

筑 波 大 学

博 士 （ 医 学 ） 学 位 論 文

Analysis for the regulation of the  
expression of aryl hydrocarbon  
receptor by T-bet overexpression  
independently of IFN $\gamma$  under Th-17  
polarized condition

(Th17 細胞分化誘導下における  
T-bet 過剰発現による IFN $\gamma$  非依存的な aryl  
hydrocarbon receptor の発現制御の検討)

2016

筑波大学大学院博士課程 人間総合科学研究科

横澤 将宏

# 目次

概要	2
第一章：序論	6
第二章：目的	10
第三章：実験材料と方法	11
第四章：結果	17
1. Tbet Tg マウスにおける Th17 細胞分化誘導の検討	
2. Tbet 遺伝子導入系における Th17 細胞分化誘導の検討	
3. IL-6/STAT3 シグナル経路の差の評価	
4. Aryl hydrocarbon receptor (AHR) 発現の評価	
5. CIA モデルにおける AHR 発現の検討	
第五章：考察	23
第六章：結論	28
謝辞	29
参考文献	30
主要略語一覧	38
図表	39
参考論文	61

## 概要

### 【目的】

関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) は、多関節の慢性炎症とそれに伴う骨破壊を生じる関節滑膜を主座とする原因不明の炎症性疾患であり、様々な免疫担当細胞が病態形成に関与し、各細胞が産生するサイトカインなどによって互いに制御し合う機構が存在している。RA 患者の関節滑膜には CD4 陽性細胞の浸潤が認められ、特に Th17 細胞が RA の病態に大きな影響を与えているとされる。我々は、T 細胞でのみ Tbet を強制発現させた Tbet トランスジェニック (Tg) マウスを用いたコラーゲン誘導関節炎 (CIA) の検討で、抗原特異的な Th17 細胞分化が抑制されることで CIA が著明に抑制されることを報告した。この検討で、IFN $\gamma$ 非依存的に Tbet による転写因子間の制御機構が存在する可能性が考えられたが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。本研究では、Tbet 過剰発現を背景にして Th17 細胞分化制御機構について明らかにすることを目的として研究を行った。

### 【実験材料と方法】

1) Tbet Tg マウスおよび Tbet Tg マウスと IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスを交配させた Tbet Tg/IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスを作成し、野生型 (WT) マウスと共に CD4 陽性細胞を単離して Th17 細胞分化誘導を行い、IFN $\gamma$ と IL-17 産生および Tbet と ROR $\gamma$ t 発現を

FCM で解析した。

2) CD4 陽性細胞上の IL-6 受容体発現および IL-6 刺激後の STAT3 のリン酸化を FCM で解析した。

3) Th17 細胞分化誘導後の細胞から mRNA を抽出し、定量 PCR で関連転写因子 (*tbx21*, *rorc*, *stat3*, *stat1*, *runx1*, *irf4*, *nfbiz*, *ahr*) について検出した。

4) WT マウスと IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスのナイーブ CD4 陽性細胞を単離し、レトロウイルス感染実験で T-bet を過剰発現させ、1)~3) と同様の検討を行った。

5) T-bet Tg マウスの実験系および T-bet 遺伝子導入系の CD4 陽性細胞における *smad2* 発現および WT マウスと IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスの CD4 陽性細胞の Th1 細胞分化誘導下での *smad2* 発現を定量 PCR で検出した。

6) T-bet Tg マウスの実験系および T-bet 遺伝子導入系において Th17 細胞分化誘導下に aryl hydrocarbon receptor (AHR) の発現を FCM で解析した。

7) T-bet Tg マウスの実験系および T-bet 遺伝子導入系において Th17 細胞分化誘導条件に FICZ を添加し IL-17 産生促進効果を評価し、FICZ 添加時における *cyp11a1* を定量 PCR で検出した。

8) II 型コラーゲン (CII) で免疫後の WT マウスおよび T-bet Tg マウスのリンパ節細胞を CII 刺激下で培養し、転写因子発現 (*tbx21*, *rorc*, *ahr*) を定量 PCR で検出した。

## 【結果】

- 1) T-bet Tg と T-bet Tg/IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスにおいて、ROR $\gamma$ t 発現および IL-17 産生は抑制された。
- 2) T-bet Tg と T-bet Tg/IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスにおいて、IL-6 受容体発現は低下し、STAT3 のリン酸化も抑制された。
- 3) T-bet Tg と T-bet Tg/IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスにおいて、定量 PCR で *rorc* の発現と *ahr* の発現が低下していた。
- 4) T-bet 遺伝子導入系において、IFN $\gamma$ 非依存的に T-bet 過剰発現下で IL-17 産生は抑制された。IL-6 受容体発現や STAT3 のリン酸化に変化はなかった。定量 PCR で *rorc* と同様に *ahr* の発現が低下した。
- 5) T-bet Tg マウスにおいて *smad2* は IFN $\gamma$  非依存的に発現低下を認めたが、T-bet 遺伝子導入系においては発現に変化はみられなかった。*smad2* は Th1 細胞分化の過程で IFN $\gamma$  非依存的に発現が低下した。
- 6) T-bet Tg マウスの実験系および T-bet 遺伝子導入系いずれにおいても、IFN $\gamma$  非依存的に AHR の蛋白発現低下は認められた。
- 7) FICZ を添加しても T-bet 過剰発現下では IFN $\gamma$  非依存的に IL-17 産生は亢進せず、*cyp11a1* も発現増強がみられなかった。
- 8) T-bet Tg マウスにおける CII 反応性の *rorc* および *ahr* の発現は抑制された。

## 【考察】

T-bet Tg マウスの実験系、T-bet 遺伝子系のいずれにおいても IFN $\gamma$  非依存的に IL-17 産生は抑制された。一方で、IL-6 受容体発現と STAT3 のリン酸化について違いがみられた。T-bet 過剰発現に伴う Th1 細胞環境の時間経過が IL-6 受容体に関連する *smad2* 発現に影響し、T-bet Tg マウスにおいて IL-6 受容体発現が抑制されると推察された。T-bet Tg マウスの実験系と T-bet 遺伝子導入系において、*rorc* と同様に *ahr* の mRNA 発現低下を IFN $\gamma$  非依存的に認め、AHR は蛋白レベルでも発現は抑制された。また FICZ 刺激による IL-17 産生促進や *cyp11a1* の発現が抑制され、T-bet 過剰発現下に AHR 発現が抑制される確証が示された。CII 免疫後の細胞を用いた vivo の検討で、T-bet Tg マウスにおける *ahr* 発現は抑制された。本研究により T-bet 過剰発現による AHR 発現制御が確認され、Th17 細胞分化の新たな制御の可能性を見出すことができた。今後、RA における検討を行うことで、関節炎病態における転写因子による制御メカニズムの解明が期待できる。

## 【結論】

T-bet 過剰発現によって IFN $\gamma$  非依存的に AHR 発現が抑制され、Th17 細胞分化の制御に関与する可能性が示唆された。

## 第一章：序論

### 1. 関節リウマチ

関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) は、多関節の慢性炎症とそれに伴う骨破壊を生じる関節滑膜を主座とする原因不明の炎症性疾患であり、T 細胞、B 細胞、形質細胞、マクロファージなど様々な免疫担当細胞が病態形成に関与し、各細胞が産生するサイトカインなどによって互いに制御し合う機構が存在している。特に RA 患者の関節滑膜には CD4 陽性細胞の浸潤が認められると共に、タクロリムスやアバタセプトといった T 細胞を標的とした治療薬が効果を示している点から (1,2)、T 細胞が重要な役割を担っていると考えられている。また滑膜に浸潤した T 細胞には Th17 細胞が産生するサイトカインである IL-17 の発現が観察され、患者の血清や滑液中における IL-17 の上昇も認められる (3,4)。RA 患者の疾患活動性は、末梢血 CD4 陽性 T 細胞中の Th17 細胞の比率と強く相関していることも報告されており (5)、T 細胞サブセットの中でも Th17 細胞が RA の病態に大きな影響を与えていると想定される。一方で、抗 IL-17 抗体を用いた治療は RA に対して試みられたものの、十分な効果が認められておらず、RA 病態に対する制御メカニズムは未だに不明な点が多く残されている。



## 2. コラーゲン誘導関節炎 (collagen induced arthritis、CIA)

CIA は RA の動物モデルとして古くから用いられており (6,7)、特に Th17 細胞によって誘導される実験的自己免疫性関節炎モデルとして多くの報告がある。IL-17 やその主要転写因子である ROR $\gamma$ t が病態の促進因子とされ (8)、一方で Th1 細胞が産生する IFN $\gamma$ や、その主要転写因子である T-bet が抑制性の因子として考えられている (9,10)。我々の先行研究では、CD2 プロモーター下に T 細胞でのみ T-bet を強制発現させた T-bet トランスジェニック (Tg) マウスを用いた CIA の検討で、抗原特異的な Th17 細胞分化が抑制されることにより CIA が著明に抑制されることを報告した (11)。この検討の中で、IFN $\gamma$  非依存的に T-bet による転写因子間の制御機構が存在する可能性が考えられたが、その詳細なメカニズムはまだ明らかとはなっていない。

## 3. ヘルパーT 細胞

ヘルパーT 細胞のサブセットは複数存在し、それぞれ異なるサイトカイン産生を行うことで様々な機能をもっている。Th1 細胞は IFN $\gamma$ を産生することで内因性抗原に対する免疫能において重要な役割を担っており、Th2 細胞は IL-4、IL-5、IL-13 を産生して寄生虫や細胞外抗原に対する防御において必須とされる (12)。Th17 細胞は IL-17、IL-21、IL-22 を産生し、細菌感染や真菌感染に対

する免疫能に影響するのみでなく、様々な自己免疫病態への働きが多く報告されている (13,14)。ナイーブ CD4 陽性 T 細胞から各ヘルパーT 細胞サブセットへの分化は、ある特定のサイトカイン環境において誘導される各サブセット特異的な転写因子発現に依存している。Th1 細胞分化における主要転写因子は T-bet と考えられており、T-bet は TCR 刺激、IL-12/STAT4 シグナル経路、IFN- $\gamma$ /STAT1 シグナル経路を介して誘導され、直接的に IFN $\gamma$ 産生を活性化する (15-17)。同様にマウスの Th17 細胞分化については、IL-6 と TGF- $\beta$ により誘導される転写因子である ROR $\gamma$ t に依存するとされ (18)、ROR $\gamma$ t が欠損することで Th17 細胞分化が妨げられることから、Th17 細胞における主要な転写因子と考えられている (19)。一方で、STAT3、ROR $\alpha$ 、IkB $\zeta$ 、IRF4、Runx-1、aryl hydrocarbon receptor (AHR) といった Th17 細胞分化を促進させる他の転写因子も数多く報告されている (20-27)。IRF4 や Runx-1 は ROR $\gamma$ t 発現を誘導し、直接的に IL-17 産生を亢進させる (23,25)。またリガンド依存性の転写因子である AHR は Th17 細胞分化の調節因子として考えられており、IL-17 や IL-22 といったサイトカイン産生を亢進させる (26-28)。これらの転写因子はそれぞれの T 細胞サブセットにおけるサイトカイン産生に関与すると共に、直接的あるいは間接的に他の T 細胞サブセットの分化制御に関わっている (29, 30)。特に T-bet による Th17 細胞分化制御では IFN $\gamma$  依存的な抑制メカニズムが考えられ

ていたが (31)、近年では IFN $\gamma$  非依存的に Th17 細胞関連の転写因子である Runx-1 や IRF4 を介した制御メカニズムも報告されているが (32,33)、他の転写因子との関連は不明な点がある。

#### 4. 本研究の背景

以上に示すように、RA の動物モデルである CIA を用いた検討において、Th17 細胞に関連したサイトカインが病態に関与していると考えられているが、実臨床における RA の治療において IL-17 を標的とした治療は十分な効果をみせていない。今後、転写因子は RA における新たな治療標的となる可能性があるが、Th17 細胞分化への転写因子による制御メカニズムは未だに不明な点が多い。本研究では、T-bet 過剰発現の状態を背景にして Th17 細胞分化制御機構について明らかにすることを目的として研究を行った。

## 第二章：目的

Th1 細胞の主要転写因子である T-bet の過剰発現下における Th17 細胞分化の制御機構の詳細について明らかにする。

### 第三章：実験材料と方法

#### 1. マウス

本研究に用いている T-bet Tg マウスは、C57BL/6J 由来のマウスにおいて CD2 プロモーター下に T-bet 遺伝子を組み込んでいる。T 細胞において T-bet の過剰発現と IFN $\gamma$ の産生増加が認められるマウスで (34)、筑波大学医学医療系解剖学発生学研究室の高橋智教授より御供与いただいた。C57BL/6J の WT マウスおよび IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスは Jackson Laboratory より購入した。また IFN $\gamma$ の有無による影響を評価するために、T-bet Tg マウスと IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスを交配させ、T-bet Tg/IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスを作成し実験に用いた。いずれのマウスも筑波大学生命科学動物資源センターの規則に従って実験を行った。

#### 2. 細胞の単離

マウスの脾細胞から、Dynabeads Mouse CD4 (L3T4) (Miltenyi Biotec、Bergisch gladbach、Germany) あるいは CD4+CD62L+ T cell isolation kit II (Miltenyi Biotec) を用いて、magnetic bead-based cell sorting system (MACS) (Miltenyi Biotec) によって精製度が 92%以上の細胞を回収して各実験に用いた。

### 3. プラスミド DNA とレトロウイルス上清の作成

筑波大学医学医療系（血液内科）の錦井秀和講師より御供与いただいた pGCDNsam ires-EGFP (MSCV) レトロウイルスベクターに対して、マウスの T-bet 遺伝子を組み込んだ。パッケージング細胞である Plat E 細胞に対して Lipofectamine (Invitrogen、Carsbad、CA) を用いてレトロウイルスベクターを導入し、産出される T-bet 遺伝子を組み込んだウイルスを含む培養上清 (T-bet RV; retrovirus vector) と T-bet 遺伝子を組み込んでいないウイルスを含む培養上清 (empty RV; retrovirus vector) を用意した。

