

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591662

研究課題名(和文)GVHDモデルマウスにおける細胞障害性T細胞を制御する転写因子の同定

研究課題名(英文)Identification of a transcription factor that controls cytotoxic T lymphocyte in a murine model of GVHD

研究代表者

宮川 史(Miyagawa, Fumi)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00346024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、我々はCD8 T細胞において、IRF8がT細胞受容体/副刺激経路と c サイトカインシグナル伝達経路の2つのシグナルにより持続して活性化されていることを示した。阻害剤によりそれぞれのシグナル伝達経路をブロックすると、IRF8の発現とCD8 T細胞のエフェクター分化は抑制された。GVHDモデルマウスにおいてIRF8を欠損したCD8 T細胞は細胞障害性T細胞に分化できず、GVHDも軽減した。以上の結果より我々は、IRF8がT細胞受容体/副刺激経路と c サイトカインシグナル伝達経路を統合することで、ナイーブCD8 T細胞のエフェクターCD8 T細胞への分化を促進することを示した。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that c-cytokines, especially IL-15, play a critical role in determining whether or not CD8 cells exert cytotoxic activity in an experimental GVHD mouse model. We then hypothesized that cooperation between c-cytokine and TCR/co-stimulation signaling is critical in enabling the transition of naive CD8 T cells into effector cells. In this study, we demonstrated that the transcription factor interferon regulatory factor 8 (IRF8) is persistently activated by these two signals in CD8 T cells. Blocking these signaling pathways by either a ZAP70 inhibitor or a Jak3 inhibitor abrogated IRF8 upregulation and inhibited effector differentiation in CD8 T cells. In an experimental GVHD mouse model, IRF8 deficient CD8 T cells failed to differentiate into cytotoxic T cells, causing reduced pathology. Together, our work shows that IRF8 integrates the TCR/co-stimulation and c-cytokine signaling pathways and drives transition of naive CD8 T cells to effector cells.

研究分野：皮膚免疫学

キーワード：CD8 T cell effector function IL-15 gamma c cytokine TCR GVHD

1. 研究開始当初の背景

(1) K14-OVATg マウスを用いた免疫反応、免疫寛容の誘導と阻止

我々は皮膚に対する免疫反応、免疫寛容のメカニズムを理解するために、K14 プロモーターを用いて膜結合型 chicken ovalbumin (OVA) を皮膚に発現させた K14-mOVA トランスジェニック (Tg) マウスを作成した^{1,2}。MHC class I 拘束性に OVA を認識する T 細胞受容体を過剰に発現させた OT-I マウスを用いることで、K14-mOVA Tg マウスの自己抗原 (OVA) に対する免疫反応 / 免疫寛容を惹起させることが可能である。K14-mOVA Tg マウスに CD80T-I 細胞を移入すると、移植片対宿主病 (GVHD) に類似する皮膚病変を誘発することができる¹。我々はこの系を用いて、IL-15 が免疫反応と免疫寛容を決定づける重要な因子であることを報告した³。

(2) 免疫反応、免疫寛容を決定づける可能性のある転写因子 IRF8 の同定

上記 GVHD モデルマウスで、IL-15 が免疫反応の有無を決定することが示唆されたため、次に免疫反応の有無が決まるチェックポイントに関わる遺伝子を分子レベルで明らかにすることにした。in vivo の系では十分量の細胞を得ることが困難であったため、IL-15 を添加することで増殖しエフェクター機能を獲得するが、添加しないと抗原に反応しない OT-I 細胞の培養条件を見出し、マイクロアレイで発現遺伝子を比較した。免疫反応を起こす OT-I 細胞にのみ持続して高値に発現していた遺伝子は 144 個あったが、そのうち CD8 T 細胞での役割がよく分かっていなかった interferon regulatory factor 8 (IRF8) に着目することにした。

