

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590571

研究課題名(和文) Th17 および Tfh 分化に及ぼす TRAF5 の抑制作用の解明

研究課題名(英文) Roles of TRAF5 in the lineage commitment of helper T cell subsets

研究代表者

宗 孝紀 (S0, Takanori)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60294964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円

研究成果の概要(和文)：アレルギー性喘息や関節リウマチなどの免疫病の増悪には、ヘルパーT細胞(Th細胞)と呼ばれるリンパ球が重要な役割をはたす。Th17細胞は、その分化にサイトカイン IL-6 を必要とする Th細胞の一集団であり、好中球に対する活性化能や自己免疫病を増悪させる悪玉細胞として働く。本研究により、TRAF5 という細胞内タンパク質が IL-6 によるシグナル伝達を阻害し、これにより Th17 細胞の産生や Th17 細胞による自己免疫病の発症を抑制することを初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Helper T-lymphocytes (Th cells) promotes immune-mediated inflammatory diseases, such as allergic asthma and rheumatoid arthritis. Signaling via IL-6 contributes to the development of the Th17 subset, which is one of major subpopulations of Th cells. Th17 cells activate neutrophils and are involved in autoimmune diseases. This study demonstrates that TRAF5 adaptor protein constitutively associates with a cytoplasmic region in the signaling transducing receptor for IL-6, gp130, to inhibit the IL-6 signaling and that TRAF5 works as an anti-inflammatory factor to limit immune responses mediated by pathogenic Th17 cells.

研究分野：免疫学

キーワード：ヘルパーT細胞 CD4+ T細胞 TRAF5 Th17 シグナル伝達 自己免疫 サイトカイン TRAF

1. 研究開始当初の背景

TRAF5 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 5) は、TNF 受容体型分子群 (TNFR スーパーファミリー) の細胞内領域に結合することで NF- κ B などの炎症性シグナルの促進因子として機能することが知られていた。申請者は、CD4⁺ T 細胞 (ヘルパー T 細胞、Th 細胞) の分化における TRAF5 の機能を解析した結果、TRAF5 が炎症性 CD4⁺ T 細胞の分化に対し阻害的にはたらくことを見いだした (引用文献 1)。この結果から、従来炎症を促進すると考えられていた TRAF5 が、ある種の特別な免疫応答、特に CD4⁺ T 細胞を介する炎症応答において、抗炎症的にはたらくことが示唆された。また本研究の開始当初、TRAF5 が IL-6 に対する T 細胞応答に対し抑制的にはたらくという予備知見を得ていた。

2. 研究の目的

本研究では、CD4⁺ T 細胞内に発現する TRAF5 によるシグナル制御機構および TRAF5 を介する Th 細胞分化制御機構の解明を目的とした。特に、IL-6 シグナルに対して TRAF5 がどのような分子機序で抑制能を発揮するかについて、また IL-6 が分化促進因子となる Th17 細胞および Tfh 細胞の分化に対し TRAF5 がどのように抑制能を発揮するかについて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Ba/F3 細胞を用いた TRAF5 の機能評価

gp130 の遺伝子導入により、gp130 を細胞表面に発現する Ba/F3 細胞 (Ba/F3-gp130 細胞) を作成した。Ba/F3 細胞は、培地に IL-3 を添加することにより維持した。この細胞を IL-6/IL-6R で刺激することにより、細胞増殖応答として IL-6 シグナルの強度を評価できることを確認できた (図 1)。さらに TRAF5 の機能を解析するために、Ba/F3-gp130 細胞に TRAF5 を遺伝子導入し TRAF5 を高発現する細胞株 (TRAF5)、また RNA 干渉により内在性 TRAF5 をノックダウンした細胞株 (shTRAF5) それぞれを作成した (図 1)。免疫プロテオミクスにより、それぞれの細胞株で TRAF5 の発現量の亢進および低下を確認できた。また、これらの細胞株における gp130 の発現量や IL-3 に対する細胞増殖能はコントロールベクターを遺伝子導入した細胞株 (Control vector) と同等であることを確認した。

(2) IL-6 シグナル伝達における TRAF5 の作用点の特定

IL-6 受容体のシグナル伝達分子である gp130 と TRAF5 との相互作用が示唆された。そこで、TRAF5 および gp130 の欠失変異体を作成し、これらの発現ベクターを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、細胞内に発現したタンパク質を免疫沈降することで、そ

