

シグナル・ネットワーク研究チーム

Laboratory for Signal Network

チームリーダー 久保 允 人

KUBO, Masato

獲得免疫において中心的役割を持つヘルパー T 細胞は特定のサイトカインを産生することにより異なる機能を発現する。これらヘルパー T 細胞の存在は、アレルギーや感染症に対する免疫反応において、重要な働きを持ち、獲得免疫反応が Th1 あるいは Th2 いずれかに傾くかによって、病態の予後を大きく左右することとなる。サイトカイン受容体シグナルは Th1・Th2 バランスを制御する上で非常に重要な働きを持つ。そこで、我々のチームでは Th2 分化を制御するサイトカインシグナル制御メカニズムについて解析をすることにより、アレルギー病態の制御をめざす。また、これら T 細胞の機能分化には遺伝子レベルでの構造的変化を伴うエピジェネティカルな制御が関わっている。ゲノムプロジェクトにより DNA 配列の全貌は明らかにされ、哺乳動物種間での DNA 配列の比較から、この非翻訳領域内で保存されている領域が、様々な動物種で同一の方向に進む細胞分化を制御するスイッチとして働く可能性が予想される。我々のチームではこの保存されている制御領域に着目し、ナイーブ T 細胞が Th2 分化に伴い IL-4 遺伝子の転写スイッチが制御される分子メカニズムを解明している。

1. サイトカイン制御分子によるアレルギー反応の制御 (関 *¹, 塚田 *², 尾崎, 久保)

Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) はサイトカイン抑制制御分子として同定され、分子内に存在する SH2 を介してキナーゼ、レセプターに結合することにより、抑制機能を惹起する分子である。我々はこれまでの研究から SOCS5 と SOCS3 が、T 細胞においてそれぞれ IL-4 と IL-12 のシグナルを抑制して、Th2 と Th1 分化をそれぞれ抑制することによりバランスに影響を与え、Th2 と Th1 反応を亢進させる働きを持つことを明らかにしてきた。

本年度、我々は SOCS 分子の遺伝子改変マウスを用い、リステリア・リーシュマニア感染および細菌性敗血症の反応系における SOCS5 と SOCS3 分子の働きを解析する目的で、B6 マウスのバックグラウンドに固定化した遺伝子改変マウスを作製した。SOCS3 を T 細胞で高発現するトランスジェニックマウスは、リステリア感染・リーシュマニア感染・細菌性敗血症、いずれにおいても病態に変化は見られなかったが、血中 IgE 抗体の上昇や T 細胞における Th2 反応の促進はいずれの場合も認められた。これに対し、SOCS5 を T 細胞で高発現するトランスジェニックマウスでは、細菌性敗血症に対する抵抗性を促進する傾向が見られた。しかしながら、リステリアとリーシュマニア感染に対しては全く影響が見られなかった。さらに、SOCS3 の遺伝子欠損マウスより得たヘテロ接合体マウス、および T 細胞およびマクロファージ特異的に遺伝子を欠失させたコンデシショナル欠損マウスを用い、アレルギー性炎症反応によって起こる抗原特異的気道過敏反応における生体内での SOCS3 の働きを解析した。その結果、T 細胞における SOCS3 遺伝子の欠損は、強く気道過敏反応を抑制したことから、アレルギー性気道過敏反応の惹起には T 細胞における SOCS3 の発現が病態の悪化につながることを明らかにした。また SOCS3 を恒常的に高発現するトランスジェニックマウスおよび欠損マウスおよび SOCS5 トランスジェニッ

クマウスを用い、アレルギー性結膜炎への関与を検討したところ、SOCS3 は病態を亢進し、SOCS5 は抑制していることが明らかとなった。

2. Th2 分化における IL-4 シグナルの時間的拘束性に関する研究 (田中 *², 久保)

Th2 分化は T 細胞抗原レセプター (TCR) シグナルと IL-4 受容体を介したシグナル伝達が協調的に働くことにより制御されている。本年度我々は IL-4 受容体シグナルが、どのような時間軸で Th2 分化の過程で起こるゲノムの動態を制御しているのかを経時的に検討するため、ヒト IL-4 受容体を持つマウス IL-4 受容体が欠損されたマウスを確立し、内因性 IL-4 が働けない環境を構築し、ヒト IL-4 による経時的 Th2 分化の誘導と IL-4 遺伝子座におけるクロマチン構造の変化を解析した。この結果、Th2 分化を決定すると考えられている GATA-3 の発現は、IL-4 によってその発現は制御されており、Th2 分化と絶対的相関関係は絶対的なものではなかった。これに対し、クロマチン構造の変化は高い相関関係が見られることから、厳格に時間で制御されていた。TCR シグナル導入後、分化誘導条件とは無関係にクロマチンレベルでヒストンのアセチル化が起こり、IL-4 遺伝子座の特定の領域での構造変化は 48 時間後より Th2 分化条件下でのみ認められた。

