慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	SOCS1による濾胞性ヘルパーT細胞の分化及び機能制御の解明
Sub Title	To elucidate the roles of SOCS1 to regulate the differentiation of follicular helper T cells
Author	森田, 林平(Morita, Rinpei)
Publisher	
Publication year	2013
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2012.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究ではTfh細胞を中心としてエフェクターTh細胞の分化におけるSOCS1の作用の解析を行った。抑制性T細胞であるTregは、SOCS1の欠損によりFoxp3を失いIFN-γやIL-17を産生するエフェクター細胞(exFoxp3細胞)に転換し、自己免疫様疾患を誘発することをつきとめた。このexFoxp3細胞ではSTAT1やSTAT3が過剰に活性化しており、IFN-γやSTAT1の更なる欠損によってexFoxp3細胞の出現は抑制された。よってSOCS1はTregにおいてFoxp3の安定性及びIFN-γへの耐性を付与し、exFoxp3への転換を抑えていることが明らかとなった。
Notes	研究種目：基盤研究(C) 研究期間：2010～2012 課題番号：22590438 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_22590438seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2010～2012
課題番号：22590438
研究課題名（和文）　ＳＯＣＳ１による濾胞性ヘルパーＴ細胞の分化及び機能制御の解明

研究課題名（英文）　To elucidate the roles of SOCS1 to regulate the differentiation of follicular helper T cells

研究代表者
森田　林平（MORITA RIMPEI）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：00362541

研究成果の概要（和文）：
本研究ではTfh細胞を中心としてエフェクターTh細胞の分化におけるSOCS1の作用の解析を行った。抑制性T細胞であるTregは、SOCS1の欠損によりFoxp3を失いIFN-γやIL-17を産生するエフェクター細胞（exFoxp3細胞）に転換し、自己免疫様疾患を誘発することをつきとめた。このexFoxp3細胞ではSTAT1やSTAT3が過剰に活性化しており、IFN-γやSTAT1の更なる欠損によってexFoxp3細胞の出現は抑制された。よってSOCS1はTregにおいてFoxp3の安定性及びIFN-γへの耐性を付与し、exFoxp3への転換を抑えていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：
The purposes of this study are to elucidate the effects of SOCS1 on the differentiation of effecter Th cells, especially follicular helper T cells. We successfully demonstrated that immunosuppressive T cells, Treg cells turned into exFoxp3 cells with losing Foxp3 expression and producing IFN-g and IL-17 when SOCS1 was deleted in Treg cells. Moreover, the mice bearing the exFoxp3 cells were found to suffer from auto-immune diseases. However, these exFoxp3 cells revealed hyper-activation of STAT1 and STAT3, and IFN-g or STAT1 and SOCS1-double deficient Treg cells did not turn into the exFoxp3 cells. These results suggest that SOCS1 stabilizes Foxp3 expression in Treg cells and suppresses to convert them into exFoxp3 cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
総　計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：リンパ球、抗体産生、SOCS1、IL-21、Th17

１．研究開始当初の背景：

リウマチ、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、花粉症、膠原病などの免疫アレルギー疾患は長期にわたり著しく生活に支障をきたし、国民の健康上重大な問題となっている。これらの疾患は免疫過剰状態、あるいは免疫寛容の

破綻した状態であって、本来免疫系が反応しない自己抗原や花粉などの外来抗原に異常に反応した結果ととらえることができる。したがってこのような免疫応答の異常を修正することが最も根本的な治療方法であると考えられる。

ヘルパーT 細胞は免疫の中枢として免疫応答のみならず免疫疾患においても中心的な役割を果たす。サイトカインはヘルパーT 細胞の分化を規定するとともにマクロファージなど免疫応答の実行細胞へ指令を伝える情報伝達分子の役割を果たす。免疫系の恒常性はこのヘルパーT 細胞を中心とした正と負の免疫反応のバランスによって維持されている。ナイーブ T 細胞は、樹状細胞などの抗原提示細胞によって抗原刺激とサイトカインの作用を受けて正の応答を担うエフェクターT 細胞（Th1, Th2, Th17）へと分化成熟するが,同時に負の応答を担う Foxp3 陽性抑制性 T 細胞（Treg）や IL-10 産生抑制性 T 細胞（Tr1）も増加もしくは分化誘導される。

