

AP1転写因子JunBによるTh17細胞の病原性の制御

石川 裕規

1. はじめに

免疫システムは状況に応じてさまざまな免疫反応を誘導することにより、異なる感染戦略を持つ多岐にわたる病原体に対する生体防御として機能する。また、一部の免疫反応はアレルギーおよび自己免疫疾患といった生体にとって望ましくない結果をもたらす。多様な免疫細胞をコントロールし免疫反応の方向性を決める司令塔として働くのが、CD4陽性Tヘルパー細胞である¹⁾。この細胞には複数の亜集団が存在し、それぞれが特定の免疫反応を制御する。たとえば、サイトカインinterleukin-17 (IL-17)の発現を特徴とするT helper 17 (Th17)細胞は腸に多く存在し、細菌および真菌に対する生体防御を担うだけでなく腸の恒常性の維持にも関わる²⁻⁴⁾。また、Th17細胞は自己免疫疾患の誘導という生体にとって望ましくない機能も持つ⁵⁾。これらのTh17細胞の機能的多様性は、病原性の有無で区別されるTh17細胞の異なる亜集団と関連することが最近の研究で明らかになってきている⁶⁾。炎症誘導能の低い非病原性Th17細胞と炎症誘導能の高い病原性Th17細胞はともに、系列決定転写因子であるROR γ tおよびその誘導に関わる転写因子STAT3, IRF4, BATFによって分化誘導される⁷⁻¹⁰⁾。しかしながら、これまでTh17細胞の病原性に関連する転写メカニズムについての理解は十分ではない。筆者らはAP-1転写因子の一つJunBがTh17細胞の病原性に深く関わることを最近報告している¹¹⁾。本稿では、我々のデータを中心にTh17細胞の病原性に関わる転写メカニズムを紹介する。

2. Th17細胞の分化

ナイーブ（特異的に反応する抗原に出会ったことがない）CD4陽性T細胞は、抗原刺激を受けると、その際に存

在するサイトカインの影響によって、特定のCD4陽性Tヘルパー細胞へと分化する。本稿で焦点を当てるTh17細胞については、二つの異なるサイトカインの組み合わせによって*in vitro*においてその分化を誘導できる¹²⁻¹⁴⁾。すなわち、TGF- β とIL-6がある状況〔Th17(β)細胞誘導状況〕もしくは、IL-6, IL-1 β とIL-23がある状況〔Th17(23)細胞誘導状況〕のいずれにおいても、活性化CD4陽性T細胞はTh17細胞のマーカー遺伝子〔IL-17A, IL-17F, IL-23受容体(IL-23R)〕などを発現する。*in vitro*で誘導したTh17(23)細胞を移入したマウスでは強い脳脊髄炎が起こるのに対して、Th17(β)細胞の移入マウスのほとんどは病態を示さず、一部のマウスが軽度の脳脊髄炎を示すだけである¹⁴⁾。このように、Th17(23)細胞は病原性がきわめて高いが、Th17(β)はほとんど病原性を示さない。また、Th17(β)細胞ではTh17(23)細胞に比べて抗炎症性サイトカインIL-10の高い発現がみられ、Th17(β)の非病原性と関連すると考えられている¹⁴⁾。さらに、成熟した非病原性Th17(β)細胞にIL-23の刺激を加えたのちにマウスに移入すると脳脊髄炎が起こることも、IL-23がTh17細胞の病原性の誘導に重要であることを示唆している^{6, 14)}。実際に、ヒトのIL-23変異は自己免疫疾患に関連することが報告されている⁵⁾。

3. Th17細胞の分化を制御する転写メカニズム

Th17(β)細胞とTh17(23)細胞の分化はいずれもTh17細胞の系列決定転写因子であるROR γ tの機能に依存する⁷⁾。ナイーブCD4陽性T細胞はROR γ tをほとんど発現していないが、Th17細胞誘導状況において活性化した細胞ではROR γ tの発現が誘導される。このROR γ t発現の誘導には、少なくとも三つの転写因子BATF, IRF4およびSTAT3が必要である。また、これらの転写因子はROR γ tと協調することで、Th17細胞分化の過程で多くの遺伝子の発現を制御する。このように、Th17(β)細胞とTh17(23)細胞の分化においては、BATF, IRF4, STAT3, ROR γ tからなる共通の転写メカニズムが用いられる。しかしながら、両細胞の異なる病原性に関連する転写メカニズムはあまりわかっていない。

