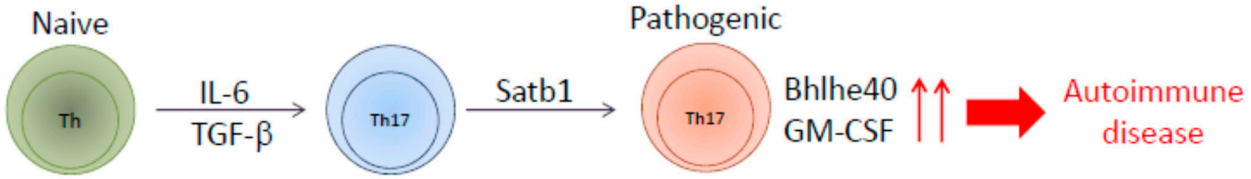
| 60　Th17細胞の転写制御機構の解明 | 廣田　圭司 |
|---|---|

**【目的】**Th17 細胞のエフェクターサイトカイン産生の制御機構の解明は、治療法の確立されていない感染症や自己免疫病に対する新規治療法開発に繋がる重要な医学研究課題である。本研究では、炎症性 Th17 細胞における Satb1 による転写制御機構と Pathogenic Th17 細胞誘導の分子基盤の解明を目指した。

**【方法】**CD4$^{+}$T 細胞条件的 Satb1 欠損（*Thpok*$^{Cre}$ *Satb1*$^{flox}$）マウス、Th17 細胞分化後特異的に Satb1 遺伝子が欠損する Th17 細胞条件的 Satb1 欠損レポーター（*IL-17*$^{Cre}$ *Satb1*$^{flox}$ *R26R*$^{eYFP}$）マウスを用いて、Satb1 による Th17 細胞特異的な転写・機能制御機構を解析した。各組織の T 細胞分画の FACS 解析、FACS ソートをおこない、細胞フェノタイプと遺伝子発現解析をおこなった。Experimental autoimmune encephalomyelitis を誘導し、Pathogenic Th17 細胞の機能解析、疾患惹起能を評価した。

**【結果】**Satb1 は T 細胞初期分化に必須の因子であるが、Th17 細胞の初期分化および生存・組織遊走に必要な因子ではなかった。Satb1 による Th17 細胞の制御機構は生体内の微小環境の影響を大きく受け、炎症環境下においては Satb1 によって GM-CSF 発現を上昇させた。さらに、Pathogenic Th17 細胞の機能発揮のためには、Satb1 が Bhlhe40 発現を上昇させ、その結果、疾患惹起能を強めた。

Satb1 による Pathogenic Th17 細胞の機能制御機構



# 60. Th17 細胞の転写制御機構の解明

廣田　圭司

京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 統合生体プロセス分野

Key words : Th17, Satb1, Autoimmune disease

## 緒　言

Th17 細胞は、細胞外細菌及び真菌に対する生体防御に重要な T ヘルパーサブセットであり、Th17 細胞分化の鍵となる転写因子 STAT3 変異を持つ患者は黄色ブドウ球菌とカンジダに対し易感染性を示す［1]。一方、Th17 細胞は、様々な自己免疫病の病態形成に関与することが強く示唆されている。最近、Th17 細胞のエフェクターサイトカインである IL-17 の作用をブロックする生物学的製剤の登場により、重度の乾癬患者に対して従来の薬と比較して劇的な治療効果が報告された［2]。従って、Th17 細胞のエフェクターサイトカイン産生の制御機構の解明は、治療法の確立されていない感染症や自己免疫病に対する新規治療法開発に繋がる重要な医学研究課題である。本研究では、炎症性 Th17 細胞における Satb1 による転写制御機構を明らかにするため Th17 細胞分化後特異的に Satb1 遺伝子が欠損する Th17 細胞条件的 Satb1 欠損レポーターマウスを用いて、Satb1 による Th17 細胞特異的な転写・機能制御機構を解析した。Satb1 は、血球細胞の初期分化のみならず T 細胞の胸腺分化段階で必須の転写因子である。しかし、試験管内・生体内における Th17 細胞の分化および機能は Satb1 の欠損によって影響は受けず、Th17 細胞は正常な組織分布を示した。一方、炎症反応下においては、Satb1 の欠損により Pathogenic Th17 細胞の機能が低下し、自己免疫疾患の発症・重症度が抑制された。これらの結果から、Satb1 による Th17 細胞の制御機構は、生体内の微小環境の影響を大きく受け、炎症環境下においてはエフェクターサイトカインを制御することが明らかとなった。したがって、炎症性 Th17 細胞の Satb1 を標的とすることにより、新しい免疫療法の開発が期待できる。