2. 研究の目的

(1) CD8 T 細胞のエフェクター分化における IRF8 の役割の解明

IRF8 の CD8 T 細胞における役割の詳細についてはよく分かっていない。我々は OT-I/IRF8

ノックアウト (KO) マウスを作製し、OT-I/IRF8KO 細胞を K14-mOVA Tg マウスに移入することで GVHD 反応が減弱することを見出した。移入した細胞を生体内より分離し、そのエフェクター機能 (サイトカイン産生能、細胞殺傷能) をしらべたところ、予備実験では IFN- γ の産生、細胞殺傷能ともに OT-I 細胞と比較して低下していたことより、IRF8 が CD8 T 細胞のエフェクター分化に関わっていることが示唆された。本研究ではこの結果の再現をとること、in vitro の系でさらに詳しく調べることを目的とした。

(2) K14-mOVA Tg マウスにおいて IRF8 とともに CD8 T 細胞のエフェクター機能に関与している IRF 転写因子の同定

CD8 T 細胞のエフェクター機能は、IRF8 を欠損させても減弱はするものの完全に消失するわけではないことより、K14-mOVA Tg に移入した CD8 T 細胞においては他の転写因子の関与も考えられた。IRF8 は、他の IRF ファミリー転写因子とダイマーをつくりその機能を発揮することが分かっている。本研究では IRF8 の CD8 T 細胞のエフェクター機能における役割を、他の IRF ファミリー転写因子との相互作用の観点から明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

in vivo の実験系としては、OT-I/IRF8KO マウスを作成し、OT-I/IRF8KO 細胞を K14-mOVA Tg マウスに移入することで、正常の OT-I 細胞とその増殖能、活性化の程度、エフェクター機能を比較検討した。具体的には OT-I/IRF8KO マウスのリンパ節、脾臓より MACS beads と CD8 カラムを用いて OT-I/IRF8KO 細胞を高純度で分離した。分離した細胞をマウスに移入後、体重測定と視診で GVHD を診断評価し、皮膚の一部を生検して確定診断とした。また移入した細胞の評価のために、宿主である K14-mOVA Tg マウスよりリンパ節、脾臓を摘出して、フローサイトメトリーを用いて、移入

した細胞の表面マーカーとサイトカイン産生能などを調べた。in vitro の実験系としては OT-1 細胞を抗原で刺激し、IRF8 あるいは他の IRF 転写因子の mRNA の発現レベルと表面マーカー、エフェクター機能との間にどういった関係が見られるかを調べた。具体的には培養した細胞を 6, 24 時間後に回収し、RNA を抽出後 real-time PCR を施行し IRF8 あるいは他の IRF 転写因子の mRNA の発現レベルを定量した。また同じ培養細胞を 24 あるいは 48 時間後に回収し、フローサイトメトリーを用いて活性化マーカーを調べた。さらに培養細胞の上清を 48 時間後に回収し、上清中の IFN- γ のレベルを ELISA で調べた。次に IRF8 が抗原刺激 (TCR signaling) や、特定のサイトカインの刺激 (γ c signaling) により引き起こされるシグナル伝達系のどこに位置するかを調べた。具体的にはこれらのシグナル伝達系を抑制する阻害剤の存在下に、OT-1 細胞を培養し、上記と同様に real-time PCR, フローサイトメトリー、ELISA を行った。

4. 研究成果

(1) IRF8 は CD8 T 細胞の活性化分子である。IRF8 は免疫細胞に限局して発現がみられる唯一の IRF family 転写因子である。しかし CD8 T 細胞における発現についてはあまり研究がなされてこなかった。我々の研究の結果、ナイーブ CD8 T 細胞では発現が見られず、CD8 T 細胞を抗 CD3/CD28 抗体を用いて in vitro で刺激すると、IRF8 の発現は mRNA および蛋白レベルにおいても、刺激後 6 時間でピークになり、12 時間、24 時間後には漸減していったことより、IRF8 の発現は CD8 T 細胞の活性化に伴い上昇することが明らかとなった。

(2) CD8 T 細胞のエフェクター機能の発現には JAK-STAT 経路と T 細胞受容体 (TCR) / 副刺激経路が IRF8 により統合される必要がある。我々のマイクロアレイの結果より、CD8 T 細胞が十分に機能的なエフェクター細胞に分化するためには、 γ c-サイトカイン経路と T