4. IL-23シグナルに関与する転写因子の同定

上述のようにIL-23サイトカインはTh17細胞の病原性を

沖縄科学技術大学院大学 (〒904-0495 沖縄県国頭郡恩納村字谷茶1919-1)

The AP1 transcription factor JunB regulates pathogenicity of Th17 cells

Hiroki Ishikawa (Okinawa Institute of Science and Technology Graduate School, 1919-1 Tancha, Onna-son, Okinawa 904-0495, Japan)

本論文の図版はモノクロ(冊子版)およびカラー(電子版)で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900230

© 2018 公益社団法人日本生化学会

高める。これに関わる転写メカニズムを理解するために、筆者らはRNAiによる機能スクリーニングを行った。すなわち、Th17細胞に発現する263個の転写因子のそれぞれをRNAiにより発現抑制し、IL-23シグナルに与える影響を調べた。IL-23はTh17細胞において*Enpp2*発現を著しく促進することから、*Enpp2*の発現をIL-23シグナル評価の指標として用いた。その結果、AP1転写因子の一つであるJunBの発現抑制によってIL-23による*Enpp2*発現促進が顕著に減少することが示された。一方、Th17細胞の分化にAP1転写因子に属するBATFが必須であることが報告されている。さらに、このBATFがJunBと相互作用することも示されている。これらのデータは、JunBがTh17細胞の分化に関わることを示唆している。

5. JunBは病原性Th17細胞の誘導に必要である

JunBのTh17細胞分化における機能を明らかにするために、T細胞特異的JunB欠損(JunB TKO: CD4^{cre}JunB^{fl/fl})マウスを作製した。JunB TKOマウスは正常に発育し、その脾臓およびリンパ節においては成熟CD4陽性T細胞が野生型マウスと同様に認められた。

小腸の粘膜固有層には、多数のTh17細胞が常時存在する³⁾。JunB TKOマウスの小腸粘膜固有層の細胞をFACSで解析したところ、野生型マウスと同程度のCD4陽性IL-17陽性のTh17細胞が認められた。同様に、定常状態の脾臓、リンパ節にあるTh17細胞の数もJunB欠損の影響を受けなかった。これらの結果は、定常状態における非病原性Th17細胞の分化はJunBに依存しないことを示唆している。

次に、自己免疫反応を起こす病原性Th17細胞の分化におけるJunBの機能を調べた。ここでは、多発性硬化症のマウスモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE)モデルを用いた。JunB TKOマウスおよび野生型マウスに、ミエリンタンパク質ペプチドを免疫した。その結果、野生型マウスは麻痺を伴うEAEを発症したのに対して、JunB TKOマウスは完全に病気に耐性であった。また、野生型マウスの脳、脊髄には多数のCD4陽性T細胞が浸潤していたのに対して、JunB TKOマウスではそのような現象はまったくみられなかった。さらに、JunB TKOマウスでは、野生型マウスでみられた脾臓、リンパ節におけるCD4陽性IL-17A陽性のTh17細胞の増加が認められなかった。これらの結果は、自己免疫疾患の誘導に関わる病原性Th17細胞の産生のためにJunBが重要であることを示唆している。

Th17細胞は、Th1細胞を含む他のTヘルパー細胞亜集団へと変化する可塑性を持ち、この可塑性がTh17細胞の病原性に関連することが示唆されている¹⁵⁾。Th17細胞の安