3. Th2 分化のエピジェネティカル制御 (田中 *², 八木, 久保)

我々のチームでは動物種間で保存されている制御領域に着目し、ナイーブ T 細胞が Th2 分化に伴い IL-4 遺伝子の転写スイッチが制御される分子メカニズムを理解していく。そこで、種間で保存されている制御領域 (Conserved noncoding sequence ; CNS) を用い、GFP をレポーターとしたトランスジェニックマウスを作製し、T 細胞機能分化に伴い Th2 サイトカイン産生を制御するゲノム領域を同定し

た。CNS-2 は IL-4 遺伝視座の下流にある CNS で、この領域をメモリー T 細胞や NKT 細胞、あるいは分化した Th2 細胞における IL-4 産生を制御する転写制御領域であることが分かってきた。そして、メモリー T 細胞や NKT 細胞における IL-4 産生制御には Notch シグナルが、Th2 細胞では GATA-3 がそれぞれ異なる分子機構により制御していることが明らかにされた。

*1 学術振興会特別研究員, *2 共同研究員

Our scientific goal is how the molecular basis of signal transduction cascades through cytokine signaling pathway regulates effector T cell differentiation and how the effector cytokine gene is epigenetically controlled during cell lineage commitment. Therefore, understanding of the biochemical events in the cytokine signaling pathway and the lineage specific transcriptional regulation in Th2 cytokine gene expression are fundamentally important.

1. Role of SOCS in allergic disease

Recently we focused on how Th1/Th2 differentiation is regulated by negative regulator of cytokine signaling (SOCS). Our laboratory has recently found that SOCS is a key molecule to determine the Th1/Th2 polarization. SOCS5 and SOCS3 preferentially expressed on Th1 and Th2 cells, respectively. SOCS3 expression levels tightly correlate with the risk for Th2 mediated immune disease, such as dermatitis and asthmatics. This year, we extend our search of how SOCS3 and SOCS5 implicated in the immunity against leishmania and listeria infections, experimental induced sepsis, and antigen induced airway hyper-responsiveness. The transgenic mice constitutively expressed SOCS5 in T cells exhibited inhibition for the experimental induced sepsis, but not for the responses against leishmania and listeria infections and the antigen induced airway hyper-responsiveness. SOCS3 expression levels tightly correlate with the risk for Th2 mediated immune disease, such as dermatitis and asthmatics. The transgenic mice constitutively expressed SOCS3 in T cells exhibited elaborating the immunity against leishmania and the antigen induced airway hyper-responsiveness. These results indicate that SOCS3 regulates the development of wide range of Th2 mediated immune disease.

2. IL-4-mediated signaling is a time-restricted instruction switch for Th2 differentiation

An initial activation signal via the T cell antigen receptor (TCR) in a restricted cytokine environment is critical for the onset of helper T (Th) cell development. Cytokines regulate the expression of key transcriptional factors, T-bet and GATA-3, which instruct the direction of Th1 and Th2 differentiation, through changes in chromatin conformation. In this study, we investigated the kinetics of IL-4-mediated signaling in a transgenic mouse, expressing human IL-4 receptor on a mouse IL-4 receptor deficient background, demonstrating that an IL-4 signal was required at the early stage of TCR-mediated T cell activation for lineage commitment to Th2, along with structural changes in chromatin, which take place in the conserved non-coding sequences (CNS)-1 and -2 within the IL-4 locus. The role of IL-4 signaling may have a time restriction during Th2 differentiation. In late stages of initial T cell activation, the chromatin structure of the IL-4 locus retains condensation state. These results demonstrate that, IL-4-induced

GATA-3 expression is time-restriction switch for Th2 differentiation.