れぞれの分子のどの部分で結合が起こるかを評価した。

また、CD4⁺ T 細胞に内在性に発現する gp130 と TRAF5 との間で結合が起こるかについても、野生型 C57BL/6 マウスより精製した CD4⁺ T 細胞を用いた免疫沈降実験により評価した。

(3) TRAF5 による Th 細胞分化制御機構

野生型および *Traf5*^{-/-} C57BL/6 マウスの脾臓から、あるいは、これらのマウスと OT-II TCR トランスジェニックマウス (ovalbumin, OVA 由来抗原ペプチド OVA₃₂₃₋₃₃₉ に反応する TCR を遺伝子導入したマウス) とを交配したマウスの脾臓からナイーブ (CD44^{low}CD62L^{high}) CD4⁺ T 細胞を精製し、*in vitro* および *in vivo* における Th 分化を評価した。

in vitro の分化培養系に IL-6 を添加することで、Th17 細胞あるいは Tfh 細胞への分化を誘導した。また、ナイーブ CD4⁺ T 細胞を同系マウスに養子移入し、OVA とフロイント完全アジュバント (CFA) でレシピエントマウスを免疫することで、ドナー CD4⁺ T 細胞の *in vivo* における Th 分化能を評価した。

(4) TRAF5 による疾患制御機構

実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) は、ヒトの多発性硬化症のモデルとして用いられ、近年の研究から Th17 細胞が疾患の病態形成に重要な役割を果たすことが明らかになっている。野生型および *Traf5*^{-/-} C57BL/6 マウスを用いて、脳炎惹起ミエリン抗原に由来する抗原ペプチド (MOG₃₅₋₅₅) と CFA の免疫により EAE を誘導し、TRAF5 の欠損が EAE の疾患病態にどのような影響を及ぼすかを評価した。

また、CD4⁺ T 細胞に発現する TRAF5 が EAE 発症にどのような役割をはたすかを明らかにするために、CD4⁺ T 細胞の養子移入により EAE を誘導する実験系を確立した。すなわち、 γ 放射線照射した同系レシピエントマウスに野生型あるいは *Traf5*^{-/-} CD4⁺ T 細胞を養子移入した後、定法に従い MOG₃₅₋₅₅ と CFA でレシピエントマウスを免疫し、ドナー T 細胞依存的に EAE を発症させる実験系である。

4. 研究成果

(1) Ba/F3 細胞を用いた TRAF5 の機能評価

Ba/F3-gp130 細胞の IL-6/IL-6R 刺激に対する細胞増殖能は、TRAF5 の発現量と逆相関することがわかった (図 1)。すなわち、TRAF5 を高発現する細胞 (TRAF5) で増殖能の低下が、TRAF5 を低発現する細胞 (shTRAF5) では増殖能の亢進が認められた。この結果と対応して、IL-6 刺激による STAT3 のリン酸化量も TRAF5 の発現量と逆相関することがわかった (data not shown)。以上の結果から、TRAF5 が IL-6 シグナルの抑制因子として機能することがわかった。

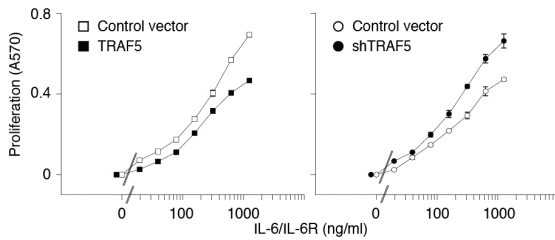


図1 TRAF5の発現量を変化させたBa/F3-gp130細胞株のIL-6依存的な細胞増殖応答

(2) IL-6シグナル伝達におけるTRAF5の作用点の特定

TRAF5が、C末端のTRAF-Cドメインを含むTRAF5²⁴²⁻⁵⁵⁸の領域を介してgp130と結合することがわかった。また、TRAF5²⁴²⁻⁵⁵⁸は、gp130の細胞内領域gp130⁷⁷⁴⁻⁷⁹⁸と結合することがわかった(図2, 引用文献2)。

野生型C57BL/6マウスに由来するCD4⁺T細胞のgp130を免疫沈降することによっても、TRAF5-gp130間の結合を確認でき、この結合はIL-6刺激に依存しないことがわかった(引用文献2)。

gp130⁷⁷⁴⁻⁷⁹⁸には、TRAF-Cドメインが認識する結合するSXXEモチーフ(SRSE)およびdi-acidicモチーフ(EEおよびED)が含まれ、これらのモチーフを介してTRAF5がgp130と恒常的に結合することがgp130の変異体を用いた解析から明らかになった(図2, 引用文献2)。