定性および可塑性におけるJunBの機能を調べるために、JunB欠損Th17-fate-mapping (Il17^{Cre}R26R^{EYFP}JunB^{fl/fl})マウスを用いた。このマウスでは、一度IL-17プロモーターが活性化する(Th17細胞に分化する)と恒常的なEYFP(enhanced yellow fluorescent protein)発現とJunB欠損が誘導されるため、Th17の安定性および可塑性におけるJunBの機能の評価にこのモデルを利用できる。JunB欠損Th17-fate-mappingマウスにEAEを誘導した結果、JunB欠損はTh17細胞のIL-17発現維持には影響を与えなかったが、Th17細胞に由来するIFN γ 発現細胞の割合が著しく減少した。このことは、JunB TKOマウスでTh17細胞の産生が損なわれた原因は、Th17細胞の安定性が低下したためではないことを示す。また、この結果はJunBがTh17細胞のTh1細胞へと変化する可塑性に関わることも示唆している。

6. Th17細胞におけるJunBの発現誘導

JunBのTh17細胞分化における機能をより深く理解するために、Th17細胞*in vitro*誘導モデルを用いた。ナイーブCD4陽性T細胞に抗CD3抗体および抗CD28抗体の刺激を加え、TGF β とIL-6存在下で培養すると非病原性Th17(β)細胞に、一方、IL-1 β 、IL-6とIL-23の存在下で培養すると病原性Th17(23)細胞が誘導される¹⁴⁾。Th17(β)細胞とTh17(23)細胞におけるJunBの発現を調べた結果、いずれのTh17細胞においてもJunBの高い発現がみられた。また、JunBの発現はIL-6単独の刺激のみで誘導され、TGF- β 、IL-1 β およびIL-23の刺激はその発現誘導にほとんど影響を与えないことも示された。さらに、IL-6のシグナルで重要な役割を果たす転写因子STAT3を欠損したCD4陽性T細胞では、IL-6によるJunBの発現誘導が強く抑制された。これらの結果は、Th17細胞分化において、IL-6とSTAT3に依存する経路でJunBの発現が誘導されることを示している。

7. JunBによるTh17細胞分化制御

JunBによるTh17細胞分化制御機構を明らかにするために、JunB欠損および野生型ナイーブCD4陽性T細胞をTh17(β)誘導状況およびTh17(23)誘導状況で培養し、3日後のIL-17AとROR γ tの発現をFACSにより調べた。その結果、JunB欠損細胞におけるIL-17Aの発現は、Th17(23)細胞誘導状況では激しく減少したが、Th17(β)細胞誘導状況では軽度の減少にとどまった。また、JunB欠損細胞におけるROR γ tの発現は、Th17(23)細胞誘導状況では著しく減少していたが、Th17(β)細胞誘導状況では正常であった。同様の傾向は、RT-qPCRによってIL-17AとROR γ tのmRNA発現を調べた際にも確認された。これらの結果は、

非病原性Th17(β)細胞ではなく、病原性Th17(23)細胞の分化はJunBを必要とすることを示唆している。

IL-23はTh17(β)細胞の安定性および病原性を高めることが報告されている⁵⁾。上述のようにJunB欠損細胞はTh17(β)細胞誘導条件では多くの細胞がIL-17Aを発現する。そこで、このIL-17A発現細胞をFACSにより選別し、IL-23を加えて培養し、Th17(β)細胞に対するIL-23の効果を評価した。その結果、過去の報告と同様に、IL-23は野生型Th17(β)のIL-17A発現を促進したが、JunB欠損Th17(β)細胞ではそのような効果はみられなかった。この結果は、JunBがIL-23によるTh17(β)細胞の安定化にも関わることを示唆する。

8. Th17細胞におけるJunBによる遺伝子発現制御

Th17細胞分化におけるJunBによる遺伝子発現制御機構を明らかにするために、JunB欠損がTh17(β)細胞およびTh17(23)細胞の遺伝子発現に与える影響をマイクロアレイ法により網羅的に調べた。Th17(β)細胞誘導状況とTh17(23)細胞誘導状況においてJunB欠損が異なる影響を与えた遺伝子群に注目したところ、たった11個の遺伝子の発現がTh17(23)細胞誘導状況においてのみJunBを必要とすることが明らかになった。しかも、そのほとんどは*Il17a*, *Il17f*, *Rorc* (ROR γ tをコードする), *Il23r*などのTh17細胞の機能に重要であることが知られている遺伝子であった。この結果は、病原性Th17細胞においてJunBがTh17細胞の機能的な重要遺伝子の発現のために必須な役割を果たすことを示唆している。