一方、ここ数年で Tfh が新たなエフェクターT 細胞として認識されつつある。元々ヒト扁桃の濾胞中に存在する CXCR5 陽性 CD4 T 細胞が B 細胞の免疫グロブリン産生を効率良く刺激出来ことが報告され Tfh と命名された。Tfh は IFN-□や IL-4 を産生しないことより Th1 や Th2 とは異なる細胞集団と考えられたが、その分化や B 細胞刺激メカニズムは不明であった。

Tfh は寄生虫感染に対する抗体産生や SLE 等の自己免疫疾患との関係も示唆されており、自己免疫疾患モデルマウスでは Tfh が自己抗体産生に重要な役割を担うことが証明されている。

２．研究の目的

我々はこれまで SOCS ファミリーを中心に、サイトカインシグナルの制御による免疫系の恒常性維持の分子機構とその破綻による免疫関連疾患の発症機構を研究して来た。SOCS 欠損 T 細胞を用いた解析から SOCS1 欠損 Treg では Foxp3 が急速に失われ、メモリーやエフェクターへと転換することを見いだしている。興味深いことに、この SOCS1 欠損マウスでは IgA をはじめ血清中の抗体価が上昇し CXCR5 陽性細胞数も増加している。これらより SOCS1 が Foxp3 陽性 Treg から Tfh の変換の鍵を握っていると考えられる。本研究では、CD4 T 細胞及び Treg 細胞特異的に SOCS1 を欠損する conditional KO マウスを作成し、濾胞性ヘルパーT 細胞（Tfh）の分化及び B 細胞へのヘルパー機能に対して、SOCS1 が如何なる働きをしているかを解明する。

３．研究の方法

（１）SOCS1 欠損 CD4 T 細胞及び抑制性 T 細胞の作成

CD4 T 細胞特異的に SOCS1 を欠損した conditional KO マウスを作成するために $SOCS1^{flox/flox}$ マウスを Lck-cre マウスと交配させる。一方、Treg に対しては $SOCS1^{flox/flox}$ マウスを Foxp3-cre マウスと交配させる。Foxp3 をマーキングするために Foxp3 遺伝子に IRES-GFP を挿入したマウスとも交配する。更に一旦 Treg となった細胞をトレースするために Rosa-YFP マウス（Foxp3-cre の発現によって YFP が恒常的に発現する）とも交配する。既に我々は $SOCS1^{flox/flox}$ Lck-cre マウスと $SOCS1^{flox/flox}$ Foxp3-cre マウスを得ており、他のマウスについても現在交配中である。

（２）In vivo Tfh 誘導実験

（１）で作成したマウスを完全アジュバンドと KLH の皮下注射により免疫する。７日後に末梢血、脾臓、リンパ節及び腸管パイエルパッチを採取する。

（３）マウス解析

①血清中の免疫グロブリン（IgM, IgG, IgA, IgE）濃度をELISAにて測定する。

②フローサイトメーターにて末梢血中の Tfh 亜集団のパターンを評価する。

③免疫組織染色により脾臓・リンパ節・パイエルパッチでの濾胞形成を評価する。

④脾臓，リンパ節，パイエルパッチより細胞浮遊液を調整しフローサイトメーターでCXCR5陽性CD4 T細胞と濾胞性B細胞の絶対数及びGFP, YFPの発現変化を評価する。

