

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790458

研究課題名(和文) 免疫制御および増悪の運命決定機構

研究課題名(英文) Mechanism of fate decision between immune regulation and immune aggravation

研究代表者

丸山 貴司 (MARUYAMA, TAKASHI)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：10622524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、I κ B-zeta欠損マウス(KOマウス)は、加齢に伴いシェーグレン症候群様の自己免疫疾患を発症する。

本研究では、その原因が制御性T細胞の免疫抑制能・安定性および分化誘導能のいずれかにあると仮定し、研究を行い、以下の事を明らかとした。

KOマウス由来の制御性T細胞は、免疫抑制能力が低下していた。KOマウス由来の制御性T細胞の安定性については、野生型マウスと比較して、顕著な違いは認められなかった。I κ B-zetaは、制御性T細胞の分化誘導過程においても影響を与える事、またその分子メカニズムについても明らかとした。

研究成果の概要(英文)：I κ B-family protein, I κ B-zeta located into nuclear, and control NF- κ B target gene expression. I κ B-zeta deficient (KO) mice caused autoimmune like sjogren's syndrome with age.

Thus, we hypothesis that KO mice have problem about the suppressor ability, stability or generation of regulatory T cells (Treg).

We found that regulatory T cells (Tregs) from KO mice has less suppression ability compared with control mice. We also found that stability of Tregs were comparable between control and KO mice. In addition, I κ B-zeta plays an pivotal role for Tregs fate decision.

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：免疫恒常性 制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

生体内の免疫系は、Foxp3 と呼ばれる転写因子を発現する制御性T細胞(Treg)によって恒常性が保たれており、Tregを欠損したヒトおよびマウスでは重篤な自己免疫疾患が引き起こされる事が知られている。近年、このTregの分化誘導にはTGF- β と呼ばれるサイトカインの刺激が必須である事が報告された。一方で、このTGF- β は、interleukin (IL)-6などの炎症性サイトカインの共存によって、Tregへの分化誘導を阻止し、自己免疫疾患の増悪を担うIL-17産生T細胞(Th17)へと分化誘導を促進する事が明らかとなった(*Nature*. 2006, 441;35-3)。つまり免疫系の制御あるいは増悪は、TGF- β 刺激を介したTregおよびTh17の分化誘導バランスによってコントロールされている事が明らかとなってきた。

TregおよびTh17分化誘導の分子メカニズムについては、既にTGF- β 下流で活性化される転写因子Smad2/3が両者の分化誘導に重要である事が報告されているものの、未だ不明な点が多い。このTregおよびTh17の分化バランスについて、申請者は転写制御因子Id3に着目した研究を行い、Id3はTGF- β 刺激によって2次的に発現が変動する事、Id3を欠損したマウスではTregが分化誘導されない一方、Th17の分化誘導が促進される事を明らかとした (Maruyama *et al.* *Nature Immunology*. 2011, 12; 86-95)。また、Id3を欠損したTregは、十分な免疫抑制能を有していない事も明らかとなった。そのため、Id3欠損マウスにおいては、シェーグレン症候群と呼ばれる涙や唾液の分泌障害が起こる自己免疫疾患が、自然発症してしまう事が明らかとなってきた。

最近、当研究室では、同じくTGF- β 刺激により発現が変動する転写制御因子I κ B- ζ について解析を進め、I κ B- ζ 欠損マウスではTh17が全く誘導されず発症が認められない事が報告された (*Nature*, 2010, 464;1381-1385)。

I κ B- ζ は、Th17の誘導に重要であることが

明らかになったが、同じくTGF- β によって誘導されるTregの分化誘導における役割については明らかでない。

最近、I κ B- ζ を欠損させたマウスにおいては、加齢と共にシェーグレン症候群様の自己免疫疾患を引き起こす事が明らかとなってきた(2011年3月 新学術領域 若手ワークショップにて口頭発表:連携研究者である牟田達史らの研究)。(その後、*Immunity*2013,38 450-460に掲載される。)

これまで申請者が解析を行ってきたId3欠損マウスも、同じくシェーグレン症候群を引き起こす事から、I κ B- ζ 欠損マウスにおいてもTregの免疫抑制能などについて、何かしらの影響が表れているのではないかと仮定した。申請者は本研究を遂行するための予備的な解析を行ったところ(*In vitro* 解析)、I κ B- ζ がTregの誘導とその免疫抑制における機能にも重要であることを明確に示す知見を得た。

本研究では、TGF- β 刺激を介したTregの分化誘導時における転写制御因子I κ B- ζ の生理的意義(*In vivo* 解析)とその分子機構の解明を目的とする。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究結果をもとに、本研究ではまだ解明されていないTregの分化誘導および免疫制御機能について転写制御因子I κ B- ζ の役割を明らかとし、自己免疫疾患発症の新しい分子メカニズムの解明と治療応用へ展開するための基礎研究を行う。