## 方法および結果

### 1. 生理的な環境下における Th17 細胞分化に Satb1 は必要でない

Th17 細胞の Satb1 の発現レベルを調べるため、胸腺細胞（$CD4^+$ $CD8^+$, CD4SP, CD8SP)、末梢リンパ組織の T 細胞（$CD8^+$ T, $CD25^-CD44^{low}$ $CD4^+$ T, $CD25^{high}$ $CD4^+$ T, $CD25^-$ $CD44^{high}$ $CD4^+$ T)、パイエル板 Th17 細胞（PPs Th17）を FACS ソートし、Satb1 の発現レベルを定量的 PCR 法を用いて解析した。これまでの報告と一致して、胸腺 $CD4^+$ $CD8^+$ 細胞の Satb1 発現レベルは高く、末梢 T 細胞と Th17 細胞の Satb1 の発現レベルは低下していた（図 1a)。次に、生体内における Th17 細胞分化の Satb1 の影響を調べるため、Satb1 欠損条件下でリンパ節およびパイエル板の Th17 細胞の比率を FACS 解析した（図 1b)。また、ナイーブ $CD4^+$ T 細胞を *RAG2*$^{-/-}$マウスに移入後におこる Homeostatic proliferation により誘導される IFN-γ産生 Th1 細胞、IL-17 産生 Th17 細胞の分化能を FACS 解析した。Th1 細胞、Th17 細胞ともに正常な機能を示しており、生理的な条件下において、Satb1 は Th17 細胞の分化に影響しなかった。

