



Title	Invariant natural killer T細胞におけるinterferon-gamma産生の分子機序の解明
Author(s)	神田, 真聡
Description	配架番号 : 2246
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12348号
Issue Date	2016-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12348
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62536
Type	doctoral thesis
File Information	Masatoshi_Kanda.pdf



学位論文

**Invariant natural killer T 細胞における interferon-
gamma 産生の分子機序の解明**
**(Molecular mechanism of interferon-gamma production
in invariant natural killer T cells)**

2016 年 6 月

北海道大学

神田 真聡

Masatoshi Kanda

学位論文

**Invariant natural killer T 細胞における interferon-
gamma 産生の分子機序の解明**
**(Molecular mechanism of interferon-gamma production
in invariant natural killer T cells)**

2016 年 6 月

北海道大学

神田 真聡

Masatoshi Kanda

目次

発表論文目録及び学会発表目録	1
1. 緒言	2
1-1 invariant NKT 細胞	2
1-2 iNKT 細胞と疾患	3
1-3 Basic helix-loop-helix, family member e40 (Bhlhe40)	3
1-4 仮説および本研究の目的	4
2. 略語表	5
3. 実験方法	7
3-1 細胞およびマウス	7
3-2 定量 real-time Polymerase Chain Reaction (PCR)	7
3-3 フローサイトメトリとソーティング	7
3-4 細胞増殖アッセイと Enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA)	11
3-5 <i>In vivo</i> における α -GC 刺激とサイトカイン測定	11
3-6 メラノーマ転移モデル	11
3-6-1 肺転移モデル	11
3-6-2 肝転移モデル	12
3-7 ルシフェラーゼレポーターアッセイ	12
3-8 Bhlhe40 に対する Short hairpin RNA によるノックダウン	14
3-9 共免疫沈降とウェスタンブロッティング	16
3-10 Chromatin immunoprecipitation (ChIP)	16
3-11 骨髄由来樹状細胞 (bone marrow dendritic cells (BMDC)) の <i>in vitro</i> 分化誘導	20
3-12 T-bet 陽性あるいは陰性 iNKT 細胞の <i>in vitro</i> 培養	20
3-13 統計処理	20
4. 実験結果	21
4-1 iNKT 細胞における IFN- γ 産生に関わる候補因子の抽出	21
4-2 iNKT 細胞における Bhlhe40 mRNA 発現	24
4-3 Bhlhe40 ^{-/-} マウスでは iNKT 細胞は正常に分化・成熟する	33
4-4 Bhlhe40 は iNKT 細胞の IFN- γ 産生を制御する	39
4-5 Bhlhe40 欠損は iNKT 細胞の抗腫瘍活性を低下させる	48

4-6 Bhlhe40 自身は <i>Ifng</i> プロモーター活性を増強しない.....	54
4-7 Bhlhe40 は T-bet の存在下において IFN- γ 産生に関与する	58
4-8 Bhlhe40 は IL-12 刺激による <i>Ifng</i> 産生も制御する	64
4-9 <i>Bhlhe40</i> ^{-/-} iNKT 細胞では, <i>Ifng</i> 領域のヒストン H3-K9 アセチル化が低下する .	69
5. 考察.....	89
6. 総括及び結論.....	92
7. 謝辞.....	93
8. 引用文献	94

発表論文目録及び学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した.

Masatoshi Kanda, Hiroyuki Yamanaka, Satoshi Kojo, Yuu Usui, Hiroaki Honda, Yusuke Sotomaru, Michishige Harada, Masaru Taniguchi, Nao Suzuki, Tatsuya Atsumi, Haruka Wada, Muhammad Baghdadi, Ken-ichiro Seino

Transcriptional regulator Bhlhe40 works as a cofactor of T-bet in the regulation of IFN- γ production in *i*NKT cell

Proc. Natl. Acad. Sci. USA in press

本研究の一部は以下の学会に発表した.

関連する学会発表なし

1. 緒言

1-1 invariant natural killer T (iNKT)細胞

高等生物に存在する免疫担当細胞は、大きく分けて自然免疫担当細胞と獲得免疫担当細胞に分類される。前者はマクロファージ・樹状細胞・好中球・natural killer 細胞などが主にその役割を担っている。自然免疫は初期免疫応答において極めて重要な役割を担っており、外来抗原を認識する pattern-recognition-receptor と呼ばれる受容体を介して活性化される¹。活性化された自然免疫担当細胞は、サイトカインなどの放出を介して、そのシグナルを獲得免疫担当細胞に伝え、抗原特異的な免疫応答を惹起するのを助ける。

natural killer T (NKT)細胞は、T 細胞マーカーおよび natural killer 細胞マーカーを発現するリンパ球の中で糖脂質や脂質を認識して活性化される。NKT 細胞のうち CD1d 拘束性を持つもので、特定の T cell receptor (TCR)を持つものを invariant NKT (iNKT)細胞という。iNKT 細胞は NKT 細胞のなかで、最もよく研究されている細胞群である。特定の TCR とは、マウスでは V α 14-J α 18/V β 8 あるいは V β 7 または V β 2 とされ、ヒトでは V α 24/V β 11 を持つものとされる。

iNKT 細胞は、樹状細胞などの抗原提示細胞の CD1d 分子上に提示された糖脂質の刺激を受けて活性化され、すみやかにさまざまなサイトカインを産生する特徴をもつ。これらのサイトカインには interferon-gamma (IFN- γ), interleukin (IL)-2, IL-4, IL-13, IL-17, IL-21, IL-22, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)^{2,3}などが含まれており、iNKT 細胞自身あるいは他の免疫担当細胞であるマクロファージや樹状細胞、T 細胞、natural killer 細胞などに作用し、免疫応答を制御する^{2,6}。このことから、初期免疫応答の initiator として iNKT 細胞は重要な働きをしているとされる⁶。

iNKT 細胞は胸腺の CD4⁺CD8⁺ double positive (DP)細胞から成熟してできるとされており⁷、胸腺内でその成熟過程は NK1.1 および CD44 の発現パターンから、Stage 1 (NK1.1^{lo} CD44^{lo}), Stage 2 (NK1.1^{lo} CD44^{hi}), Stage 3 (NK1.1^{hi} CD44^{hi})に分けられる⁸。また、iNKT 細胞は、その発現するサイトカインの産生のパターンから、IFN- γ 産生を特徴とする Th1-like iNKT 細胞 (iNKT1), IL-13 産生を特徴とする Th2-like iNKT 細胞 (iNKT2), IL-17A・IL-22 産生を特徴とする Th17-like iNKT 細胞 (iNKT17)などにサブセット分類される⁹⁻¹²。

過去の検討から iNKT 細胞はさまざまな働きを持つことが示されているが、中でも iNKT 細胞によってすみやかにかつ大量に産生される IFN- γ は、iNKT 細胞の特徴的な性質とされ、腫瘍排除や感染応答において重要な働きをしているとされる。しかしながら、iNKT 細胞がどのようにしてすみやかにかつ大量の IFN- γ を産生するのかに

についての分子機構についてはまだ十分に明らかになっていない。

1-2 iNKT 細胞と疾患

iNKT 細胞のマウスにおいては血液中の 0.2-0.5%程度、ヒト末梢血においては、0.01-0.5%程度と、血球における占める割合は少ないが、生体においては重要な働きをしており、iNKT 細胞の異常は種々の疾患と関与しているとされている¹³。

iNKT 細胞の異常と関連のある疾患としては、ライム病や結核などの感染症、悪性腫瘍、乾癬・アトピー性皮膚炎などの皮膚疾患、移植片対宿主病や拒絶反応、動脈硬化、喘息、ひいては I 型糖尿病・全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患にも関与する^{6,14,15}。さらに、これらの疾患に対して、iNKT 細胞による細胞治療¹⁶や、alpha-galactosylceramide (α -GC)などの抗原刺激による iNKT 細胞の賦活化による疾患治療¹⁷が試みられている。特に腫瘍における iNKT 細胞治療¹⁶では、iNKT 細胞の IFN- γ 産生能が治療効果と関連する可能性も示されているなど、iNKT 細胞における IFN- γ 産生は種々の病態において重要な働きをしていることが推察される。この iNKT 細胞における IFN- γ 産生機序を解明することは様々な疾患病態の理解を進め、ひいては疾患治療法の開発へとつながっていく可能性がある。

1-3 Basic helix-loop-helix, family member e40 (Bhlhe40)

本研究では後述する実験方法・結果により、Basic helix-loop-helix, family member e40 (Bhlhe40)が、iNKT 細胞による IFN- γ 産生の分子機構に関わる候補因子である可能性を見出した。

Bhlhe40 は basic helix-loop-helix protein family に分類される転写因子の一つで、元来時計遺伝子の一つとして、日内変動をきたす分子として注目された歴史をもつ¹⁸。転写因子としては class B E-box 配列に結合し、転写抑制として働くことがよく知られていた¹⁹。しかしながら、最近になって、直接転写制御領域に結合して働くだけでなく、他の転写因子の補因子として働くという報告や^{20,21}、ときには転写の活性化を起こすなどさまざまな働きをもつことが報告されている²²。Bhlhe40 はこれらの複雑な働きを介して、細胞増殖やアポトーシス、免疫応答を制御しているとされ、興味深い分子である^{18,23-25}。また、*Bhlhe40*^{-/-}マウスは T 細胞・B 細胞の異常活性化によるリンパ増殖症を引き起こし、自己抗体の産生および、糸球体に免疫複合体沈着をおこし、自己免疫疾患を発症するとされている²⁵。先に述べたように、iNKT 細胞の機能不全が自己免疫疾患の病態の原因の一つとなっていることが示されていることから、*Bhlhe40*^{-/-}マウスにおける、iNKT 細胞による IFN- γ 産生の分子機構に迫ることが、ひいては自己免疫疾患の病態解明の一助になると考えた。

1-4 仮説および本研究の目的

上記から、iNKT 細胞のもつ迅速かつ大量の IFN- γ を産生はさまざまな疾患病態の根底にあるにもかかわらず、その分子メカニズムが明らかにされていない。

そこで、本研究では、iNKT 細胞の IFN- γ 産生の分子機序を明らかにすることを目的とした。

2. 略語表

本文中のおよび図中で使用した略語は以下の通りである.

7-AAD	7-amino-actinomycin D
Ab	Antibody
BMDC	bone marrow dendritic cell
Bhlhe40	basic helix-loop-helix, family member e40
<i>Bhlhe40</i> shRNA ^r	knockdown-resistant <i>Bhlhe40</i>
CNS	conserved non-coding sequence
ChIP	chromatin immunoprecipitation
DNA	deoxyribonucleic acid
DP	double positive
DTT	Dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immuno-sorbent assay
FBS	fetal bovine serum
HEPES	2-[4- (2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid
Hprt	hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase
IFN- γ	interferon-gamma
IL	interleukin
KD	knock-down
MEF	mouse embryonic fibroblast
NF- κ B	nuclear factor-kappa B kinase
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NKT	natural killer T
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEI	polyethyleneimine
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate 4-O-methyl ether
RNA	ribonucleic acid
SDS	sodium dodecyl sulfate

SLAMF1	signaling lymphocytic activation molecule family member 1
T-bet	T-box transcription factor Tbx21
TNF- α	tumor necrosis factor-alpha
Th1	Type 1 helper T
Tris	tris (hydroxymethyl)aminomethane
WCL	whole cell lysate
cDNA	complementary deoxyribo nucleic acid
<i>i</i> NKT	invariant NKT
shRNA	short hairpin ribonucleic acid
α -GC	alpha-galactosylceramide

3. 実験方法

3-1 細胞およびマウス

本研究では Lenti-X™ 293T (Clontech Laboratory), B16 マウスメラノーマ細胞株 (ATCC), EL-4 マウス T 細胞リンパ腫細胞株 (理研バイオリソースセンター)を購入して使用した. いずれの細胞も Dulbecco's Modified Eagle's Medium (和光純薬)に, 10%牛胎児血清 (fetal bovine serum; FBS) (ニチレイバイオサイエンス), 0.1 mM 非必須アミノ酸 (Gibco), 100 IU/ml ペニシリン・ストレプトマイシン (Gibco), 0.03% L-グルタミン (Gibco)を添加したものをを用いて, 37°C, 5% CO₂ の条件下において培養した.

野生型 (C57BL/6)マウスは日本 SLC より購入して用いた. *Bhlhe40*^{-/-}マウスおよび, *Ja18*^{-/-}マウスは既報告に従って作製されたものを使用した^{23,26}. NKT クローンマウスはNKT細胞の核移植により作製されたNKT-nt-ES細胞をから作製し²⁷, *Bhlhe40*^{-/-}×NKT クローンマウスは *Bhlhe40*^{-/-}マウスと NKT クローンマウスを自家交配して作製した. マウスは北海道大学遺伝子病制御研究所の室温の管理された specific-pathogen-free ルームで飼育した. 動物の取り扱い「北海道大学動物実験に関する規定」に則り, 北海道大学の動物実験倫理審査の承認を受けて行った. 実験には 6-8 週齢のマウスを使用した.

3-2 定量 real-time polymerase chain reaction (PCR)

細胞からの RNA の抽出は RNeasy® Plus Mini Kit (QIAGEN)を用いて, 標準プロトコールによって行った. cDNA の合成は SuperScript® III (Invitrogen)あるいは, RivaTra Ace® (TOYOBO)を用いて標準プロトコールでおこなった. cDNA 合成産物は, Fast SYBR® green PCR Master Mix (Applied Biosystems)を用いて, StepOne™ Real-time PCR system (Applied Biosystems)による real-time PCR を行った.

プライマーは QuantiTect primer assays (QIAGEN)を用いて行い, ターゲット配列は, *Ifng*, *Il4*, *Il17a*, *Bhlhe40*, *Tbet* および hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (*Hprt*)とした. データは内部コントロールとして *Hprt* を用い, 比較 Ct 法によって解析した.