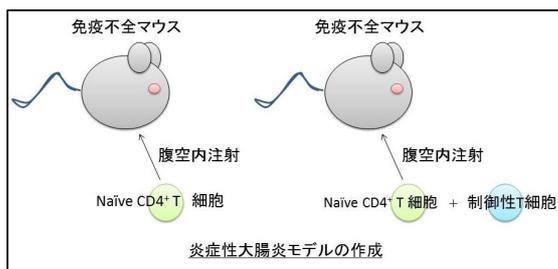
(1) I κ B- ζ 欠損マウス由来のTregが、十分に免疫抑制機能を保持しているかを明らかについて、*In vivo* モデルなどを使用し、明らかとする。

(2) I κ B- ζ の発現制御が、TGF- β 刺激によってどのようになされているのかを明らかとする。

(3) Tregの分化誘導に対し、転写制御因子I κ B- ζ はどのように働いているのか、その詳しい分子メカニズムを含め明らかとする。

3. 研究の方法

(1) 腸管出血性大腸炎モデルの作成
免疫不全マウスとして知られる Rag2 遺伝子欠損マウスに、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を移入する。この時、野生型および I κ B- ζ 欠損マウス由来の制御性 T 細胞と一緒に移入する事で、大腸炎の抑制が認められるかについての検討を行う。



また、野生型および I κ B- ζ 欠損マウス由来の Treg の、免疫抑制能力に關与する分子やサイトカインの発現について、フローサイトメトリーや Real Time PCR 法を用いた比較検討を行う。また、Treg の安定性について検証について、*In vitro*による培養実験によって検証を行う。

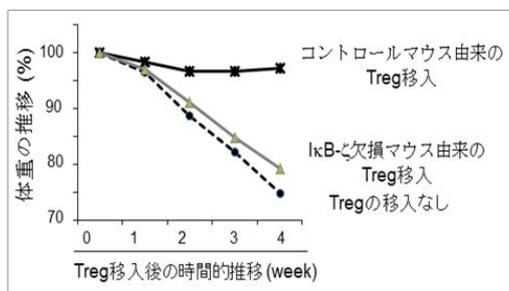
(2) ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を脾臓より精製し、試験管の中で培養を行う。この時、TGF- β 刺激を行うものを行わないものを準備する。0、2、4 および 72 時間培養を行い、Western Blotting や Real time PCR 法により、I κ B- ζ の発現を確認する。

(3) Treg のマスターレギュレーターである Foxp3 遺伝子座をクローニングしたりポータープラスミドを使用し、I κ B- ζ の発現ベクターによるリポーター活性の変動について、検討を行う。

4. 研究成果

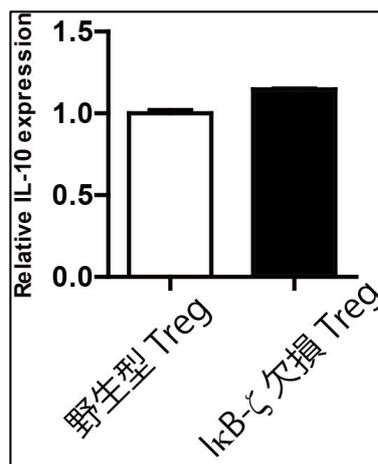
(1) 腸管出血性大腸炎モデルの作成を行ったところ、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を、免疫不全マウスに移入してから 1 週間後より、徐々に体重の減少が認められた。この時、野生型マウス由来の Treg を同時に移入すると、体重の減少を抑えられた。しかし、I κ B- ζ 欠損マウス由来の Treg を同時に移入すると、体重の減少が抑えられない事、および、大腸における炎症反応の増悪が認められた(右上图参照:細胞移入前の免疫不全マウスの体

重を 100%とし、週 1 回の体重測定を行い、その推移について、グラフ化した)



I δ 3 欠損マウスにおいても、同様の知見が認められる事から、I κ B- ζ 欠損マウスにおけるシェーグレン症候群様の自己免疫疾患の発症要因の 1 つとして、Treg の免疫抑制能の低下が示唆された。

次に、その原因について、Treg の免疫抑制能に關与する共刺激分子(CTLA-4、ICOS および GITR)の発現に着目し、野生型マウス、および、I κ B- ζ 欠損マウス由来の Treg において比較検討を行ったところ、両者に顕著な違いは認められなかった。また、Treg からの抑制性サイトカイン IL-10 の産生能については、I κ B- ζ 欠損マウス由来の Treg において、野生型マウス由来の Treg と同等の発現を示す事が明らかとなった(下图参照:ハウスキーピングゼンである *Gapdh* にて補正。Real Time PCR 法による IL-10 遺伝子発現)