細胞受容体 / 副刺激経路が統合する必要があることが示唆されていた。これを証明するために各経路の阻害剤を用いて OT-1 細胞の増殖、IFN- γ の産生等を検討した。 γ c-サイトカイン経路をブロックする JAK 阻害剤 (CP-690550) の存在下で OT-1 細胞を抗 CD3/CD28 抗体で刺激したところ、増殖は抑制されなかったが、IRF8 mRNA の発現、IFN- γ の産生、活性化マーカー CD25、CD69 の発現は、阻害剤の容量依存的に抑制された。同様に T 細胞受容体経路をブロックする Zap70 阻害剤 (piceatannol) 存在下に同様の実験を行ったところ、IRF8 mRNA の発現、IFN- γ の産生は阻害剤の容量依存的に抑制された。

(3) IRF8 欠損 OT-1 細胞は K14-mOVATg マウスの GVHD 反応を軽減する。

IRF8 が OT-1 細胞のエフェクター機能に直接関わっているかしらべるために、OT-1/IRF8KO マウスを作成した。OT-1/IRF8KO マウスより OT-1/IRF8KO 細胞を分離し、K14-mOVATg マウスに養子移入したところ、GVHD の臨床症状 (体重減少、皮膚粘膜病変など) は野生型の OT-1 細胞を移入したマウスと比べ減弱した。

(4) IRF8 欠損 OT-1 細胞の分裂能は正常だが、エフェクター機能は減弱する。

次に我々は CD8 T 細胞の活性化における IRF8 の役割について検討した。まず分裂能をしらべるために、CFSE で標識した OT-1/IRF8KO 細胞を K14-mOVATg マウスに移入したところ、野生型 OT-1 細胞と同程度の分裂能を示したことより、IRF8 は CD8 T 細胞のクローナルな増殖を直接的には制御していないといえる。この結果に合致して、OT-1 細胞あるいは OT-1/IRF8KO 細胞を K14-mOVATg マウスに移入後 5 日目の所属リンパ節、脾臓において、増殖した OT-1 細胞と OT-1/IRF8KO 細胞の数には違いは見られなかった。ところが活性化マーカーの発現をフローサイトメトリーで解析してみると、OT-1 細胞は

CD25^{high}CD44^{high}CD62L^{low}の形質を示し十分に活性化されていた。一方 OT-I/IRF8KO 細胞では、CD25 の上昇が少なく、CD62 も高値のままであり、活性化の程度は不十分であったことより、IRF8 は細胞分裂には関与していないが、CD8 T 細胞の phenotypic maturation に関与している可能性が考えられた。そこで OT-I/IRF8KO 細胞のエフェクター機能をしらべたところ、IFN- γ の産生能と殺傷能は OT-I 細胞に比べ、OT-I/IRF8KO 細胞では低下していた。このことより IRF8 は CD8 T 細胞のエフェクター機能に関与していると考えられた。

(5) IRF4 も CD8 T 細胞の活性化分子である。IRF8 は、他の IRF ファミリー転写因子とダイマーをつくりその機能を発揮することが分かっている。CD8 T 細胞の活性化に伴い、IRF8 と平行して発現のみられる IRF ファミリー転写因子があるかどうかをまず *in vitro* の系で検討した。免疫細胞に発現の見られる IRF 転写因子は、IRF1、2、4、5、7、8 であるので、抗 CD3/CD28 抗体で刺激した OT-I 細胞を用いて real-time PCR でこれらの発現を経時的にしらべた。このうち IRF4 のみが、IRF8 と同様に CD8 T 細胞の活性化とともにその発現が見られ、6 時間後にピークになり、12、24 時間後には発現が低下した。この結果より IRF8 とともに CD8 T 細胞のエフェクター機能に関与している可能性が考えられた。