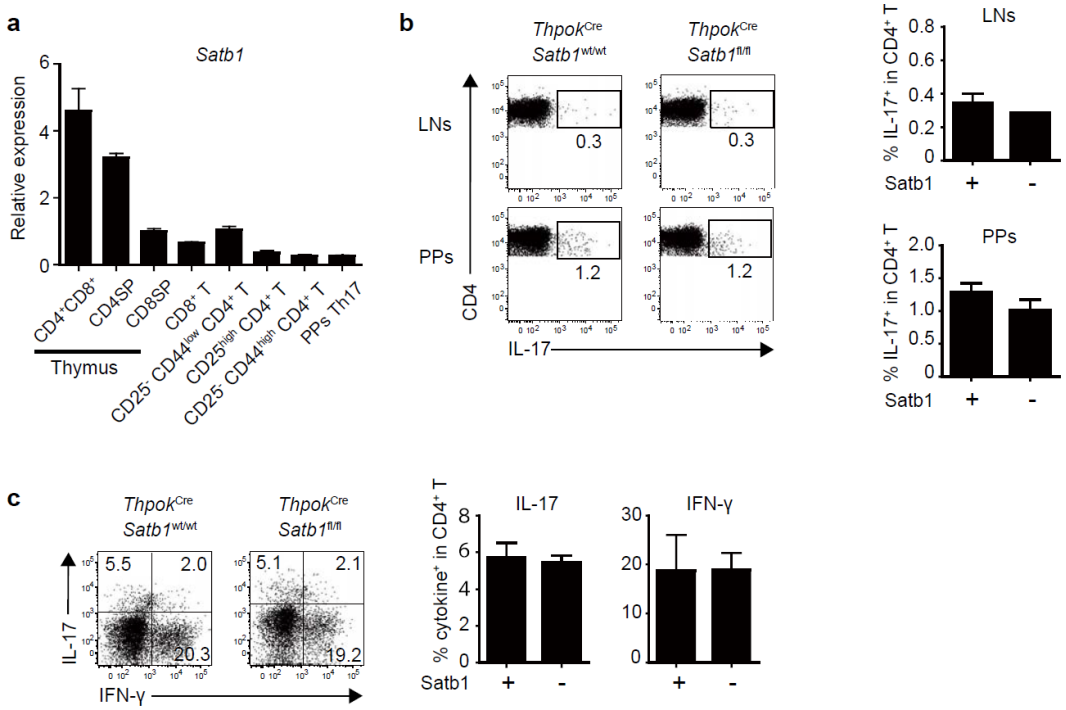



図 1. Satb1 欠損 $CD4^+$ T 細胞の Th17 細胞への正常分化

a）胸腺、末梢リンパ組織から分画した T 細胞の Satb1 発現レベル

b）Satb1 欠損マウスのリンパ節（LNs）、パイエル板（PPs）における IL-17 産生 Th17 細胞の割合

c）Satb1 欠損ナイーブ $CD4^+$ T 細胞を *RAG2*$^{-/-}$マウスに移入後の IL-17、IFN-γ産生 $CD4^+$ T 細胞の割合

**2. Paghogenic Th17 細胞の機能発現には Satb1 が必要である**

次に、自己免疫疾患を惹起する Pathogenic Th17 細胞の分化と機能を評価するため、Th17 細胞分化後特異的に Satb1 遺伝子が欠損する Th17 細胞条件的 Satb1 欠損レポーター（*Satb1*$^{Th17KO}$）マウスを用いて、Th17 依存的自己免疫疾患モデルである Experimental autoimmune encephalomyelitis（EAE）を誘導した。*Satb1*$^{Th17KO}$マウスは、EAE の発症頻度・重症度ともに統計的に有意に低く、Satb1 が Pathogenic Th17 細胞の機能制御に重要であることが示唆された（図 2a）。*Satb1*$^{Th17KO}$と control マウス間でのリンパ節および脊髄組織中 Th17 細胞の分化・増殖能に差異は認められないことから、図 1 の結果と一致して、Satb1 が炎症組織中 Th17 細胞分化、遊走、増殖能には影響を及ぼさないことが示唆された（図 2b、図 2c）。Th17 細胞の産生するエフェクターサイトカインを評価すると、Satb1 欠損 Th17 細胞では IL-2、IL-10、IL-17、IFN-γ産生に変化は認められなかったが、GM-CSF 産生が有意に低下した（図 2d）。GM-CSF は Th17 細胞の Pathogenic サイトカインの一つとして知られており［3〜4］、EAE の発症・重症化に関わる炎症性サイトカインである。これらの自己免疫疾患モデルマウスの解析から、Satb1 は Pathogenic Th17 細胞が産生する GM-CSF 産生を特異的に制御し、組織炎症に関わる分子であることを明らかにした。