3-3 フローサイトメトリとソーティング

解析に用いるサンプルは, Fcγ 受容体に対する非特異的な結合を回避するために, Fc 受容体ブロッカー (2.4G2)による前処置を行った. その後, 標準プロトコールを用いて, 蛍光色素で標識された標的抗体あるいはアイソタイプを一致させたコントロール抗体と反応させた. サンプル解析は最終的に 2% FBS と 0.05% アジ化ナトリウムを

含む phosphate buffered saline (PBS)に混ぜて行った。死細胞除去には 7-AAD (BD Bioscience)を用いた。

サイトカインの細胞内染色では、細胞表面タンパクを蛍光色素で標識された標的抗体あるいはアイソタイプを一致させたコントロール抗体と反応させた後、Cytofix/Cytoperm™ kit (BD Bioscience)の標準プロトコルを用いて、細胞の固定および透過処理を行った。その後に、細胞内タンパクを蛍光色素で標識された抗体あるいはアイソタイプを一致させたコントロール抗体と反応させた。

蛍光抗体で標識したサンプルは、フローサイトメトリは FACS Calibur™ あるいは、FACS Canto™ II (BD Bioscience)を用いて行い、セルソーティングは FACS Aria™ II (BD Bioscience)を用いて行い、データ解析には FlowJo™ software (LLC)を用いた。

ソーティングでは、ソーティング後サンプルの純度は 98%以上であることを確認した。

a-GC-CD1d dimer は、CD1d 融合タンパク (dimer XI, BD Bioscience), a-GC (KRN7000, Kirin Pharma Co), phycoerythrin 標識ラット anti-mouse IgG1 Ab (BD Biosciences)を用いて既報告の方法を用いて自家調整した²⁸。その他の蛍光標識に用いた抗体を表 1, 表 2 に示す。

表 1. 蛍光標識標的抗体リスト

Antibody name	Target protein	Clone name	Supplier
α -TCR β Ab	Tcr β	H57-597	Biolegend
α -T-bet Ab	T-bet	4B10	Biolegend
α -NK1.1 Ab	Nk1.1	PK136	eBioscience
α -CD4 Ab	Cd4	RM4-5	Biolegend
α -CD19 Ab	Cd19	MB19-9	eBioscience
α -CD44 Ab	Cd44	IM7	Biolegend
α -CD150 Ab	Cd150	TC15-12F12.2	Biolegend
α -Ly49A Ab	Ly49a	YE1/48.10.6	Biolegend
α -Ly49C Ab	Ly49c	SW5E6	BD Bioscience
α -Ly49G2 Ab	Ly49g2	4D11	eBioscience
α -IL-4 Ab	IL-4	BVD6-24G2	BD Bioscience
α -IL-17RB Ab	Il17rb	9B10	Biolegend
α -IFN- γ Ab	IFN- γ	XMG1.2	Biolegend

表 2. アイソタイプコントロール抗体リスト

Antibody name	Isotype	Clone name	Supplier
Hamster IgG isotype control	Armenian hamster IgG	HTK888	Biolegened
Mouse IgG1 κ isotype control	Mouse IgG1 κ	MOPC-21	Biolegend
Mouse IgG2a κ isotype control	Mouse IgG2a κ	MOPC-173	Biolegend
Rat IgG2a κ isotype control	Rat IgG2a κ	RTK2758	Biolegend
Rat IgG2b κ isotype control	Rat IgG2b κ	RTK4530	Biolegend
Rat IgG1 κ isotype control	Rat IgG1 κ	RTK2071	Biolegend

3-4 細胞増殖アッセイと Enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA)

野生型または *Bhlhe40*^{-/-}マウスの脾臓から iNKT 細胞 (TCRβ⁺ CD1d- α-GC dimer⁺)および CD4⁺ T 細胞を FACS AriaTM II を用いて分取し、96 ウェル丸底プレートに 1 ウェルあたり 2×10⁵ 個で散布した。そこにさらに 2×10⁵ 個/ウェルの割合で、*Jal8*^{-/-}マウスの脾臓細胞に 35Gy の放射線照射したものを添加した。培地は 10% FBS 含有 RPMI-1640 (和光純薬)に 0.1 mM 非必須アミノ酸, 1 mM ピルビン酸, 10 mM 2-[4- (2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid (HEPES) (Gibco), 100 IU/ml ペニシリン・ストレプトマイシン, 2 mM L-グルタミン, 100 μM β-メルカプトエタノール (Gibco)を添加したものをを用いた。各ウェルに α-GC を 0, 0.1, 1, 10, 100 ng/ml の濃度で添加し, 37°C, 5% CO₂ の条件下において培養した。40 時間後, 培地に ³H-thymidine (1 μCi/well) を加え, さらに 8 時間 37°C, 5% CO₂ の条件下において培養した。³H-thymidine によって標識された細胞を cell harvester (INOTECH)を用いて, Filtermat A (PerkinElmer)に吸着させたのち, MicroBetaTM 2 (PerkinElmer)を用いて DNA への ³H-thymidine の取り込みを測定した。同様の条件下における培養上清を回収し, IFN-γ と IL-4 の産生を ELISA で測定した (Mouse IFN-γ DuoSet[®] R&D (DY485), Mouse IL-4 DuoSet[®] R&D (DY404))。

3-5 *In vivo* における α-GC 刺激とサイトカイン測定

8 週齢の野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウス 各 3 匹に 2 μg の α-GC を尾静脈注射し, 0, 6, 12, 24, 36, 48 時間後の血清を採取した。採取した血清中の IFN-γ と IL-4 の濃度を CBA kit (BD Biosciences)で評価した。フローサイトメトリは FACS CantoTM II を使用し, FCAP arrayTM v3.0 (BD Biosciences)を用いて解析を行った。

Add-back 実験においては, NKT クローンマウスおよび *Bhlhe40*^{-/-}×NKT クローンマウスを用いた。それぞれのマウスの脾臓から, 2×10⁶ 個の iNKT 細胞 (TCRβ⁺ CD1d- α-GC dimer⁺)を FACS AriaTM II を用いて分取し, 8 週齢の *Jal8*^{-/-}マウスに尾静脈投与した。iNKT 細胞投与 1 時間後に, 2 μg の α-GC を尾静脈投与した。iNKT 細胞投与を 0 時間とし, 0, 1, 6, 12, 24, 36, 48 時間後の血清を採取した。採取した血清中の IFN-γ と IL-4 の濃度を上記と同様の方法で評価した。

サイトカインの細胞内染色は, 8 週齢の野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウス 各 3 匹に 1.5 μg の α-GC を尾静脈注射し, 1 時間後に肝臓を摘出し, TCRβ⁺ CD1d- α-GC dimer⁺細胞における, IFN-γ と IL-4 の発現を FACS CantoTM II で測定し, FlowJoTM software で解析した。

3-6 メラノーマ転移モデル

3-6-1 肺転移モデル

C57BL/6 マウス由来メラノーマ細胞株である B16 (5×10⁵ 個)を 6-8 週齢の野生型お

よび *Bhlhe40*^{-/-}マウス各 3 匹に尾静脈から接種し、続けて 4 µg の α-GC あるいは同体積の PBS を腹腔内投与した。接種 7 日目に屠殺し、肺を摘出し、肺表面に顕微鏡下に認められるメラノーマ転移結節数を測定した。

3-6-2 肝転移モデル

B16 (1×10⁶ 個)を 6-8 週齢の野生型および *Ja18*^{-/-}マウス各 3 匹の脾臓に接種した。このマウスに NKT クローンマウスおよび *Bhlhe40*^{-/-}×NKT クローンマウスの脾臓から FACS Aria™ II を用いて分取した 1×10⁶ の iNKT 細胞 (TCRβ⁺ CD1d-α-GC dimer⁺)を尾静脈投与し、続けて 2 µg の α-GC あるいは同体積の PBS を腹腔内投与した。接種 10 日目に屠殺し、肝を摘出し、肉眼所見を写真に記録し、肝表面におけるメラノーマ細胞の占める割合を解析した。

3-7 ルシフェラーゼレポーターアッセイ

Lenti-X™ 293T 細胞は polyethyleneimine (PEI)により、1 µg のベクターをトランスフェクションした。一方、EL-4 とマウス胎児線維芽細胞 mouse embryonic fibroblast (MEF) は、10 µg のベクターを Neon® system (Invitrogen)のエレクトロポレーションによりトランスフェクションした。ルシフェラーゼレポータープラスミドには表 3 のものを用いた。

T-bet 発現ベクターは 0.01 µg あるいは 0.1 µg で行い、トランスフェクションのコントロールとして 10 ng の pSV-β galactosidase control vector を同時にトランスフェクションした。pGL4.32-luc2P/NFκB-RE/Hygro をトランスフェクションした MEF にはトランスフェクション後 0 時間あるいは 16 時間後に phorbol 12-myristate 13-acetate 4-O-methyl ether (PMA) (Sigma) 刺激を行い、pGL4.30-luc2P/NFAT-RE/Hygro をトランスフェクションした EL-4 には、トランスフェクション直後に 500 nM の ionomycin で刺激を行った。ルシフェラーゼ活性は Luciferase Assay System (Promega)用いて、トランスフェクション後 24 時間あるいは 48 時間において、POWERSCAN4 (DS ファーマ)で測定した。

なお、遺伝子組み換え操作に関しては、「北海道大学遺伝子組み換え実験等安全管理規定」を遵守し行った。

表 3. ルシフェラーゼアッセイベクターリスト

Vector name	Provider / Supplier
pBS-luc-IFN γ	Dr. Kenneth M. Murphy , Washington University ^{29,30}
pGL4.32-luc2P/NF κ B-RE/Hygro	Promega (E8491)
pGL4.30-luc2P/NFAT-RE/Hygro	Promega (E8481)
pSV- β galactosidase control vector	Promega (E1081)

3-8 Bhlhe40 に対する short hairpin RNA によるノックダウン

マウス Bhlhe40 に対する short hairpin (shRNA) シークエンスをレンチウイルスプラスミドにクローニングし，レンチウイルスパッケージングシステムを用いてレンチウイルスを作製した．パッケージングには Lenti-X™ 293T 細胞を用いて，self-inactivating vector, entry vector, packaging constructs を構成するプラスミドを PEI で一過性発現させ，48 時間後のレンチウイルスパーティクルを含む上清を用いて，EL-4 あるいは iNKT 細胞に感染させた．これらの実験に用いたベクターを表 4 に示す．

表 4. レンチウイルス関連ベクターリスト

Vector name	Provider / Supplier
CS-RFA-EC	
pENTR4-H1	Dr. Miyoshi Hiroyuki , RIKEN BioResource
pCAG-HIVgp	Center, Ibaraki, Japan
pCMV-VSV-G-Rev	

3-9 共免疫沈降とウェスタンブロッティング

共免疫沈降には、HA タグで標識した *Bhlhe40* あるいは実験系とは無関係と考えられるタンパク質 (chloramphenicol acetyl transferase) を HA タグで標識したものと Myc タグで標識した *T-bet*, *Stat4* あるいはコントロールベクターを Lenti-X™293T 細胞に PEI でトランスフェクションしたものをを用いた。トランスフェクション 48 時間後に細胞を M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific) 500 µl で処理し、氷上で 20 分インキュベートした。不溶性分画は遠心分離により除去したものを実験に用いた。内在性の *Bhlhe40* と *T-bet* の結合の確認実験では、NKT クローンマウスの脾臓から 3×10^6 個の iNKT 細胞を採取し、未処理あるいは、Hamstar IgG (10 µg/ml) で架橋した α -CD3/CD28 Abs (3 µg/ml) による刺激を 60 分間行った。それらの細胞を M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent にリン酸化阻害薬としてオルトバナジジン酸ナトリウムとフッ化ナトリウムを加えたもので、氷上で 20 分インキュベートし、不溶性分画を遠心分離により除去したものをを用いた。細胞溶解液は 20 µl protein G セファロースビーズ (Beads Pierce) を加えて、ローテーター上 4°C で 1 時間プレクリアを行った。その後、10000 rpm, 1 分間 4 °C で遠心したのちに、上清を回収し、 α -HA, α -Myc, α -*T-bet* あるいは α -*Bhlhe40* Ab を氷上で 1 時間反応させたのちに、20 µl の protein G セファロースビーズを加え、ローテーター上 4°C で 1 時間反応させた。ビーズを lysis buffer (1% Nonidet P-40, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA) で 5 回洗ったのちに、95°C で 5 分間煮沸したものを 10% SDS-PAGE ゲルで Bio-Rad のウェットウェスタンブロットシステムを用いて、ポリアクリルアミド電気泳動を行った。Immobilon®-P (Millipore) に PAGE ゲルタンパク質を転写した。トランスフェクションサンプルでは α -HA あるいは α -Myc Ab で、内在性サンプルでは α -*Bhlhe40* (DEC1, Novus) あるいは α -*T-bet* Ab (H-210, Santa Cruz -21003) でウェスタンブロッティングを行った。二次抗体には horseradish peroxidase 標識抗体を用い、Super signal West Femto (Thermo Scientific) あるいは ECL prime (GE health care) によって化学発光したものを、ImageQuant™ LAS 4000 で検出した。

3-10 Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

クロマチン免疫沈降 (ChIP) では、 1×10^6 個の iNKT 細胞を 1 ml の細胞培養培地に懸濁したものを用いて実験を行った。ホルムアルデヒドを含む固定液 (11x, 11% ホルムアルデヒド, 50 mM HEPES (pH 8.0), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8.0), 0.5 mM EGTA) を加えてローテーター上室温 10 分間反応させたのち、1.5 M グリシン 100 µl を加えて、10 分間インキュベートし反応を停止させ、遠心分離して上清を取り除いた。1 ml の低張液 (2% FBS, 0.05% NaN₃ 含有 PBS) で ローテーター上 4°C で 10 分間反応させ、遠心分離して上清を取り除いた。その後、プロテアーゼ阻害薬を含む SDS 細胞溶解液 (50

mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0), 1% SDS)を 500 μ l 混ぜて、氷上で 20 分インキュベートした。抽出したクロマチンを Bioruptor (UCD-250, コスモバイオ)超音波破碎機によって氷冷しながらソニケーションし、DNA を 200 bp 程度に断片化した (250 W 30 秒, インターバル 30 秒を 3 回コース繰り返しで 3 サイクル)。Top speed で遠心分離した上清を 200 μ l 回収し、ChIP dilution buffer (50mM Tris-HCl (pH 8.0), 167 mM NaCl, 1.1% Triton X-100, 0.11% sodium deoxycholate)で 5 倍に希釈したものを Input サンプルとした。断片処理済みのサケ精子 DNA と Bovine Serum Albumin を含む RIPA バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8.0), 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.1% sodium deoxycholate)でオーバーナイトした 50%スラリー-protein G セファロースビーズ 60 μ l を加え、2 時間プレクリアを行った。その後遠心分離して、上清を回収した。Acetyl-Histone H3 (K9) (CSB11, Cell Signaling), Tri-Methyl-Histone H3 (K4) (C42D8, Cell Signaling), Di-Methyl-Histone H3 (K4) (C54G9, Cell Signaling), α -Bhlhe40 ポリクローナル抗体あるいは normal rabbit IgG (Santa Cruz (SC-2027))を 10 μ g/sample でそれぞれ加えてオーバーナイトインキュベートした。反応液に 20 μ l の 50%スラリー-protein G セファロースビーズを加え 2 時間インキュベートしたのちに遠心分離し、上清を除去し、RIPA バッファー, 500 mM NaCl/RIPA バッファー, LiCl 含有洗浄液 (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.25 M LiCl, 1 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate), Tris-EDTA buffer でそれぞれ 1 回ずつ洗浄したものに ChIP direct elution buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 5 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% SDS) を 200 μ l 加え、0.1 mM DTT を 8 μ l 加えて 65°Cでオーバーナイトインキュベートし、脱クロスリンクを行った。RNase A (4 μ g/ml, Invitrogen)を加え 37°Cで 30 分インキュベートし、Proteinase K (1 μ g/ml, 和光純薬)を加えて 55°Cで 1 時間インキュベートした。抽出されたクロマチンは ChIP DNA Clean & Concentrator™ (ZYMO RESEARCH CORP)を用いて精製し、StepOne™を用いて、Genomic PCR を行った。*Ifng* 領域の増幅に利用したプライマーペア³¹⁻³⁴を表 5 に記し、*Il4* 領域の増幅には利用したプライマーペアを表 6 に示す³⁵。

表 5. *Ifng* 領域プライマーリスト

Primer name		Sequence	PCR position
#1	Forward	CAGGAAGGAGATGGGAAGTCA	-21816~21935
	Reverse	CTGTCCTTTTGACAATGAGCAGAAAT	
#2	Forward	AAGACCATCAGAGGACACAGA	-8231~-7961
	Reverse	AAACCTTCAGTGCATGGGTCT	
#3	Forward	GACAGGACTATGACTCTCTAG	-5886~-5617
	Reverse	GTTACCTCCTCCACCCGTTCA	
#4	Forward	TCATGACATGCTGTGCCTACG	-4173~-4076
	Reverse	ACTGCTGTCACTCAGTGCCTT	
#5	Forward	CCATACGCAGACACCATTG	-3432~-3185
	Reverse	TAGAAACACGAGCTCTGGG	
#6	Forward	TCTCTTGAGGTCCTCCATGC	-2771~-2577
	Reverse	GCACATTCTGCTACGCTTG	
#7	Forward	GAACATAGAACGGTCCCCGT	-2257~-2043
	Reverse	TCCTGGTCTACAGAGTGAG	
#8	Forward	CTGGGTCAAGATAACTGGG	-1451~-1246
	Reverse	TCAGCCAAAGGCTCAACCA	
#9	Forward	CACGTTGACCCTGAGTGAT	-529~-420
	Reverse	GAGGAAACTCTTGGGCTTC	
#10	Forward	GTCGAAAGGAACTCTAACATGCC	-180~+42
	Reverse	ATCAGCTGATGTGTCTTCTCTAGG	
#11	Forward	TCAGCTGATCCTTTGGACCC	+34~+105
	Reverse	CTCAGAGCTAGGCCGCAGG	

