

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 2 日現在

機関番号：37116
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2014～2016
 課題番号：26461496
 研究課題名(和文) 濾胞性ヘルパーT細胞の多様性と自己免疫病態への関与：SLE新規治療戦略の創出

 研究課題名(英文) Diversity of T follicular helper cells in the pathogenesis of systemic autoimmune diseases

 研究代表者
 中山田 真吾 (Nakayama, Shingo)

 産業医科大学・医学部・講師

 研究者番号：60389426
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：SLE患者末梢血ではTfh/Th1様細胞が増加し、その分化にはIL-12刺激によるSTAT1とSTAT4のリン酸化が必要であった。Tfh/Th1様細胞ではBcl-6遺伝子座にSTAT1およびSTAT4の結合が確認され、抑制型ヒストン修飾を減弱させることで遺伝子発現を誘導した。In vitroで分化誘導したTfh/Th1様細胞におけるSTAT1またはSTAT4のknockdownにより、Tfh/Th1様細胞の表現型が完全に阻害された。以上、SLEではSTAT分子の活性化がヒストン修飾を介した病的Tfh/Th1様細胞の誘導に関与しており、その特異的阻害による治療応用への可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the phenotype of Tfh cells in patients with SLE and epigenetic modifications by STAT family transcription factors. The proportion of CD4+CXCR5+CXCR3+CCR6-CD69+ Tfh-Th1-like cells was increased in SLE patients. In vitro, IL-12 increased differentiation of CD4+CXCR5+CXCR3+Bcl-6+T-bet+IL-21+IFN- γ Tfh-Th1-like cells through phosphorylation of STAT1 and STAT4. The loci of Bcl-6 and T-bet at STAT binding sites in TCR-stimulated CD4+ T cells were marked by bivalent histone modifications. After IL-12 stimulation, both STAT1 and STAT4 directly bound on Bcl-6 and T-bet gene loci accompanied by suppression of trimethylated H3K27me3 repressive histone mark. Knockdown of STAT1 or STAT4 abolished the capacity of CD4+ T cells to differentiate into Tfh-Th1-like cells after IL-12 stimulation. Our observations suggest that IL-12-mediated activation of both STAT1 and STAT4 alters histone modification and may commit the characteristic expansion of Tfh-Th1-like cells in SLE.

研究分野：リウマチ膠原病学

キーワード：濾胞性ヘルパーT細胞 全身性エリテマトーデス インターフェロン インターロイキン エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

(1) 全身性エリテマトーデス (SLE) の病態は、自己反応性 T 細胞と B 細胞との機能連関による自己抗体の過剰産生で特徴付けられる。しかし、その治療はステロイド薬などの非特異的な免疫抑制療法が中心であり、病態に特異的な免疫異常を是正する治療は存在しない。

(2) 濾胞性ヘルパー T (T_{fh}) 細胞は、B 細胞の機能と抗体反応を制御する液性免疫に特化した機能をもつ新規ヘルパー T 細胞である。申請者らは T_{fh} 細胞の分化が他のヘルパー T 細胞サブセットと密接に関連しており、サイトカインをはじめとする細胞外環境により、マスター転写因子でのエピゲノム機構の制御を介して、他のサブセットと相互に形質転換が可能であることを見出してきた (文献 1-5)。今回、申請者らは T_{fh} 細胞の“可塑性”が SLE の複合的な病態と関連すると仮説を立てた。

(3) 本研究では SLE 患者における T_{fh} 細胞の表現型の特徴と T_{fh} への分化偏向を齎す機序をサイトカインシグナルで誘導されるエピゲノム制御機構で解析し、その標的シグナルの阻害によるヘルパー T 細胞の分化異常の修復を軸とした画期的な免疫寛解導入療法の開発への足がかりとすることを目的とした。

2. 研究の目的

(1) SLE 患者末梢血 T_{fh} 細胞のフェノタイプを 8 カラーフローサイトメトリーで同定する。

(2) 健常人から CD4 陽性 T 細胞を抽出して、試験管内で分化培養させて T_{fh} 細胞の分化能を明らかにする。その際、T_{fh} 細胞への分化偏向を齎す細胞内シグナル及び主要転写因子を同定する。さらに、主要転写因子の遺伝子発現領域におけるヒストン修飾評価によりエピゲノム機構を解析する。