<引用文献>

1. Shibaki A, Sato A, Vogel JC, Miyagawa E, Katz SI, Induction of GVHD-like skin disease by passively transferred CD8+ T-cell receptor transgenic T cells into keratin 14-ovalbumin transgenic mice, *J Invest Dermatol*, 123,2004,109-115
2. Miyagawa F, Gutermuth J, Zhang H, Katz SI, The use of mouse models to better

understand mechanisms of autoimmunity and tolerance, *J Autoimmun*, 35,2010, 192-198

3. Miyagawa F, Tagaya Y, Kim BS, Patel HJ, Ishida K, Ohteki T, Waldmann TA, Katz SI, IL-15 serves as a co-stimulator in determining the activity of autoreactive CD8 T cells in an experimental mouse model of graft vs. host like disease, *J Immunol*, 181,2008, 1109-1119

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

英文のみ記載、すべて査読あり

1. Shobatake C, Miyagawa F, Fukumoto T, Hirai T, Kobayashi N, Asada H, Usefulness of ultrasonography for rapidly diagnosing cutaneous sinus tracts of dental origin, *Eur J Dermatol*, 24, 2014, 683-687
DOI: 10.1684/ejd.2014.2441.
2. Ogawa K, Morito H, Hasegawa A, Miyagawa E, Kobayashi N, Watanabe H, Sueki H, Tohyama M, Hashimoto K, Kano Y, Shiohara T, Ito K, Fujita H, Aihara M, Asada H, Elevated serum TARC/CCL17 relates to reactivation of human herpesvirus 6 in DRESS/DIHS, *Br J Dermatol*, 171, 2014, 425-427
DOI: 10.1111/bjd.12948.
3. Miyagawa F, Fukumoto T, Kobayashi N, Asada H, Successful treatment of diffuse normolipemic plane xanthoma with probucol, *Case Rep Dermatol*, 5, 2013, 148-151
DOI: 10.1159/000351682.
4. Miyagawa F, Okiyama N, Villarroel V, Katz SI, Identification of CD3+CD4-CD8-T cells as potential regulatory cells in experimental mouse

- model of skin graft vs. host disease (GvHD), *J Invest Dermatol*, 133, 2013, 2538-2545
DOI: 10.1038/jid.2013.212.
5. Miyagawa F, Fukumoto T, Yurugi S, Nakamine H, Asada H, CD8+ primary cutaneous peripheral T-cell lymphoma in an 18-year-old woman, *J Dermatol*, 40, 2013, 571-572
DOI: 10.1111/1346-8138.12151.
 6. Ogawa K, Morito H, Hasegawa A, Daikoku N, Miyagawa F, Okazaki A, Fukumoto T, Kobayashi N, Kasai T, Watanabe H, Sueki H, Iijima M, Tohyama M, Hashimoto K, Asada H, Identification of TARC/CCL17 as a potential marker for early indication of disease and prediction of disease activity in DIHS/DRESS, *J Dermatol Sci*, 69, 2013, 38-43
DOI: 10.1016/j.jdermsci.2012.10.002.
 7. Miyagawa F, Zhang H, Terunuma A, Ozato K, Tagaya Y, Katz SI, Interferon regulatory factor 8 integrates T-cell receptor and cytokine-signaling pathways and drives effector differentiation of CD8 T cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 109, 2012, 12123-12128
DOI: 10.1073/pnas.1201453109.
 8. Paek SY, Miyagawa F, Zhang H, Linton JT, Hoover SB, Simpson RM, Katz SI, Soluble peptide treatment reverses CD8 T cell-induced disease in a mouse model of spontaneous tissue-selective autoimmunity, *J Invest Dermatol*, 132, 2012, 677-686
DOI: 10.1038/jid.2011.347.
- [学会発表](計 11 件)
国際学会のみ記載
1. Miyashita K, Shobatake C, Miyagawa F, Kobayashi N, Ommori R, Asada H, Involvement of HHV-6 infection in renal damage associated with DIHS, The 39th Japanese Society for Investigative Dermatology, Dec 12-14, 2014, Suita, Osaka
 2. Miyagawa F, Asada H, IRF7 controls the production of autoantibodies against the DNA- and RNA-containing autoantigens in murine lupus, The 39th Japanese Society for Investigative Dermatology, Dec 12-14, 2014, Suita, Osaka
 3. Miyashita K, Shobatake C, Nishimura T, Ogawa K, Miyagawa F, Kobayashi N, Ommori R, Asada H, Involvement of HHV-6 infection in renal damage associated with DIHS/DRESS, The 44th European Society for Dermatological Research, Sep 10-13, 2014, Copenhagen, Denmark
 4. Miyashita K, Shobatake C, Miyagawa F, Kobayashi N, Ommori R, Yonekawa S, Tanabe K, Kawate K, Morita K, Asada H, A case of acute renal failure related to DIHS due to TMP/SMX, The 39th International Herpesvirus workshop, July 19-23, 2014, Kobe, Hyogo
 5. Miyagawa F, Asada H, A role of IRF7 in the pathogenesis of SLE, The 73rd Society for Investigative Dermatology, May 7-10, 2014, Albuquerque, New Mexico, USA
 6. Asada H, Ogawa K, Hasegawa A, Miyagawa F, Watanabe H, Sueki H, Tohyama M, Hashimoto K, Kano Y, Shiohara T, Fujita H, Aihara M, Dynamics of Chemokines in Severe Drug Hypersensitivity, The 6th Drug Hypersensitivity Meeting, April 9-12, 2014, Bern, Switzerland