表 6. *Il4* 領域プライマーリスト

Primer name		Sequence	PCR position
A	Forward	GCCAGAACATCAGGGTTAGTT	+14856~+15140
	Reverse	CAGCCTGGACTACATTGGAC	
B	Forward	ATCAGAACATCACGTCGTCT	+12497~+12865
	Reverse	ATGCCAACCTGAAGAACTAAC	
C	Forward	CTCTCCTGCCTCTCTTAATTC	+11172~+11659
	Reverse	CTGATGCCACCTTAGTAAGTG	
D	Forward	AGGCATTATCCATGAGGTAC	+9056~+9347
	Reverse	CAGCCTCTGATTTCGATCAA	
E	Forward	AGAGTGCCAAGTCACTGTTAC	+8332~+8555
	Reverse	CTGTGAGTACTTCGTGCAG	
E'	Forward	GTATGTATGATGCGTATGTGG	+6902~+7142
	Reverse	GCA TGGCACTACACCC	
F	Forward	CCCCACCACA ACTATTAGG	+3286~+3632
	Reverse	CCCCACTTGGTTATTTATGAC	
G	Forward	GGGTGTGAATAAGCCATATTG	+2333~+2507
	Reverse	CCCAGCGTTTACATGAGC	
H	Forward	GCCTGTAGGGACCATACGA	+788~+1019
	Reverse	GCCTTGCTTGATACGGTATCT	
Grogan	Forward	TTGGTCTGATTTACAGG	+4~-177
	Reverse	AACAATGCAATGCTGGC	
I	Forward	GGAGGTTCTGGGCTAGGTTG	-608~-908
	Reverse	GGGCTGTTTCCTGGTTAGTGA	
J	Forward	CTGGAGCAAAGAATAGACCAT	-2475~-2752
	Reverse	TCCAGCCTCTGCCTTATC	
K	Forward	AGAGTGGCACCTGAGACTTAG	-7032~-7227
	Reverse	TGCATGTACTTTGGTAGGGTC	
L	Forward	CATGCCCAGTTGAGATTGT	-9849~-10168
	Reverse	GAATGCCAGTGCTCTTACAGT	

3-11 骨髄由来樹状細胞 (bone marrow dendritic cell (BMDC))の *in vitro* 分化誘導

8 週齢の野生型マウスの大腿骨および、脛骨から骨髄前駆細胞を取り出し、 5×10^5 個/ウェルで 24 ウェルプレートに散布した。培地は 1 ウェルあたり 1ml の RPMI-1640 に 10% FBS, 1 mM 非必須アミノ酸, 100 IU/ml ペニシリン・ストレプトマイシン, 0.03% L-グルタミン, $100 \mu\text{M}$ β -メルカプトエタノール, granulocyte-monocyte colony stimulating factor (10 ng/ml, Promega), IL-4 (1 ng/ml, Promega)を添加したものをを用いて, 37°C , 5% CO_2 の条件下において培養した。2 日に 1 回の頻度で 3 分 4 の培地を新しい培地に交換し, 6 日目の付着性細胞を BMDC として, 回収し 35 Gy 放射線照射処理を行った。

3-12 T-bet 陽性あるいは陰性 iNKT 細胞の *in vitro* 培養

6-8 週齢の野生型マウスの脾臓から, CD1d- α -GC dimer⁺細胞を magnetic-activated cell sorting (MACS[®] Miltenyi Biotech)を用いて, ポジティブセクションで分離した。分離した細胞をさらに FACS AriaTM II を用いて, T-bet 陽性細胞サブセット (TCR β ⁺ CD1d- α -GC dimer⁺ CD4⁺ IL17RB⁻) と T-bet 陰性細胞サブセット (TCR β ⁺ CD1d- α -GC dimer⁺ CD4⁺ IL17RB⁺)に分離した。ソーティング後の目的細胞の純度は 98%以上であることを確認した。ソーティングにより分離した細胞はサブセット毎に 1×10^5 個/ウェルずつ, 2×10^5 個の放射線照射済 BMDC と共に共培養した。培地には RPMI-1640 に 10% FBS, 1 mM 非必須アミノ酸, 100 IU/ml ペニシリン・ストレプトマイシン, 0.03% L-グルタミン, α -CD3 Ab (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 145-2C11 Biolegend)と α -CD28 Ab (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 37.51 Biolegend)を加えたものをを用いた。3 日目に培養上清の半分を RPMI-1640 に上記サプリメントを加えたものに, さらに IL-2 (20 ng/ml, Promega)と IL-7 (20 ng/ml, Promega)を加えた培地に交換し, 以後 3 日毎に培地の半分を上記培地に交換して培養を行った。およそ 3 週間培養したのちに, その他の実験に使用した。

3-13 統計処理

すべてのデータは平均と $\pm$ 標準誤差を示している。サンプル群間の比較は T 検定あるいは, ウェルチの T 検定を行った。p 値は 0.05 以下のものを有意とし, NS の記載は有意差なしを示す。

4. 実験結果

4-1 iNKT 細胞における IFN- γ 産生に関わる候補因子の抽出

iNKT 細胞における IFN- γ 産生に関わる候補因子を抽出するために、公開マイクロアレイデータベースである Reference genomics Database of Immune Cells (RefDIC; <http://refdic.rcai.riken.jp/profile.cgi>)³⁶ を利用し、以下の3つの性質を持つ因子を抽出した。

1. iNKT 細胞で強い発現が認められるもの 2. Type 1 helper T (Th1)細胞の検討において、IFN- γ 産生への関与が示唆されるもの 3. 詳細な機能解析がなされていないもの、これらの条件により候補因子群を 17 遺伝子抽出した (図 1)。

これらの候補因子で、Lentivirus による shRNA で knock-down (KD)を行い、iNKT 細胞における IFN- γ 産生への影響を調べた。上記の中から Bhlhe40 に対する shRNA において、KD により iNKT 細胞における、IFN- γ 産生を低下させる傾向があることを確認した (図 2)。

上記スクリーニングの結果から、以後 Bhlhe40 が iNKT 細胞においてどのような機序で IFN- γ 産生を制御するかという点に注目して検討を進めることとした。

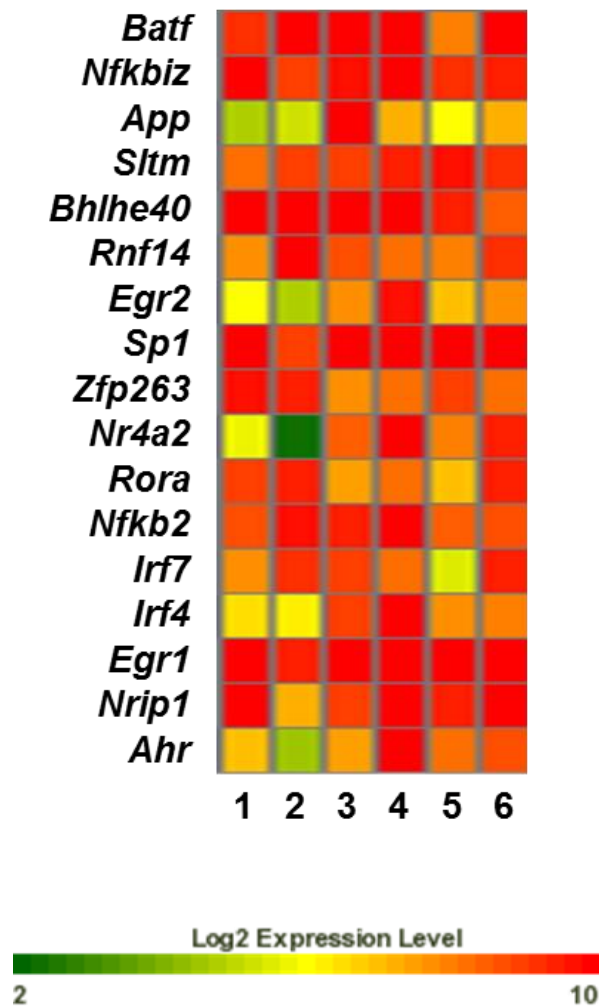


図1 RefDICにより抽出された iNKT 細胞における IFN- γ 産生に関わる候補因子群

RefDIC によって抽出された 17 の候補因子群の iNKT 細胞における発現を表すヒートマップを示す。縦軸は抽出された遺伝子の略称、横軸はデータセットを示す。1, 2: WT マウスの脾臓から抽出された NK1.1⁺TCR β ⁺CD1 β 2M⁺ iNKT 細胞のデータセット (Sample ID: RMSPTNT004001, RMSPTNT005001) 3: α -GC で刺激された野生型マウスの脾臓から抽出された TCR β ⁺ CD1d- α -GC dimer⁺ iNKT 細胞のデータセット (Sample ID : RMSPTNT006001) 4 : α -GC で刺激された NKT クローンマウスの脾臓から抽出された CD1d- α -GC dimer⁺ iNKT 細胞のデータセット (Sample ID: RMSPTNT007001) 5 : 野生型マウスの脾臓から抽出された TCR β ⁺ CD1d- α -GC dimer⁺ iNKT 細胞のデータセット (Sample ID: RMSPTNT008001) 6: α -GC で刺激された NKT クローンマウスの胸腺から抽出された CD1d- α -GC dimer⁺ iNKT 細胞のデータセット (Sample ID: RMTYNT002001)

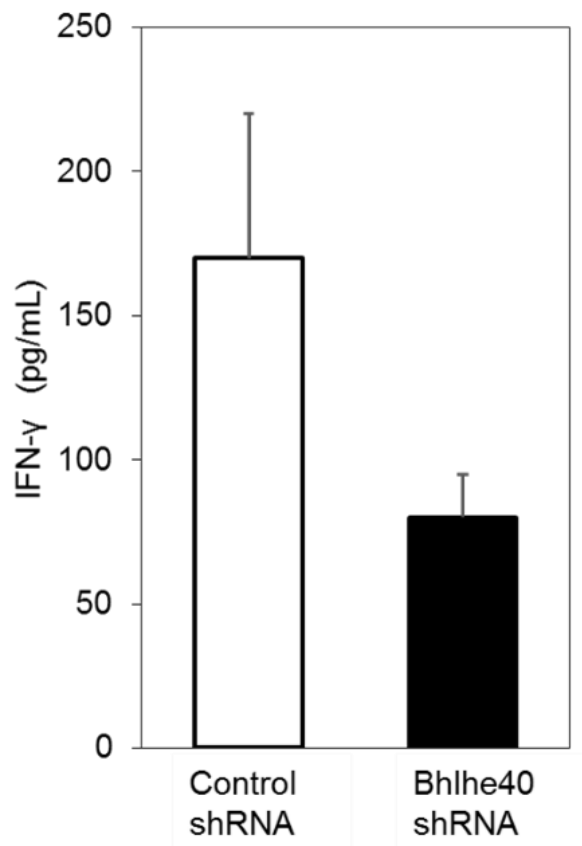


図2 *Bhlhe40* knock-down による *i*NKT 細胞における IFN- γ 産生への影響

Lentivirus による *Bhlhe40* shRNA を脾臓由来 *i*NKT 細胞 (TCR β^+ CD1d- α -GC dimer $^+$)に感染させ、 α -GC 刺激した 48 時間後における培養上清中の IFN- γ 産生を ELISA によって測定した結果を示す。データは 3 回の実験結果の平均値と標準誤差を示す。

4-2 iNKT 細胞における *Bhlhe40* mRNA 発現

これまでの RefDIC と Lentivirus によるスクリーニング解析の結果から *Bhlhe40* に注目して検討をすすめることとした。過去の報告を調べたところ、iNKT 細胞における *Bhlhe40* の発現を詳細に検討した報告がないことから、まずは iNKT 細胞における *Bhlhe40* の生理学的な性質について検討することとした。

まず、*Bhlhe40* の iNKT 細胞における発現量を検討するために、野生型マウスの脾臓 $CD4^+$ T 細胞および $CD8^+$ T 細胞をコントロールとして、iNKT 細胞における *Bhlhe40* mRNA の発現を検討した (図 3)。iNKT 細胞では、 $CD4^+$ T 細胞および $CD8^+$ T 細胞と比較して、*Bhlhe40* mRNA の発現量が多いことが示された。

iNKT 細胞は胸腺細胞から成熟し、その成熟過程は NK1.1 および、CD44 の発現パターンから Stage 1 (NK1.1^{lo} CD44^{lo})、Stage 2 (NK1.1^{lo} CD44^{hi})、Stage 3 (NK1.1^{hi} CD44^{hi}) に分類される⁸ (図 4)。これら胸腺 iNKT 細胞の developmental stage における *Bhlhe40*, *Ifng*, *Tbet* mRNA の発現量を検討したところ、iNKT 細胞の developmental stage が進むにつれ、これらの 3 つの mRNA の発現量が増加する傾向があった (図 5)。

また、iNKT 細胞は CD4 および IL-17 receptor B (IL-17RB) の発現パターンによりサブセット分類される¹² (図 6)。このサブセット分類では、それぞれ異なるサイトカインの産生パターンを示す。 $CD4^+$ IL-17RB⁻ (iNKT1) サブセットでは IFN- γ の産生能が高いとされ、 $CD4^+$ IL-17RB⁺ (iNKT2) サブセットでは IL-4 や IL-13 の産生能が高く、 $CD4^+$ IL-17RB⁺ (iNKT17) サブセットでは IL-17A や IL-22 の産生能が高いとされる⁹⁻¹²。これらのサブセットにおいて *Bhlhe40* mRNA の発現量を検討したところ、developmental stage における検討と同様に、IFN- γ の産生能が高い細胞である $CD4^+$ IL-17RB⁻ (iNKT1) サブセットにおいて、*Bhlhe40* mRNA の発現量が高い傾向があった (図 7)。

Bhlhe40 は哺乳類における生体分子時計の制御に重要な働きをするとされており、視交叉では日内リズムに対応して *Bhlhe40* の発現量が変化する¹⁸。そこで iNKT 細胞においても *Bhlhe40* の発現量に日内リズムが存在するかを検討した。野生型マウスの脾臓 iNKT 細胞および $CD4^+$ T 細胞の *Bhlhe40* mRNA の発現量の日内リズムを調べたところ、iNKT 細胞および $CD4^+$ T 細胞では *Bhlhe40* mRNA の発現量に日内リズムによる変化は認められなかった (図 8)。

さらに、iNKT 細胞に TCR 刺激が入り活性化した際に、*Bhlhe40* mRNA の発現量がどのように変化するかについて検討した。脾臓 iNKT (TCR β^+ CD1d- α -GC dimer⁺) 細胞に、 α -CD3/CD28 Abs で刺激し、0, 24, 48 時間における *Bhlhe40* mRNA の発現量を評価したところ、 α -CD3 Ab 単独あるいは α -CD3/CD28 Abs による刺激により *Bhlhe40* mRNA の発現量が増加する傾向があった (図 9)。

これらの結果から、iNKT 細胞では $CD4^+$ T 細胞や $CD8^+$ T 細胞と比較して、*Bhlhe40*

mRNA の発現量が多く、IFN- γ 産生能の高い developmental stage 3 の胸腺 iNKT 細胞や、CD4⁺ IL-17RB⁻ iNKT 細胞 (iNKT1)において *Bhlhe40* mRNA の発現量が多いことが分かった。更に、iNKT 細胞では *Bhlhe40* mRNA の発現量は α -CD3/CD28 Abs による TCR 刺激により増加するが、日内リズムによる変化はないことが示された。