### 4. レトロウイルス感染実験

レトロウイルス感染実験においては RetroNectin 法を用いた (35)。RetroNectin 25 $\mu$ g/ml (Takara Bio、Otsu、Japan) と anti-CD3e antibody 2 $\mu$ g/ml を一晩固相化した 48well ノントリートプレートについて、2%BSA を添加した PBS でブロッッキングした後にレトロウイルス上清を加え、32°C、2000g の条件で 2 時間遠心してレトロウイルスプレートを作成した。WT マウスおよび IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスの脾細胞から単離したナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞は、anti-CD28 antibody 1 $\mu$ g/ml (BioLegend、San Diego、CA)、anti-IFN $\gamma$  antibody 10 $\mu$ g/ml (BioLegend)、anti-IL-4 antibody 10 $\mu$ g/ml (BioLegend) と共に、anti-CD3e antibody 2 $\mu$ g/ml

(BioLegend) で一晩固相化した 48well プレートで 24 時間培養した後に、レトロウイルスプレートに移してさらに 24 時間培養を継続した。培養した細胞を回収し、レトロウイルスベクターを標識している GFP 蛋白が発現している細胞について MoFlo cell sorter (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) を用いてソーティングし、抽出されたベクターが取り込まれた細胞について Th17 細胞分化誘導および STAT3 のリン酸化実験に用いた。

## 5. T 細胞培養

10%ウシ胎児血清、ペニシリン 100 単位/ml、ストレプトマイシン 100 $\mu$ g/ml、2-メルカプトエタノール 50 $\mu$ M に調整した、RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を培養液に用いた。Th17 細胞分化誘導において、anti-CD28 antibody 1 $\mu$ g/ml、anti-IFN $\gamma$  antibody 10 $\mu$ g/ml、anti-IL-4 antibody $\mu$ g/ml、recombinant mouse IL-6 50ng/ml (eBioscience, San Diego, CA)、human TGF- $\beta$  (BioLegend) 2.5ng/ml と共に、anti-CD3e antibody 2 $\mu$ g/ml で一晩固相化した 48well プレートで 96 時間培養した。対照群 (Th0) は、anti-CD28 antibody 1 $\mu$ g/ml、anti-IFN $\gamma$  antibody 10 $\mu$ g/ml、anti-IL-4 antibody 10 $\mu$ g/ml の条件で、Th1 細胞分化誘導は、anti-CD28 antibody 1 $\mu$ g/ml、anti-IL-4 antibody 10 $\mu$ g/ml、Recombinant mouse IL-12 (BioLegend) 1 $\mu$ g/ml の条件で同様に培養した。AHR

刺激の検討においては、AHR のリガンドである 6-Formylindolo (3,2-b) Carbazole (FICZ) (Enzo Life Sciences, Exeter, United Kingdom ; Abcam, Cambridge, MA) 300nM となるように調整して Th17 細胞分化条件に添加した。

## 6. フローサイトメトリー (Flow Cytometry : FCM) 解析

分化誘導の確認は、細胞培養後に PMA (Sigma-Aldrich) 50ng/ml、ionomycin (Sigma-Aldrich) 1μg/ml、GolgiStop (BD Biosciences, San Jose, CA) 1μg/ml で 6 時間追加刺激をして FCM で解析した。細胞回収後、死細胞および細胞表面抗原を細胞外染色し、Foxp3/Transcription factor, Fixation/Permeabilization concentrate and diluent (eBioscience) を用いて細胞の固定化処理を行い、転写因子およびサイトカインを細胞内染色した後に、発現パターンをフローサイトメーター BD FACSVerser (Becton Dickinson, Mountain View, CA) および解析ソフト FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR) で解析した。STAT3 のリン酸化実験については、mouse IL-6 50ng/ml で刺激後、0 分、15 分、30 分、60 分で細胞を回収し、Lyse Fix buffer (BD Biosciences) と Perm Buffer III (BD Biosciences) を用いて固定化処理を行った後に細胞内染色を行った。転写因子の T-bet、RORγt、AHR、細胞表面抗原の CD126、CD130 の発現について



は特異抗体とアイソタイプの median fluorescence intensity (MFI) の比を用いて相対的に比較検討した (MFI [specific antibody] / MFI [isotype])。死細胞、細胞表面抗原、細胞内の転写因子ならびにサイトカインの染色用抗体は、Fixable Viability Dye eFluor 780 (eBioscience)、anti-PerCP/Cy5.5 (BioLegend)、anti-CD126-APC (BioLegend)、anti-CD130-PE (eBioscience)、anti-IFN $\gamma$ -FITC (BioLegend)、anti-Tbet-PE (eBioscience)、anti-ROR $\gamma$ t-APC (eBioscience)、anti-IL-17-PE/Cy7 (BioLegend)、anti-AHR-efluor 660 (eBioscience)、anti-pSTAT3-PE (pY705) (BD Biosciences) を用いた。

## 7. ELISA

分化培養上清を回収し、IFN $\gamma$ および IL-17 産生について、Duoset ELISA development System (R&D Systems、Minneapolis、MN) を用いて検討した。

## 8. 定量 PCR

分化培養後の細胞を回収し、Isogen (Nippon Gene、Tokyo、Japan) を用いて RNA 抽出を行った。定量 PCR においては Taqman 法を用い、*tbx21*、*rorc*、*stat3*、*stat1*、*runx1*、*irf4*、*nfbiz*、*ahr*、*smad2*、*bcl6*、*cyp1a1* について *gapdh* との比で相対定量した。用いたプローブは全て、Applied Biosystems (Foster

City、CA) より購入した。

## 9. II型コラーゲン (CII) 反応性 CD4 陽性細胞の転写因子発現の解析

Native chicken CII (Sigma-Aldrich) を 0.01M の酢酸に溶解し、完全フロイントアジュバント (CFA) へ乳化させた。熱処理した *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco) 5mg と不完全フロイントアジュバント (Sigma-Aldrich) 1ml を混合して、CFA を調整した。8-12 週齢のマウスに対して、CII 200 $\mu$ g を含む CFA を尾の基部に皮下注射した。CII 免疫の 10 日後に、WT マウスならびに Tbet Tg マウスの鼠径リンパ節を採取し、リンパ節細胞を CII 100 $\mu$ g/ml の存在下に 96well 丸底プレートで 72 時間培養した ( $2.0 \times 10^5$  cells/well)。培養後に細胞を回収し、CD4 陽性細胞を MACS で単離して RNA を抽出し、定量 PCR で検討した。

## 10. 統計学的解析

統計学的解析は、Tukey's test、Kruskal-Wallis test、Paired t-test、Student's t test を用いて行った。P<0.05 を有意差ありと判定した。

## 第四章：結果

### 1. T-bet Tg マウスにおける Th17 細胞分化誘導の検討

Th17 細胞分化誘導下における T-bet 過剰発現による影響を明らかにするため、WT マウス、T-bet Tg マウス、T-bet Tg/IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスから単離した CD4 陽性細胞を IL-6 と TGF- $\beta$ の存在下で培養し、転写因子 (T-bet、ROR $\gamma$ t) およびサイトカイン産生 (IFN $\gamma$ 、IL-17) について細胞内染色を用いて FCM で解析した。T-bet Tg マウスでは Th17 細胞分化条件下においても IFN $\gamma$ の高産生が維持されていることを確認した。また WT マウスに比べて、T-bet Tg マウスと T-bet Tg/IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスにおいて IL-17 産生と ROR $\gamma$ t 発現は有意に抑制された(図 1)。

続いて、T-bet 過剰発現による IL-17 産生の制御メカニズムについて確認するため、Th17 細胞分化に必須の経路である IL-6/STAT3 シグナル経路に着目した。WT マウス、T-bet Tg マウス、T-bet Tg/IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスから単離した CD4 陽性細胞の IL-6 受容体 (CD126、CD130) 発現ならびに IL-6 刺激による STAT3 のリン酸化を FCM で解析した。WT マウスに比して、T-bet Tg マウスおよび T-bet Tg/IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスでは CD126 と CD130 の発現はいずれも有意に低下していた(図 2)。また STAT3 のリン酸化についても、WT マウスに比して T-bet Tg マウスおよび T-bet Tg/IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスで有意に抑制された(図 3)。よって、T-bet の過剰発現下において IFN $\gamma$  非依存的に IL-6 受容体発現が低下すると共に、

STAT3 のリン酸化が抑制されることが考えられた。

また Th17 細胞分化に関連する転写因子を評価するため、Th17 細胞分化条件で培養した細胞における *tbx21*、*rorc*、*stat3*、*stat1*、*runx1*、*irf4*、*nfbiz*、*ahr* の mRNA 発現について定量 PCR を用いて検討した。T-bet Tg マウスおよび T-bet Tg/IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスにおいて、*tbx21* の発現亢進と *rorc* の発現抑制を確認した。また、*stat3*、*nfbiz* の発現亢進と *ahr* の発現抑制を認めた (図 4)。

以上の結果に関して、T-bet Tg マウスは発生段階において T-bet が過剰発現しており、T-bet 以外の分子に何らかの影響を及ぼしている可能性があるため、これらの結果が T-bet 過剰発現のみによる事象と断定はできないと考えた。そこでレトロウイルスベクターを用いた T-bet 遺伝子導入系を作成し、T-bet のみを過剰発現させた条件で同様に検討することとした。

## 2. T-bet 遺伝子導入系における Th17 細胞分化誘導の検討

WT マウスおよび IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスの CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>ナイーブ T 細胞に対して、T-bet を組み込んだ T-bet RV と対照の empty RV を感染させ、Th17 細胞分化条件下で培養し、転写因子とサイトカインについて FCM で解析した。WT マウスと IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスのどちらにおいても、empty RV 群に比して T-bet RV 群において IL-17 産生は抑制された (図 5)。培養上清を用いた ELISA においても T-

bet RV 群において IFN $\gamma$ の有無によらず、IL-17 産生は抑制されていた (図 6)。

また、T-bet Tg マウスの検討と同様に IL-6 受容体の発現および IL-6 刺激による STAT3 のリン酸化を FCM によって解析した。T-bet Tg マウスにおける実験結果とは異なり、WT マウスと IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスいずれにおいても empty RV 群と T-bet RV 群において CD126 と CD130 の発現に変化は認められず (図 7)、IL-6 刺激後における STAT3 のリン酸化についても抑制されなかった (図 8)。よって、T-bet が直接的に IL-6/STAT3 シグナル経路に影響を及ぼすことは否定的と考えられた。

続いて、Th17 細胞分化条件下で培養した細胞の mRNA 発現を比較検討した。*tbx21* の発現亢進と *rorc* の発現抑制を確認した。また T-bet Tg マウスにおける実験結果と同様に *stat3*、*nfbiz* については発現が亢進しており、*runx1* と *ahr* は発現が抑制された (図 9)。

T-bet Tg マウスと T-bet 遺伝子導入系の実験結果を踏まえて、IL-6 受容体の発現および STAT3 のリン酸化に差異を認めた点について検証することと、Th17 細胞の関連転写因子の定量 PCR の結果において、Th17 細胞の主要転写因子とされる ROR $\gamma$ t と同様の発現傾向を示した AHR に着目して追加で検討を行う方針とした。

### 3. IL-6/STAT3 シグナル経路の差の評価

T-bet Tg マウスならびに T-bet Tg/IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスでは、IL-6/STAT3 シグナル経路が抑制されることで Th17 細胞分化が制御されることが想定されたが、T-bet 遺伝子導入系においては IL-6 受容体発現や STAT3 のリン酸化に影響はみられなかった。またどちらの実験系においても、*stat3* の mRNA 発現は T-bet 過剰発現下において同様に増加を認めたことから、総 STAT3 が減少していることは否定的と考えた。そこで STAT3 のリン酸化は IL-6 刺激によって誘導されることから、IL-6 受容体発現について追加検討を行うこととした。IL-6 受容体発現に関連する分子とされる Smad2 と Bcl-6 に着目し、T-bet Tg マウスおよび T-bet Tg/IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスの CD4 陽性細胞における *smad2* ならびに *bcl6* の mRNA 発現を検討したところ、*smad2* について WT マウスに比して有意に低下していることが示された。一方で T-bet 遺伝子導入系では、T-bet RV 群と empty RV 群の間に *smad2* の mRNA 発現について有意差は認められなかった。いずれにおいても *bcl6* について発現に差はみられなかった (図 10)。そこで T-bet Tg マウスにおける CD4 陽性細胞が Th1 細胞へ偏向している点を考え、WT マウスと IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスの CD4 陽性細胞を脾細胞から単離し、Th1 細胞分化条件下で培養した細胞における *smad2* の mRNA 発現について比較検討したところ、分化初期に比較して時間経過と共に *smad2* の発現が有意に抑制されることが示された

(図 10)。以上の結果より、T-bet Tg マウスにおける IL-6 受容体発現低下の背景に *smad2* の発現低下が関与している可能性が考えられた。

#### 4. Aryl hydrocarbon receptor (AHR) 発現の評価

AHR は IL-6 と TGF- $\beta$  の刺激によって強く誘導される分子であり、T-bet Tg マウスの実験系と T-bet 遺伝子導入系における Th17 細胞分化条件下で AHR の蛋白発現について FCM を用いて検討した。どちらの実験系においても、T-bet 過剰発現下に IFN $\gamma$  非依存的に AHR 発現が抑制されることが示された(図 11)。

また AHR 発現抑制の確証を得るために、AHR の リガンドである FICZ を Th17 細胞分化条件に添加することで、本来確認される IL-17 産生促進効果が T-bet 過剰発現下に抑制されるか検討した。どちらの実験系においても、T-bet 過剰発現下において IFN $\gamma$  非依存的に IL-17 産生促進効果は認められなかった (図 12、図 13)。続いて、FICZ 刺激によって誘導される *cyp1a1* の mRNA 発現を確認したところ、T-bet 過剰発現下に抑制されることが示された (図 14)。以上より、T-bet 過剰発現によって AHR 発現が抑制されることが裏づけられた。