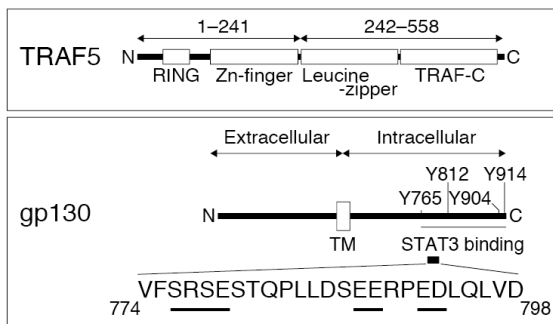


図2 TRAF5およびgp130の構造

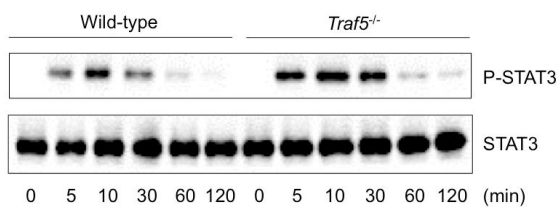


図3 野生型およびTraf5^{-/-}CD4⁺T細胞におけるIL-6刺激依存的なSTAT3のリン酸化

野生型およびTraf5^{-/-}C57BL/6マウスに由来するCD4⁺T細胞は、細胞表面にgp130を同程度に発現する。これらの細胞をIL-6/IL-6Rで刺激することで、IL-6依存的にSTAT3のリン酸化を誘導した。Traf5^{-/-}CD4⁺T

細胞において、STAT3リン酸化の有意な亢進が認められた(図3, 引用文献2)。gp130⁷⁷⁴⁻⁷⁹⁸のC末端側には、STAT3との結合に関わるチロシン残基(Y765, Y812, Y904, Y914)が存在する。TRAF5のgp130への結合により、STAT3のgp130への結合やその後起こるSTAT3のリン酸化が抑制されることがわかった(引用文献2)。TRAF5がどのようにSTAT3の活性化を阻害するかは今後明らかにしたい。

以上から、TRAF5のgp130への恒常的な結合こそがIL-6シグナルの抑制につながるということが明らかになった。

(3) TRAF5によるTh細胞分化制御機構

野生型およびTraf5^{-/-}CD4⁺T細胞を抗CD3抗体、抗CD28抗体、IL-6、TGF-βの刺激によりTh17細胞へ分化させた。Traf5^{-/-}CD4⁺T細胞において、有意なTh17細胞分化の亢進が認められた。レトロウイルス感染によりTraf5遺伝子をTraf5^{-/-}CD4⁺T細胞へ導入することで、Th17分化が抑制された(引用文献2)。以上から、CD4⁺T細胞におけるTRAF5の発現がTh17細胞分化に対し阻害的にはたらくことがわかった。

OT-IIマウスから精製した野生型あるいはTraf5^{-/-}ナイーブCD4⁺T細胞を、OVA₃₂₃₋₃₃₉抗原および野生型C57BL/6マウスの脾臓に由来する抗原提示細胞で刺激し、Th細胞への分化を誘導した。培地に添加したIL-6依存的に、培養上清中にIL-17およびIL-21が産生された。重要なことに、野生型T細胞と比較して、Traf5^{-/-}T細胞でこれらのサイトカイン産生の有意な増加が認められた。IL-17の細胞内染色により、Traf5^{-/-}OT-II T細胞がTh17細胞へ分化しやすいことを確認できた。Th17やTfh細胞のマーカーとなるRORγtやBcl6の発現解析からも、IL-6依存的なTh17やTfh分化がTRAF5の欠損により起こりやすくなることがわかった(引用文献2)。

OT-IIマウスから精製した野生型あるいはTraf5^{-/-}ナイーブCD4⁺T細胞を用いて、*in vivo*におけるTh分化能を評価した結果、TRAF5の欠損がTh17分化の亢進に結びつくことを確認できた(引用文献2)。

以上の結果から、CD4⁺T細胞に発現するTRAF5が欠損することによりIL-6シグナルが過剰になり、このことによりTh17細胞やTfh細胞への分化が起こりやすくなるということが明らかになった。