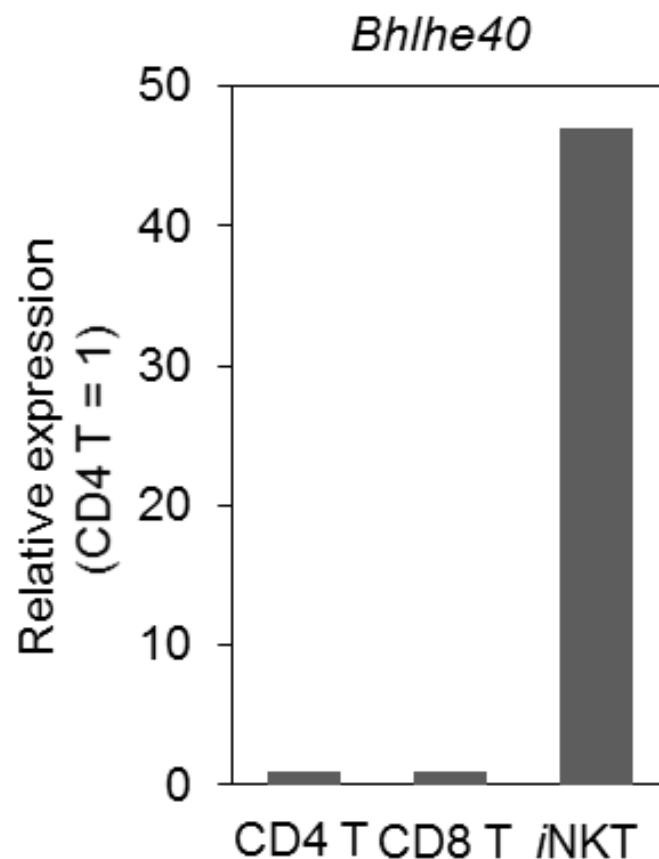


図3 T細胞および、iNKT細胞における *Bhlhe40* mRNA の発現量の比較

野生型マウスの脾臓 CD4⁺T 細胞 (CD4 T; CD3⁺CD4⁺細胞)・CD8⁺T 細胞 (CD8 T; CD3⁺CD8⁺細胞)・iNKT 細胞 (iNKT; TCRβ⁺ CD1d-α-GC dimer⁺細胞)における、*Bhlhe40* mRNA の発現を定量 real-time PCR により測定した結果を示す。データは CD4⁺T 細胞を 1 とした比較 Ct 法により検討したものを示す。3 回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す。

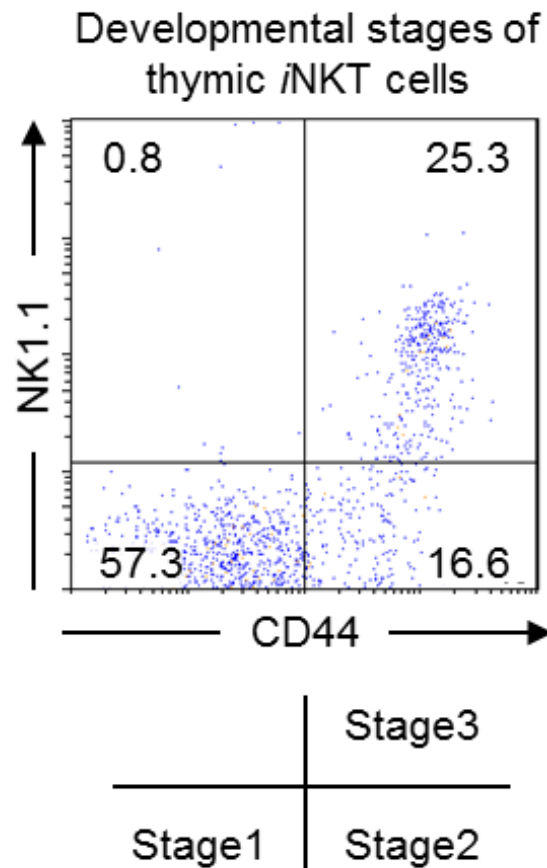


図4 胸腺 iNKT 細胞の細胞表面マーカーによる developmental stage

野生型マウスにおける胸腺 iNKT 細胞の NK1.1 および, CD44 の発現パターンを示す. Dot plot は $\text{TCR}\beta^+ \text{CD1d-}\alpha\text{-GC dimer}^+$ ゲート後に, NK1.1 および CD44 で展開したものを示す. 四分割領域は各アイソタイプコントロールを用いて設定し, 領域内の数字は表示ゲート内の全細胞における領域内細胞の占める割合 (%) を示す.

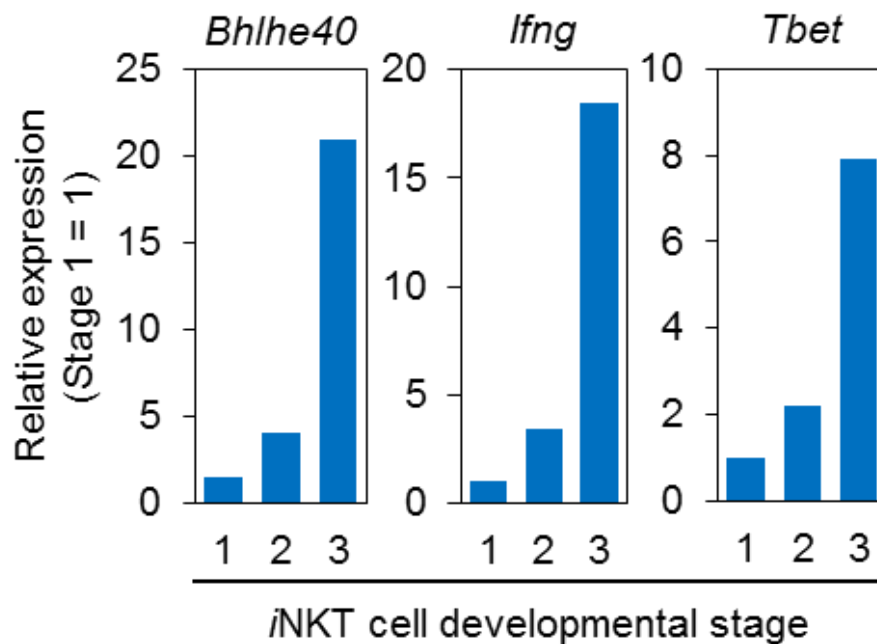


図5 胸腺 iNKT 細胞の developmental stage における *Bhlhe40*, *Ifng*, *Tbet* mRNA の発現量の比較

野生型マウスの胸腺 iNKT ($\text{TCR}\beta^+$ $\text{CD1d-}\alpha\text{-GC dimer}^+$)細胞の各 Stage における *Bhlhe40*, *Ifng*, *Tbet* mRNA の発現量を示す. 1 は Stage 1 (NK1.1^{lo} CD44^{lo}), 2 は Stage 2 (NK1.1^{lo} CD44^{hi}), 3 は Stage 3 (NK1.1^{hi} CD44^{hi})を指す. 定量 real-time PCR の結果を Stage 1 = 1 とした比較 Ct 法により検討したものを示す. 3 回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す.

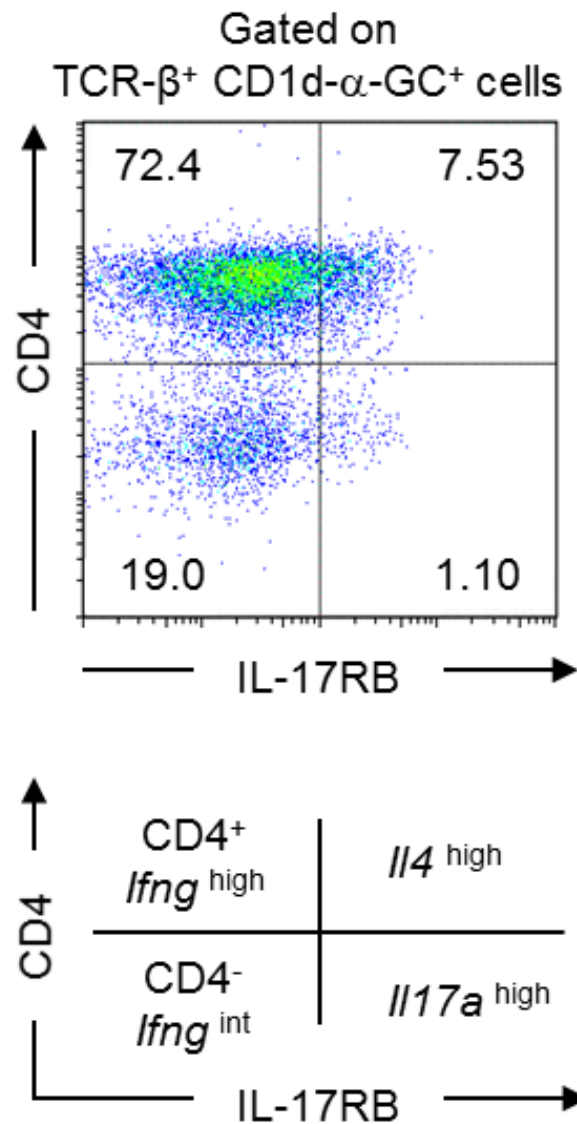


図6 iNKT細胞のサブセット分類

野生型マウスの脾臓 iNKT 細胞の CD4 および IL-17RB の発現パターンを示す。Pseudocolor plot は TCR β^+ CD1d- α -GC dimer $^+$ でゲートしたのちに、CD4 および IL-17RB で展開したものを示す。四分割領域は各アイソタイプコントロールを用いて設定し、領域内の数字は表示ゲート内の全細胞における領域内細胞の占める割合 (%)を示す。

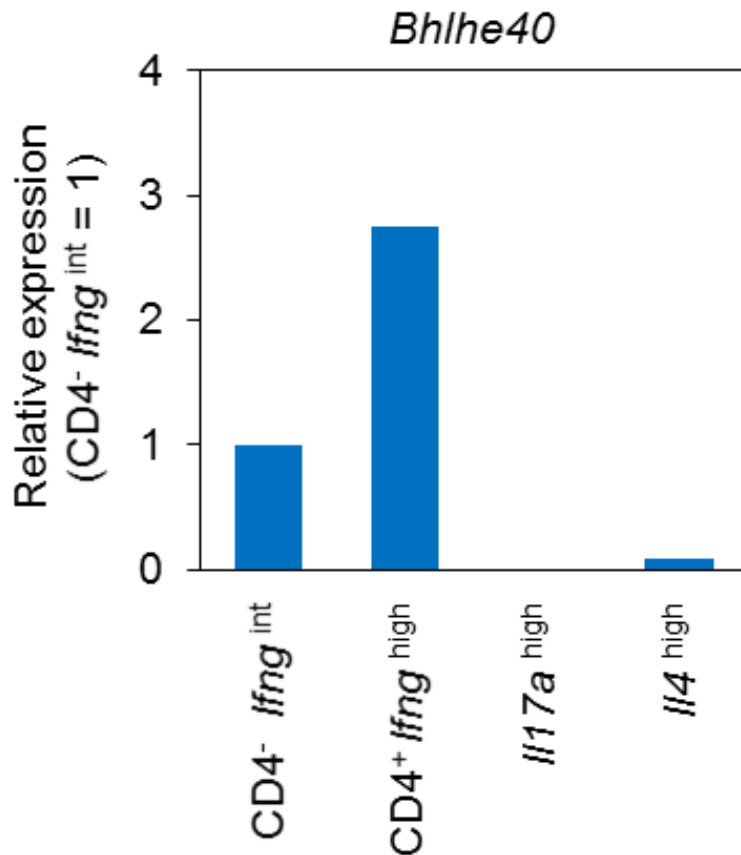


図7 iNKT細胞のサブセットにおける *Bhlhe40* mRNA の発現量の比較

野生型マウスの脾臓 iNKT 細胞のサブセットにおける *Bhlhe40* mRNA の発現量を示す。CD4⁻ *Ifng*^{int} (CD4⁻ IL-17RB⁻), CD4⁺ *Ifng*^{high} (CD4⁺ IL-17RB⁻), *Il4*^{high} (CD4⁺ IL-17RB⁺), *Il17a*^{high} (CD4⁻ IL-17RB⁺)を示し、定量 real-time PCR の結果を CD4⁻ *Ifng*^{int} = 1 とした比較 Ct 法により検討したものを示す。3回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す。

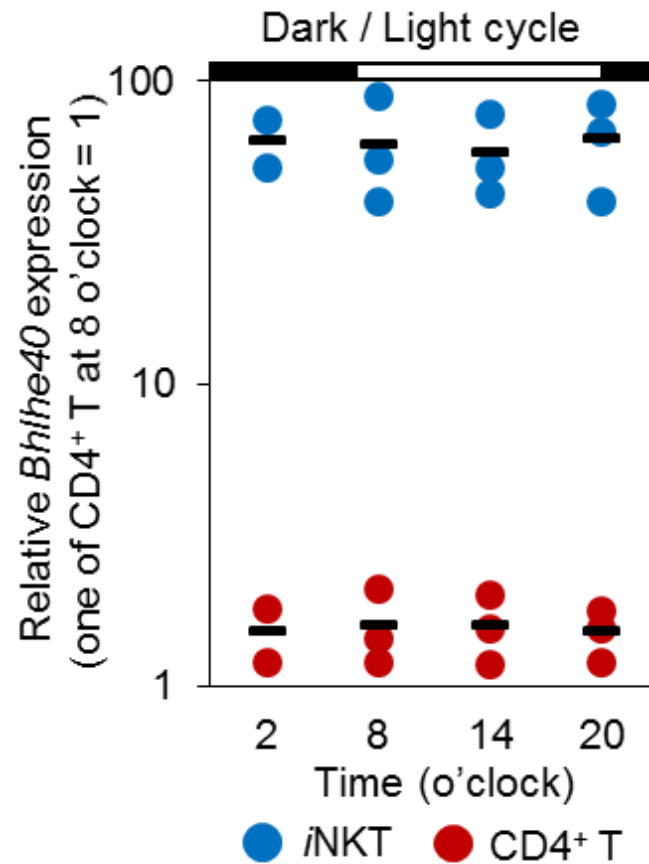


図 8 iNKT 細胞および CD4⁺ T 細胞における，日内リズムによる *Bhlhe40* mRNA の発現量の変化

野生型マウスにおける脾臓 iNKT 細胞 (iNKT) および CD4⁺ T 細胞 (CD4 T) の *Bhlhe40* mRNA の日内変動を示す．定量 real-time PCR の結果を 8 時における CD4⁺ T 細胞の 1 サンプル = 1 とした比較 Ct 法により検討したものを示す．点は各マウスのデータを示し，線は平均値を示す．8 時から 21 時までが明周期，21 時から 8 時までが暗周期を示す．3 回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す．

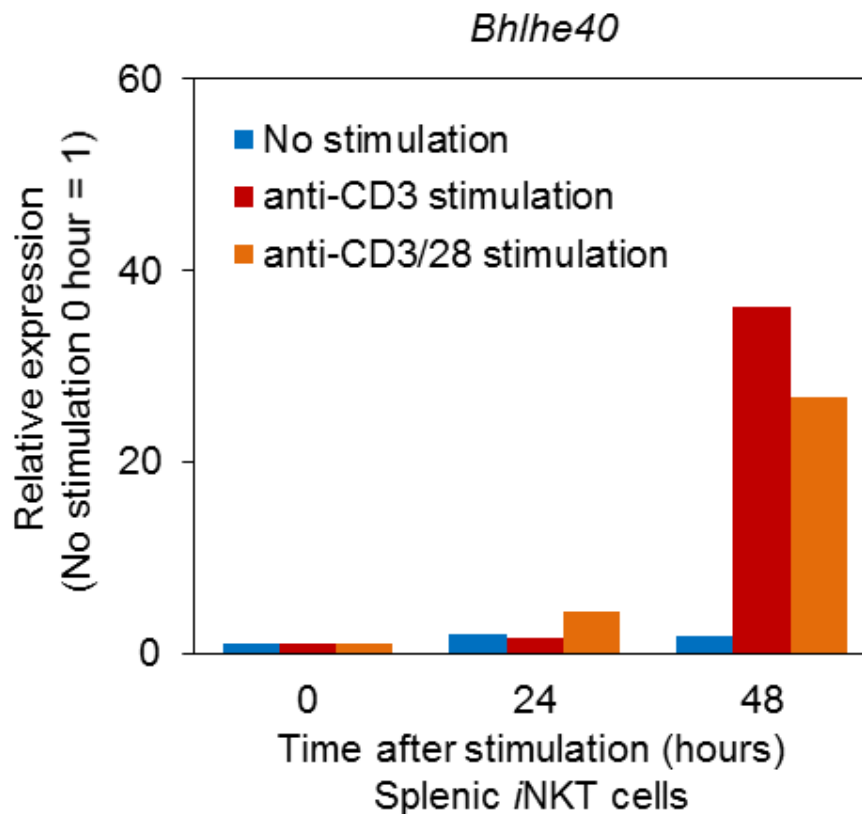


図9 TCR 刺激による iNKT 細胞の *Bhlhe40* mRNA の発現量の変化

野生型マウスにおける iNKT 細胞に、*in vitro* で α -CD3 Ab および α -CD3/CD28 Abs による TCR 刺激を行った。0, 24, 48 時間における *Bhlhe40* mRNA の発現量を示す。定量 real-time PCR により、0 時間における未刺激の iNKT 細胞 = 1 とした比較 Ct 法により検討したものを示す。3 回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す。

4-3 *Bhlhe40*^{-/-}マウスでは iNKT 細胞は正常に分化・成熟する

Bhlhe40 が iNKT 細胞に与える影響を検討するために, *Bhlhe40*^{-/-}マウスを導入してその性質を検討することとした²³. このマウスにおいて iNKT 細胞がどのような異常を示すかについては検討がなく, 本研究を通じてそれを明らかにすることとした. これまでの検討により, IFN- γ 産生能が高い iNKT 細胞において *Bhlhe40* mRNA の発現量が高いことから, まず *Bhlhe40* のノックアウトによる iNKT 細胞の分化・成熟への影響を検討した.