JunBによる転写制御機構をより理解するために、Th17(β)細胞およびTh17(23)細胞におけるJunBとTh17細胞分化制御転写因子(BATF, IRF4, STAT3)のクロマチン免疫沈降(ChIP)シーケンズ解析を行った。その結果、*Rorc*, *Il17a*, *Il23r*を含む多数のTh17細胞の重要遺伝子領域において、JunBはBATF, IRF4, STAT3とともにDNAに結合していることが明らかになった。

最後に、JunB欠損がBATF, IRF4およびSTAT3のDNA結合に与える影響をChIP-PCRによって調べた。その結果、BATF, IRF4, STAT3の*Rorc*遺伝子領域への結合は、Th17(β)細胞においてはJunBの欠損の影響を受けなかったが、Th17(23)細胞ではJunBの欠損によって著しく損なわれた。これらの結果は、病原性Th17細胞において、JunBがBATF, IRF4, STAT3による*Rorc*遺伝子発現制御を促進することを示している。

9. おわりに

筆者らの結果は、IL-23に依存する病原性Th17細胞の産

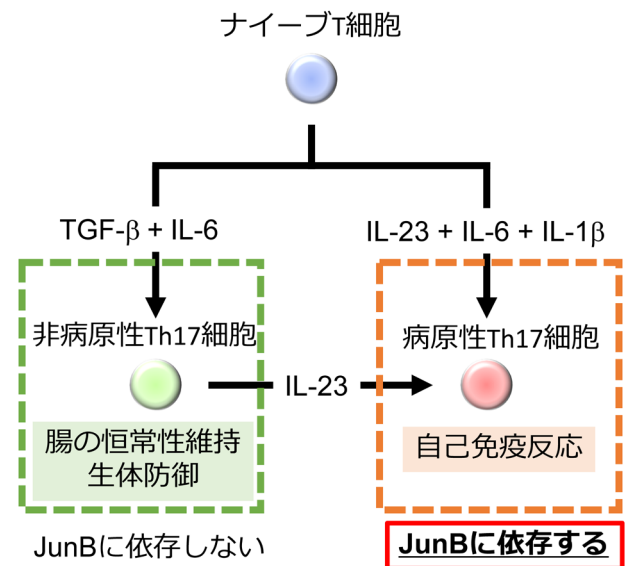


図1 JunBは病原性Th17細胞の誘導に必要である
炎症誘導能力の低い非病原性Th17細胞は腸の恒常性維持および生体防御に関わる。一方、ひどい炎症を導く病原性Th17細胞は自己免疫疾患の原因となる。IL-23によって誘導される悪性の病原性Th17細胞の分化にはJunBが必要不可欠である。一方、TGF- β によって誘導される良性的非病原性Th17細胞の分化はJunBに依存しない。

生にはJunBがきわめて重要であるが、TGF- β に依存する非病原性Th17細胞の産生はJunBに依存しないことを示している(図1)。このような表現型は、IL-23経路不全マウスの表現型と同様のものであり、JunBがIL-23による病原性Th17細胞の誘導に重要であることを示唆している。また我々の結果は、TGF- β 存在下ではJunBに依存しない経路によってROR γ t発現が誘導されることも示唆している。このメカニズムについてはいまだ不明であるが、JunBとは異なるAPI転写因子が代替的な機能を果たす可能性がある。

IL-23シグナル不全マウスの解析は、自己免疫疾患には慢性的な病原性Th17細胞活性が深く関わるのに対して、カンジダなどの菌に対する感染防御には病原性Th17細胞の一過的な誘導が重要であることを示唆している^{1,2,5)}。今回発見した病原性Th17細胞に特異的なJunBの機能を合理的に制御することにより、自己免疫反応を抑制し、かつ生体に望ましいTh17細胞の機能は損なわない新たな治療戦略の開発につながるかもしれない。

文 献

- 1) Zhu, J., Yamane, H., & Paul, W.E. (2010) *Annu. Rev. Immunol.*, **28**, 445-489.
- 2) Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., & Kuchroo, V.K. (2009) *Annu. Rev. Immunol.*, **27**, 485-517.