(4) TRAF5による疾患制御機構

野生型およびTraf5^{-/-}マウスにEAEを誘導した結果、Traf5^{-/-}マウスでEAE病態の有意な亢進が認められた。これに対応して、Traf5^{-/-}マウスでMOG抗原特異的なTh17細胞の分化が有意に亢進し(図4)、中枢神経へ浸潤するTh17細胞を含む炎症性T細胞の数も増加することがわかった(引用文献2)。

野生型あるいはTraf5^{-/-}CD4⁺T細胞依存的にEAEを発症させたところ、Traf5^{-/-}CD4⁺T

細胞が有意に EAE 臨床スコアを上昇させることがわかった (引用文献 2)。

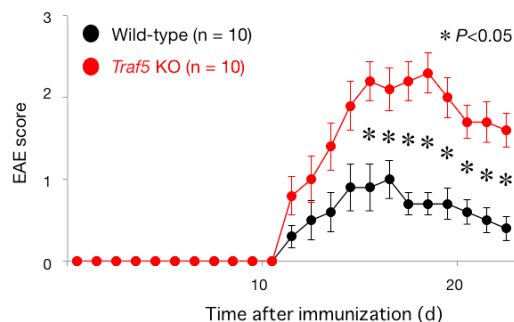


図 4 野生型および *Traf5*^{-/-} マウスにおける EAE 臨床スコアの経時変化

以上から、TRAF5 の欠損により MOG 抗原に特異的な病原性 Th17 細胞の分化が起こりやすくなり、これが EAE 病態の増悪につながる事が明らかになった。

TRAF5 の欠損が *in vivo* における Tfh 分化をどのように制御し、またこれが免疫応答としてどのような差として観察されるかについて種々の実験系により検討したが、TRAF5 の関与を示す有意な結果は得られなかった。最近の研究から、IL-6 は Tfh 分化の初期に分化因子としてはたらくものの、それ以外の因子により Tfh 分化が大きく影響を受けることが明らかになっている。このような理由により期待する結果が得られなかったと推察する。

本研究から、TRAF5 の gp130 への結合により IL-6 シグナルが抑制されるという予想外の T 細胞炎症シグナル機構を明らかにすることができた。この TRAF5 による新たなシグナル機構は、これまでに TRAF ファミリー分子で明らかにされている機構と以下の 3 点で一線を画する。1) 向炎症でなく抗炎症に関係すること、2) TNF 受容体でなくサイトカイン受容体シグナルの抑制に関係すること、3) 誘導的でなく恒常的な TRAF 結合配列により制御されることである。今後、より普遍的な炎症反応制御の観点から TRAF5 の機能を理解し、さらに発展させ、炎症性疾患の治療法の開発に資する分子基盤の確立を目指したい。

<引用文献>

1) So T, Salek-Ardakani S, Nakano H, Ware CF, Croft M. TNF receptor-associated factor 5 limits the induction of Th2 immune responses. *J Immunol* 172, 4292-4297, 2004.

2) Nagashima H, Okuyama Y, Asao A, Kawabe T, Yamaki S, Nakano H, Croft M, Ishii N, So T. The adaptor TRAF5 limits the differentiation of

inflammatory CD4⁺ T cells by antagonizing signaling via the receptor for IL-6. *Nat Immunol* 15, 449-456, 2014.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)
以下すべて査読あり。

1) Nagashima H, Ishii N (/9), So T (/9). The adaptor TRAF5 limits the differentiation of inflammatory CD4⁺ T cells by antagonizing signaling via the receptor for IL-6. *Nat Immunol* 15, 449-456, 2014. DOI: 10.1038/ni.2863.

2) Yamaki S, So T (/17), Ishii N (/17). OX40 and IL-7 play synergistic roles in the homeostatic proliferation of effector memory CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol* 44, 3015-3025, 2014. DOI: 10.1002/eji.201444701.

3) Haji Y, So T (/8), Ishii N (/8). Activation of Notch1 promotes development of human CD8⁺ single positive T cells in humanized mice. *Biochem Biophys Res Commun* 447, 346-351, 2014. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.04.003.

4) So T, Croft M. Regulation of PI-3-kinase and Akt signaling in T lymphocytes and other cells by TNFR family molecules. *Front Immunol* 4, 139, 2013. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00139.