3. Th2 cytokines exhibited a highly restricted expression profile in the cells of distinct lineage

lineage that differentiate under distinct tissue environment. Epigenetic changes in the chromatin structure of the Th2 locus tightly associate with cytokine expression profile during the differentiation process from naïve CD4 T cells toward effector Th2 cells. Using a transgenic approach as reporter GFP emission, we studied cis-acting activity of considerable conservation of noncoding sequences on *il4* locus to regulate Th2 specific expression. Conserved noncoding sequence-2 (CNS-2), which locates at far downstream of *il4* gene, regulated IL-4 expression of distinct T cell lineages. In NKT and memory like CD4+T cells, CNS-2 cis-acting element controlled initial IL-4 production through Notch/RBP-J signaling pathway. The CNS-2 mediated GFP expression also tightly correlated with Th2 specific IL-4 production in secondly response, and this element clearly exhibited Th2 specific binding of GATA-3 that is master regulator for Th2 lineage. These results indicate that CNS-2 cis-acting element on *il4* locus distinctly regulates primary and secondary *il4* gene expression in distinct T cell lineages.

Staff

Laboratory Head

Dr. Masato KUBO

Research Scientist

Dr. Akemi OZAKI

Dr. Ryoji YAGI

Dr. Yoh-ichi SEKI

Technical Staff

Ms. Yoshie SUZUKI

Assistant

Ms. Yoko NAGAI

Trainees

Mr. Jun TSUKADA (Grad. Sch. RIBS, Tokyo Univ. Sci.)

Mr. Shinya TANAKA (Grad. Sch. RIBS, Tokyo Univ. Sci.)

Ms. Seiko KADOSHIMA (Grad. Sch. RIBS, Tokyo Univ. Sci.)

Mr. Yasutaka MOTOMURA (Fac. Sci. Technol., Tokyo Univ. Sci.)

Mr. Katsunori YANAGAWA (Fac. Sci. Technol., Tokyo Univ. Sci.)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

Tanigaki K., Tsuji M., Han H., Yamamoto N., Tsukada J., Inoue H., Kubo M., and Honjo T.: “Regulation of ab/gd T cell lineage commitment and peripheral T cell response by Notch/RBP-J signaling.”, *Immunity* **20**, 611–622 (2004). *

Seki N., Miyazaki M., Suzuki W., Hayashi K., Arima K., Myburgh E., Izuhara K., Brombacher F., and Kubo M.: “IL-4-induced GATA-3 expression is a time-restricted instruction switch for Th2 cell differentiation”, *J. Immunol.* **172**, 6158–6166 (2004). *

Inoue H., Kato R., Fukuyama S., Nonami A., Taniguchi K., Matsumoto K., Nakano T., Tsuda M., Matsumura M., Kubo M., Ishikawa F., Moon B. G., Takatsu K., Nakanishi Y., and Yoshimura A.: “Spred-1 negatively regulates allergen-induced airway eosinophilia and hyperresponsiveness”, *J. Exp. Med.* **201**, 73–82 (2005). *

Watanabe M., Watanabe S., Hara Y., Harada Y., Kubo M., Tanabe K., Toma H., and Abe R.: “ICOS-mediated costimulation on Th2 differentiation is achieved by the enhancement of IL-4 receptor-mediated signaling”, *J. Immunol.* **174**, 1989–1996 (2005). *

(総説)

Inoue H. and Kubo M.: “SOCS proteins in T helper cell differentiation: implications for allergic disorders?”, *Expert. Rev. Mol. Med.* **6**, 1–11 (2004).

久保允人: “SOCS3 と免疫疾患”, *Mebio* **21**, 23–28 (2004).

久保允人: “メモリー T 細胞と *IL-4* 遺伝子の DNaseI 高感受性領域”, *Molecular Medicine Vol. 41 臨時増刊号: 免疫 2005* **41**, 144–151 (2004).

久保允人: “T 細胞の分化と活性化におけるサイトカインの関与”, 別冊・医学のあゆみ「サイトカイン」, pp. 51–54 (2004).

関陽一, 久保允人: “末梢の T 細胞の生存維持におけるサイトカインシグナルの必要性”, *臨床免疫* **42**, 285–291 (2004).

久保允人: “SOCS3 と自己免疫病およびアレルギー”, *分子リウマチ* **2**, 15–21 (2005).

[単行本・Proc.]

(総説)

久保允人: “Th1/Th2 細胞分化における細胞内シグナル伝達機構”, サイトカイン・ケモカインのすべて: 基礎から最新情報まで, 笠倉新平, 松島綱治 (編), 日本医学館, 東京, pp. 486–494 (2004).

塚田旬, 久保允人: “サイトカイン測定 (ELISA 法および細胞内染色)”, 実験医学別冊: 免疫学的プロトコール, 羊土社, 東京, pp. 140–149 (2004).

尾崎暁美, 関陽一, 久保允人: “SOCS3 による Th-2 介在アレルギー性反応制御”, *Annual Review 免疫 2005*, 奥村康, 平野俊夫, 佐藤昇志 (編), 中外医学社, 東京, pp. 110–117 (2005).

