

## 論文の内容の要旨

### **The functional role of KLF5 in effector CD4<sup>+</sup> T cells** (CD4 陽性 T 細胞における KLF5 の機能とその役割)

加茂 雄大

転写因子 KLF5 は Krüppel 様転写因子ファミリーと呼ばれる転写因子群の一つであり、個体の発生、細胞の増殖と分化、癌などの病態形成で重要であることが知られており、心血管疾患、メタボリックシンドローム、慢性腎臓病でも重要な働きをしていることが明らかになっている。血管傷害に対する応答として、KLF5 は血管平滑筋の形質転換および血管リモデリングに重要な遺伝子の発現を制御している。平滑筋におけるこの KLF5 の働きの一部は RAR と KLF5 の相互作用を介する。また心臓に圧負荷を与えると、KLF5 は心臓線維芽細胞で心臓リモデリングに重要な遺伝子の発現を制御する。KLF5 は脂肪細胞の分化を制御する転写因子ネットワークの重要な構成要素でもある。また骨格筋では、KLF5 は PPAR $\delta$  との相互作用を介して脂肪酸燃焼に関わる遺伝子群の発現を制御している。さらに腎臓の傷害に対する応答として、KLF5 は腎臓に集積するマクロファージの機能を調節することによって炎症の過程を制御する。このように KLF5 は心血管疾患、メタボリックシンドローム、慢性腎臓病において多様な機能を果たしている。

KLF5 は心血管疾患や慢性腎臓病の炎症過程において重要な役割を果たしているが、KLF5 が免疫細胞においてどのような役割を果たしているか知られていない。KLF5 が免疫細胞において核内受容体と相互作用することによって免疫細胞の機能を制御しているかもしれないという仮説を検証するために、私は哺乳類細胞ツーハイブリッド法を用いて、免疫細胞で発現する核内受容体と KLF5 のタンパク質間相互作用の解析を系統的に行った。その結果、KLF5 は核内受容体ファミリーの中のオーファン受容体であるレチノイド関連オーファン受容体 (ROR $\alpha$ , ROR $\beta$ , ROR $\gamma$ ) と相互作用することを見出した。

ROR $\alpha$  と ROR $\gamma$  は多くの組織で発現しており、特に ROR $\gamma$  は CD4 陽性 T 細胞の中の一群である Th17 細胞の分化を制御する主要な調節因子であることが広く知られており、ROR $\alpha$  も Th17 細胞の分化に重要な役割を果たす。Th17 細胞はインターロイキン(IL)-17A, IL-17F, IL-22 を産生し、自己免疫疾患や炎症性疾患において中心的役割を果たしていると考えられている。そこで、KLF5 が CD4 陽性 T 細胞の機能を制御することによって炎症過程に寄与しているかもしれないという仮説を検証するために、私は CD4 陽性 T 細胞における KLF5 の機能の解析を進めた。

マウス脾臓から分離した CD4 陽性ナイーブ T 細胞を培養してエフェクター T 細胞(Th1,Th2,Th17)に分化誘導する実験で、CD4 陽性 T 細胞が分化する過程での KLF5 の発現を調べたところ、PMA およびイオノマイシン刺激の存在下では *Klf5* mRNA は Th1,Th2,Th17 の各々の分化条件で発現が確認された。また、PMA およびイオノマイシンの刺激によってサイトカインの発現量は増加する。そして、Th1,Th2,Th17 の各々の分化条件において PMA およびイオノマイシンの刺激によって *Klf5* mRNA の発現量も増加した。

次に、CD4 陽性 T 細胞における KLF5 の機能を解析するために、造血細胞特異的 KLF5 欠損(*Klf5*<sup>fl/fl</sup> Tie2-Cre)マウスの脾臓から CD4 陽性ナイーブ T 細胞を分離した。この CD4 陽性 T 細胞では *Klf5* mRNA の発現が見られなかった。この KLF5 欠損 T 細胞を分化誘導する実験で T 細胞の増殖を CFSE 蛍光度により解析したところ、Th17 分化条件では KLF5 欠損 T 細胞の増殖は低下しており、KLF5 は Th17 細胞の分化の過程で T 細胞の増殖を制御すると考えられた。

IL-23 シグナルは Th17 細胞の増殖を促進すると考えられている。そこで、造血細胞特異的 KLF5 欠損マウスの脾臓から分離した KLF5 欠損 CD4 陽性ナイーブ T 細胞を Th17 細胞に分化誘導する実験で、KLF5 欠損 T 細胞の IL-23R (インターロイキン 23 受容体) の発現量を調べた。Th17 分化条件において KLF5 欠損 T 細胞では野生型 T 細胞と比較して *Il23r* mRNA の発現量の減少が見られた。一方、*Il17a* および (ROR $\gamma$  をコードする) *Rorc* mRNA の発現量は KLF5 欠損 T 細胞と野生型 T 細胞で変わらなかった。この結果から、KLF5 は IL-23R 発現を活性化すると考えられた。