#### 5. CIA モデルにおける AHR 発現の検討

T-bet Tg マウスにおける CIA の抑制への AHR の関与を検証するため、CII

免疫後の WT マウスならびに T-bet Tg マウスのリンパ節細胞を CII 存在下で追加培養し、CII 反応性のサイトカインならびに培養細胞中の CD4 陽性細胞における転写因子発現を評価した。T-bet Tg マウスにおける CII 反応性の IL-17 産生が抑制されることを確認した。CII 反応性の転写因子発現として、T-bet Tg マウスにおいて *rorc* と同様に *ahr* の発現が抑制されることを認めた (図 15)。

以上の結果から、T-bet 過剰発現によって IFN $\gamma$  非依存的に AHR 発現が制御されることで、Th17 細胞分化の制御に関与する新たな可能性が示唆された (図 16)。



## 第五章：考察

我々は以前に T-bet Tg マウスを用いた検討で、Th17 細胞分化抑制を介して RA の動物モデルである CIA が著明に抑制されることを報告した (22)。しかし T-bet Tg マウスにおける Th17 細胞分化制御の詳細なメカニズムは不明であった。今回我々は、Th17 細胞分化誘導下において、T-bet 過剰発現によって IFN $\gamma$  非依存的に AHR 発現が抑制されることを新たに示した。

T-bet Tg マウスにおける Th17 細胞分化誘導下において、IFN $\gamma$  非依存的に IL-17 産生や ROR $\gamma$ t 発現は抑制された。その背景として、IL-6 受容体発現の低下や STAT3 のリン酸化抑制を認め、転写因子としては *nfkbi*、*stat3* の mRNA 発現亢進と *rorc*、*ahr* の mRNA 発現低下を認めた。T-bet 過剰発現によって生じる Th17 細胞分化制御における機序を確認するために行った T-bet 遺伝子導入系において、T-bet 過剰発現下に IFN $\gamma$  非依存的に IL-17 産生は抑制されていたが、IL-6 受容体発現や STAT3 のリン酸化抑制は認められず、T-bet Tg マウスにおける結果とは異なっていた。転写因子については T-bet Tg マウスにおける実験と同様に *nfkbi*、*stat3* の mRNA 発現亢進と *rorc*、*ahr* の mRNA 発現低下を認めた。

IL-6 受容体の発現および STAT3 のリン酸化抑制について、T-bet Tg マウスの実験系と T-bet 遺伝子導入系で差がみられた点に関して、Smad2 と Bcl-6 の

発現に着目した。*Smad2* 欠損マウスにおいて IL-17 産生は抑制され、IFN $\gamma$  産生が亢進する (36)。また CD4 陽性細胞における *Smad2* 欠損マウスを用いた検討で IL-6 受容体の発現が抑制され (37)、*Bcl-6* 欠損マウスにおいて T 細胞における IL-6 受容体発現の低下がみられると報告されている (38)。そこで T-bet 過剰発現下における *smad2* ならびに *bcl6* の mRNA 発現を比較検討したところ、T-bet Tg マウスの実験系でのみ IFN $\gamma$  非依存的に *smad2* の mRNA 発現が抑制され、IL-6 受容体発現の低下と同じ傾向を示した。一方で *bcl6* の発現に差はみられなかった。Th1 細胞分化において分化初期と分化後期におけるプロファイルが変化することが考えられており (39)、T-bet Tg マウスについては発生段階で Th 細胞が Th1 に偏向している点 (分化後期)、T-bet 遺伝子導入系においては T-bet が過剰発現した直後で Th1 への偏向が乏しい点 (分化初期) という違いを考えた。Th1 細胞分化誘導における *smad2* の mRNA 発現について経過を追ったところ、*smad2* は時間経過と共に発現低下を示した。T-bet 過剰発現は直接的に *smad2* 発現を抑制はしないが、Th1 細胞環境の時間経過が *smad2* 発現に影響することで、T-bet Tg マウスにおける IL-6 受容体発現が抑制されると推察された。

T-bet Tg マウスの実験系と T-bet 遺伝子導入系において、複数の転写因子について同様の発現傾向がみられた。*nfbiz* がコードする I $\kappa$ B $\zeta$  は Th17 細胞分化

を促進させる分子であり、発現に ROR $\gamma$ t の存在は必要としないものの、ROR $\gamma$ t と協調することで Th17 細胞の機能が発揮されることから (22、40)、本研究の結果において *nfbiz* の発現亢進のみでは Th17 細胞分化促進に至らなかったと考えられる。T-bet 過剰発現下における *nfbiz* の発現亢進メカニズムについて直接的な関連性は明らかではない。I $\kappa$ B $\zeta$  は IFN $\gamma$  産生に関与する Nf- $\kappa$ B の抑制因子であり (41)、IFN $\gamma$  産生亢進によって I $\kappa$ B $\zeta$  が調節因子として発現亢進する可能性は考えられるが、IFN $\gamma$  非依存的な発現亢進を説明するには不十分であり検討の余地がある。Th17 細胞分化に必須といえる分子である STAT3 について (20)、T-bet 過剰発現下に mRNA 発現亢進を認めた。STAT3 の制御に働く分子としては SOCS3 が挙げられるが (42)、T-bet は Bcl-6 と協調して SOCS3 の転写を抑制することが報告されており、STAT3 発現亢進につながると考えられた (43)。Th17 細胞の主要転写因子とされる ROR $\gamma$ t をコードする *rorc* と同様に T-bet 過剰発現下に抑制された *ahr* について Th17 細胞分化制御への関連が考えられた。

AHR は Th17 細胞において発現が認められ、IL-6 と TGF- $\beta$  の刺激で強く誘導される転写因子で、IL-17 や IL-22 といったサイトカイン産生に寄与する (27)。IL-17 欠損マウスだけでなく IL-22 欠損マウスにおける CIA が抑制され (44、45)、AHR 欠損マウスにおける CIA も有意に抑制されることが報告されており

(46)、IL-22 の上流に存在する AHR は Th17 細胞における重要な転写因子と考えられる (47)。我々の検討において、T-bet Tg マウスおよび T-bet 遺伝子導入系のいずれにおいても IFN $\gamma$  非依存的に AHR は蛋白レベルでも発現抑制が示され、AHR リガンド刺激によって IL-17 産生促進効果が阻害された点および AHR 刺激で誘導される *cyp11a1* の発現が抑制された点から、T-bet 過剰発現下に AHR 発現が抑制される確証が示された。AHR の発現に比して *cyp11a1* の発現は高度に抑制されており、T-bet 過剰発現下に *cyp11a1* の上流に位置する他の分子の発現に影響を与えている可能性も考えられた。

T-bet による AHR 発現制御メカニズムが興味深い点であり、T-bet が直接的あるいは間接的に AHR 発現を制御する可能性を考えた。まず直接的な制御として 2 つの可能性を挙げる。1 つ目は IRF4 を介した制御と同様に (35)、T-bet が AHR 遺伝子のプロモーター部位へ直接結合することで転写を制御することが考えられる。もう 1 つは Runx-1 を介して ROR $\gamma$ t 発現を制御するように (34)、ROR $\gamma$ t と結合する他の転写因子に T-bet が結合することで AHR の転写制御する機序である。間接的な制御としては、AHR が誘導される過程における T-bet の関与である。AHR 発現の詳細なメカニズムは明らかではないが、特に IL-6 と TGF $\beta$  の刺激で強く誘導されることから (28)、いずれかの下流シグナルを制御することが AHR 発現抑制につながる可能性がある。しかし本研究の結果から

IL-6/STAT3 経路および TGF $\beta$ 受容体下流の転写因子である Smad2 には、T-bet 発現のみでの関連性は乏しいことが考えられる。T-bet-AHR 間の詳細な制御メカニズムは今後もさらなる検討の余地がある。

最後に T-bet Tg マウスにおける CIA モデルの炎症環境を想定して、CII 免疫後の細胞における転写因子発現評価を行い、*rorc* 発現同様に *ahr* 発現も抑制されることを確認した。この結果のみでは、T-bet Tg マウスにおける CIA の制御に AHR の抑制がどの程度影響しているか証明はできていない。T-bet と AHR の転写因子間の制御メカニズムが Th17 細胞分化ならびに CIA の病態にどこまで影響を与えるかは今後の検討課題である。

図 16 に T-bet による Th17 細胞分化制御について、これまでの知見と合わせて示す。IFN $\gamma$ に依存する経路と依存しない経路が挙げられ、本研究により T-bet 過剰発現による AHR 発現制御が確認され、Th17 細胞分化の新たな制御の可能性を見出すことができた。今後、本研究によって得られた可能性についてヒトの RA における検討を行うことで、関節炎病態における転写因子による制御メカニズムの解明が期待でき、さらには RA の新たな治療戦略発見に結びつけたい。

## 第六章：結論

T-bet 過剰発現によって IFN $\gamma$  非依存的に AHR 発現が抑制され、Th17 細胞分化の制御に関与する可能性が示唆された。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり多大なる御指導をいただいた住田孝之教授、松本功准教授、近藤裕也講師に厚く御礼を申し上げます。

また、本研究における T-bet Tg マウスをご供与いただきました高橋智教授、レトロウイルスベクターを御供与いただきました錦井秀和講師に御礼申し上げます。

そして、本研究に関して数多くの助言をいただきました膠原病・リウマチ・アレルギー内科の研究室の皆様深く感謝いたします。

最後に、私を支え続けてくれた妻と我が子、家族に心から感謝します。

## 参考文献

1. Schiff M, Keiserman M, Coddling C *et al*. Efficacy and safety of abatacept or infliximab vs placebo in ATTEST: a phase III, multi-centre, randomized, double-blind, placebo-controlled study in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate. *Ann Rheum Dis*. 2008; 67(8): 1096-103.
2. Dutta S, Ahmad Y. The efficacy and safety of tacrolimus in rheumatoid arthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2011; 3(6): 283-91.
3. Chabaud M, Durand JM, Buchs N *et al*. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum*. 1999; 42(5): 963-70.
4. Ziolkowska M, Koc A, Luszczkiewicz G *et al*. High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporine A- sensitive mechanism.
5. Leipe J, Grunke M, Dechant C *et al*. Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010; 62(10): 2876-85.
6. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an



experimental model of arthritis. *J Exp Med*. 1977; 146(3): 857-68.

7. Courtenay JS, Dallman MJ, Dayan AD *et al*. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature*. 1980; 283(5748): 666-8.
8. Nakae S, Nambu A, Sudo K *et al*. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol*. 2003; 171(11): 6173-7.
9. Manoury-Schwartz B, Chiochia G *et al*. High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN-gamma receptors. *J Immunol*. 1997; 158(11): 5501-6.
10. Chu CQ, Swart D, Alcorn D *et al*. Interferon-gamma regulates susceptibility to collagen-induced arthritis through suppression of interleukin-17. *Arthritis Rheum*. 2007; 56(4): 1145-51.
11. Kondo Y, Iizuka M, Wakamatsu E *et al*. Overexpression of T-bet gene regulates murine autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum*. 2012; 64(1): 162-72.
12. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996; 383(6603): 787-93.

13. Jetten AM. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl Recept Signal* 2009; 7: e003.
14. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S *et al.* Th17 cells in human disease. *Immunol Rev* 2008; 223: 87-113.
15. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL *et al.* A novel transcription factor, Tbet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000; 100: 655-69.
16. Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C *et al.* Distinct effects of Tbet in TH1 lineage commitment and IFN- $\gamma$  production in CD4 and CD8 T cells. *Science* 2002; 295: 338-342.
17. Afkarian M, Sedy JR, Yang J *et al.* Tbet is a STAT1- induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Immunol* 2002; 3: 549-57.
18. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T<sub>H</sub>-17 cells requires transforming growth factor- $\beta$  and induction of the nuclear receptor ROR $\gamma$ t. *Nat Immunol* 2008; 9: 641-9.
19. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L *et al.* The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells. *Cell* 2006; 126: 1121-33.

20. Mori T, Miyamoto T, Yoshida H *et al.* IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ -initiated IL-6-STAT3 pathway is critical in mediating inflammatory cytokines and RANKL expression in inflammatory arthritis. *Ing Immunol.* 2011; 23(11): 701-12.
21. Yang XO, Pappu BP, Nurieva R *et al.* T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. 2008; 28(1): 29-39.
22. Okamoto K, Iwai Y, Oh-Hora M *et al.* I $\kappa$ B $\zeta$  regulates T<sub>H</sub>17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature* 2010; 464: 1381-5.
23. Brüstle A, Heink S, Huber M *et al.* The development of inflammatory T<sub>H</sub>-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol* 2007; 8: 958-66.
24. Ciofani M, Madar A, Galan C *et al.* A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell* 2012; 151: 289-303.
25. Zhang F, Meng G, Strober W. Interactions among the transcription factors Runx1, ROR $\gamma$ t and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* 2008; 9: 1297-306.
26. Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM *et al.* The aryl hydrocarbon

receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins.

Nature 2008; 453: 106-9.

27. Zhou L. AHR function in lymphocytes: Emerging concepts. Trends Immunol 2016; 37: 17-31.

28. Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH *et al.* Control of T<sub>reg</sub> and T<sub>H</sub>17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. Nature 2008; 453: 65-71.

29. Zhou L, Lopes JE, Chong MM *et al.* TGF- $\beta$ -induced Foxp3 inhibits T<sub>H</sub>17 cell differentiation by antagonizing ROR $\gamma$ t function. Nature 2008; 453: 236-40.

30. Hwang ES, Szabo SJ, Schwartzberg PL *et al.* T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of Tbet with GATA-3. Science 2005; 307: 430-3.

31. Tanaka K, Ichiyama K, Hashimoto M *et al.* Loss of suppressor of cytokine signaling 1 in helper T cells leads to defective Th17 differentiation by enhancing antagonistic effects of IFN- $\gamma$  on STAT3 and Smads. J Immunol. 2008; 180(6): 3746-56.

32. Lazarevic V, Chen X, Shim JH *et al.* Tbet represses T<sub>H</sub>17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding ROR $\gamma$ t.

Nat Immunol 2011; 12:96-104.