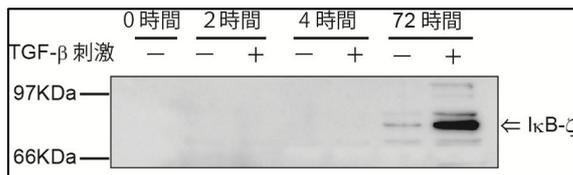


その他、Treg における TGF- β 産生そのものについての比較検討も行ったが、野生型マウスおよび I κ B- ζ 欠損マウス由来の Treg において、顕著な違いは認められなかった。

さらに、野生型および I κ B- ζ 欠損マウス由来の Treg を CFSE (5-(and6)- carboxy

fluorescein diacetate succinimidyl ester)で染色し、細胞分裂と共にマスターレギュレーター-Foxp3 の発現がどのように変化するかについての検討も行った。Treg が、細胞分裂と共に Foxp3 発現を失いやすい場合、安定化が欠如しているとの事が言える。野生型および I κ B- ζ 欠損マウスの Treg は、それぞれ細胞分裂と共に、Foxp3 発現の低下が認められるものの、両者に違いはない事が明らかとなった事から、I κ B- ζ は Treg の安定性の欠如によって、免疫抑制能力を失ったわけではないことが明らかとなった。

(2) TGF- 刺激を介した I κ B- ζ の発現については、Real time PCR 法を用いた結果、刺激していない群と比較し、違いは認められなかった。しかし、Western Blotting 法により、タンパクレベルでの発現を比較すると、TGF- 刺激 4 時間後においては、I κ B- ζ の発現上昇は認められないものの、72 時間では I κ B- ζ の発現上昇が顕著に認められた(下図参照)。



この時、I κ B- ζ の別の Isoform である I κ B- ζ (S)(N 末端の 99 アミノ酸が欠損している内在性の核内 I B 分子)については、その発現を確認する事は出来なかった。

これまで、I κ B- ζ の発現については、mRNA からタンパク質へと翻訳される課程において【転写後制御】と呼ばれる制御が重要であることが報告されており、mRNA の 3'UTR 領域が、この転写後制御を担う重要な役割を果たしている事が報告されている(BBRC 2007 11;3:785-791)。

本研究で、TGF- 刺激を介した I κ B- ζ の発現誘導が明らかになったと共に、T 細胞における I κ B- ζ の発現調整においても、mRNA からタンパク質への転写後制御後が重要な役割を果たしている事が示唆された。

(3) Foxp3 リポーターに対して、I κ B- ζ 単独の過剰発現を行ったところ、Foxp3 リポーター

活性に変動は認められなかった。

これまで、I κ B- ζ 単独においては、標的遺伝子の活性を変動させる機能がないことが報告されている事、また、NF- κ B と複合体を形成し、NF- κ B の標的遺伝子を正または負に制御する事が報告されている事から(*J Biol Chem.* 2005 280:9:7444-7451)、NF- κ B により発現が変動する Foxp3 発現に対しての I κ B- ζ の役割について、検討を行った。Foxp3 遺伝子発現制御領域については、既に NF B の結合サイトが存在する事、また、NF B のサブユニットである p65 が、発現そのものに重要な役割を担う転写制御因子であることが報告されている(*Adv Exp Med Biol.* 2012;946:207-21)。

研究代表者は、NF- κ B のサブユニットである p65 の過剰発現により Foxp3 リポーター活性を上昇させる系を用いた。この時、I κ B- ζ の強制発現を同時に行うと、p65 の過剰発現で上昇した Foxp3 リポーター活性は、著しく低下する事が明らかとなった。また、I κ B- ζ (S)を強制発現した場合でも、同様の結果を得ることが出来た。これまで、Th17 のマスターレギュレーターとして報告されている ROR γ t については、Foxp3 遺伝子発現制御領域に直接結合し、その発現を負に制御する事が知られている事から、I κ B- ζ も同様に、Th17 を正に制御し、Treg の分化誘導を負に制御する転写制御因子である事が示唆された。

以上、I κ B- ζ は Treg の免疫抑制能の獲得には重要な役割を果たすが、Treg の分化誘導については負に制御している事が示唆された。また、Treg の安定性には影響を与えない事が明らかとなってきた(論文投稿中)。

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)
〔学会発表〕(計 3 件)

Maruyama Takashi & Muta Tatsushi.

Control of the differentiation of regulator T cells by the transcriptional regulator I B-

第 42 回 日本免疫学会、2013 年 12 月 13 日、千葉

Maruyama Takashi & Muta Tatsushi.

Critical roles for the transcriptional regulator I B- in regulatory T cells
ICI2013 (15th International Congress of Immunology)、2013年8月25日、イタリア、ミラノ

小林 修平、牟田 達史、丸山 貴司
核内 I B タンパク、I B_{NS} による Th17 産生制御

第 134 年会、2013 年 3 月 30 日、日本薬学会、熊本

6 . 研究組織

(1)研究代表者

丸山 貴司 (MARUYAMA TAKASHI)
東北大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号：10622524

(2)連携研究者

牟田 達史 (MUTA TATSUSHI)
東北大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号：60222337