ROR $\gamma$  は Th17 細胞への分化の過程で *Il17a* 遺伝子プロモーターに直接結合して *Il17a* の転写を活性化するとともに、*Il23r* 遺伝子プロモーターとイントロン 3 に直接結合して *Il23r* の転写を活性化することが示されている。KLF5 が *Il23r* 遺伝子の転写を直接制御するか否かを検証するためにルシフェラーゼリポーターアッセイを行ったところ、*Il23r* 遺伝子プロモーターとイントロン 3 を含む条件では、KLF5 は ROR $\gamma$  とともに発現している場合に *Il23r* 遺伝子の転写活性をさらに増加させた。

ヒトのゲノム解析において *IL23R* 遺伝子多型はクローン病の発症と関連していることが知られており、IL-23 シグナルと Th17 細胞はヒトとマウスの炎症性腸疾患の病態形成に深く関わっていると考えられている。CD4 陽性 T 細胞の KLF5 が腸炎の病態形成を制御するか否かを検証するために、造血細胞特異的 KLF5 欠損マウスにデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を 7 日間投与して腸炎を誘発した。造血細胞特異的 KLF5 欠損マウスでは DSS 投与開始 10 日後以降で体重減少の程度は小さくなり、腸炎の症状が軽減された。この結果から、KLF5 は化学物質誘発性腸炎において腸の炎症過程に寄与している可能性があると考えられた。

Th17 細胞の分化を制御する因子は ROR $\gamma$  の他にも ROR $\alpha$ , Runx1, HIF1, I $\kappa$ B $\zeta$ , KLF4 など多数報告されている。これらはいずれも転写因子であり、*Il17a* 遺伝子プロモーターに直接結合して *Il17a* の転写活性化に重要であることが示されている。本研究の結果では、Th17 分化条件において *Il17a* の発現量は KLF5 欠損 T 細胞と野生型 T 細胞で変わらず、KLF5 は *Il17a* 遺伝子の転写調節には重要でないと考えられた。一方、IL-23R 発現を直接制御する因子としては ROR $\gamma$  の他に T-bet が報告されているが、他にはほとんど知られていない。本研究では、培養細胞において KLF5 は ROR $\gamma$  とともに IL-23R 発現の活性化に重要であることが明らかになった。IL-23 シグナルは Th17 細胞の増殖を促進すると考えられており、KLF5 が IL-23R 発現を活性化することは KLF5 が Th17 細胞の増殖を制御することと関連していると考えられた。生体内で KLF5 が *Il23r* 遺伝子の転写調節領域に結合して *Il23r* 遺伝子の転写を制御するか否か、および KLF5 が ROR $\gamma$  との相互作用を介して ROR $\gamma$  が持つ *Il23r* 遺伝子の転写活性を変化させるか否かは明らかでなく、今後検証する必要がある。

ROR $\gamma$  欠損 CD4 陽性 T 細胞を移入すると腸炎は起こらないことが示されており、ROR $\gamma$  は Th17 細胞の分化を制御する主要な調節因子であるとともに炎症性腸疾患の病態形成にも関わると考えられている。しかし、Th17 細胞の主要なサイトカインである IL-17A の働きを IL-17A 中和抗体の投与や IL-17A 遺伝子欠損により阻害すると、マウスの DSS 腸炎がむしろ重症化することが報告されている。つまり、IL-17A は腸炎に対して保護的な作用を持つと考えられる。IFN- $\gamma$  は重要な炎症性メディエーターであるが、IFN- $\gamma$  欠損 CD4 陽性 T 細胞を移入しても腸炎を引き起こすことが示されており、腸炎においては IFN- $\gamma$  の他にも炎症性メディエーターが必要だと考えられている。一方、IL-23R 欠損マウスでは DSS 腸炎の症状が軽くなり、IL-23R 欠損 CD4 陽性 T 細胞の移入では腸炎は起こらないことが示されている。すなわち、IL-23 シグナルは Th17 細胞の病原性と炎症性腸疾患の病態形成に深く関与していると考えられている。本研究の結果では、造血細胞特異的 KLF5 欠損マウスで DSS 腸炎の症状が軽くなった。KLF5 がどのように腸の炎症過程に寄与するか検証が必要であるが、KLF5 は IL-23 シグナルを活性化することによって Th17 細胞の病原性を制御している可能性がある。Th17 細胞の病原性に関わる他の因子はまだ十分明らかにされておらず、今後の研究により解明していく必要がある。

結論を述べると、KLF5 は CD4 陽性 T 細胞の IL-23 シグナルを活性化することによって、Th17 細胞の増殖や病原性を制御して腸の炎症過程に寄与する可能性があることが示された。IL-23 シグナルは炎症性腸疾患だけでなく乾癬や脊椎関節症の病態形成にも深く関与しており、IL-12 および IL-23 の共通サブユニット IL-12/23p40 に対するヒト型モノクローナル抗体製剤であるウステキヌマブは、乾癬やクローン病に対して有効性が報告されている。KLF5 は IL-23 シグナルを制御する因子としてこれらの炎症性疾患の病態形成にも寄与している可能性があり、この分子的機序をもとに新しい治療戦略の開発が期待される。