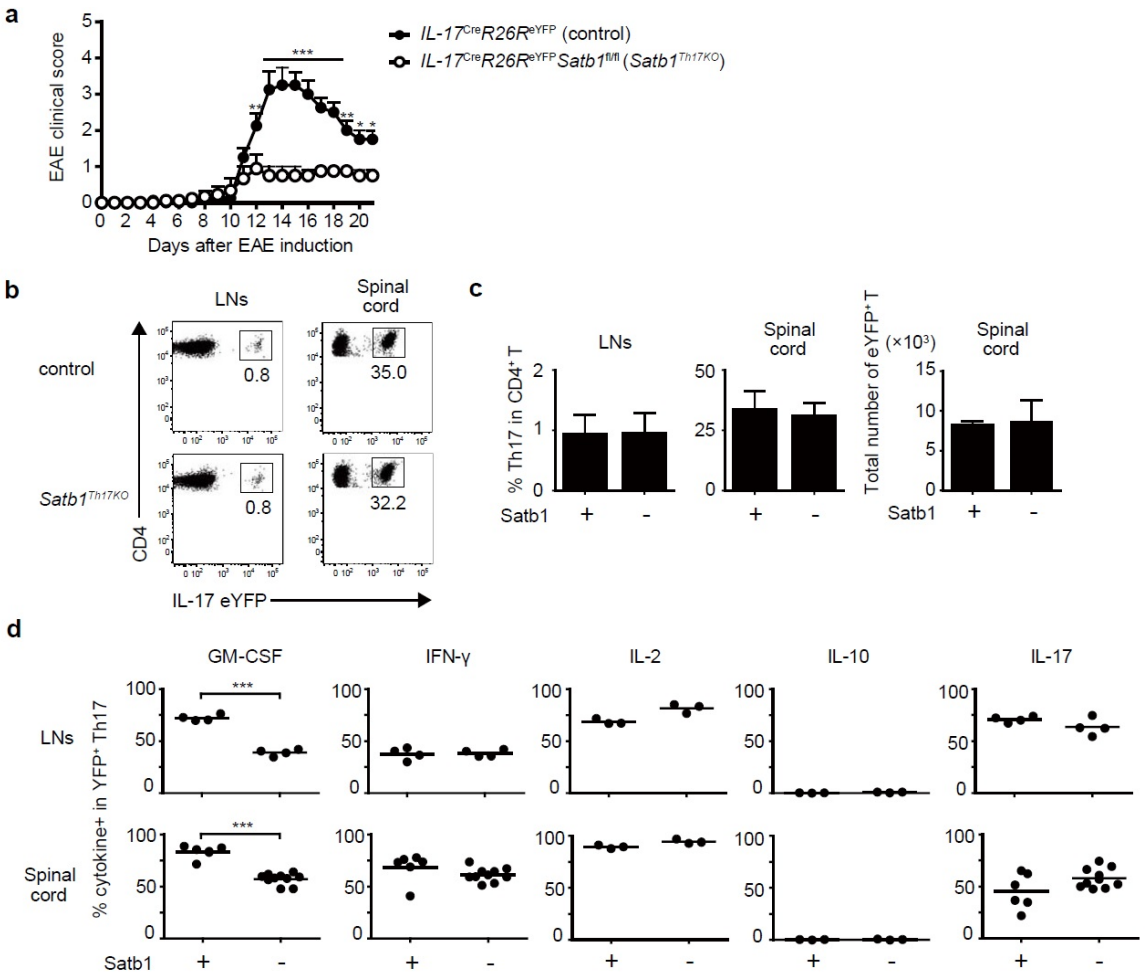



図 2. Satb1 は Pathogenic Th17 細胞の機能に重要である

a）Experimental autoimmune encephalomyelitis（EAE）を誘導した *Satb1*$^{Th17KO}$（*IL-17*$^{Cre}$ *R26R*$^{eYFP}$ *Satb1*$^{fl/fl}$）および control（*IL-17*$^{Cre}$ *R26R*$^{eYFP}$）マウスの重症度スコア

b）EAE 誘導後のリンパ節、脊髄の eYFP$^{+}$ Th17 細胞の割合

c）EAE 誘導後のリンパ節、脊髄の eYFP$^{+}$ Th17 細胞の割合および脊髄中の eYFP$^{+}$ Th17 細胞数

d）EAE 誘導後のリンパ節、脊髄の eYFP$^{+}$ Th17 細胞のサイトカイン産生プロファイル、*** $P < 0.01$（Two-way ANOVA）