- 3) Honda, K. & Littman, D.R. (2016) *Nature*, **535**, 75–84.
- 4) Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K., & Littman, D.R. (2009) *Cell*, **139**, 485–498.
- 5) Patel, D.D. & Kuchroo, V.K. (2015) *Immunity*, **43**, 1040–1051.
- 6) Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.P., Hirahara, K., & O’Shea, J.J. (2011) *Trends Immunol.*, **32**, 395–401.
- 7) Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., & Littman, D.R. (2006) *Cell*, **126**, 1121–1133.
- 8) Ciofani, M., Madar, A., Galan, C., Sellars, M., Mace, K., Pauli, F., Agarwal, A., Huang, W., Parkhurst, C.N., Muratet, M., Newberry, K.M., Meadows, S., Greenfield, A., Yang, Y., Jain, P., Kirigin, F.K., Birchmeier, C., Wagner, E.F., Murphy, K.M., Myers, R.M., Bonneau, R., & Littman, D.R. (2012) *Cell*, **151**, 289–303.
- 9) Yosef, N., Shalek, A.K., Gaublot, J.T., Jin, H., Lee, Y., Awasthi, A., Wu, C., Karwacz, K., Xiao, S., Jorgolli, M., Gennert, D., Satija, R., Shakya, A., Lu, D.Y., Trombetta, J.J., Pillai, M.R., Ratcliffe, P.J., Coleman, M.L., Bix, M., Tantin, D., Park, H., Kuchroo, V.K., & Regev, A. (2013) *Nature*, **496**, 461–468.
- 10) Li, P., Spolski, R., Liao, W., Wang, L., Murphy, T.L., Murphy, K.M., & Leonard, W.J. (2012) *Nature*, **490**, 543–546.
- 11) Hasan, Z., Koizumi, S.I., Sasaki, D., Yamada, H., Arakaki, N., Fujihara, Y., Okitsu, S., Shirahata, H., & Ishikawa, H. (2017) *Nat. Commun.*, **8**, 15628.
- 12) Mangan, P.R., Harrington, L.E., O’Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., & Weaver, C.T. (2006) *Nature*, **441**, 231–234.
- 13) Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., & Stockinger, B. (2006) *Immunity*, **24**, 179–189.
- 14) Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.P., Tato, C.M., McGeachy, M.J., Konkel, J.E., Ramos, H.L., Wei, L., Davidson, T.S., Bouladoux, N., Grainger, J.R., Chen, Q., Kanno, Y., Watford, W.T., Sun, H.W., Eberl, G., Shevach, E.M., Belkaid, Y., Cua, D.J., Chen, W., & O’Shea, J.J. (2010) *Nature*, **467**, 967–971.
- 15) Hirota, K., Duarte, J.H., Veldhoen, M., Hornsby, E., Li, Y., Cua, D.J., Ahlfors, H., Wilhelm, C., Tolaini, M., Menzel, U., Garafalaki, A., Potocnik, A.J., & Stockinger, B. (2011) *Nat. Immunol.*, **12**, 255–263.

著者寸描

●石川 裕規 (いしかわ ひろき)

沖縄科学技術大学院大学免疫シグナルユニット准教授。博士(農学)。

■略歴 2006年名古屋大学大学院生命農学研究科博士課程修了, 06年マイアミ大学ポスドク, 09年東北大学薬学部ポスドク, 12年より現職。

■研究テーマと抱負 免疫細胞の多様性を生み出すメカニズムに興味を持っています。免疫システムにおいて重要な機能を果たす免疫細胞の亜集団を同定し, その分化メカニズムを明らかにしていきたいです。

■ウェブサイト <https://groups.oist.jp/ja/isu>

■趣味 ジョギング。