33. Gökmen MR, Dong R, Kanhere A *et al.* Genome-wide regulatory analysis reveals that T-bet controls Th17 lineage differentiation through direct suppression of IRF4. J Immunol 2013; 191: 5925-32.
34. Ishizaki K, Yamada A, Yoh K *et al.* Th1 and type 1 cytotoxic T cells dominate responses in T-bet overexpression transgenic mice that develop contact dermatitis. J Immunol. 2007; 178(1): 605-12.
35. Suto A, Kashiwakuma D, Kagami S *et al.* Development and characterization of IL-21-producing CD4<sup>+</sup> T cells. J Exp Med 2008; 205: 1369-79.
36. Takimoto T, Wakabayashi Y, Sekiya T *et al.* Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF-beta-mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development. J Immunol. 2010; 185(2): 842-55.
37. Malhotra N, Robertson E, Kang J. Smad2 is essential for TGFβ-mediated Th17 cell generation. J Biol Chem. 2010; 285(38): 29044-8.
38. Nurieva RI, Chung Y, Martinez GJ *et al.* Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. Science. 2009; 325(5943): 1001-5.
39. Nakayamada S, Kanno Y, Takahashi H *et al.* Early Th1 cell

- differentiation is marked by a Tfh cell-like transition. *Immunity*. 2011; 35: 919-31.
40. Maruyama T, Kobayashi S, Ogasawara K *et al*. Control of IFN- $\gamma$  production and regulatory function by the inducible nuclear protein I $\kappa$ B- $\zeta$  in T cells. *J Leukoc Biol*. 2015; 98(3): 385-93.
  41. Yamamoto M, Yamazaki S, Uematsu S *et al*. Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein I $\kappa$ B $\zeta$ . *Nature*. 2004; 430(6996): 218-22.
  42. Lu Y, Fukuyama S, Yoshida R *et al*. Loss of SOCS3 gene expression converts STAT3 function from anti-apoptotic to pro-apoptotic. *J Biol Chem*. 2006; 281(48): 36683-90.
  43. Oestreich KJ, Huang AC, Weinmann AS. The lineage-defining factors Tbet and Bcl-6 collaborate to regulate Th1 gene expression patterns. *J Exp Med*. 2011; 28(5): 1001-13.
  44. Geboes L, Dumoutier L, Kelchtermans H *et al*. Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice. *Arthritis Rheum*. 2009; 60(2): 390-5.
  45. Corneth OB, Reijmers RM, Mus AM *et al*. Loss of IL-22 inhibits

autoantibody formation in collagen-induced arthritis in mice. *Eur J Immunol.* 2016; 46(6): 1404-14.

46. Nakahama T, Kimura A, Nguyen NT *et al.* Aryl hydrocarbon receptor deficiency in T cells suppresses the development of collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 14222-7.

47. Kimura A, Naka T, Nohara K *et al.* Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 9721-6.

## 主要略語一覧

本論文において用いた主な略語を以下に示す。

AHR	Aryl hydrocarbon receptor
Cyp	Cytochrome P450
IRF	Interferon regulatory factor
I $\kappa$ B	Inhibitor of NF- $\kappa$ B
ROR	Retinoic acid-related orphan Receptor
Runx	Runt-related transcription factor
RA	Rheumatoid arthritis
RV	Retrovirus vector
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TCR	T cell receptor
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
Th1	Type 1 helper T
Th2	Type 2 helper T
Th17	IL-17-producing helper T
Tfh	Follicular helper T



## 図表

### 図 1 T-bet Tg マウスの Th17 細胞分化誘導下におけるサイトカイン産生および転写因子発現

Th17 細胞分化誘導を行い、サイトカイン産生および転写因子発現を FCM で解析した。上段に IFN $\gamma$ および IL-17 産生の展開図を示した（対照群：Th0）。下段には Th17 細胞分化条件下における IFN $\gamma$ と IL-17 産生および T-bet と ROR $\gamma$ t 発現についてまとめた。データは平均 $\pm$ 標準誤差で示したもので（n=5）、T-bet および ROR $\gamma$ t については MFI ratio（MFI [specific antibody]/MFI [isotype]）で検討した（\*P<0.05、\*\*P<0.01、Tukey's test）。

### 図 2 T-bet Tg マウスにおける IL-6 受容体（CD126、CD130）発現

CD4 陽性細胞上の IL-6 受容体の構成分子である CD126 および CD130 について FCM で解析した。上段にはヒストグラムを示し（灰色部分はアイソタイプコントロール）、下段のグラフは平均 $\pm$ 標準誤差を示したもので（n=5）、MFI ratio で検討した（\*\*P<0.01、Tukey's test）。

### 図 3 T-bet Tg マウスにおける STAT3 のリン酸化評価

CD4 陽性細胞に対して IL-6 刺激を加え、0 分、15 分、30 分、60 分後のリン酸化 STAT3 を FCM で解析した。上段にはヒストグラムを示し（灰色部分はアイソタイプコントロール）、下段にはリン酸化 STAT3 陽性細胞の時間経過をグラフに示した。データは平均±標準誤差で示したものである（n=5）。刺激後 15 分時のみ正規分布に従わず Kruskal-Wallis test で検定し、その他は Tukey's test で検定した（\*P<0.05、\*\*P<0.01）。

#### 図 4 T-bet Tg マウスにおける Th17 細胞関連転写因子の mRNA 発現

Th17 細胞分化誘導後に mRNA の抽出を行い、Th17 細胞の関連転写因子 (*tbx21*, *rorc*, *stat3*, *stat1*, *runx1*, *irf4*, *nfbiz*, *ahr*) について定量 PCR で検出した。データは平均±標準誤差で示した（n=4）（\*P<0.05、\*\*P<0.01、Tukey's test）。

#### 図 5 T-bet 遺伝子導入系における Th17 細胞分化誘導下におけるサイトカイン産生および転写因子発現

ウイルス感染後に Th17 細胞分化誘導を行い、サイトカイン産生および転写因子発現を FCM で解析した。上段に IFN $\gamma$ および IL-17 産生の展開図を示した。下段には Th17 細胞分化条件下における IFN $\gamma$ と IL-17 産生および T-bet と ROR $\gamma$ t 発現についてまとめた。データは平均±標準誤差で示したもので（n=4）、

T-bet および ROR $\gamma$ t については MFI ratio (MFI [specific antibody]/MFI [isotype]) で検討した (\*P<0.05、\*\*P<0.01、Tukey's test)。

#### 図 6 Th17 細胞分化誘導下の培養上清中サイトカイン評価

Th17 細胞分化誘導下の培養上清中の IFN $\gamma$ および IL-17 の濃度を ELISA で測定した。データは平均±標準誤差で示した (n=4) (\*\*P<0.01、Tukey's test、N.D.: Not detectable)。

#### 図 7 T-bet 遺伝子導入系における IL-6 受容体 (CD126、CD130) 発現

ウイルス感染後、CD4 陽性細胞上の CD126 および CD130 について FCM で解析した。上段にはヒストグラムを示し (灰色部分はアイソタイプコントロール)、下段のグラフは平均±標準誤差を示したもので (n=3)、MFI ratio を用いて検討した (Tukey's test)。T-bet RV 群と empty RV 群で有意差は認められなかった。

#### 図 8 T-bet 遺伝子導入系における STAT3 のリン酸化評価

ウイルス感染細胞を GFP でソーティングし、IL-6 刺激を加え、0 分後、15 分後、60 分後にリン酸化 STAT3 を FCM で解析した。上段にはヒストグラムを示

し（灰色部分はアイソタイプコントロール）、下段にはリン酸化 STAT3 陽性細胞の時間経過をグラフに示した。データは平均±標準誤差で示したもので (n=3) (Tukey's test)、T-bet RV 群と empty RV 群で有意差は認められなかった。

#### 図 9 T-bet 遺伝子導入系における Th17 細胞関連転写因子の mRNA 発現

ウイルス感染細胞をソーティングし、Th17 細胞分化誘導後に mRNA の抽出を行って、Th17 細胞の関連転写因子 (*tbx21*, *rorc*, *stat3*, *stat1*, *runx1*, *irf4*, *nfbiz*, *ahr*) について定量 PCR で検出した。データは平均±標準誤差で示した (n=5)。  
(\*P<0.05、\*\*P<0.01、Tukey's test または Kruskal-Wallis test)。

#### 図 10 T-bet 過剰発現下における IL-6R 関連転写因子の mRNA 発現

WT マウス、T-bet Tg マウス、T-bet Tg/IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスの CD4 陽性細胞およびウイルス感染後にソーティングした CD4 陽性細胞から mRNA の抽出を行い、*tbx21*, *smad2*, *bcl6* について定量 PCR で検出した。また WT マウスおよび IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスの CD4 陽性細胞を Th1 細胞分化誘導した後に mRNA の抽出を行い、*smad2* について定量 PCR で検出した。データは平均±標準誤差で示した (n=4) (\*P<0.05、\*\*P<0.01、CD4 陽性細胞の検討は Tukey's test、Th1 分化誘導における検討は Paired t-test)。

### 図 11 T-bet 過剰発現下における AHR の蛋白発現

T-bet 過剰発現下に Th17 細胞分化誘導後に AHR 発現を FCM で解析した。(1) T-bet Tg マウス、(2) T-bet 遺伝子導入系。グラフは平均±標準誤差を示したもので (n=4)、MFI ratio で検討した (\*P<0.05、Tukey's test)。

### 図 12 T-bet Tg マウスの Th17 細胞分化誘導下における FICZ 添加による IL-17 産生亢進の評価

Th17 細胞分化誘導条件に AHR リガンドである FICZ 300nM を添加して、IL-17 産生亢進効果について FCM で解析した。データは平均±標準誤差で示した (n=5) (\*P<0.05、\*\*P<0.01、Tukey's test)。

### 図 13 T-bet 遺伝子導入系の Th17 細胞分化誘導下における FICZ 添加による IL-17 産生亢進の評価

ウイルス感染後の Th17 細胞分化誘導条件に FICZ 300nM を添加して、IL-17 産生亢進効果について FCM で解析した。データは平均±標準誤差で示した (n=3) (\*P<0.05、\*\*P<0.01、Tukey's test)。

#### 図 14 T-bet 過剰発現下の FICZ 添加時における *cyp1a1* の mRNA 発現

AHR リガンド刺激によって誘導される *cyp1a1* について、FICZ を添加した Th17 細胞分化誘導後に mRNA の抽出を行い定量 PCR で検出した。(1) T-bet Tg マウス、(2) T-bet 遺伝子導入系。グラフは平均±標準誤差を示した (n=4) (\*\*P<0.01、Tukey's test)。

#### 図 15 CII 反応性の IL-17 ならびに転写因子発現

CII 免疫後 10 日目の WT マウスならびに T-bet Tg マウスから鼠径リンパ節を採取し、リンパ節細胞を CII 存在下で追加培養した。培養上清中の IL-17 を ELISA で測定し、細胞から MACS で CD4 陽性細胞を単離した後に mRNA を抽出して定量 PCR で *tbx21*、*rorc*、*ahr* について定量 PCR で検出した。グラフは平均±標準誤差を示した (n=4) (\*P<0.05、\*\*P<0.01、Tukey's test、N.D.: Not detectable)。

#### 図 16 T-bet による Th17 細胞分化制御

T-bet による Th17 細胞分化制御について、IFN $\gamma$  から STAT1 および SOCS3 を介した STAT3 発現抑制が想定される IFN $\gamma$  依存経路と IFN $\gamma$  の関与を伴わない T-bet による転写因子間での抑制が想定される IFN $\gamma$  非依存経路に分けて示した。