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Kubo M. and Tanaka S.: “A conserved non-coding sequence (CNS)-2 in the IL-4 locus regulates constitutive

IL-4 mRNA expression in the memory CD4⁺ T cells”, 12th Int. Congr. of Immunology and 4th Ann. Conf. of FOCIS, (International Union of Immunological Societies), Montreal, Canada, July (2004).

Seki Y., M F., and Kubo M.: “Significance of SOCS1 in regulation of a memory phenotype T cell”, 12th Int. Congr. of Immunology and 4th Ann. Conf. of FOCIS, (International Union of Immunological Societies), Montreal, Canada, July (2004).

Tsukada J., Hanada T., Abe R., Yoshimura A., and Kubo M.: “The expression of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) regulates aberrant expansion of the IFN- γ producing CD8 α^+ dendritic cells”, 12th Int. Congr. of Immunology and 4th Ann. Conf. of FOCIS, (International Union of Immunological Societies), Montreal, Canada, Dec. (2004).

Kubo M.: “Regulation of initial IL-4 production in memory like CD4⁺ T cells by a conserved non-coding sequence (CNS)-2 on the IL-4 locus”, 34th Ann. Meet. of the Japanese Soc. for Immunology, Sapporo, Dec. (2004).

(国内会議)

田中伸弥, 久保允人: “メモリー Th2 細胞, マスト細胞, NKT 細胞における Conserved non-coding sequence (CNS)-2 により IL-4 の転写制御機構の解明”, 京都 T 細胞会議学術集会, 京都, 6 月 (2004).

塚田旬, 久保允人: “樹状細胞における SOCS1 分子の役割”, 京都 T 細胞会議学術集会, 京都, 6 月 (2004).

関陽一, 久保允人: “末梢におけるナイーブ CD4⁺ 細胞の維持における SOCS1 の役割”, 京都 T 細胞会議学術集会, 京都, 6 月 (2004).

久保允人: “Th2 細胞とアレルギー反応”, 日本動物細胞工学会国内大会, 東京, 6 月 (2004).

久保允人: “SOCS3 と Th1/Th2 分化調節”, 第 25 回日本炎症・再生医学会, 東京, 7 月 (2004).

久保允人: “Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) によるアレルギー炎症の制御”, 第 69 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会「サイトカインによるアレルギー性炎症の誘導: 研究の最前から」, (日本インターフェロン・サイトカイン学会), 青森, 7 月 (2004).

長井治子, 遠山千春, 安部良, 久保允人, 野原恵子: “TCDD1 による抗体産生制御の原因遺伝子の検索”, 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2004).

久保允人: “The role of SOCS3 in the development and maintenance of allergic inflammation”, 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2004).

八木良二, 田中伸弥, 尾崎暁美, 久保允人: “Cell Lineage 特異的に IL-4 転写を制御する cis-elements の解析”, 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 12 月 (2004).

田中剛, 金地佐知子, 有馬和彦, 合田千穂, 安永晃一郎, 生澤公一, 柳原行義, 久保允人, 杉田雄二, 出原賢治: “IL-4 による B 細胞における aryl hydrocarbon receptor の誘導”, 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 12 月 (2004).

田中伸弥, 久保允人: “IL-4 遺伝子座 conserved non-coding sequence (CNS)-2 領域による Th2 メモリー T 細胞の IL-

4 産生制御”, 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 12 月 (2004).

金城市子, 濱野真二郎, 山内盛泰, 関陽一, 吉田裕樹, 久保允人, 吉村昭彦: “SOCS-3 は CD4⁺T 細胞の Th3 型分化を制御する”, 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 12 月 (2004).

高取宏昌, 中島裕史, 廣瀬晃一, 加々美新一郎, 岩本逸夫, 齋藤康, 久保允人, 吉村昭彦: “Stat5a による Th 細胞分化制御機構の解明”, 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 12 月 (2004).

尾崎暁美, 久保允人: “アレルギー性結膜炎マウスモデルを使ったサイトカイン制御機構の解析”, 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 12 月 (2004).

塚田旬, 花田俊勝, 知念孝敏, 安部良, 吉村昭彦, 久保允人: “サイトカイン制御シグナル分子 SOCS1 による CD8 α 樹状細胞の制御”, 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 12 月 (2004).

関陽一, 久保允人: “末梢でのナイーブ CD4T 細胞の生存維持におけるサイトカインシグナルの必要性”, 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 12 月 (2004).