(3) (2) を誘導する JAK/STAT ファミリーをはじめとする細胞内シグナルの阻害による T_{fh} 細胞への分化偏向の修復および活性化の制御を試みる。

3. 研究の方法

(1) 健常人、SLE 患者より末梢血を採取し、末梢血リンパ球の細胞表現型を NIH/FOCIS が Human Immunology Project として提唱した抗体セット、及び、ケモカイン受容体抗体を含む独自の抗体セットを用いて 8 カラーフローサイトメトリー (FACSVerse) で解析した。

(2) 次に、ヒト末梢血ナイーブ T 細胞を TCR 架橋と各種サイトカイン (IL-6, IL-12, IL-21, IFN- γ / β など) で分化誘導させ、STAT のリン酸化、転写因子 Bcl-6、T-bet などの発現を検討した。

(3) さらに、T_{fh} 細胞分化のエピゲノム制御を明らかにするため、ヒトヘルパー T 細胞を抽出し、TCR 架橋と IL-12 刺激を行ったうえで T_{fh} 細胞の分化を規定する Bcl-6 遺伝子へプロモータ領域への STAT 蛋白の結合、ヒストン蛋白の修飾をクロマチン免疫沈降法 (ChIP) にて検討した。

(4) 最終的に、in vitro で分化誘導した T_{fh} 細胞を用いて、STAT 分子の knock down による分化と活性化への影響を解析した。

4. 研究成果

(1) 健常人と比較し、SLE 患者の末梢血では活性化 T_{fh}/Th1 (CD4⁺CXCR5⁺CXCR3⁺CCR6⁻CD69⁺) 様細胞の割合が特徴的に増加していた。一方、Th17 細胞や Th1 細胞などの他のヘルパー T 細胞サブセットの割合は変化を認めなかった。

(2) ヒト末梢血ナイーブ T 細胞を TCR 架橋と IL-12 で刺激すると、STAT1 および STAT4 の

リン酸化が亢進することで、CD4⁺CXCR5⁺CXCR3⁺ICOS⁺Bcl-6⁺T-bet⁺IL-21⁺IFN- γ である Tfh/Th1 様の細胞の分化が誘導された。

(3) Tfh/Th1 様細胞の分化には、IFN- γ /STAT1 による IL-12 受容体の誘導による priming phase を経由し、IL-12/STAT1/STAT4 を介した Bcl-6 の転写誘導の effector phase の多段階プロセスで形成されていた。

(4) ChIP 解析では、Tfh/Th1 様細胞における Bcl-6 および T-bet 遺伝子座のプロモータ領域には STAT の結合モチーフが存在し、TCR 架橋と IL-12 刺激によって STAT1 および STAT4 の結合が確認された。

(5) Bcl-6 および T-bet 遺伝子座のプロモータ領域での STAT 結合部位には、促進型 (H3K36me3) および抑制型 (H3K9me3) の双方のヒストン蛋白修飾が認められた。すなわち Tfh 細胞のマスター転写因子である Bcl-6 遺伝子座は bivalent domain 様のヒストン修飾を受けており、ヒト Tfh 細胞に於ける可塑性が示唆された。

(6) Tfh/Th1 様細胞では、IL-12 刺激により STAT1 および STAT4 が Bcl-6 および T-bet の遺伝子座へ直接結合することにより、抑制型ヒストン修飾 (H3K9me3) が減弱する一方で、促進型ヒストン修飾 (H3K36me3) が維持されることにより Bcl-6 および T-bet の遺伝子発現が促進、維持された。

(7) In vitro で分化誘導した Tfh 細胞を用いて、STAT 分子の阻害によるエピゲノム制御を介した Tfh 細胞の異常な細胞表現型の是正を検討した。その結果、STAT1 および STAT4 の knockdown により、Bcl-6、T-bet の発現が抑制されるとともに、CXCR5、ICOS の発現およ