### 3. Satb1 は Bhlhe40 発現をコントロールすることで Th17 細胞のエフェクター機能を調節する

Satb1 による Pathogenic Th17 細胞の制御機構を解明するため、Satb1 欠損 Th17 細胞と正常型 Th17 細胞の遺伝子発現プロファイル解析をおこなった。結果、転写因子 Bhlhe40 が Satb1 欠損 Th17 細胞で低下していることを見いだした。末梢ナイーブ T 細胞、エフェクターT 細胞、パイエル板 Th17 細胞、EAE 誘導後リンパ節 Th17 細胞の *Bhlhe40* 発現レベルを解析したところ、EAE 誘導後の Pathogenic Th17 細胞で有意な発現上昇が認められた（図 3a）。次に、Pathogenic Th17 細胞内における Satb1-Bhlhe40 軸が EAE 惹起能と GM-CSF 産生に関わるかどうかを評価するため、Satb1 欠損 T 細胞にレトロウイルスベクターを用いて *Bhlhe40* を遺伝子導入し、EAE を誘導した。*Bhlhe40* 遺伝子導入により、T 細胞内での有意な *Bhlhe40* 発現上昇が得られた（図 3b）。次に、control と *Satb1*$^{Th17KO}$マウスの T 細胞に *Bhlhe40* 遺伝子を導入後 *RAG2*$^{-/-}$マウスに養子移入し、EAE を惹起した（図 3c）。*Bhlhe40* 遺伝子導入により Satb1 欠損 Th17 細胞の GM-CSF 産生能、疾患惹起能が回復したことから、Satb1 は Bhlhe40 の発現制御を介して Pathogenic Th17 細胞の機能を制御することが分かった。