まず, 野生型マウスと *Bhlhe40*^{-/-}マウスにおいて, iNKT 細胞の存在頻度に差があるかを検討した. iNKT 細胞の主要な存在臓器である胸腺・肝臓・脾臓において iNKT 細胞の頻度を比較したが, 野生型と *Bhlhe40*^{-/-}マウス間に明らかな違いは認められなかった (図 10). また, CD4 および IL-17RB による iNKT 細胞サブセットの解析も行ったが, 野生型と *Bhlhe40*^{-/-}マウス間に明らかな違いは認められなかった (図 11). さらに, 胸腺 iNKT 細胞における, NK1.1 および CD44 の発現パターンによる developmental stage に関しても, 野生型と *Bhlhe40*^{-/-}マウス間に明らかな違いは認められなかった (図 12). ここまでの検討の結果から胸腺・肝臓・脾臓における iNKT 細胞の割合には野生型と *Bhlhe40*^{-/-}マウス間に明らかな差がないことが示された.

次に iNKT 細胞の成熟状態を検討するために, 成熟 iNKT 細胞のマーカーとされる Ly49 ファミリー (Ly49A, Ly49C, Ly49G2)³⁷ の発現を評価した. 野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウスの胸腺 iNKT 細胞において Ly49 ファミリーの発現に違いは認められなかった (図 13). また, 胸腺 DP 細胞上に発現する CD1d と signaling lymphocytic activation molecule family member 1 (SLAMF1)は, NKT 前駆細胞に作用して iNKT 細胞の成熟に関与するとされる^{15,38}. 胸腺 DP 細胞の CD1d と SLAMF1 発現を評価したが, これらの分子の発現も野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウス間に相違はなかった (図 14). これらのことから, *Bhlhe40* 欠損による iNKT 細胞の分化・成熟への明らかな異常は認められないと考えられた.

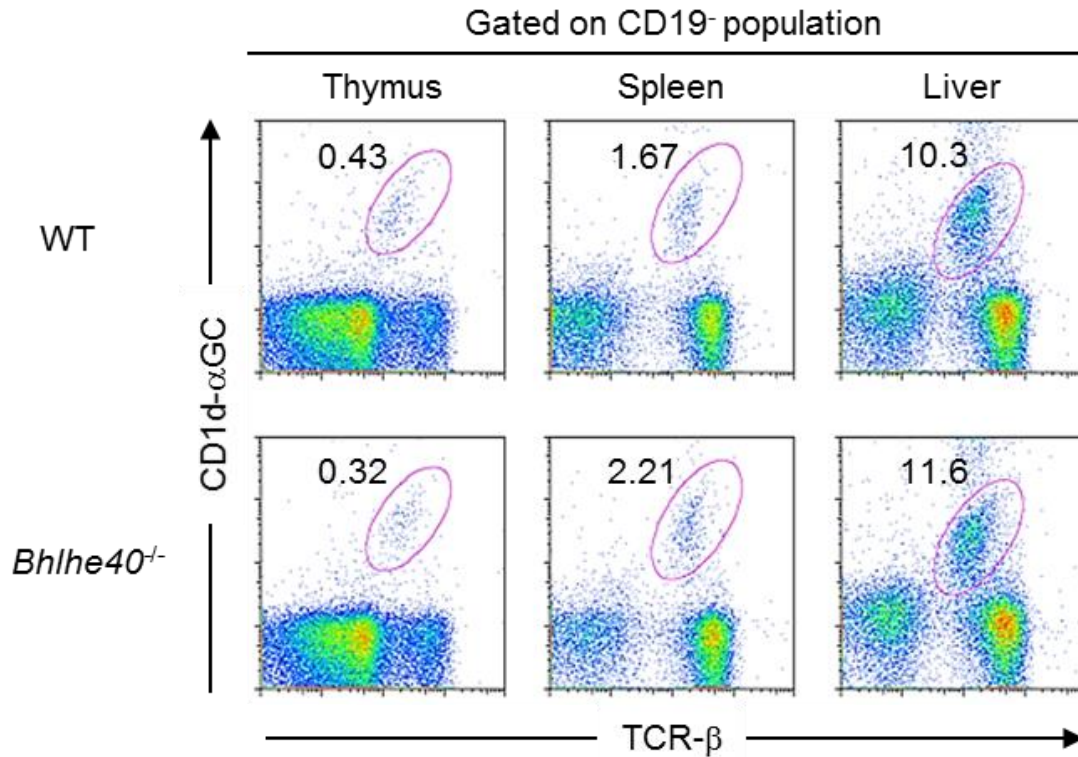


図 10 野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウスの胸腺・脾臓・肝臓の iNKT 細胞

野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウスの胸腺・脾臓・肝臓の iNKT 細胞の割合を示す。Pseudocolor plot は CD 19 をゲートアウトしたのちに、TCRβ および CD1d-α-GC dimer で展開したものを示す。楕円で囲われた TCRβ⁺CD1d-α-GC dimer⁺ の領域が iNKT 細胞を示す。領域内の数字は表示ゲート内の全細胞における領域内細胞の占める割合 (%)を示す。3 回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す。

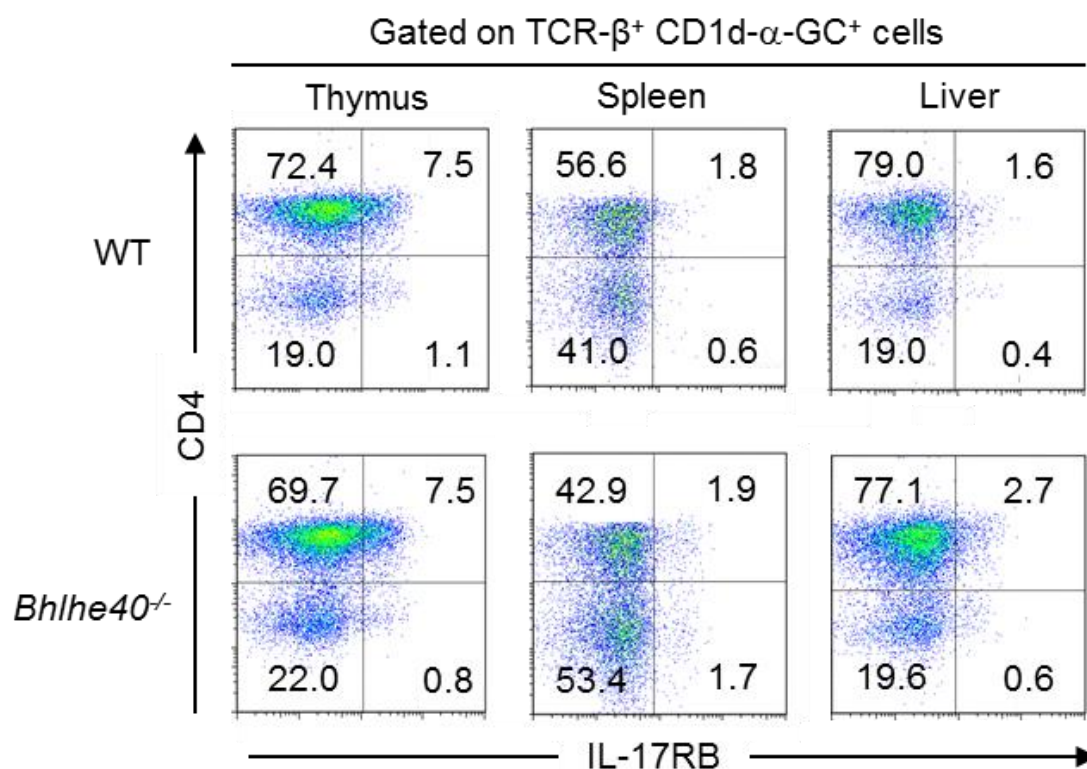


図 11 野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウスの胸腺・脾臓・肝臓の iNKT 細胞サブセットの割合を示す。Pseudocolor plot は TCR β ⁺ CD1d- α -GC dimer⁺ でゲートしたのちに、CD4 および IL-17RB で展開したものを示す。四分割領域は各アイソタイプコントロールを用いて設定し、領域内の数字は表示ゲート内の全細胞における領域内細胞の占める割合 (%)を示す。3 回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す。

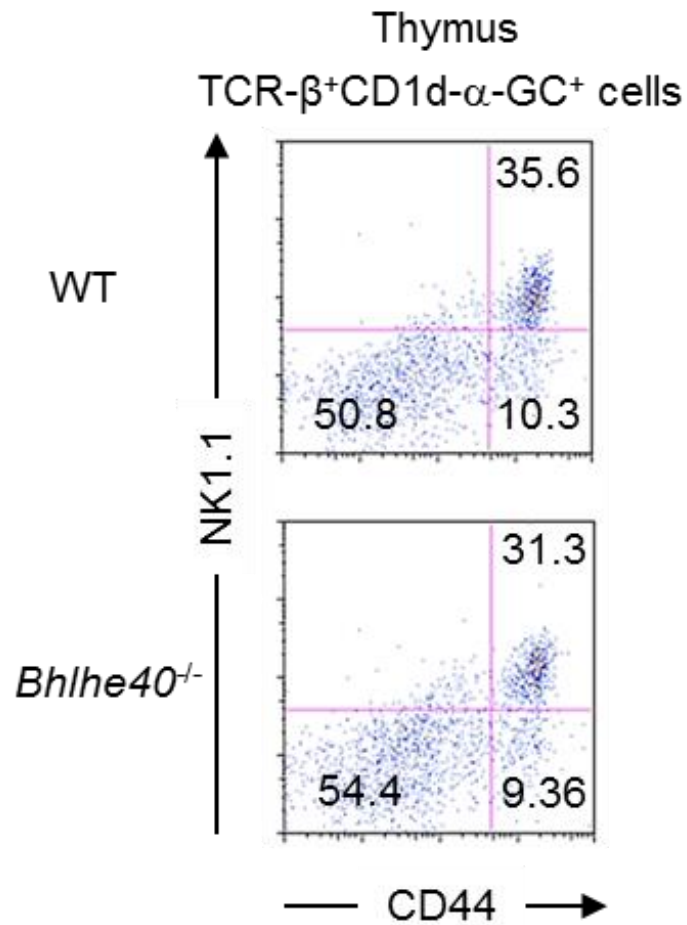


図 12 野生型および *Bhlhe40* $^{-/-}$ マウスの胸腺 iNKT 細胞 developmental stage

野生型および *Bhlhe40* $^{-/-}$ マウスにおける胸腺 iNKT 細胞における, NK1.1 および CD44 の発現パターンによる developmental stage を示す. Pseudocolor plot は TCR β^+ CD1d- α -GC dimer $^+$ でゲートしたのちに NK1.1 および CD44 で展開したものを示す. 四分割領域は各アイソタイプコントロールを用いて設定し, 領域内の数字は表示ゲート内の全細胞における領域内細胞の占める割合 (%) を示す. 3 回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す.

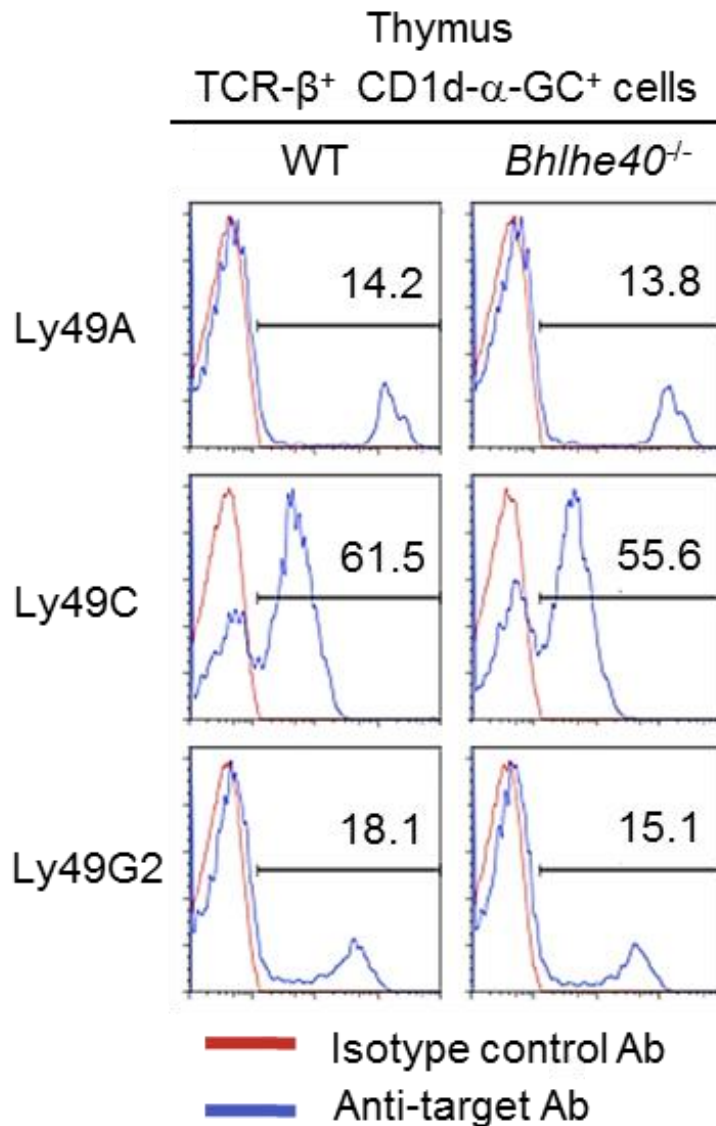


図 13 野生型および *Bhlhe40* $^{-/-}$ マウスの胸腺 iNKT 細胞における Ly49 ファミリーの発現

野生型および *Bhlhe40* $^{-/-}$ マウスにおける胸腺 iNKT 細胞の Ly49A, Ly49C, Ly49G2 の発現パターンを示す。ヒストグラムは TCR β^+ CD1d- α -GC dimer $^+$ でゲートしたのちにアイソタイプコントロールと重ねたものを示す。数字はアイソタイプコントロールから求められる Target 陽性細胞のゲート内に占める割合 (%)を示す。3 回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す。

