

**A20 (*Tnfaip3*) expressed in CD4⁺ T cells
suppresses Th2 cell-mediated allergic airway
inflammation in mice**

(CD4 陽性 T 細胞に発現する A20(*Tnfaip3*)は
Th2型アレルギー性気道炎症を抑制する)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：中島裕史教授)

横山 裕亮

背景

A20 (*Tnfrsf25*)は、ユビキチン修飾タンパクであり、代表的なターゲットとしてNF- κ Bシグナルを制御することが知られている。これまで、A20はB細胞、樹状細胞、腸管上皮細胞などにおいて、抗炎症作用を発揮していることが報告されている。さらに、喘息患者の気道上皮細胞においてA20の発現が低下していることや、TNFAIP3のSNPが気管支喘息のリスク因子になることが示されている。

しかしながら、気管支喘息においてその病態形成のキープレーヤーであるT細胞におけるA20の役割は依然として不明である。そこで、本研究においては、A20のヘルパーT細胞分化および、気管支喘息病態における役割の解明を目的とした。

結果および考察

CD4-CreA20^{fl/fl}マウスにおいてHDM誘発性気道炎症が増悪する

まず、T細胞特異的にA20を欠損させたCD4-CreA20^{fl/fl}マウスを作成した。CD4-CreA20^{fl/fl}マウスの成長に異常を認めず、死亡率も野生型マウスと比較し少なくとも生後1年間にわたり差を認めなかった。CD4-CreA20^{fl/fl}マウスおよび、littermate controlであるA20^{fl/fl}マウスを用いて、House Dust Mite(HDM)を経気道的に投与した喘息モデル実験を行った。気管支肺胞洗浄液(BALF)中の総細胞数、CD4⁺T細胞、好酸球、好中球が、CD4-CreA20^{fl/fl}マウスにおいて有意に増加していた。組織学的所見においても、CD4-CreA20^{fl/fl}マウスでは、好酸球浸潤の増悪、粘液産生細胞の過形成を認めた。さらに、喘息モデル実験を行ったマウスから肺を採取し、単離した細胞をHDM再刺激下で培養し、培養上清中のサイトカイン産生を測定したところ、CD4-CreA20^{fl/fl}マウスにおいてTh2サイトカインであるIL-5、IL-13の産生が増加していることが確認された。一方でIL-17の産生には差を認めなかった。気管支喘息の特徴であるメサコリン負荷に対する気道過敏性も、喘息モデル実験を行なったCD4-CreA20^{fl/fl}マウスにおいては、有意に増強していることが確認された。

これらの実験結果からCD4⁺T細胞におけるA20はアレルギー性気道炎症を抑制していることが示唆された。

CD4⁺T 細胞に発現する A20 は Th2 分化を特異的に抑制する

A20 がヘルパーT 細胞に与える影響を検討するため、CD4-CreA20^{fl/fl} マウスおよび野生型マウスの Naive CD4⁺T 細胞を単離し、in vitro でのヘルパーT 細胞分化を比較した。すると Th2 培養条件下にて、IL-5、IL-13 産生 CD4⁺T 細胞が、野生型マウスと比較して CD4-CreA20^{fl/fl} マウスにおいて有意に増加していた。一方で、Th1 培養条件下における IFN γ 産生、Th17 培養条件下における IL-17 産生に関しては両群において有意な差を認めなかった。

また、野生型マウスの CD4⁺T 細胞にレトロウイルスを用いて A20 を強制発現させ、同様のヘルパーT 細胞分化を比較検討した。コントロールと比較し、A20 を強制発現させた場合、Th2 培養条件下で IL-5、IL-13 産生 CD4⁺T 細胞数の有意な減少を認めた。一方で、Th1 培養条件下における IFN γ 産生、Th17 培養条件下における IL-17 産生に関しては両群において有意な差を認めなかった。

CD4⁺T 細胞において A20 は IL-4/STAT6 シグナルにより発現誘導される

これまでの報告では T 細胞において、A20 は TCR/CD28 刺激により発現誘導され、IKK/NF- κ B シグナルを抑制していることが示されている。CD4⁺T 細胞における A20 欠損が、Th2 分化の亢進をもたらすメカニズムの解明を目的として、Th1、Th2、Th17 培養条件下における *Tnfrif3* の mRNA の発現を継時的に評価した。すると Th1、Th17 培養条件と比較して、Th2 培養条件下において、培養開始 2 時間にて *Tnfrif3* の mRNA の発現の著明な誘導が確認された。