⑤定量RT-PCRにてBcl6やFoxp3の発現量測定する。

⑥リンパ節及びパイエルパッチの細胞をin vitroにて再刺激し、培養上清中のサイトカン、特にTfhに特長的なIL-21をELISAに測定する。

⑦末梢血、脾臓及びパイエルパッチよりCXCR5陽性CD4 T細胞を分離し濾胞性B細胞と SEB 存在下にて in vitro 共培養する。12日後、培養上清中の免疫グロブリン（IgM, IgG, IgA, IgE）濃度を測定する。

（４）CD4 T細胞移植実験

（１）で作成したマウスの脾臓及びリンパ節よりCD4 T細胞或いはTregを取り出し､CD3□欠損マウスに静脈注射する。更にケモカイン受容体発現パターンに従い、夫々のconditional KOマウスからTfh亜集団を取り出し移植する。完全アジュバンドとKLHの皮下注射により免疫し７日後にマウスの解析を行う。解析内容は【（３）マウス解析】と同様である。

（５）In vitro Tfh分化実験

SOCS1によるTfh分化制御の分子機構を明らかにするために、SOCS1 欠損ナイーブ CD4 T細胞を in vitro で IL-6 & anti-TGF-□抗体によりTfhに分化させる。得られたCD4 T細胞でのCXCR5の発現をフローサイトメーターで、IL-21とBcl6を定量RT-PCRにて評価する。さらに【①Tfhの in vitro 機能評価法】を用いてTfhとしての機能も評価する。

（６）SOCS1過剰発現CD4 T細胞の移植

上述のSOCS1欠損CD4 T細胞移植実験にて所見が得られたならば、次にSOCS1を過剰発現させたCD4 T細胞の移植を試み、免疫グロブリン産生の低下を引き起こすか否か評価する。

（７）Tfh分化に関わる分子の同定

SOCS1欠損TregがTfhに分化し易いことが証明されたならば、次にその分子機構を明らかにするために、マイクロアレイにより SOCS1欠損Tregと野生型Treg間の遺伝子表現パターンの違いを解析する。異なる遺伝子表現を示す遺伝子についてはレトロウイルスベクターにクローニングし、in vitroでのTfh分化に及ぼす影響を調べ、Tfh 分化に関与するか否か検討する。

４．研究成果

Treg特異的SOCS欠損マウスを解析したところ、脾臓や胸腺でnTreg細胞が増加しているにも関わらず、皮膚炎や高ガンマグロブリン血症等のSLE様の症状を呈することを認めた。さらに in vitro および in vivo の移入実験によって、SOCS1欠損TregはFoxp3を失い、自らIFN-γやIL-17を産生するエフェクター細胞（exFoxp3 細胞）として自己免疫様疾患（Rag 欠損マウスへの移入の場合は炎症性腸疾患）を誘発することをつきとめた。このexFoxp3細胞ではSTAT1やSTAT3が過剰に活性化しており、IFN-γやSTAT1の欠損によってexFoxp3細胞の出現は抑制された。よって

SOCS1 は Treg において Foxp3 の安定性及び IFN-γへの耐性を付与し、exFoxp3 への転換を抑えていることが明らかとなった。一方、Rag 欠損マウスへのナイーブ T 細胞との共移入の系で IFN-γSOCS1 両欠損 nTreg は腸炎を抑制できなかった。この IFN-γSOCS1 両欠損 nTreg では STAT3 の活性は高く維持されており IL-17 の産生が認められた。
以上の結果より SOCS1 は STAT1 を制限して Foxp3 の消失や IFN-γの産生を抑制しているのみならず、STAT3 の過剰な活性化を抑制し IL-6 や IL-17 などの STAT3 下流のサイトカインの産生も抑制していることが示唆された。これらの結果は SOCS1 が nTerg 細胞の重要な守護神であることを示している

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 11 件）

1. Sekiya T, Kashiwagi I, Yoshida R, Fukaya T, Morita R, Kimura A, Ichinose H, Metzger D, Chambon P, Yoshimura A. (2013) Nr4a receptors are essential for thymic regulatory T cell development and immune homeostasis. Nat Immunol. 14:230-7. doi: 10.1038/ni.2520.