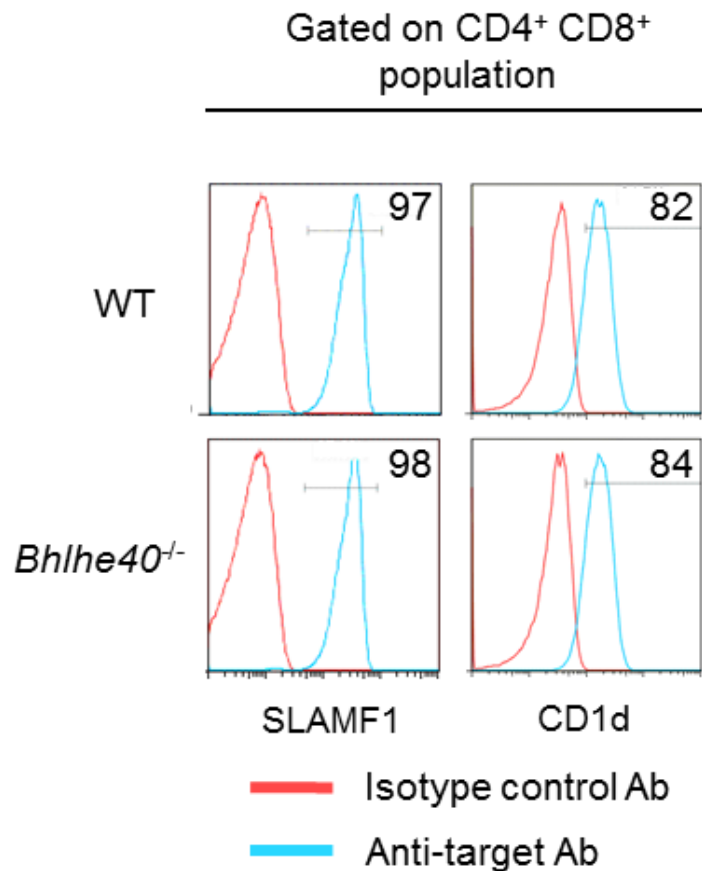


図 14 野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウスの胸腺 DP 細胞における CD1d および SLAMF1 の発現

野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウスにおける胸腺 DP 細胞の CD1d および SLAMF1 の発現パターンを示す。ヒストグラムは胸腺細胞を CD4⁺ CD8⁺でゲートしたのちにアイソタイプコントロールと重ねたものを示す。数字はアイソタイプコントロールから求められる Target 陽性細胞のゲート内に占める割合 (%)を示す。3 回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す。

4-4 Bhlhe40 は iNKT 細胞の IFN- γ 産生を制御する

これまでの検討で, Bhlhe40 は IFN- γ 産生能の高い iNKT 細胞 (iNKT1 および胸腺 iNKT 細胞 developmental stage 3)での発現量が多いことが明らかとなり, *Bhlhe40* 欠損は iNKT 細胞の分化・成熟には明らかな影響を与えないことが示された. そこで, Bhlhe40 は実際に iNKT 細胞の IFN- γ の産生を制御するかについて検討した.

iNKT 細胞は外来刺激にすみやかに応答し, IFN- γ を産生することが特徴とされる. 迅速な IFN- γ の産生機序には pre-formed *Ifng* mRNA の存在が関与しているとされている³⁹. そこで, 未刺激の iNKT 細胞の各サブセットにおける pre-formed cytokine mRNA について検討した. 野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウスの iNKT 細胞間において, pre-formed *Ifng*, *Il4*, *Il17a* mRNA の発現量に差は認められなかった (図 15). これまでの結果を合わせると, Bhlhe40 は休止状態の iNKT 細胞に対して明らかな影響を与えないと考えられた.

次に, *in vitro* で α -GC による TCR 刺激を行い iNKT 細胞によるサイトカイン産生を ELISA で評価した. すると, *Bhlhe40*^{-/-}マウス iNKT 細胞では野生型 iNKT 細胞と比較して, IFN- γ の産生が低下し, IL-4 の産生は変化がなかった (図 16).

これらのサイトカイン産生能の違いが生じた原因として, まず iNKT 細胞の α -GC 刺激による細胞増殖反応に野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウス iNKT 細胞の間で差がある可能性を考え, ³H チミジン取り込み能を利用した細胞増殖アッセイを行った. このアッセイ系において, α -GC 刺激 48 時間後までに, 野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウスの iNKT 細胞の細胞増殖に差はないことがわかった (図 17).

さらに, TCR 刺激を α -CD3/CD28 Abs による刺激に変えて, 時間経過に伴う iNKT 細胞の *Ifng* mRNA の産生能を評価した. この実験においても, *Bhlhe40*^{-/-}マウス iNKT 細胞で *Ifng* mRNA の産生が低下する傾向にあった (図 18).

これらのことから, *Bhlhe40*^{-/-}マウス iNKT 細胞における IFN- γ の産生能の低下の原因として, iNKT 細胞における TCR 刺激を介した IFN- γ 産生機構に Bhlhe40 が関与していることが推定された.

さらに, *in vivo* においても IFN- γ の産生異常が生じるかどうかについて検討した. まず, 野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウスに α -GC を投与し, 1 時間後の脾臓 iNKT 細胞における IFN- γ および IL-4 の細胞内染色を行った. IFN- γ の細胞内発現は *Bhlhe40*^{-/-}マウス iNKT 細胞のほうが野生型 iNKT 細胞よりも低下しており, IL-4 の細胞内発現には差が認められなかった (図 19). また, 野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウスに α -GC に投与し, 血清 IFN- γ および IL-4 の時間経過による変化を評価した. 血清 IFN- γ は α -GC 投与 12 時間後において, *Bhlhe40*^{-/-}マウスにおいて低下していたが, IL-4 は野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウスにおいて差がなかった (図 20).

血清サイトカイン濃度は iNKT 細胞以外のサイトカイン産生の影響も受けうること

から，上記結果のみでは *i*NKT 細胞における *Bhlhe40* 欠損による影響で血清サイトカイン濃度が変化したのか，その他の細胞における *Bhlhe40* 欠損が影響したことによっておこったものかを判断することはできない．そこで，これらの血清サイトカイン濃度の差が *i*NKT 細胞における *Bhlhe40* 欠損によるものであることを示すために，*i*NKT 細胞欠損マウスである *Ja18*^{-/-} マウスに対して，野生型および *Bhlhe40*^{-/-} マウスの *i*NKT 細胞を add-back してから， α -GC 刺激を行って血清 IFN- γ および IL-4 の時間経過による変化を評価した．Add-back 実験においても，血清 IFN- γ 濃度が *Bhlhe40*^{-/-} マウスにおいて低くなる傾向があり，IL-4 は野生型および *Bhlhe40*^{-/-} マウスにおいて差がなかった (図 21)．

これらのことから，*i*NKT 細胞における *Bhlhe40* 欠損は TCR 刺激による IFN- γ の産生能を低下させるが，IL-4 の産生能には影響を与えず， α -GC 投与によって引き起こされる初期免疫応答による血中 IFN- γ 産生を低下させることが分かった．

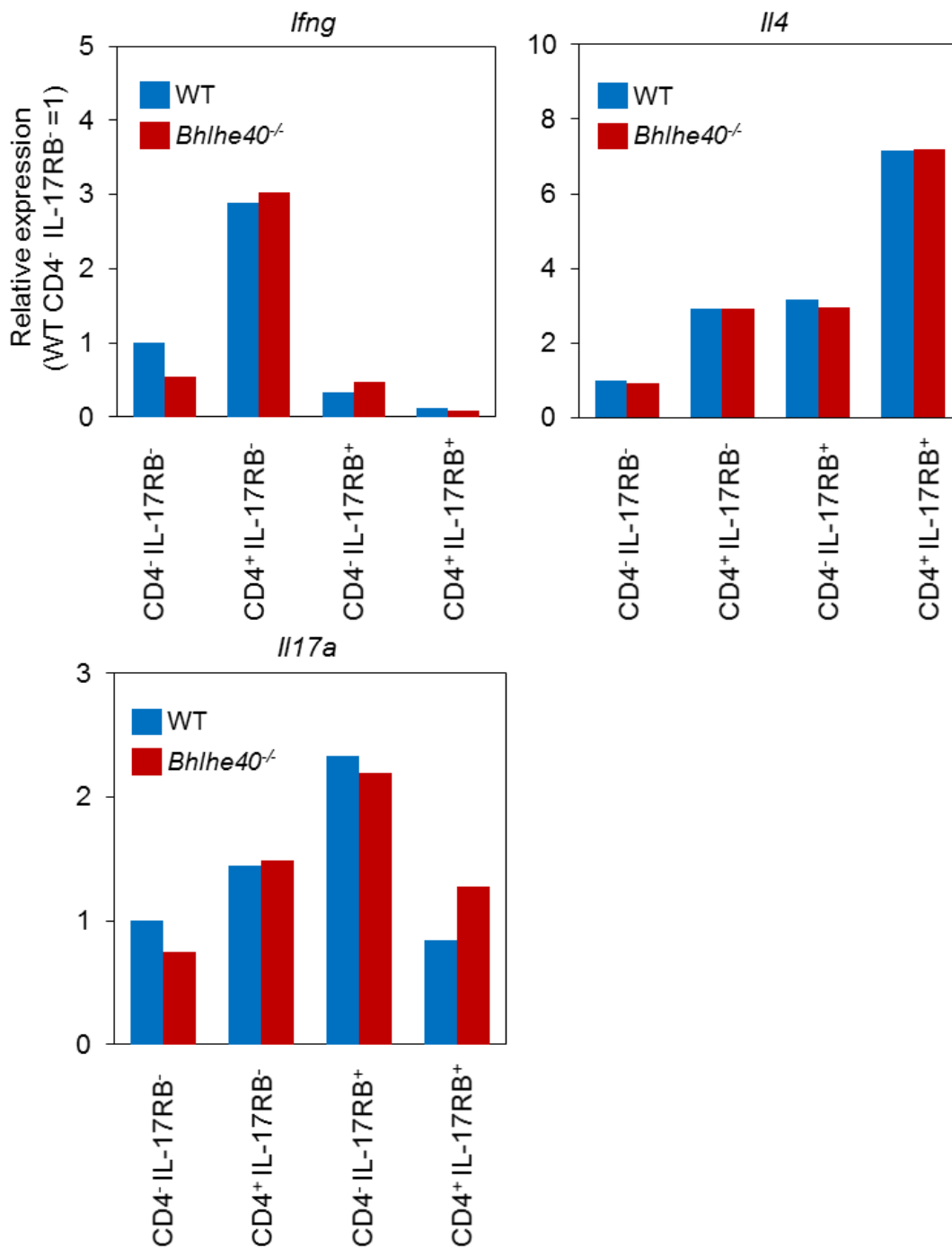


図 15 野生型および *Bhlhe40*^{-/-} マウス iNKT 細胞サブセットにおける pre-formed *Ifng*, *Il4*, *Il17a* mRNA の発現量の比較

野生型および *Bhlhe40*^{-/-} マウスの脾臓 iNKT (TCRβ⁺ CD1d-α-GC dimer⁺) 細胞のサブセットにおける pre-formed *Ifng*, *Il4*, *Il17a* mRNA の発現量を示す。定量 real-time PCR の結果を野生型 CD4⁻ IL-17RB⁻ = 1 とした比較 Ct 法により検討したものを示す。3 回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す。

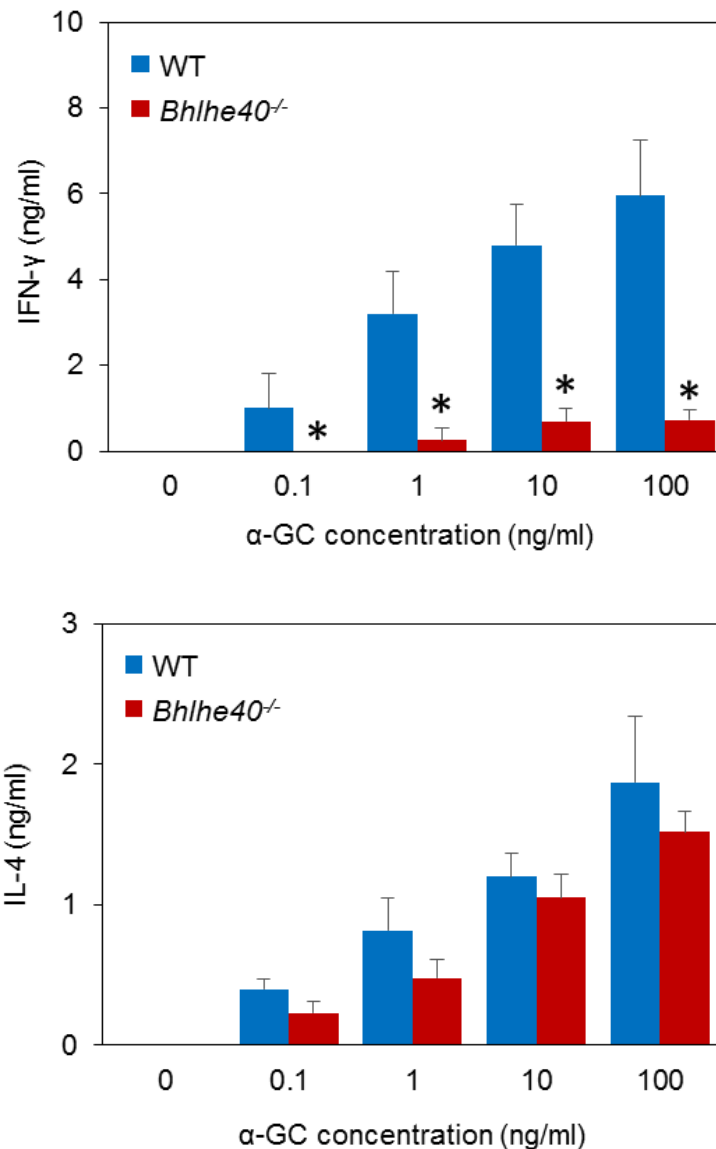


図 16 野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウス *i*NKT 細胞の α -GC 刺激による IFN- γ および IL-4 の産生

野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウスの脾臓 *i*NKT (TCR β ⁺ CD1d- α -GC dimer⁺)細胞を *in vitro* 培養条件下において α -GC 刺激 (0, 0.1, 1, 10, 100 (ng/ml))を行い, 48 時間後の培養上清内のサイトカイン濃度を ELISA で測定したものを示す. 野生型マウス *i*NKT 細胞の結果を WT, *Bhlhe40*^{-/-}マウス *i*NKT 細胞の結果を *Bhlhe40*^{-/-}として示す. グラフは平均値と標準誤差を示す. *は同一条件における野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウスのデータを T 検定で比較した際 p 値が 0.01 未満のものを示す.

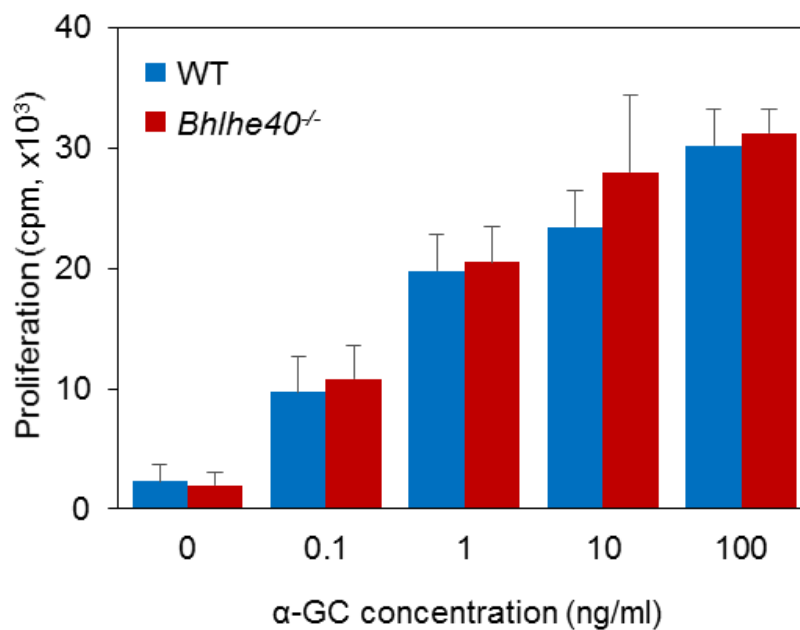


図 17 野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウス iNKT 細胞の α -GC 刺激による ³H チミジン 取り込み能

野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウスの脾臓 iNKT (TCR β ⁺ CD1d- α -GC dimer⁺)細胞を *in vitro* 培養条件下において α -GC 刺激 (0, 0.1, 1, 10, 100 (ng/ml))を行い, 40 時間から 48 時間における ³H チミジン取り込み能を測定したものを示す. 野生型マウス iNKT 細胞の結果を WT, *Bhlhe40*^{-/-}マウス iNKT 細胞の結果を *Bhlhe40*^{-/-}として示す. グラフは平均値と標準誤差を示す.

