであるコラーゲン誘導性関節炎を強く抑制した。しかし同じ濃度 (15mg/kg マウス体重) において、Th17 が発症に深く関わるとされる実験性自己免疫脳脊髄炎 (EAE) モデルではその発症を促進させた。また P6 は Th2 関連疾患であるアトピー性皮膚炎を強力に抑制した。このモデルにおいても Th2 の抑制と Th17 の促進を認めた。Th17 関連サイトカイン (IL-17、IL-22) のアトピー性皮膚炎モデルにおける役割を検討した所、IL-17 と IL-22 は皮膚の損傷の修復を促進させ、アトピー性皮膚炎の発症を抑制した。以上より現在有望視されている JAK 阻害剤は様々な免疫疾患に有効であるが、各 Th サブセットの分化抑制効果には差異があり、対象疾患選択には十分な検討が必要であることが明らかとなった。

(4) 細胞内シグナル伝達系の反応をモデル化する詳細なモデルの構築を行った。その結果、本モデルでは、ある程度 Th1, Th2, Th17, iTreg それぞれの分化条件で分化する Th 細胞の割合が実験結果と一致することがわかった。そこで次に TGF-β の濃度依存性を調べたところ Th17 は中程度の TGF-β で iTreg は高濃度の TGF-β で効率よく分化誘導されることが予測された。実際に Th17 条件化で TGF-β の濃度を振ると同様の結果が観察された。一方 TCR 刺激の強度の依存性を調べたところ Th17 は強い TCR

刺激を必要とすることが予測された。実施に実験を行うとiTregに比べてTh17の誘導には強いTCR刺激が必要であった。これらのことから本モデルはTh分化の挙動を再現していることが示唆された。

TGF- β を添加すると、iTregが最初増加するが、3日後以降減少し、Th2が増加してくる。この現象をモデル化するには、Foxp3によって誘導される、もしくはFoxp3非依存的にTGF- β によって誘導されるiTregの増殖を抑制する因子の存在が必要である。Foxp3欠損細胞を用いた検索からそのような分子の存在が示唆される。このような個々の実験結果を再現するように各サブタイプへのサイトカインの影響などをモデル化していき、ヘルパーT細胞分化のモデル化を行った。このモデルを用いて、各種条件での各サブタイプの変化を解析する。

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 11 件) すべて査読有り

1) Sekiya T, Kashiwagi I, Yoshida R, Fukaya T, Morita R, Kimura A, Ichinose H, Metzger D, Chambon P, Yoshimura A. Nr4a receptors are essential for thymic regulatory T cell development and immune homeostasis. *Nature Immunol.* 2013 Jan 20;14(3):230-7.

2) Hasegawa E, Sonoda KH, Shichita T, Morita R, Sekiya T, Kimura A, Oshima Y, Takeda A, Yoshimura T, Yoshida S, Ishibashi T, Yoshimura A. IL-23-Independent Induction of IL-17 from $\gamma\delta$ T Cells and Innate Lymphoid Cells Promotes Experimental Intraocular Neovascularization. *J Immunol.* 2013 Feb 15;190(4):1778-87.

3) Shichita T, Hasegawa E, Kimura A, Morita R, Sakaguchi R, Takada I, Sekiya T, Ooboshi H, Kitazono T, Yanagawa T, Ishii T, Takahashi H, Mori S, Nishibori M, Kuroda K, Akira S, Miyake K, and Yoshimura A. Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nature Medicine* 2012 Jun;18(6):911-7

4) Yoshida H, Suzuki M, Sakaguchi R, Tani I, Kotani H, Shudo N, Yoshimura A. Preferential induction of Th17 cells in vitro and in vivo by Fucogalactan from *Ganoderma lucidum* (Reishi). *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 May 25;422(1):174-80.

5) Sugiyama Y, Kakoi K, Kimura A, Takada I, Kashiwagi I, Wakabayashi Y, Morita R, Nomura M, Yoshimura A. Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the suppression of iNOS synthesis in macrophages by regulating IRF3 and STAT1 pathways. *Int Immunol.* 2012

Apr;24(4):253-65.

6) Yoshida H, Kimura A, Fukaya T, Sekiya T, Morita R, Shichita T, Inoue H, Yoshimura A. Low dose CP-690,550 (tofacitinib), a pan-JAK inhibitor, accelerates the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis by potentiating Th17 differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Feb 10;418(2):234-40.

7) Nakagawa R, Yoshida H, Asakawa M, Tamiya T, Inoue N, Morita R, Inoue H, Nakao A, Yoshimura A. Pyridone 6, a pan-JAK inhibitor, ameliorates allergic skin inflammation of NC/Nga mice via suppression of Th2 and enhancement of Th17. *J Immunol.* 2011 Nov 1;187(9):4611-20.

8) Mori T, Miyamoto T, Yoshida H, Asakawa M, Kawasumi M, Kobayashi T, Morioka H, Chiba K, Toyama Y, Yoshimura A. IL-1 β and TNF α -initiated IL-6-STAT3 pathway is critical in mediating inflammatory cytokines and RANKL expression in inflammatory arthritis. *Int Immunol.* 2011 Nov;23(11):701-12.

9) Wakabayashi Y, Tamiya T, Takada I, Fukaya T, Sugiyama Y, Inoue N, Kimura A, Morita R, Kashiwagi I, Takimoto T, Nomura M, Yoshimura A. Histone 3 lysine 9 (H3K9) methyltransferase recruitment to the interleukin-2 (IL-2) promoter is a mechanism of suppression of IL-2 transcription by the transforming growth factor- β -Smad pathway. *J Biol Chem.* 2011 Oct 14;286(41):35456-65

10) Ichiyama K, Sekiya T, Inoue N, Tamiya T, Kashiwagi I, Kimura A, Morita R, Muto G, Shichita T, Takahashi R, Yoshimura A. Transcription Factor Smad-Independent T Helper 17 Cell Induction by Transforming-Growth Factor- β Is Mediated by Suppression of Eomesodermin. *Immunity.* 2011 May 27;34(5):741-54.

11) Matsunaga Y, Inoue H, Fukuyama S, Yoshida H, Moriwaki A, Matsumoto T, Matsumoto K, Asai Y, Kubo M, Yoshimura A, Nakanishi Y. Effects of a Janus kinase inhibitor, pyridone 6, on airway responses in a murine model of asthma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Jan 7;404(1):261-7.

[学会発表](計 3 件)

1. Satoshi Yamada, Akihiko Yoshimura, "Sensitivity analysis of helper T cell differentiation", 第41回日本免疫学会学術集会, 2012年12月5日, 神戸

2. Satoshi Yamada, Akihiko Yoshimura, "Sensitivity analysis of computer model of helper T cell differentiation", The 3rd Synthetic Immunology Workshop, 2012年5月19日, 京都

3. Satoshi Yamada, Akihiko Yoshimura, "Important factors in computer model of helper T cell differentiation", 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月14日, 横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔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://new.immunoreg.jp/>

6. 研究組織

(1) 代表研究者

吉村 昭彦 (YOSHIMURA AKIHIKO)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：90182815

(2) 研究分担者 なし：

(3) 連携研究者

山田 訓 (YAMADA SATOSHI)

岡山理科大学・工学部・教授

研究者番号：20393506