7. Miyagawa F, Zhang H, Katz SI, Asada H, IRF8 and IRF4 may work cooperatively in CD8 T cell effector differentiation, The 6th International Investigative Dermatology, May 8-11, 2013, Edinburgh, UK
8. Ogawa K, Morito H, Hasegawa A, Daikoku N, Miyagawa F, Okazaki A, Fukumoto T, Kobayashi N, Watanabe H, Sueki H, Iijima M, Tohyama M, Hashimoto K, Asada H, Identification of TARC/CCL17 as a potential marker for early indication of disease and prediction of disease activity in DIHS/DRESS, The 37th Japanese Society for Investigative Dermatology, Dec 7-9, 2013, Naha, Okinawa
9. Fukumoto T, Ogawa K, Miyagawa F, Katayama E, Hasegawa M, Kasai T, Nakamine H, Yurugi S, Asada H, Primary cutaneous small medium-sized T-cell lymphoma with an unusual CD8+ and cytotoxic phenotype, presenting as multiple lesion, The 49th American Society of Dermatopathology, Oct 11-14, 2012, Chicago, Illinois, USA
10. Miyagawa F, Tagaya Y, Ozato K, Katz SI, IRF8 controls activation-induced cell death on CD8 T cells by regulating Bcl2, The 72nd Society for Investigative Dermatology, May 9-12, 2012, Raleigh, North Carolina, USA
11. Ogawa K, Hasegawa A, Daikoku N, Miyagawa F, Okazaki A, Fukumoto T, Kobayashi N, Kasai T, Asada H, TARC/CCL17 in DIHS: Identification of TARC as potential marker for early indication of the disease and prediction of the disease activity.

The 5th Drug Hypersensitivity Meeting,
April 11-14, 2012, Munich, Germany

〔図書〕(計3件)

1. 宮川 史、浅田秀夫、薬剤性過敏症症候群 (DIHS)、月刊薬事 薬物アレルギー、じほう、2014、72-76
2. 宮川 史、顔の紅斑、頸、肘窩の掻痒、内科で役立つ一発診断から迫る皮膚疾患の鑑別診断、羊土社、2013、50-57
3. 宮川 史、福本隆也、顔面腫瘍を呈する皮膚良性腫瘍、Monthly Book Derma No.199 顔面の腫瘍鑑別診断と治療、全日本病院出版会、2012、13-22

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮川 史 (MIYAGAWA, Fumi)
奈良県立医科大学・皮膚科・助教
研究者番号：00346024

(2)研究分担者

浅田 秀夫 (ASADA, Hideo)
奈良県立医科大学・皮膚科・教授
研究者番号：60252681