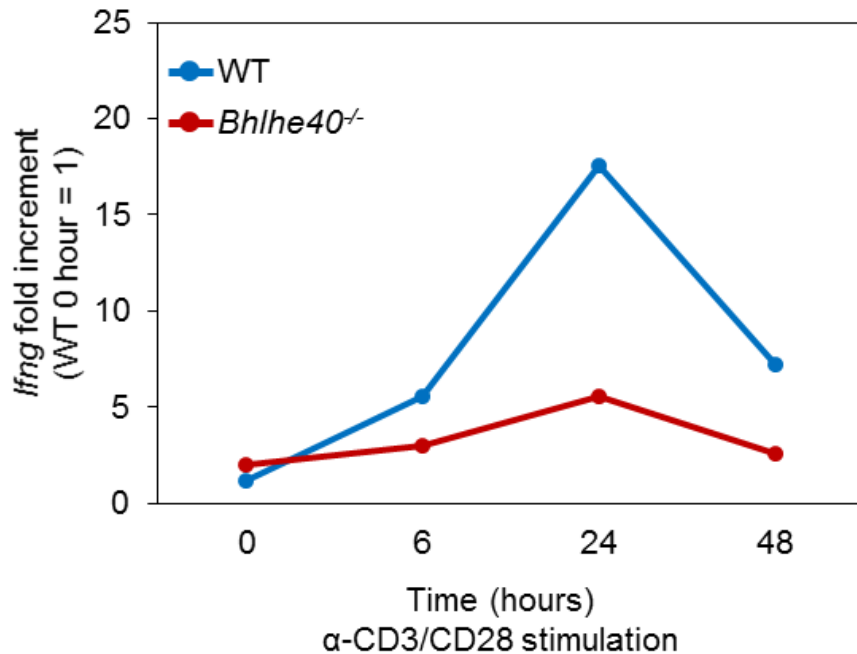


図 18 野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウス iNKT 細胞の α -CD3/CD28 Abs 刺激による *Ifng* mRNA の産生の時間経過による変化

野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウスの脾臓 iNKT (TCR β ⁺ CD1d- α -GC dimer⁺)細胞を *in vitro* 培養条件下において α -CD3/CD28 Abs (3, 1 μ g/ml)で刺激し, 0, 6, 24, 48 時間における *Ifng* mRNA の産生量を示す. 野生型マウス iNKT 細胞の結果を WT, *Bhlhe40*^{-/-}マウス iNKT 細胞の結果を *Bhlhe40*^{-/-}として示す. 定量 real-time PCR の結果を野生型 iNKT 細胞の 0 時間 = 1 とした比較 Ct 法により検討したものを示す. 3 回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す.

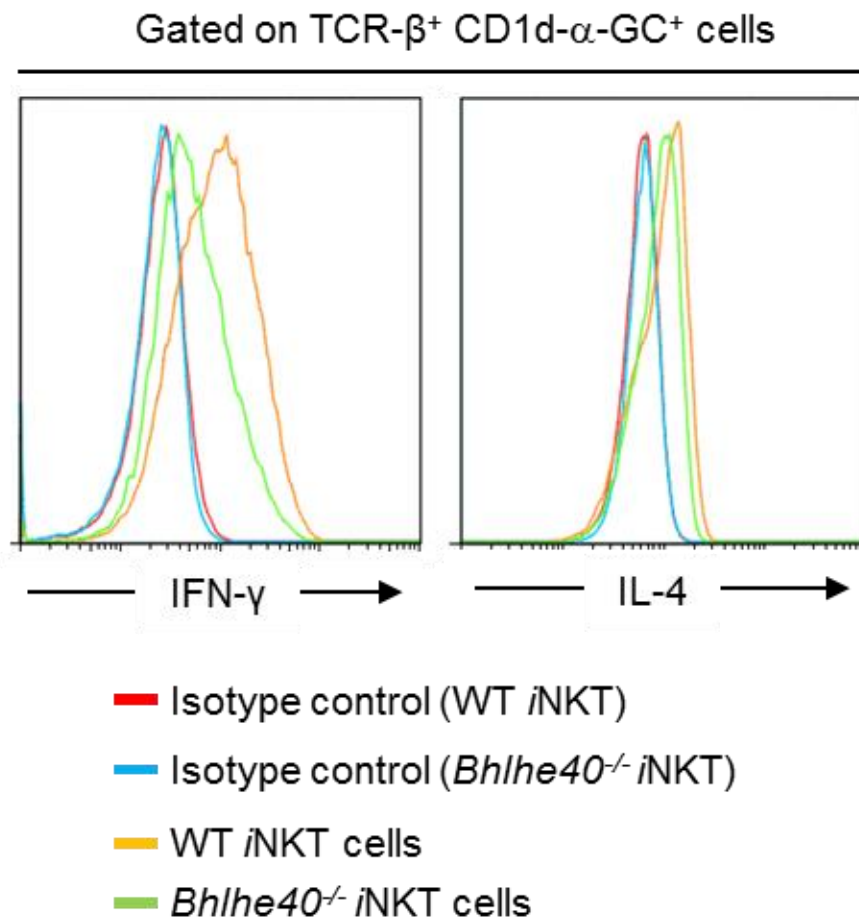


図 19 野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウスに *in vivo* α -GC 刺激した際の脾臓 *i*NKT 細胞における IFN- γ および IL-4 の細胞内染色

野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウスに α -GC 刺激 (1.5 μ g)を尾静脈投与し, 1 時間後に脾臓 *i*NKT (TCR β^+ CD1d- α -GC dimer $^+$)細胞の IFN- γ および IL-4 の細胞内染色を示す. ヒストグラムは TCR β^+ CD1d- α -GC dimer $^+$ でゲートしたのちにアイソタイプコントロールと重ねたものを示す. 3 回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す.

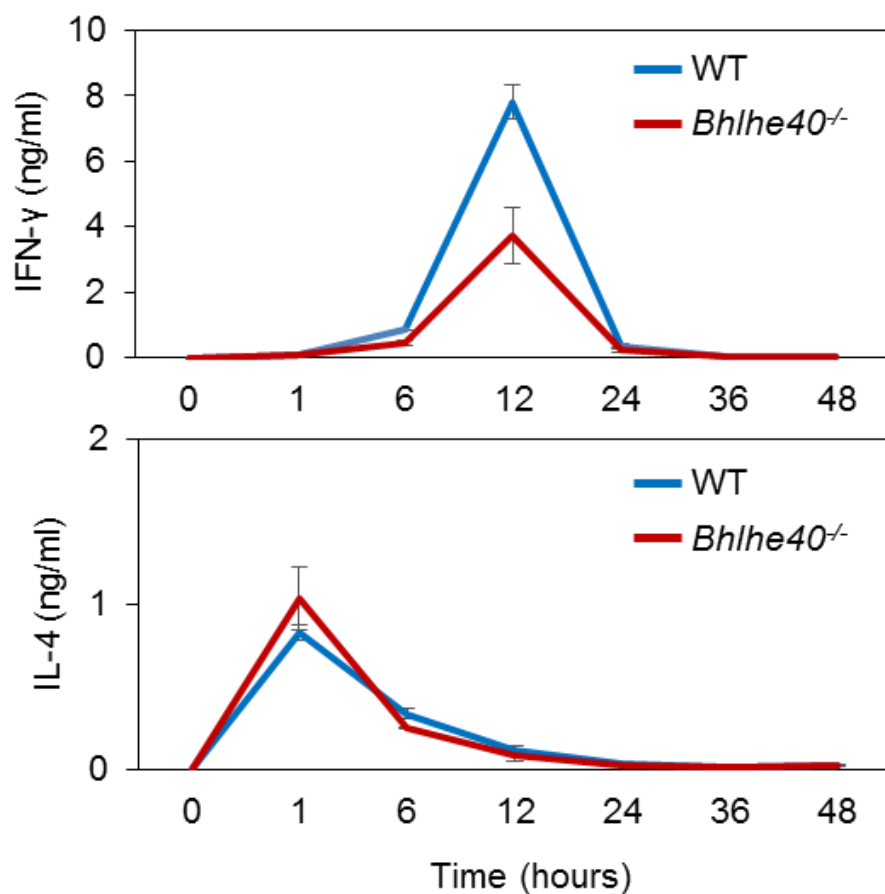


図 20 野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウスに *in vivo* α-GC 刺激した際の血清 IFN-γ および IL-4 濃度の時間経過による変化

野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウス (各 3 匹)に α-GC 刺激 (2 μg)を尾静脈投与し, 0, 1, 6, 12, 24, 36, 48 時間後における血清 IFN-γ および IL-4 の濃度を ELISA で測定したものを示す. 野生型マウスの結果を WT, *Bhlhe40*^{-/-}マウスの結果を *Bhlhe40*^{-/-}として示す. グラフは平均値と標準誤差を示す.

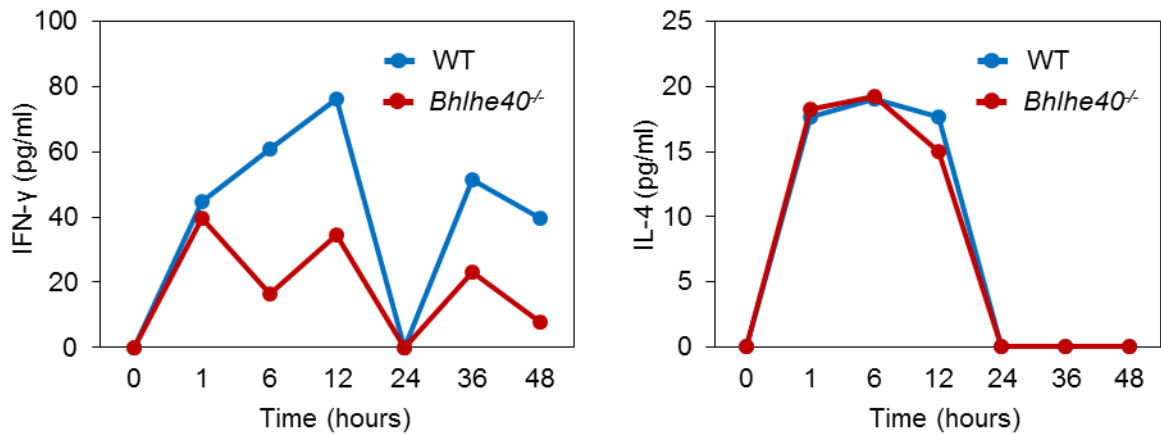


図 21 *Ja18*^{-/-} マウスに野生型および *Bhlhe40*^{-/-} iNKT 細胞を add-back し, α -GC 刺激した際の血清 IFN- γ および IL-4 濃度の時間経過による変化

iNKT ノックアウトマウス (*Ja18*^{-/-}マウス)に野生型および *Bhlhe40*^{-/-} iNKT (TCR β ⁺CD1d- α -GC dimer⁺)細胞を 2×10^6 個 add-back し, 1 時間後に α -GC (2 μ g) を尾静脈投与し, add-back から 0, 1, 6, 12, 24, 36, 48 時間後における血清 IFN- γ および IL-4 の濃度を ELISA で測定したものを示す. 野生型マウス iNKT 細胞を add-back した *Ja18*^{-/-}マウスの結果を WT, *Bhlhe40*^{-/-}マウス iNKT 細胞を add-back した *Ja18*^{-/-}マウスの結果の結果を *Bhlhe40*^{-/-}として示す. 3 回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す.

4-5 *Bhlhe40* 欠損は iNKT 細胞の抗腫瘍活性を低下させる

これまでの検討で, *Bhlhe40* 欠損は iNKT 細胞における IFN- γ 産生能を低下させることが示されたが, この異常の生理学的意義に関してはまだ明らかにできていない. iNKT 細胞の IFN- γ 産生は腫瘍の転移抑制において重要な働きを担っていることが報告されている⁴⁰⁻⁴². そこで, メラノーマの転移モデルを用いて, iNKT 細胞における *Bhlhe40* 欠損が起こす生理学的異常を検討した.

まず, 野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウスに B16 メラノーマ細胞を投与し, α -GC あるいは PBS の投与を行い, 7 日後の肺表面に認められる転移結節数を検討した. 野生型では α -GC 投与により, 肺表面の転移結節数は著名に減少するが, *Bhlhe40*^{-/-}マウスでは, α -GC 投与を行っても, 肺表面の転移結節数の減少は認められなかった (図 22, 23). 本研究で用いている *Bhlhe40*^{-/-}マウスはすべての細胞で *Bhlhe40* が欠損していることから, 先のサイトカイン産生能の実験と同様に, iNKT 細胞以外の細胞における *Bhlhe40* 欠損が結果に影響している可能性が否定できない. そこで, add-back 実験を行った. *Ja18*^{-/-}マウスに B16 メラノーマ細胞を脾臓に投与し, 野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウス iNKT 細胞あるいは生理食塩水を投与してから, α -GC 投与した. 処置後 10 日目に肝表面におけるメラノーマの肝表面の占拠面積を評価した. *Bhlhe40*^{-/-}マウス iNKT 細胞を add-back した群で, 野生型 iNKT 細胞を add-back した群よりも, 肝転移したメラノーマ細胞の占拠面積の増加が認められ, 腫瘍転移の抑制能が低下していた (図 24, 25, 26).

これらの結果から, *Bhlhe40* 欠損は iNKT 細胞における IFN- γ 産生能を低下させ, 抗腫瘍活性が低下することが示された.

Lung metastasis model

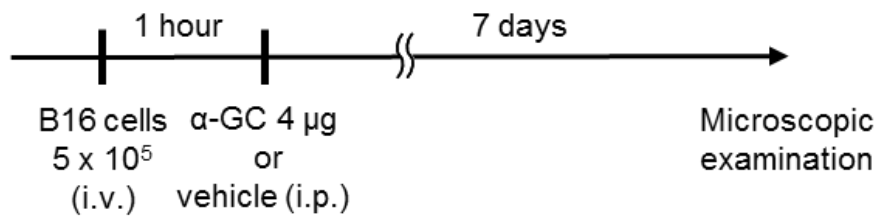


図 22 肺転移モデルの実験系

野生型および *Bhlhe40*^{-/-} マウス (各 3 匹) に B16 メラノーマ細胞を 5×10^5 個ずつ尾静脈投与により接種し, α -GC (4 μ g) あるいは同体積の PBS を腹腔内投与した. 7 日後の肺表面に認められる転移結節数を実体顕微鏡下に評価した.