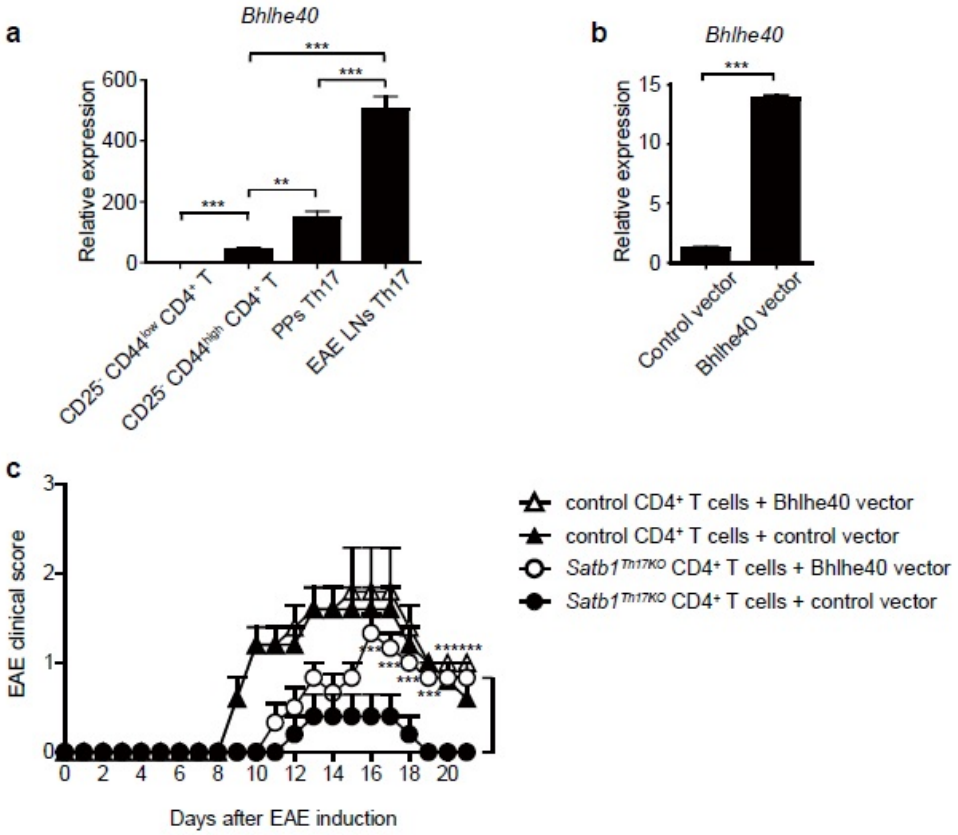



図 3. *Bhlhe40* 遺伝子導入により Satb1 欠損 Th17 細胞の疾患惹起能が回復する

a) FACS ソートした T 細胞分画の *Bhlhe40* 発現レベルを定量的 PCR により解析した

b) Satb1 欠損 $CD25^{-}$ $CD44^{low}$ $CD4^{+}$ T 細胞にレトロウイルスベクターを用いて *Bhlhe40* を強制発現させた後、*Bhlhe40* の発現レベルを定量的 PCR により解析した

c) *Bhlhe40* 遺伝子導入した control および $Satb1^{Th17KO}$ T 細胞を $RAG2^{-/-}$ マウスに養子移入し、その 2 週間後に EAE を誘導した。*** $P < 0.01$（a, b, Student's t-test ; c, Two-way ANOVA）

## 考　察

Satb1 による Th17 細胞の制御機構は、生体内の微小環境の影響を大きく受け、炎症環境下においては特異的なエフェクターサイトカインを制御することが明らかとなった。Satb1 は T 細胞初期分化に必須の因子であるが、Th17 細胞の初期分化および生存・組織遊走には必要ではない。一方、Pathogenic Th17 細胞の機能発揮のためには、Satb1 が Bhlhe40 発現を上昇させ、その結果、疾患惹起能を強める（図 4）。これらの結果は、non-Pathogenic Th17 細胞の分化・機能には Satb1 の関与が低いことを示唆しており、全身的な Satb1 の阻害をおこなった場合、生理的な Th17 細胞への影響は限定的であると考えられる。したがって、炎症性 Th17 細胞の Satb1 を標的とすることにより、Th17 細胞が関わる自己免疫疾患に対する新しい免疫療法の開発が期待できる。

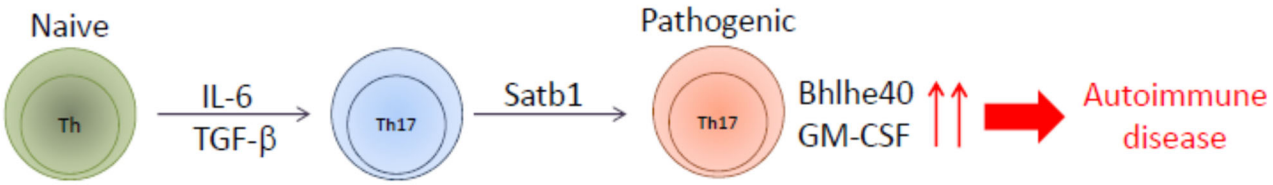



図 4. Satb1 による Pathogenic Th17 細胞の機能制御機構

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、大阪大学免疫学フロンティア研究センターの坂口志文教授、京都大学ウイルス・再生医科学研究所の近藤玄教授である。

## 文　献

1) Minegishi Y, Saito M, Tsuchiya S, Tsuge I, Takada H, Hara T, Kawamura N, Ariga T, Pasic S, Stojkovic O, Metin A, Karasuyama H. Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome.Nature. 2007 Aug 30;448(7157):1058-62. Epub 2007 Aug 5. PMID:17676033

2) Gordon KB, Colombel JF, Hardin DS. Phase 3 Trials of Ixekizumab in Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis. N Engl J Med. 2016 Nov 24;375(21):2102. doi: 10.1056/NEJMc1610828.

3) El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, Zhang GX, Dittel BN, Rostami A. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. Nat Immunol. 2011 Jun;12(6):568-75. doi: 10.1038/ni.2031.

4) Codarri L, Gyülvészi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magnenat L, Suter T, Becher B. RORγt drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. Nat Immunol. 2011 Jun;12(6):560-7. doi: 10.1038/ni.2027.