5) Horino S, So T (/14), Ishii N (/14). Gene therapy model of X-linked severe combined immunodeficiency using a modified foamy virus vector. *PLoS One* 8:e71594, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0071594.

6) Sun SL, So T (/13), Ishii N (/13). Y chromosome-linked B and NK cell deficiency in mice. *J Immunol* 190, 6209-6220, 2013. DOI: 10.4049/jimmunol.1300303.

7) Kawabe T, So T (/8), Ishii N (/8). Homeostatic proliferation of naive CD4⁺ T cells in mesenteric lymph nodes generates gut-tropic Th17 cells. *J Immunol* 190, 5788-5798, 2013. DOI: 10.4049/jimmunol.1203111.

8) So T, Croft M. Regulation of the PKCθ-NF-κB axis in T lymphocytes by the tumor necrosis factor receptor family member OX40. *Front Immunol* 3, 133, 2012. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00133.

〔学会発表〕(計 17 件)

1) 宗孝紀, TRAF5 による Th17 細胞分化抑制機構、第 4 回 Multidisciplinary meeting on atherosclerosis、2015 年 1 月 10 日、「仙台ト

ラストシティ・カンファレンスルーム(宮城県・仙台市)」

2) 長島宏行(代表)、TRAF5 controls Th17 development by antagonizing IL-6-receptor signaling、第43回日本免疫学会学術集会、2014年12月12日、「京都国際会議場(京都府・京都市)」

3) **宗孝紀**、A novel molecular function of TRAF5 in CD4 T cell lineage commitment、The 2nd symposium of international immunological memory and vaccine forum、2014年8月25日、「ラホヤ(アメリカ合衆国)」

4) 長島宏行(代表)、TNF receptor-associated factor 5 inhibits Th17 differentiation by antagonizing IL-6-receptor signaling、The 2nd symposium of international immunological memory and vaccine forum、2014年8月25日、「ラホヤ(アメリカ合衆国)」

5) 長島宏行(代表)、TRAF5はIL-6シグナルを制御することでTh17分化を抑制する、第68回日本細菌学会東北支部総会、2014年8月23日、「東北大学片平さくらホール(宮城県・仙台市)」

6) **宗孝紀**、ヘルパーT細胞分化におけるTRAF5の抗炎症シグナル機構、第3回 Multidisciplinary meeting on atherosclerosis、2014年1月11日、「仙台トラストシティ・カンファレンスルーム(宮城県・仙台市)」

7) 長島宏行(代表)、TRAF5 controls inflammatory CD4 T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis、第42回日本免疫学会学術集会、2013年12月11日、「幕張メッセ(千葉県・千葉市)」

8) 長島宏行(代表)、TRAF5欠損マウスでは実験的自己免疫性脳脊髄炎が増悪する、第67回日本細菌学会東北支部総会、2013年8月30日、「東北大学片平さくらホール(宮城県・仙台市)」

9) 長島宏行(代表)、TNF receptor-associated factor 5 inhibits Th17 and Tfh differentiation、第41回日本免疫学会学術集会、2012年12月5日、「神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)」

10) 長島宏行(代表)、TNF receptor-associated factor 5によるヘルパーT細胞制御機構の解明、第66回日本細菌学会東北支部総会、2012年8月23日、「東北大学片平さくらホール(宮城県・仙台市)」

〔図書〕(計2件)

1) **宗孝紀**、**石井直人**、ヘルパーT細胞分化に

おける TRAF5 を介したチェックポイント制御、先端医学社、炎症と免疫、2015年、23巻、21-26頁。

2) **宗孝紀**、**石井直人**、OX40とIL-7によるメモリーCD4⁺T細胞の維持機構、科学評論社、臨床免疫・アレルギー科、2013年、59巻、559-566頁。

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

〔その他〕
1) 長島宏行、**宗孝紀**、アダプタータンパク質 TRAF5はインターロイキン6シグナルを阻害することにより炎症性CD4陽性T細胞の分化を抑制する、2014年、ライフサイエンス新着論文レビュー First Author's、<http://first.lifesciencedb.jp/>

2) **宗孝紀**、**石井直人**、「免疫病発症を抑制-東北大と米ラホヤ研 細胞内たん白質発見」、2014年4月1日、化学工業日報。

6. 研究組織

(1)研究代表者

宗 孝紀 (SO Takanori)
東北大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：60294964

(2)研究分担者

石井 直人 (ISHII Naoto)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号：60291267