び IL-21 産生が抑制された。

以上、SLE 患者末梢血では可塑性を有する Tfh/Th1 細胞が存在し、その分化には IL-12-STAT1-STAT4 経路を介して分化誘導される事が示唆された。また、Tfh 細胞と Th1 細胞のマスター転写因子である Bcl-6 および T-bet 遺伝子座は bivalent domain 様のヒストン修飾を受けており、ヒト Tfh 細胞に於ける可塑性を支持していた。また、STAT 分子の特異的阻害がエピゲノム制御を介した Tfh 細胞の異常な細胞表現型の是正、及び、活性化分子の発現・機能の抑制をもたらし、SLE 患者における治療標的としての可能性が示唆された。

<引用文献>

1. [Nakayamada S](#), Kanno Y, Takahashi H, Jankovic D, Lu KT, Johnson TA, Sun HW, Vahedi G, Hakim O, Hannon R, Schwartzberg PL, Hager GL, O'Shea JJ. Early Th1 Cell Differentiation Is Marked by a Tfh Cell-like Transition. *Immunity*. 2011; 35: 919-31.
2. [Nakayamada S](#), Takahashi H, Kanno Y, O'Shea JJ. Helper T cell diversity and plasticity. *Curr Opin Immunol*. 2012; 24:297-302.
3. Vahedi G, Takahashi H, [Nakayamada S](#), Sun HW, Sartorelli V, Kanno Y, O'Shea JJ. STATs Shape the Active Enhancer Landscape of T Cell Populations. *Cell*. 2012; 151: 981-993.
4. Takahashi H, Kanno T, [Nakayamada S](#), Hirahara K, Sciumè G, Muljo SA, Kuchen S, Casellas R, Wei L, Kanno Y, O'Shea JJ. TGF-beta and retinoic acid induce miR-10a which targets Bcl-6 and constrains helper T cell plasticity. *Nat Immunol*. 2012; 13:587-95.
5. Hakim O, Myong-Hee Sung MH, [Nakayamada](#)

S, Voss TC, Baek S, Hager GL. Spatial Congregation of STAT Binding Directs Selective Nuclear Architecture During T Cell Functional Differentiation. Genome Res. 2013; 23: 462-472.

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 7 件)

中山田 真吾、田中 良哉、全身性エリテマトーデスにおける免疫異常のオーバービュー、炎症と免疫、査読無、25 巻、2017、pp.120-124

中山田 真吾、田中 良哉、Tfh 細胞の病的意義、最新医学、査読無、71 巻、2016、pp.2314-2319

中山田 真吾、田中 良哉、濾胞性ヘルパー-T 細胞、炎症と免疫、査読無、24 巻、2016、pp.470-476

中山田 真吾、久保 智史、田中 良哉、自己免疫疾患におけるリンパ球サブセット解析の新展開、リウマチ科、査読無、56 巻、2016、pp.317-323

中山田 真吾、田中 良哉、自己免疫疾患における濾胞性ヘルパー-T (Tfh)細胞、日本臨床免疫学会会誌、査読無、39 巻、2016、pp.1-7

中山田 真吾、田中 良哉、ヒトヘルパー-T 細胞サブセットの多様性と病態における役割、医学のあゆみ、査読無、252 巻、2015、pp.55-60

中山田 真吾、田中 良哉、濾胞性ヘルパー-T (Tfh)細胞と自己免疫疾患、九州リウマチ、査読無、34 巻、2014、pp.12-16

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

中山田 真吾、田中 良哉、最新医学社、最新医学別冊 診断と治療の ABC 118 「全身性エリテマトーデス」分担執筆、第 4 章 管理・治療：治療薬剤 (3) 生物学的製剤、2016、254 (167-175)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中山田 真吾 (NAKAYAMADA, Shingo)

産業医科大学・医学部・講師
研究者番号：60389426

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者

馬 暁雪 (MA, Gyosetsu)

久保 智史 (KUBO, Satoshi)

山形 薫 (YAMAGATA, Kaoru)