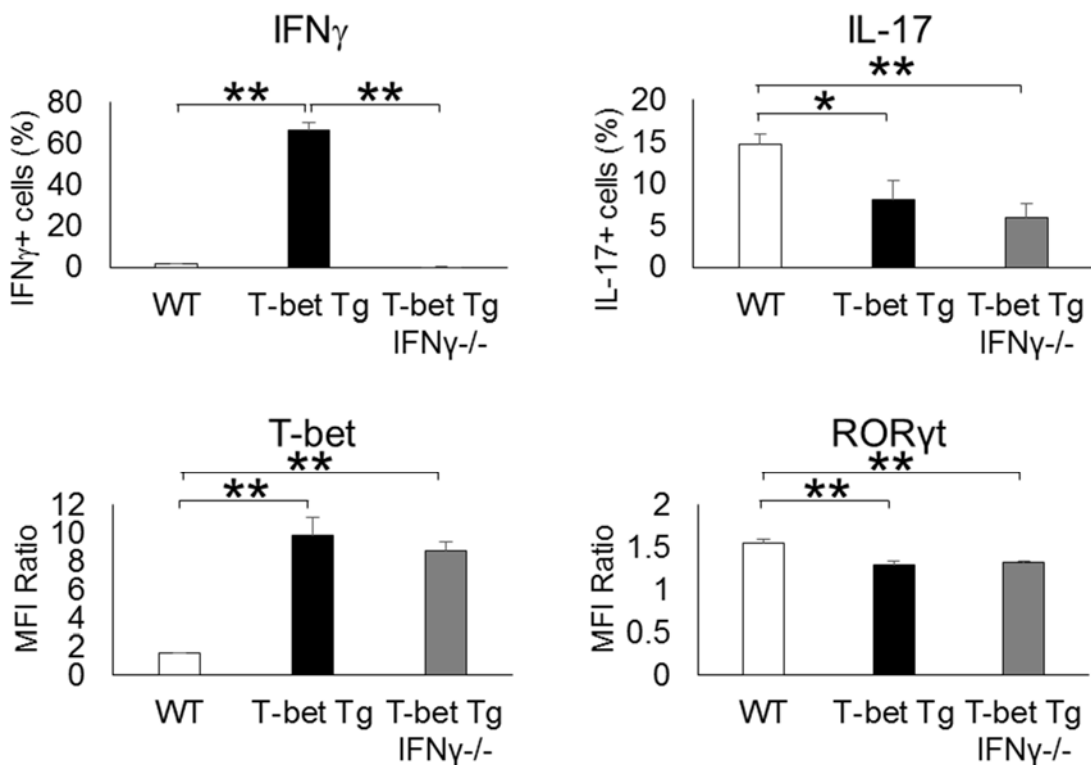
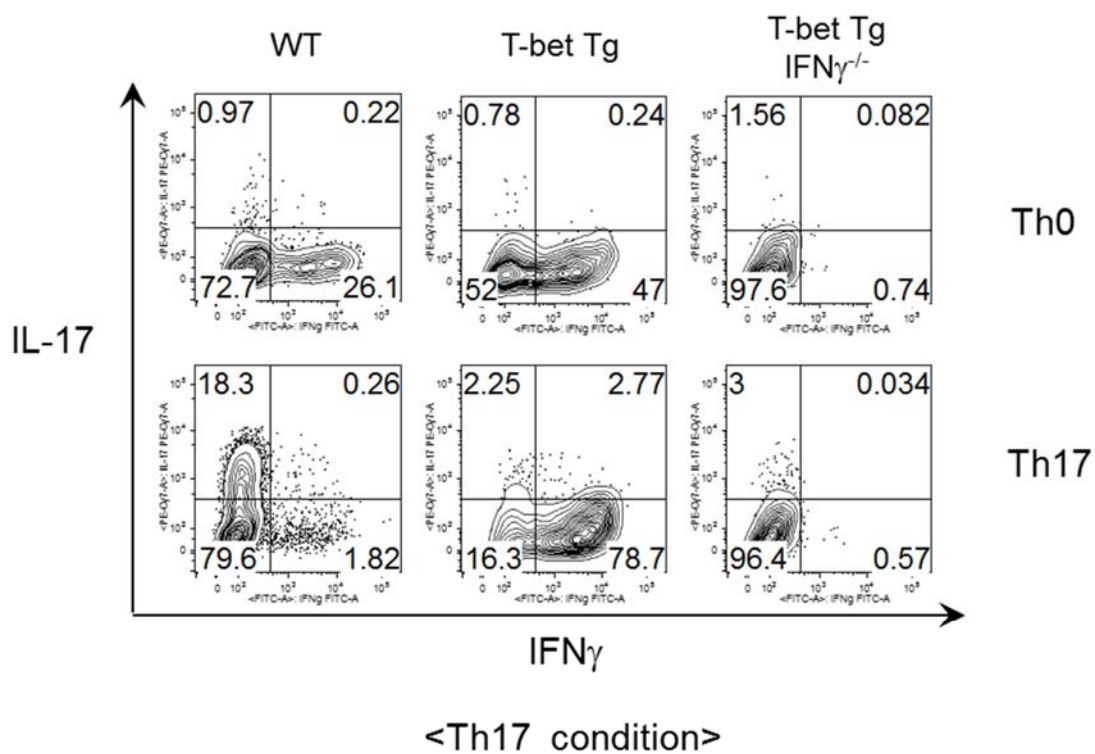