また、STAT6 ノックアウトマウスの CD4⁺T 細胞においては、Th2 培養条件下においても *Tnfrif3* の mRNA の発現誘導が障害されることが確認され、A20 の発現は STAT6 依存的であることが示唆された。

さらに、A20 の発現誘導は IL-4 単独刺激でも再現され、抗 CD3/CD28 抗体のみによる刺激では誘導されないことが確認された。以上の結果から Th2 培養条件による A20 の発現は IL-4/STAT6 経路により誘導されることが示唆された。

A20 は、STAT6 非依存的に GATA3 の発現を抑制する

Th2 分化におけるマスターレギュレーターである GATA3 の mRNA の発現を CD4-CreA20^{fl/fl} マウスおよび、野生型マウスにおいて比較検討した。Th2 培養条件下において、CD4-CreA20^{fl/fl} マウスは野生型マウスと比較して、短時間で

GATA3 の mRNA の発現誘導を認めた。一方で、Naïve CD4⁺T 細胞においては、GATA3 の mRNA の発現に両群において差を認めなかった。

また蛋白レベルにおいても、CD4-CreA20^{fl/fl} マウスにおける GATA3 の発現は、野生型マウスに比較して亢進していることが確認された。

これまでの報告から STAT6 が GATA3 の発現に重要な働きをしていることが知られている。しかしながら、Th2 培養条件下におけるリン酸化 STAT6 の発現を CD4-CreA20^{fl/fl} マウスおよび野生型マウスにおいて Western blotting で比較したところ、蛋白量に有意差を認めなかった。

これらのことから、A20 の発現は、IL-4/STAT6 経路により誘導されるが、GATA3 の発現抑制作用は、STAT6 とは独立して機能していることが示唆された。

Th2 分化とユビキチン化

本研究において、我々は CD4⁺T 細胞に発現する A20 が HDM 誘発性アレルギー性気道炎症を抑制することを明らかにした。近年、TNFAIP3 の SNP が気管支喘息のリスクと関連することが報告されている。さらに、LPS の前投与による HDM 誘発性アレルギー性気道炎症の抑制作用が、気道上皮細胞において A20 を欠損したマウスにおいては認められないことが報告されている。我々は、気道上皮細胞のみならず、CD4⁺T 細胞に発現する A20 がアレルギー性気道炎症を抑制していることを示した。これらのことから、A20 は気管支喘息に様々な機序で影響を与えていることが示唆される。

これまでに、CD4⁺T 細胞に発現する A20 が CD4⁺T 細胞の生存にネクロトーシスを介して関与することが報告されている。我々の実験においても、CD4-CreA20^{fl/fl} マウスから単離した Naïve CD4⁺T 細胞を *in vitro* で CD3/CD28 刺激したところ、野生型マウスと比較して生存 T 細胞が減少する傾向を認めた。しかしながら、喘息モデルをおこした CD4-CreA20^{fl/fl} マウスの肺において CD4⁺T 細胞は増加しており、*vivo* においては必ずしも細胞死に直接つながらない可能性が示唆された。そして A20 が欠損することによる Th2 サイトカイン産生の亢進が、アレルギー性気道炎症において重要であると考えた。

A20 による Th2 分化の詳細な機序に関しては依然として不明瞭な点が存在する。我々は、A20 を欠損した CD4⁺T 細胞において GATA3 の発現が亢進することを明らかにした。ユビキチン化は、蛋白の翻訳後修飾において重要な働きを

していることがすでに報告され、蛋白分解やシグナル伝達に関与するとされている。また近年、ユビキチンリガーゼや脱ユビキチン酵素が CD4⁺T 細胞のヘルパーT細胞分化に関与することが示された。特に Th2 分化においても、STAT6 および GATA3 がユビキチン修飾を受けることが報告されている。ユビキチンリガーゼである Grail、Cbl-b が STAT6 の分解に寄与し、Mdm2 が GATA3 と関連するとされる。

本研究において、我々は A20 の欠損により、STAT6 非依存的に GATA3 の発現が亢進することを明らかにした。A20 はユビキチンリガーゼおよび脱ユビキチン酵素の二つ働きをあわせ持った蛋白であり、NF- κ B 経路における様々な分子のユビキチン修飾に関与することが報告されており、GATA3 のユビキチン修飾にも関与していること推察されたが、さらなる分子メカニズムの解明が必要である。

本研究結果は、CD4⁺T 細胞において A20 は GATA3 の安定性に関与し、Th2 分化を抑制していることを示唆しており、気管支喘息における Th2 細胞の制御機構において新たな知見を示したといえる。

Current Biology

平成 2 8 年 1 2 月 投稿中