2. Hasegawa E, Sonoda KH, Shichita T, Morita R, Sekiya T, Kimura A, Oshima Y, Takeda A, Yoshimura T, Yoshida S, Ishibashi T, Yoshimura A. (2013) IL-23-independent induction of IL-17 from γδT cells and innate lymphoid cells promotes experimental intraocular neovascularization. J Immunol. 190:1778-87. doi: 10.4049/jimmunol.1202495.

3. Sugiyama Y, Kakoi K, Kimura A, Takada I, Kashiwagi I, Wakabayashi Y, Morita R, Nomura M, Yoshimura A.(2012) Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the suppression of iNOS synthesis in macrophages by regulating IRF3 and STAT1 pathways. Int. Immunol. 24:253-265. doi: 10.1093/intimm/dxr126.

5. Yoshida H, Kimura A, Fukaya T, Sekiya T, Morita R, Shichita T, Inoue H, Yoshimura A. (2012) Low dose CP-690,550 (tofacitinib), a pan-JAK inhibitor, accelerates the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis by potentiating Th17 differentiation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 418:234-240. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.12.156.

6. Nakagawa R, Yoshida H, Asakawa M, Tamiya T, Inoue N, Morita R, Inoue H, Nakao A, Yoshimura A. (2011) Pyridone 6, a Pan-JAK Inhibitor, Ameliorates Allergic Skin Inflammation of NC/Nga Mice via Suppression of Th2 and Enhancement of Th17. J Immunol. 187:4611-4620. doi: 10.4049/jimmunol.1100649.

7. Takahashi R, Nishimoto S, Muto G, Sekiya T, Tamiya T, Kimura A, Morita R, Asakawa M, Chinen T, Yoshimura A. (2011) SOCS1 is essential for regulatory T cell functions by preventing loss of Foxp3 expression as well as IFN-{gamma} and IL-17A production. J Exp Med. 208:2055-2067. doi:

10.1084/jem.20110428.

8. Ichiyama K, Sekiya T, Inoue N, Tamiya T, Kashiwagi I, Kimura A, Morita R, Muto G, Shichita T, Takahashi R, Yoshimura A. (2011) Transcription Factor Smad-Independent T Helper 17 Cell Induction by Transforming-Growth Factor-β Is Mediated by Suppression of Eomesodermin. Immunity. 34:741-754. doi: 10.1016/j.immuni.2011.02.021.

9. Sekiya T, Kashiwagi I, Inoue N, Morita R, Hori S, Waldmann H, Rudensky AY, Ichinose H, Metzger D, Chambon P, Yoshimura A. (2011) The nuclear orphan receptor Nr4a2 induces Foxp3 and regulates differentiation of CD4 $^{+}$ T cells. Nature Communications. doi:10.1038/ncomms1272

10. Morital R, Schmitt N, Bentebibel SE, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G, Foucat E, Dullaers M, Oh SK, Sabzghabaei N, Lavecchio EM, Punaro M, Pascual V, Banchereau J, Ueno H. (2011) Human blood CXCR5^{+}CD4^{+} T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. Immunity. 34:108-121. doi: 10.1016/j.immuni.2010.12.012.

11. 森田林平 (2011) 濾胞ヘルパーT 細胞の分化誘導. 臨床免疫・アレルギー科 56:694-699.

〔学会発表〕(計２件)

1.森田林平、第 40 回日本免疫学会学術集会・総会、千葉、平成２３年１１月２７日～２９日、Human blood CXCR5+ CD4+ T cells are counterparts of T follicular cells、

2.森田林平、吉村昭彦、第 41 回日本免疫学会学術集会・総会、神戸、平成２４年１２月５日～７日、Epigenetic modification induces CD8abexpressing double-positive T cells from human blood CD4+ T cells counterparts of T follicular cells、

６．研究組織

(1)研究代表者

森田　林平 (MORITA RIMPEI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：00362541

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し