図1 T-bet Tg マウスの Th17 細胞分化誘導下における  
サイトカイン産生および転写因子発現

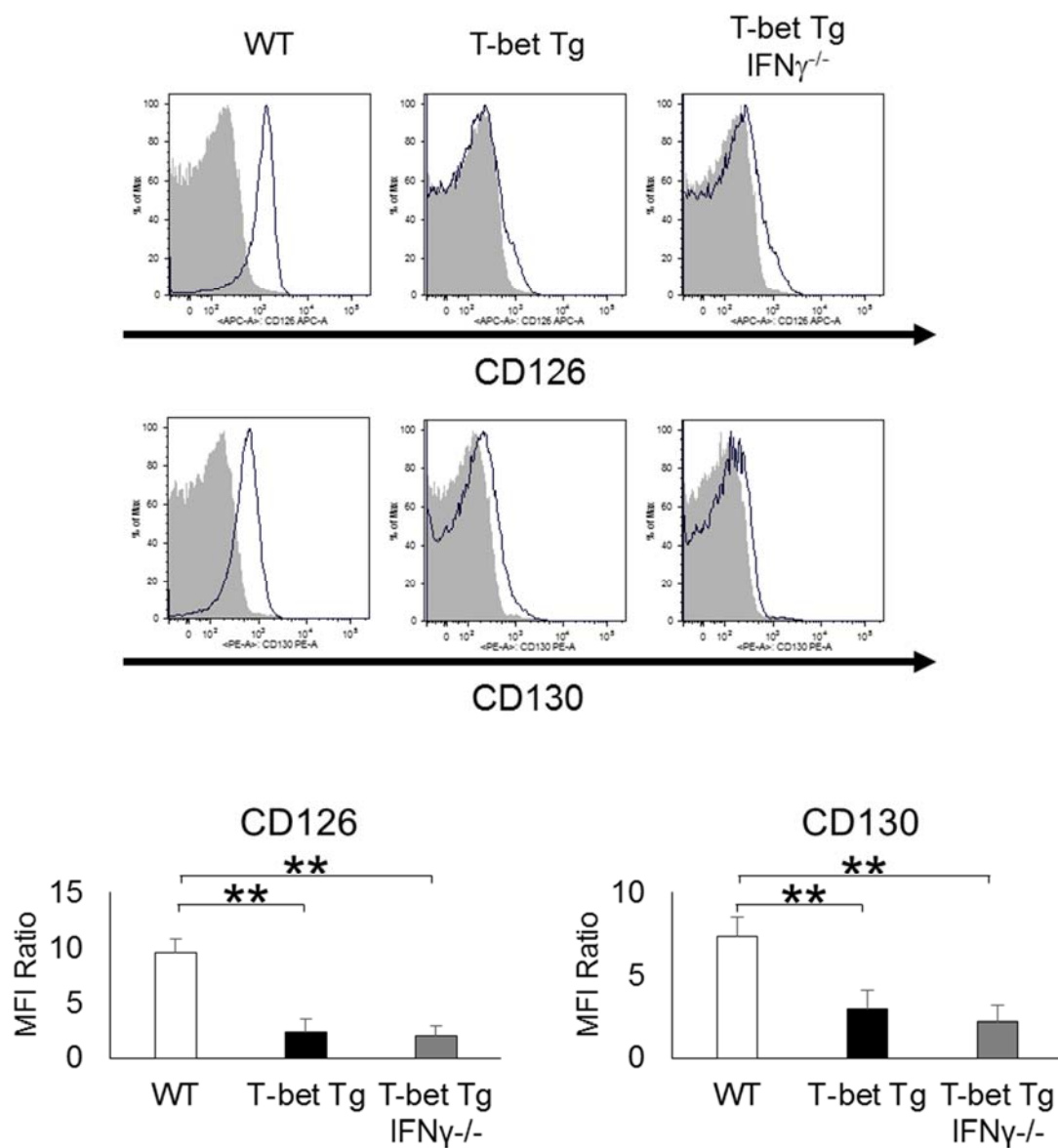


図2 T-bet Tg マウスの CD4 陽性細胞における IL-6 受容体 (CD126、CD130) 発現



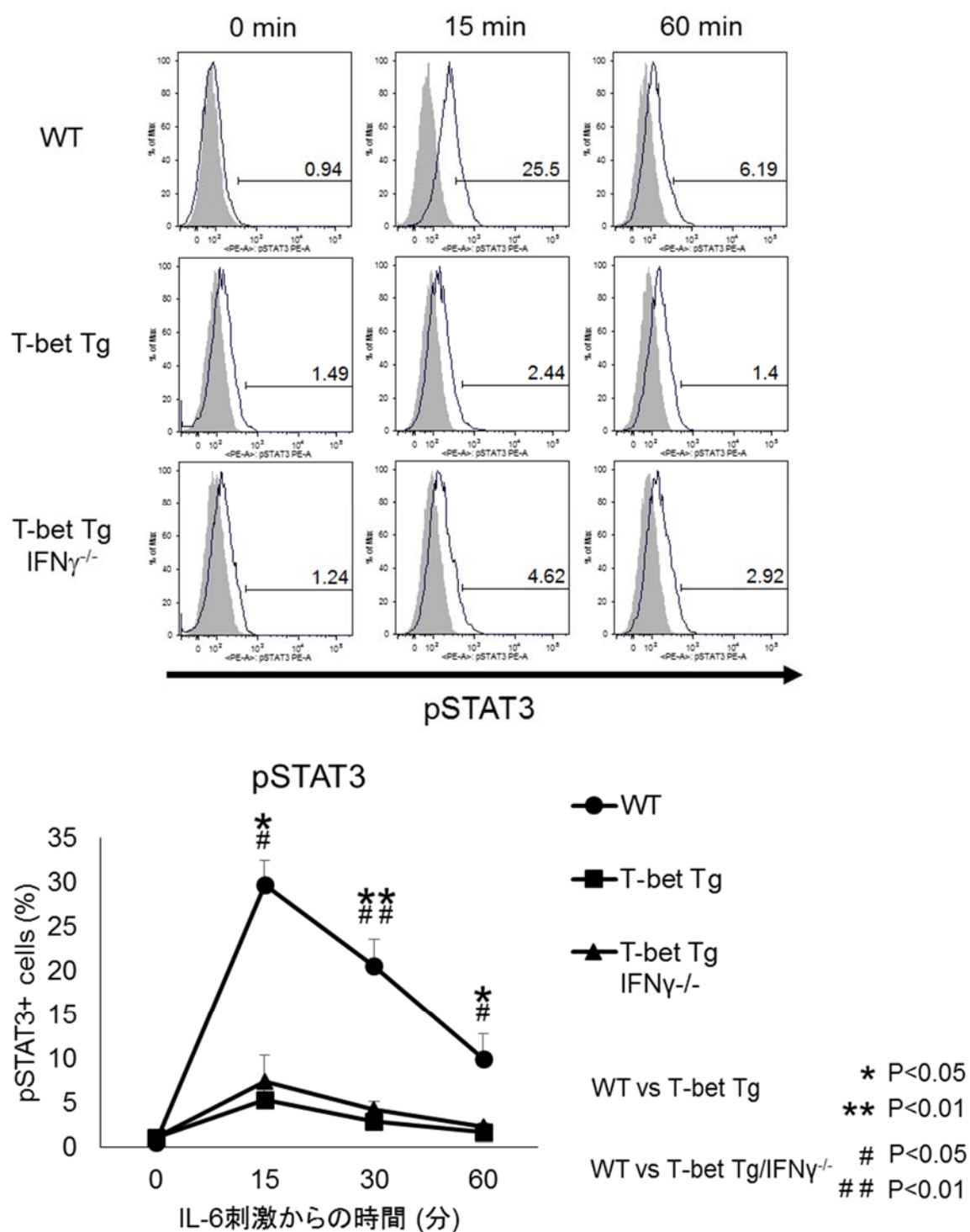


図3 T-bet Tg マウスにおける STAT3 のリン酸化評価

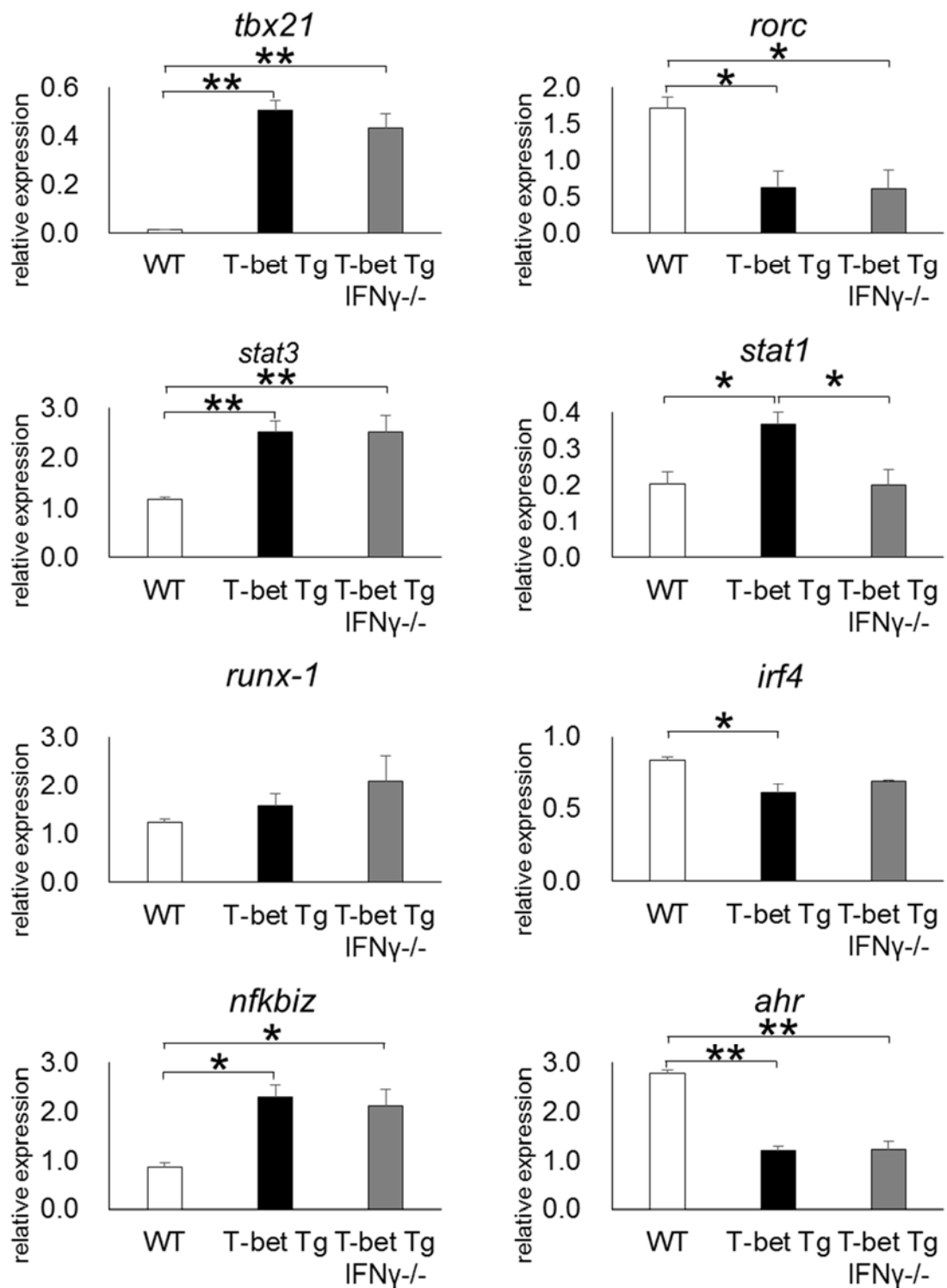


図4 T-bet Tg マウスにおける Th17 細胞関連転写因子の mRNA 発現

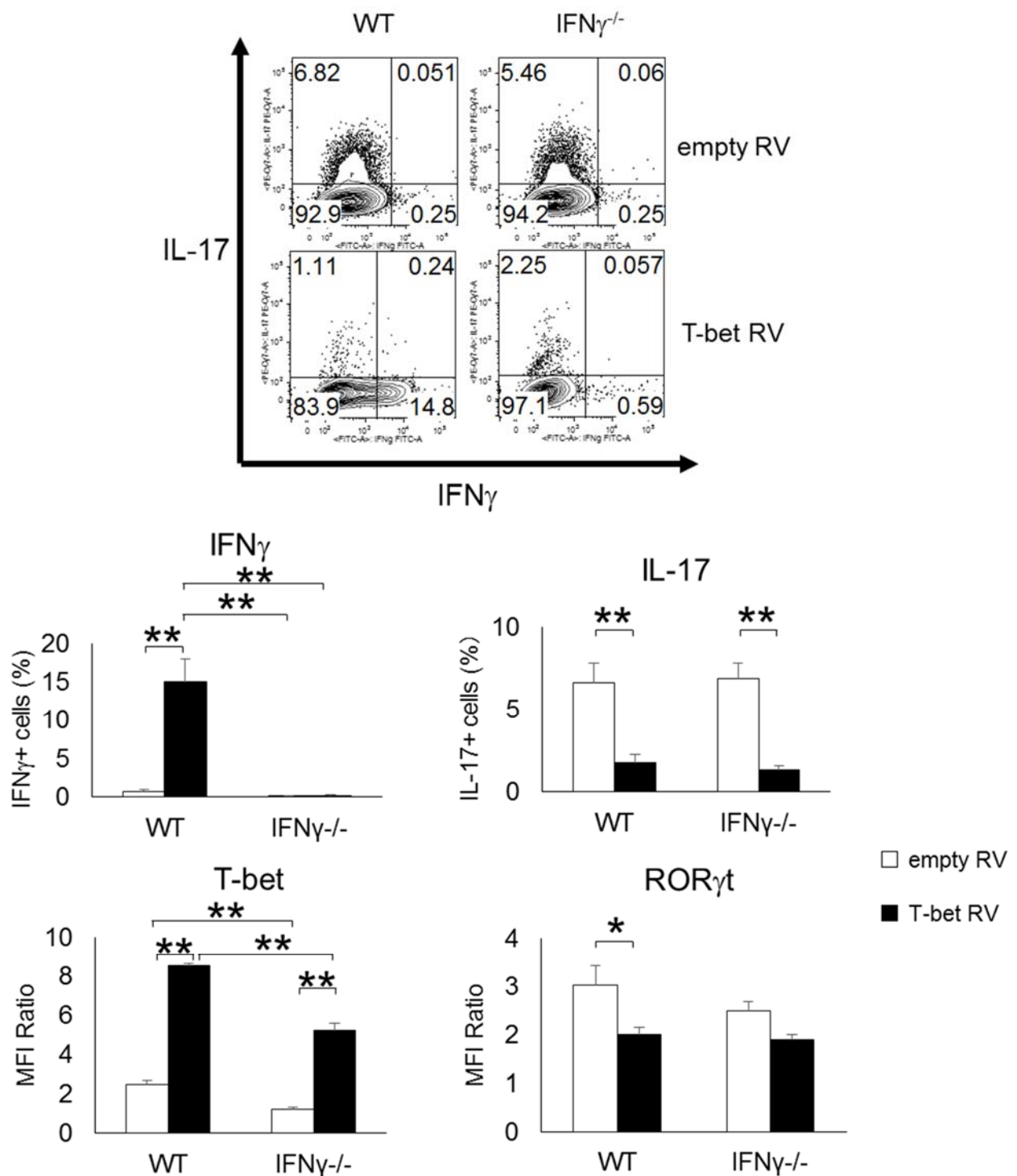


図5 T-bet 遺伝子導入系における Th17 細胞分化誘導下におけるサイトカイン産生および転写因子発現

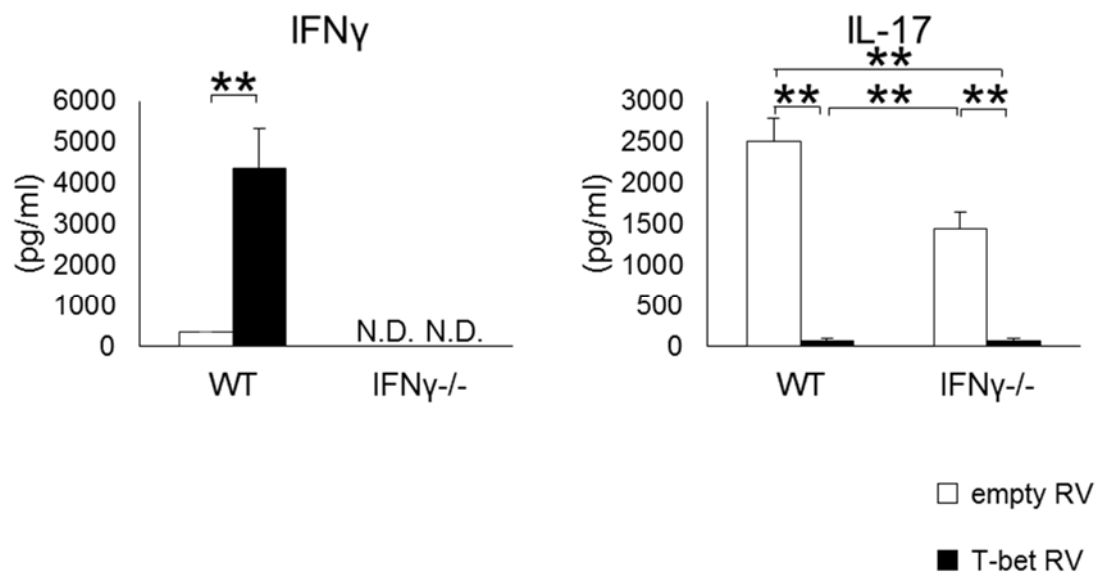


図 6 Th17 細胞分化誘導下の培養上清中サイトカイン評価

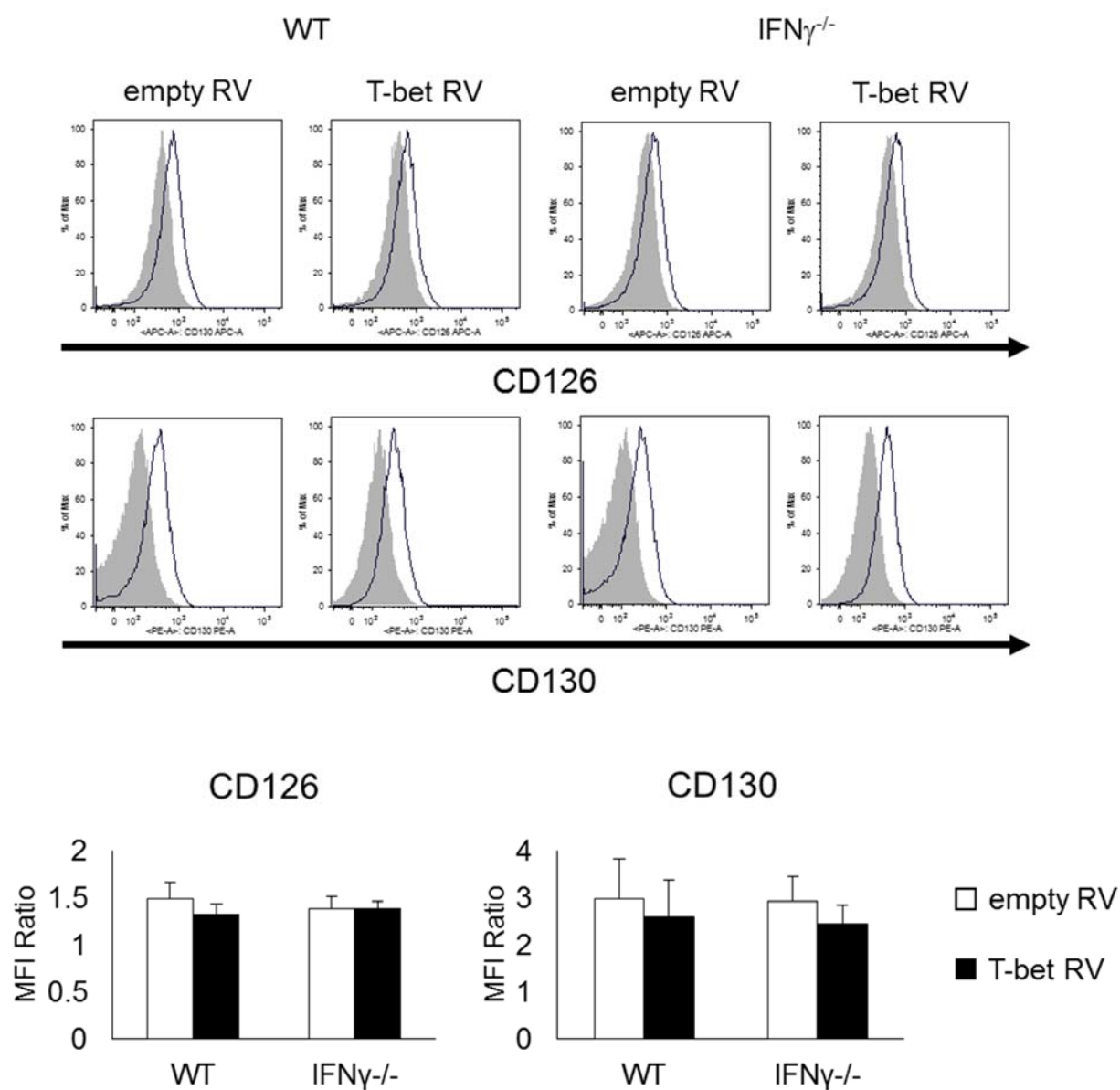


図7 T-bet 遺伝子導入系における IL-6 受容体 (CD126、CD130) 発現

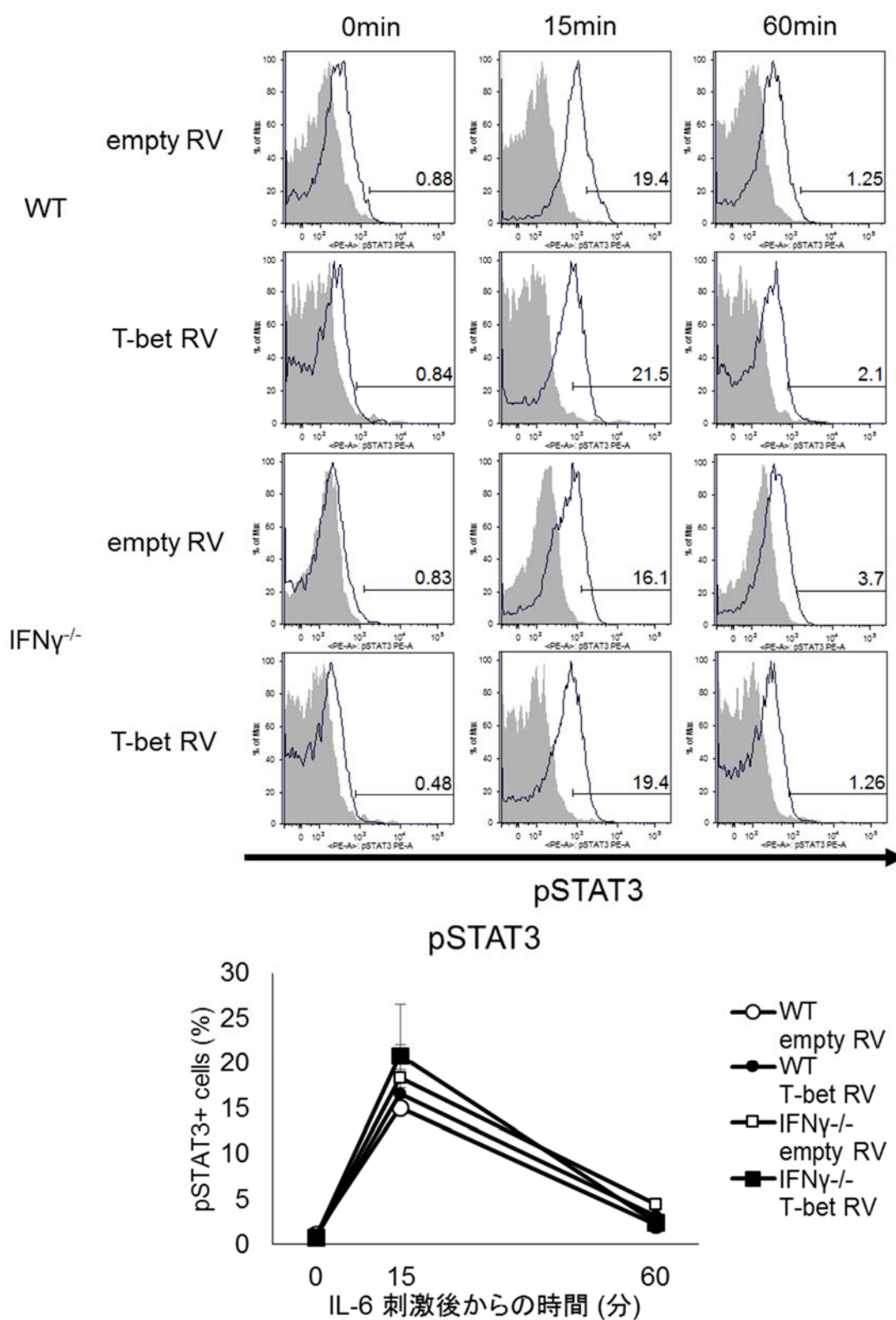


図8 T-bet 遺伝子導入系における STAT3 のリン酸化評価

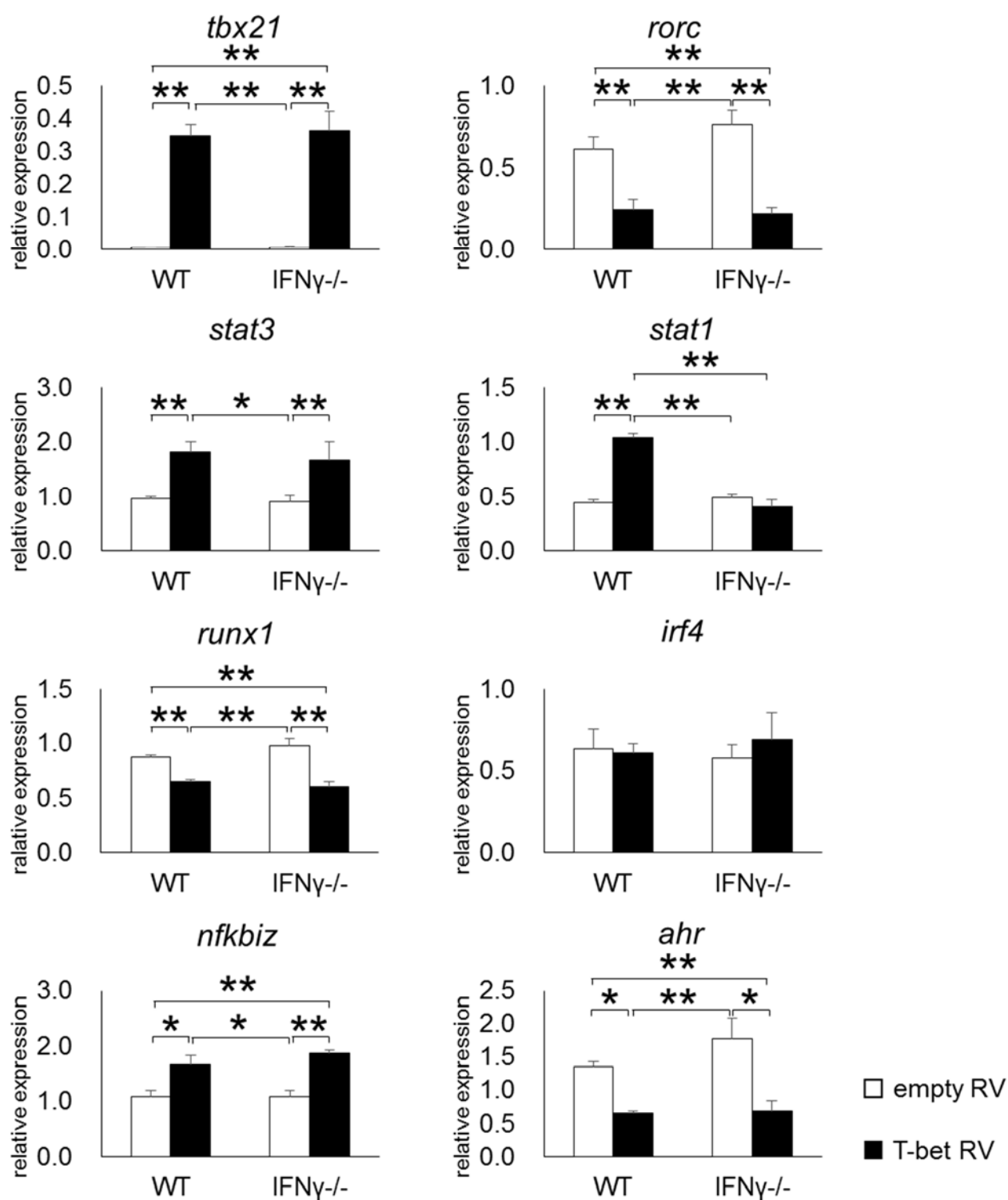


図9 T-bet 遺伝子導入系における Th17 細胞関連転写因子  
の mRNA 発現

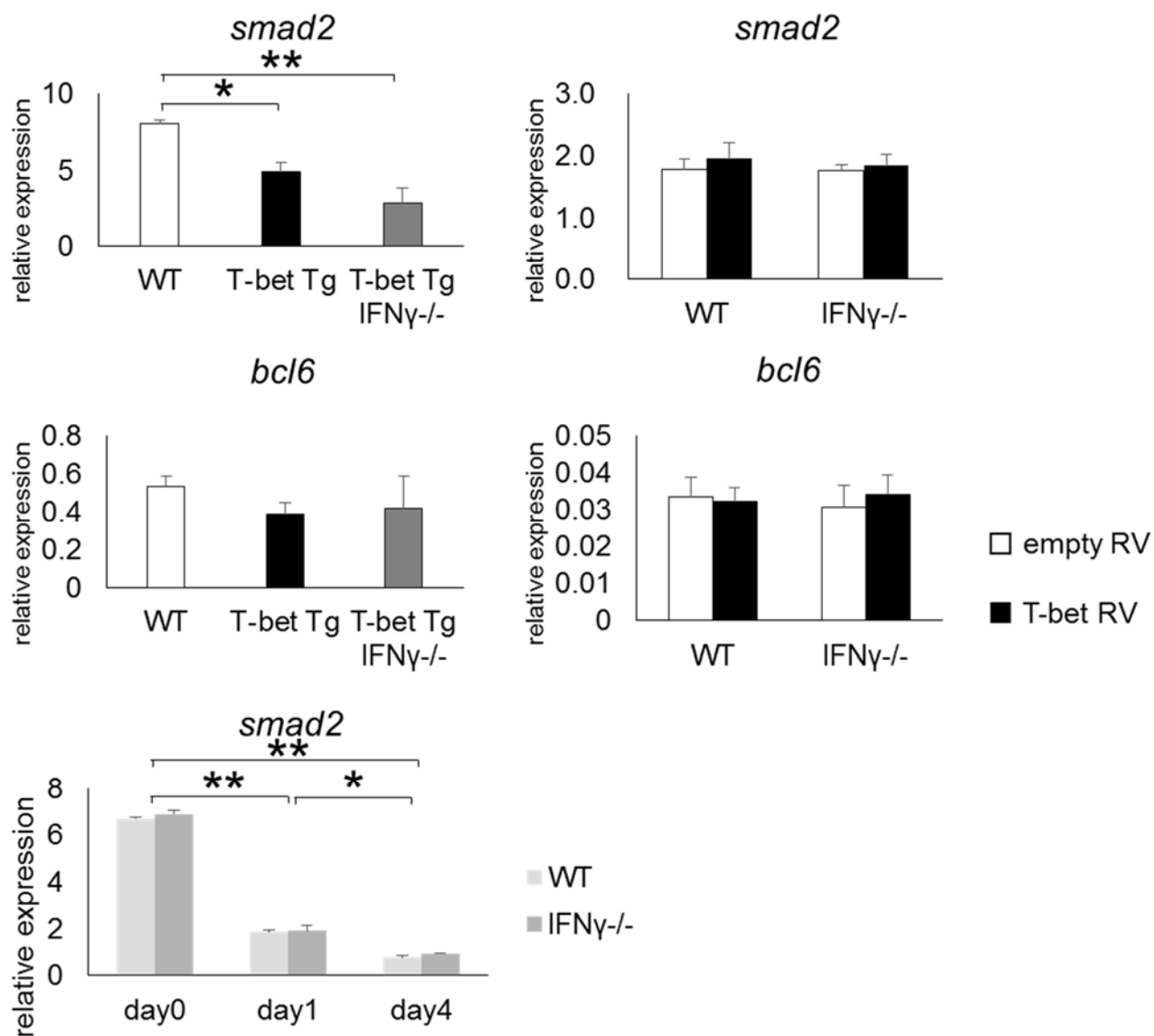
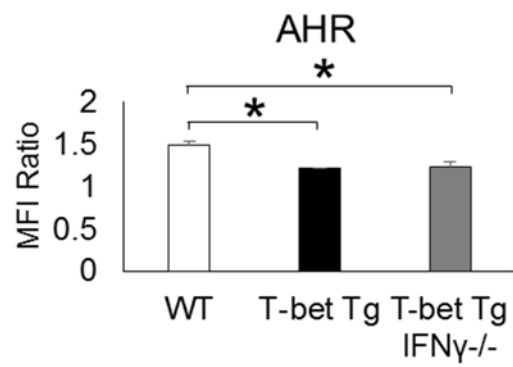


図 10 T-bet 過剰発現下における IL-6R 関連転写因子の mRNA 発現



(1)



(2)

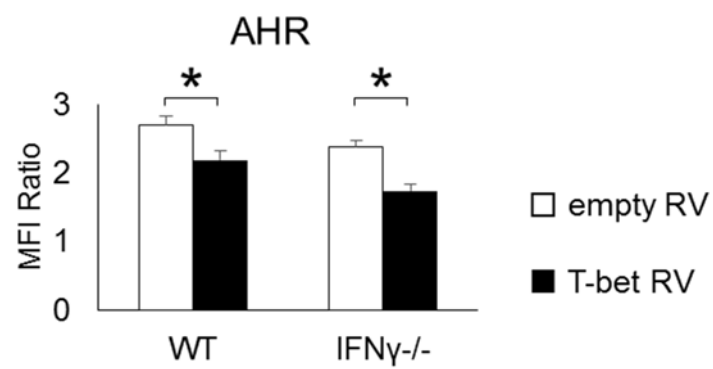


図 11 T-bet 過剰発現下における AHR の蛋白発現

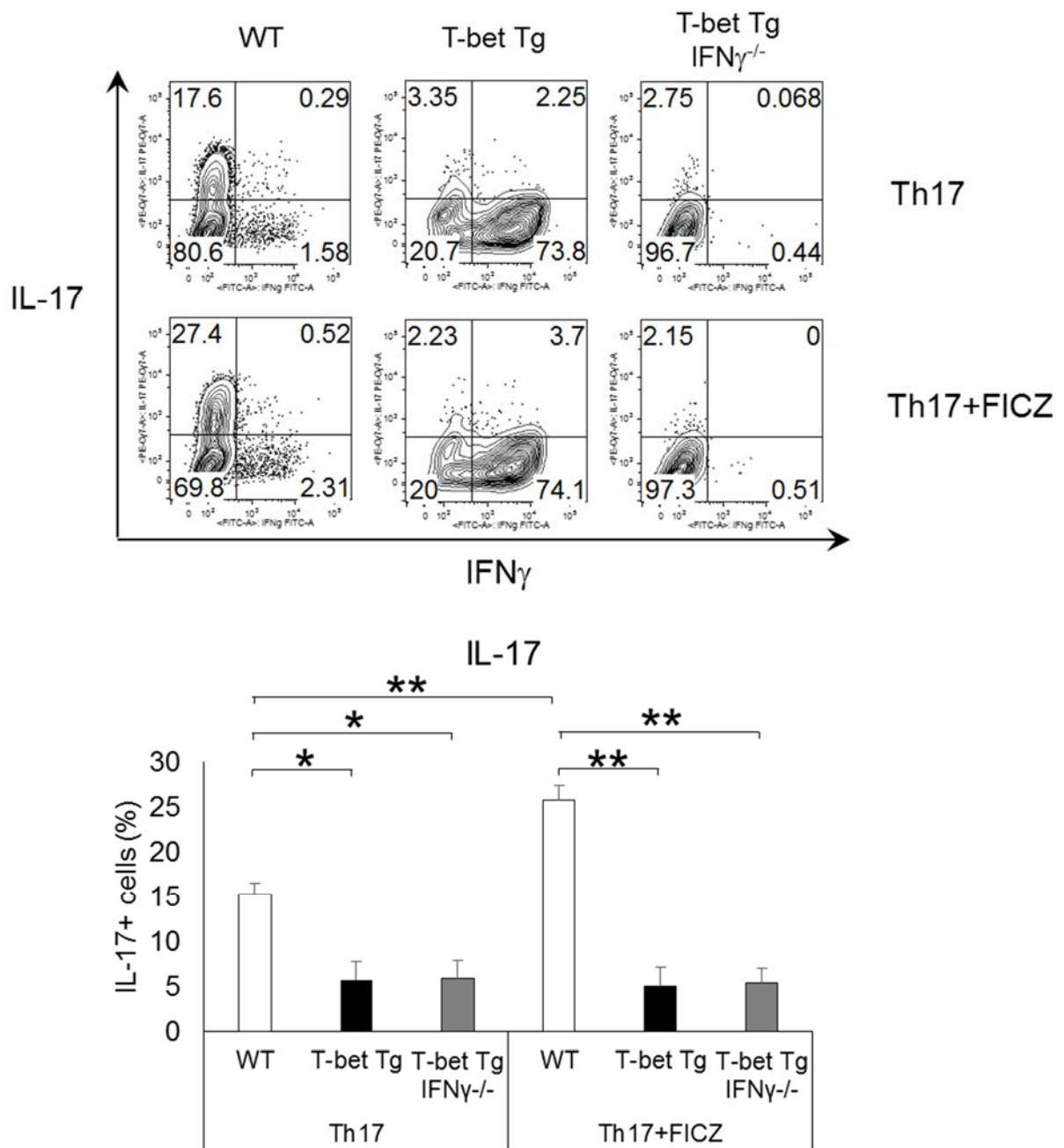


図 12 T-bet Tg マウスの Th17 細胞分化誘導下における  
FICZ 添加による IL-17 産生亢進の評価

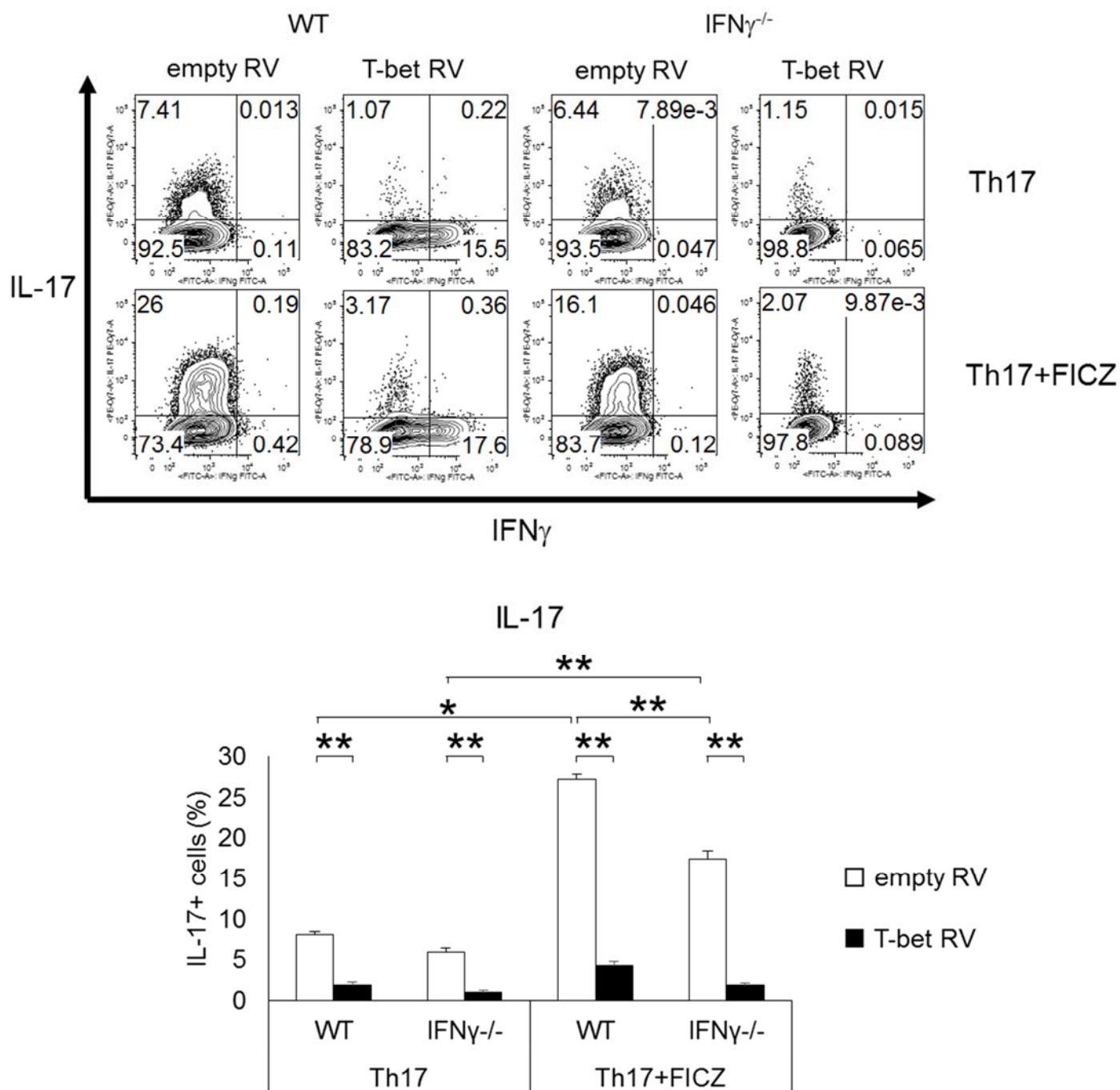
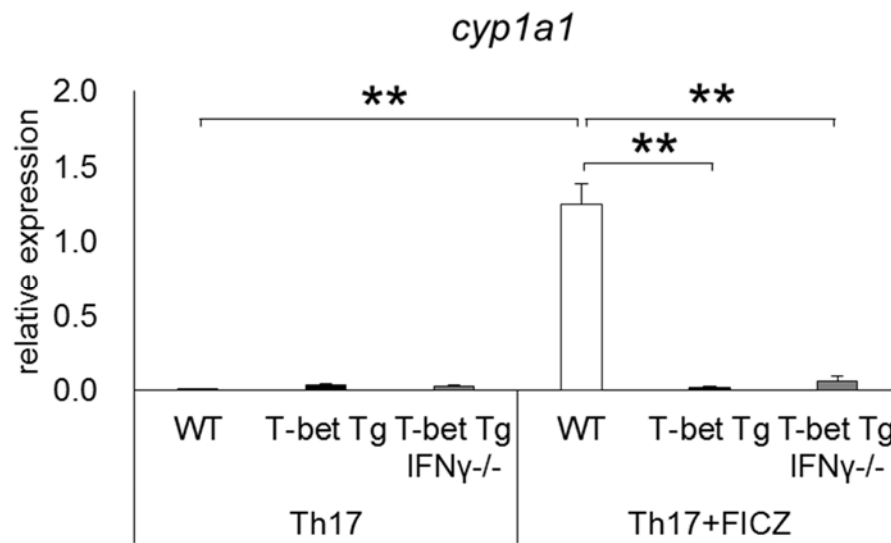


図 13 T-bet 遺伝子導入系の Th17 細胞分化誘導下における FICZ 添加による IL-17 産生亢進の評価

(1)



(2)

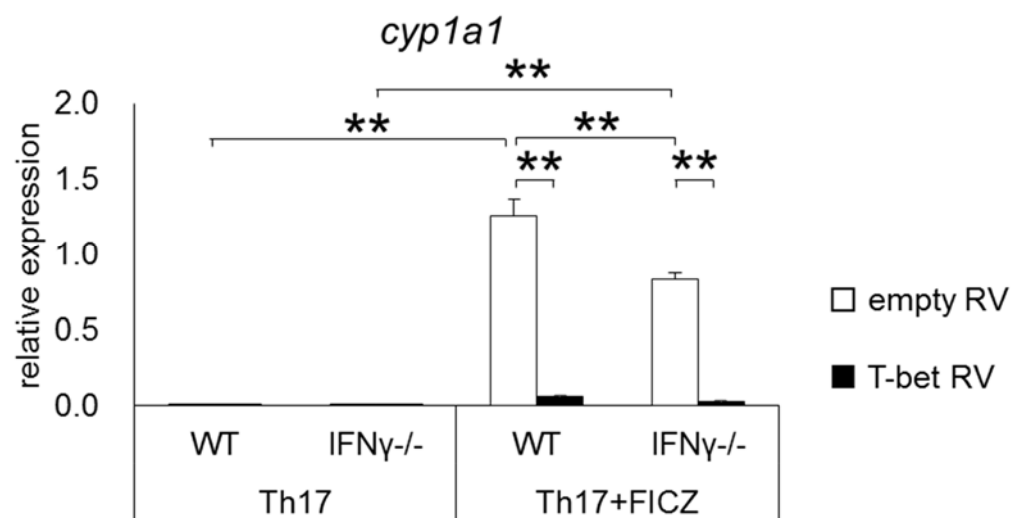


図 14 T-bet 過剰発現下の FICZ 添加時における *cyp1a1* の mRNA 発現

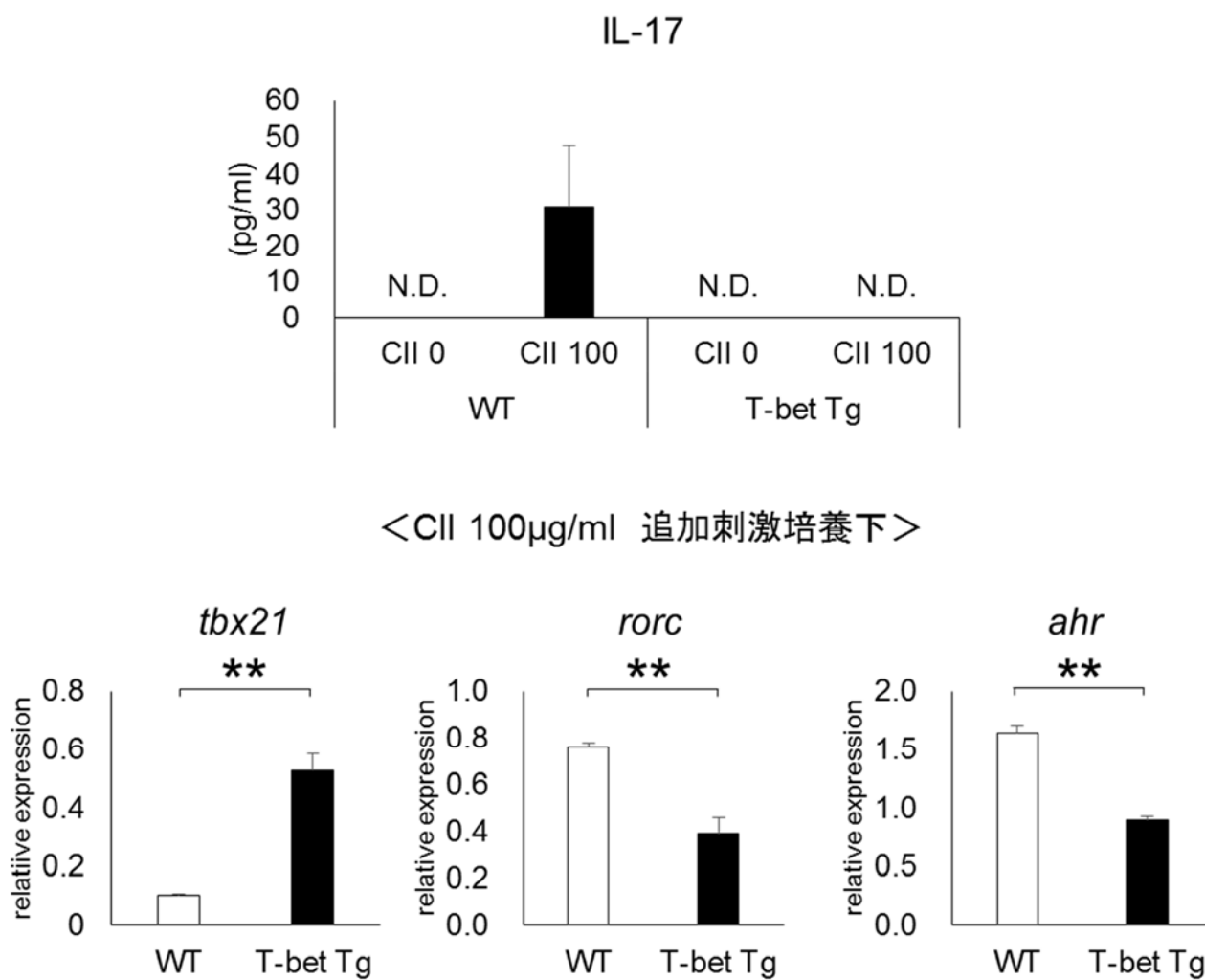
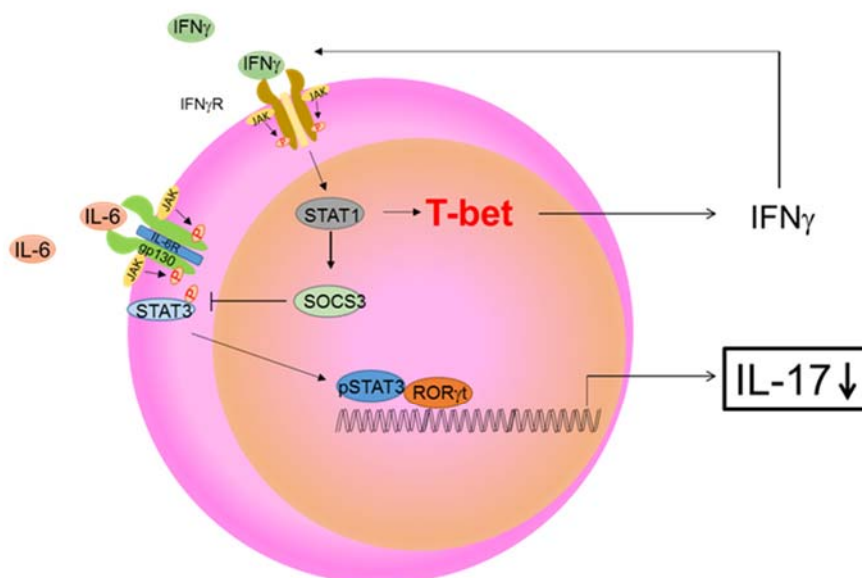


図 15 CII 反応性の IL-17 産生ならびに転写因子発現

### IFN $\gamma$ dependent pathway



### IFN $\gamma$ independent pathway

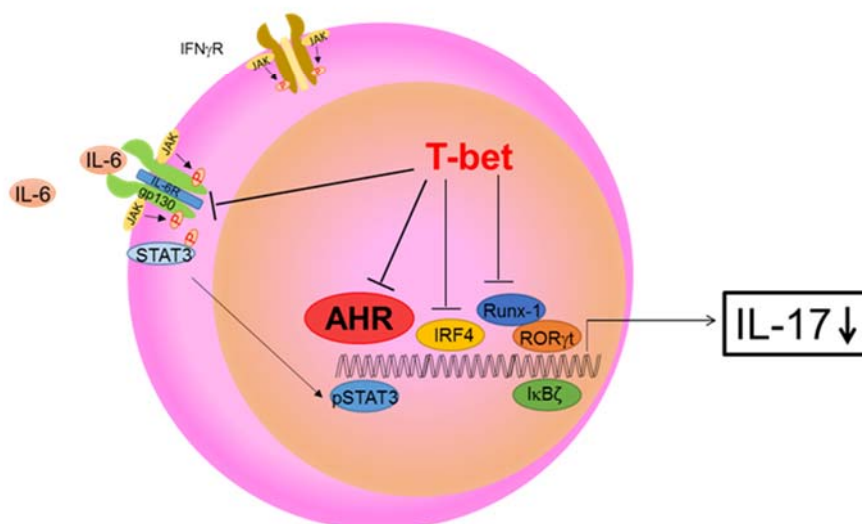


図 16 T-bet による Th17 細胞分化制御