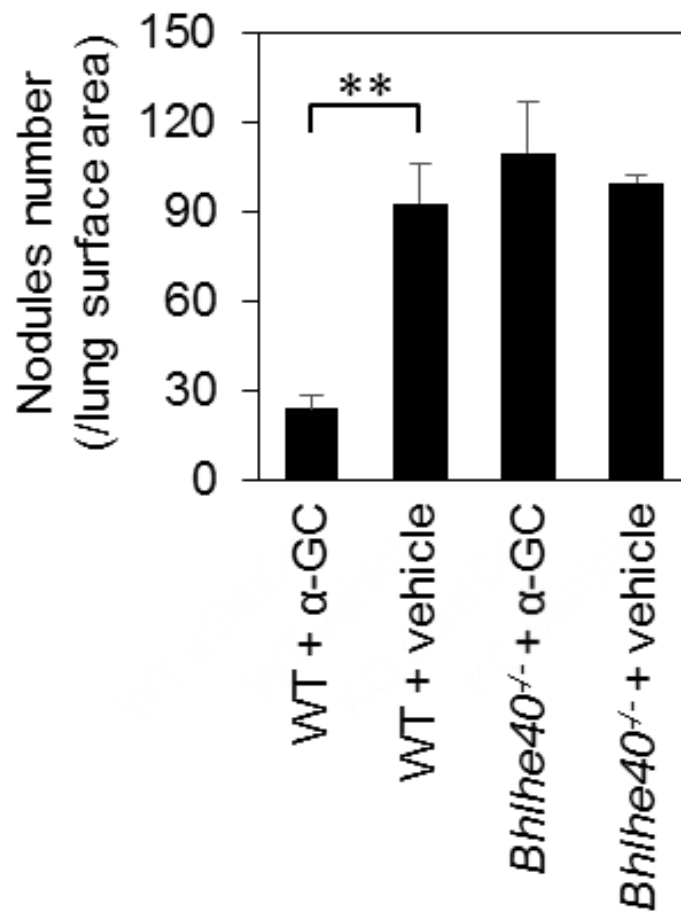


図 23 B16 メラノーマ細胞肺転移モデルにおける肺転移結節数

図 22 の方法で評価した、7 日目の肺表面に認められた転移結節数を示す。野生型マウスに α -GC を投与した群を WT + α -GC、野生型マウスに PBS を投与した群を WT + vehicle、*Bhlhe40*^{-/-}マウスに α -GC を投与した群を *Bhlhe40*^{-/-} + α -GC、*Bhlhe40*^{-/-}マウスに PBS を投与した群 (各群 3 匹)を *Bhlhe40*^{-/-} + vehicle として示す。グラフは平均値と標準誤差を示す。**は T 検定で比較した際 p 値が 0.05 未満のものを示す。

Liver metastasis model

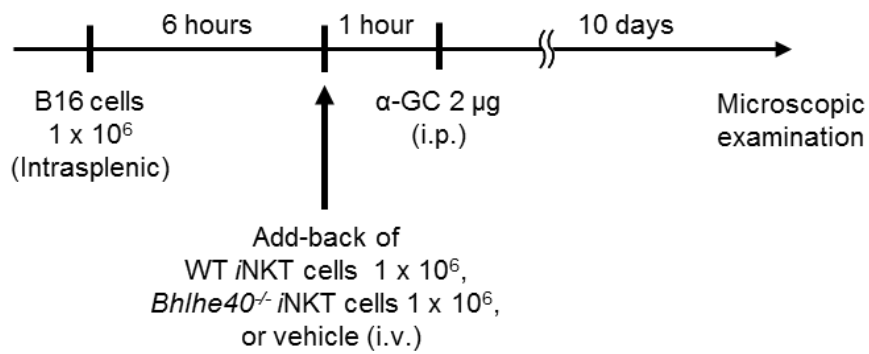


図 24 肝転移モデルの実験系

野生型および *Ja18*^{-/-} マウスに B16 メラノーマ細胞を 1×10^6 個ずつ脾投与し、野生型および *Bhlhe40*^{-/-} iNKT (TCR β ⁺ CD1d- α -GC dimer⁺)細胞を 1×10^6 個あるいは同体積の生理食塩水を add-back し、1 時間後に α -GC (2 μ g)を腹腔内投与した。10 日後の肝表面に占めるメラノーマの面積を評価した。

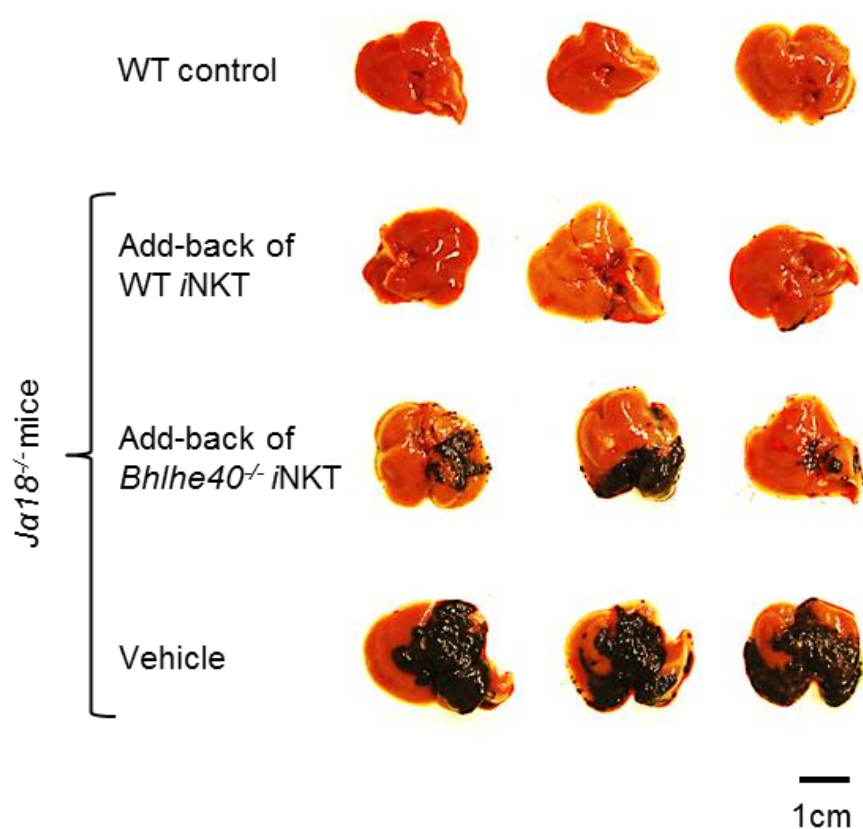


図 25 B16 メラノーマ細胞肝転移モデルにおける 10 日後の肝表面

図 24 の方法で評価した肝表面の写真を示す. 野生型マウスに B16 メラノーマ細胞を投与したものを WT control, *Ja18^{-/-}* マウスに B16 メラノーマ細胞と野生型 iNKT 細胞を add-back したものを Add-back of WT iNKT, *Ja18^{-/-}* マウスに B16 メラノーマ細胞と *Bhlhe40^{-/-}* iNKT 細胞を add-back したものを Add-back of *Bhlhe40^{-/-}* iNKT, *Ja18^{-/-}* マウスに生理食塩水を投与したものを Vehicle として示す.

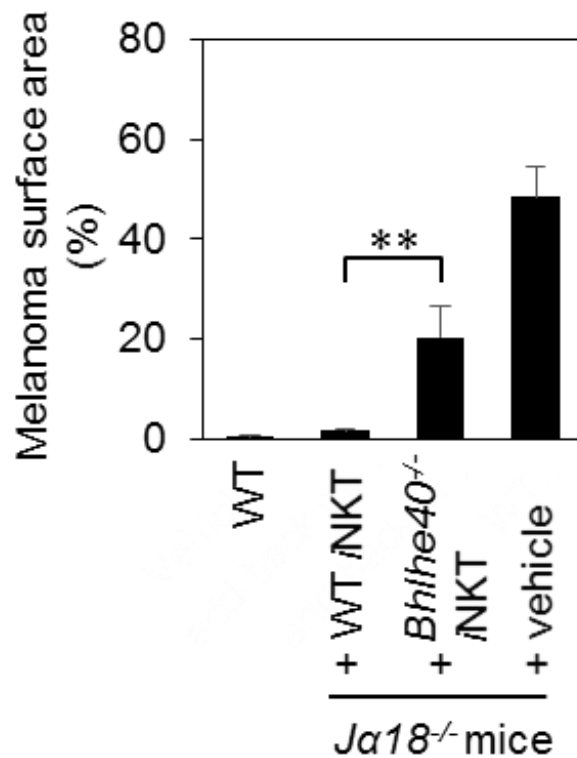


図 26 B16 メラノーマ細胞肝転移モデルにおける 10 日後の B16 メラノーマ転移巣の肝表面占有面積

図 25 の結果を数値化したものを示す。野生型マウス B16 メラノーマ細胞を投与したものを WT, *Ja18*^{-/-} マウスに B16 メラノーマ細胞と野生型 iNKT 細胞を add-back したものを *Ja18*^{-/-} mice + WT iNKT, *Ja18*^{-/-} マウスに B16 メラノーマ細胞と *Bhlhe40*^{-/-} iNKT 細胞を add-back したものを *Ja18*^{-/-} mice + *Bhlhe40*^{-/-} iNKT, *Ja18*^{-/-} マウスに生理食塩水を投与したものを *Ja18*^{-/-} mice + vehicle として示す。グラフは平均値と標準誤差を示す。**は T 検定で比較した際 p 値が 0.05 未満のものを示す。

4-6 Bhlhe40 自身は *Ifng* プロモーター活性を増強しない

これまでの検討から, Bhlhe40 は iNKT 細胞において TCR 刺激による IFN- γ 産生を増強し, IFN- γ 産生に伴う iNKT 細胞が障害されていることが示された. しかしながら, どのような分子機構で Bhlhe40 が IFN- γ 産生に関与するのかは, まだ明らかとなっていない. そこで, この点を明らかにするために, まず Bhlhe40 が *Ifng* プロモーター活性に与える影響について検討した. *Bhlhe40*^{-/-} MEF に対して, コントロールベクターあるいは, *Bhlhe40* 発現ベクターをトランスフェクションして, *Ifng* プロモーター活性の変化を検討した. *Bhlhe40*^{-/-} MEF に *Bhlhe40* を強制発現しても, *Ifng* プロモーター活性に明らかな変化は認められなかった (図 27). この結果から *Bhlhe40* が直接 *Ifng* プロモーターに作用する可能性は否定的であった.

TCR 刺激による IFN- γ の産生機序には TCR の下流に関与する転写因子として, nuclear factor-kappa B kinase (NF- κ B) や nuclear factor of activated T cells (NFAT) が知られている^{43,44}. そこで, 次に Bhlhe40 がこれらの転写因子の働きを増強する可能性を考えた. *Bhlhe40*^{-/-} MEF に, コントロールベクターあるいは *Bhlhe40* 発現ベクターをトランスフェクションし, PMA による刺激を行い, NF- κ B レポーターベクターの活性をルシフェラーゼアッセイで検討した. *Bhlhe40* の強制発現による PMA 刺激下における NF- κ B 活性に明らかな変化はなかった (図 28). このことから, Bhlhe40 が NF- κ B 経路に関与する可能性も否定的となった.

さらに, マウス T 細胞リンパ腫細胞株である EL-4 において, Bhlhe40 と NFAT 経路の関与について検討した. EL-4 は Bhlhe40 を発現していることから, まず, この細胞に *Bhlhe40* shRNA を恒常発現させた. そこに, knockdown-resistant *Bhlhe40* (*Bhlhe40* shRNA⁺) を発現させ, Bhlhe40 の発現のレスキューをおこなった. これにより Bhlhe40 の発現を制御した EL-4 に対して ionomycin による NFAT 経路の刺激を行い, NFAT レポーターベクターの活性をルシフェラーゼアッセイで検討した. これらにより EL-4 において Bhlhe40 の発現を操作しても, NFAT 活性の変化は認められなかった (図 29). このことから, Bhlhe40 が NFAT 経路に関与する可能性も否定的となった.

これらの結果から, Bhlhe40 は直接 *Ifng* プロモーターを制御する可能性や, TCR シグナルの下流に関与する NF- κ B や NFAT のシグナルを増強することで, IFN- γ 産生を増強している可能性は否定的であった.

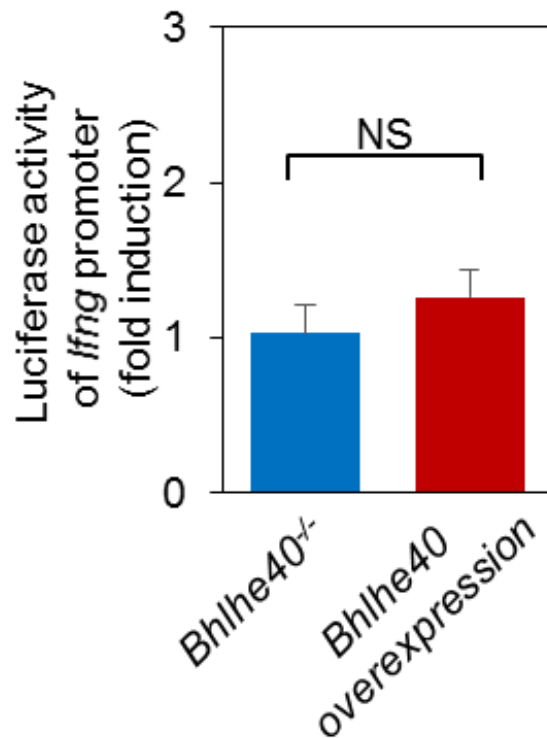


図 27 *Bhlhe40*^{-/-} MEF における *Bhlhe40* の強制発現による *Ifng* プロモーター活性の変化

Bhlhe40^{-/-} MEF にコントロールベクターあるいは、*Bhlhe40* 発現ベクターと *Ifng* プロモータールシフェラーゼレポーターベクターをトランスフェクションして、48 時間後の *Ifng* プロモーター活性をルシフェラーゼアッセイで検討した。ルシフェラーゼ活性は β ガラクトシターゼで補正したものをを用い、*Bhlhe40*^{-/-} MEF にコントロールベクターをトランスフェクションしたもの = 1 とした。*Bhlhe40*^{-/-} MEF にコントロールベクターをトランスフェクションしたものを *Bhlhe40*^{-/-} として示し、*Bhlhe40*^{-/-} MEF に *Bhlhe40* 発現ベクターをトランスフェクションしたものを *Bhlhe40* overexpression として示している。グラフはルシフェラーゼ活性の平均値と標準誤差を表す。

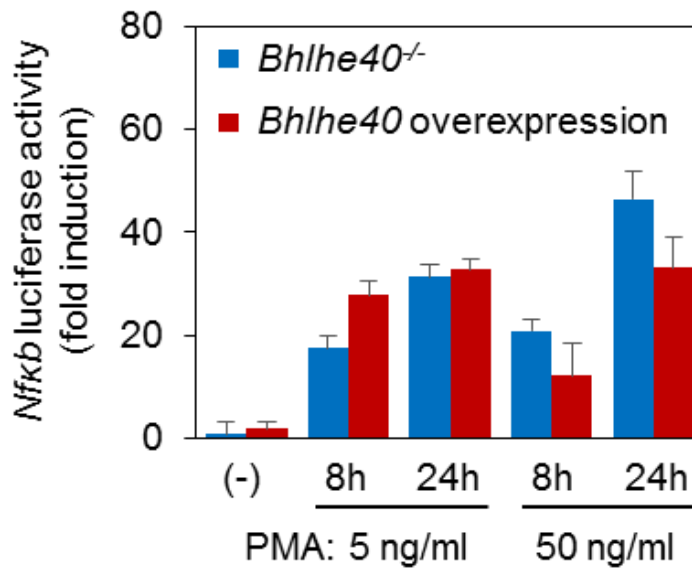


図 28 *Bhlhe40*^{-/-} MEF における *Bhlhe40* の強制発現による NF-κB 活性の変化

Bhlhe40^{-/-} MEF にコントロールベクターあるいは、*Bhlhe40* 発現ベクターと NF-κB レポーターベクターをトランスフェクションし、トランスフェクション直後あるいは 16 時間後に PMA (5 ng/ml あるいは 50 ng/ml) による刺激を行い、トランスフェクションから 24 時間後の NF-κB 活性をルシフェラーゼアッセイで検討した。ルシフェラーゼ活性は β ガラクトシターゼで補正したものをを用い、*Bhlhe40*^{-/-} MEF にコントロールベクターをトランスフェクションし刺激せずに測定したもの = 1 とした。*Bhlhe40*^{-/-} MEF にコントロールベクターをトランスフェクションしたものを *Bhlhe40*^{-/-} として示し、*Bhlhe40*^{-/-} MEF に *Bhlhe40* 発現ベクターをトランスフェクションしたものを *Bhlhe40* overexpression として示している。(-) は PMA による刺激を行わなかったことを示す。グラフはルシフェラーゼ活性の平均値と標準誤差を表す。

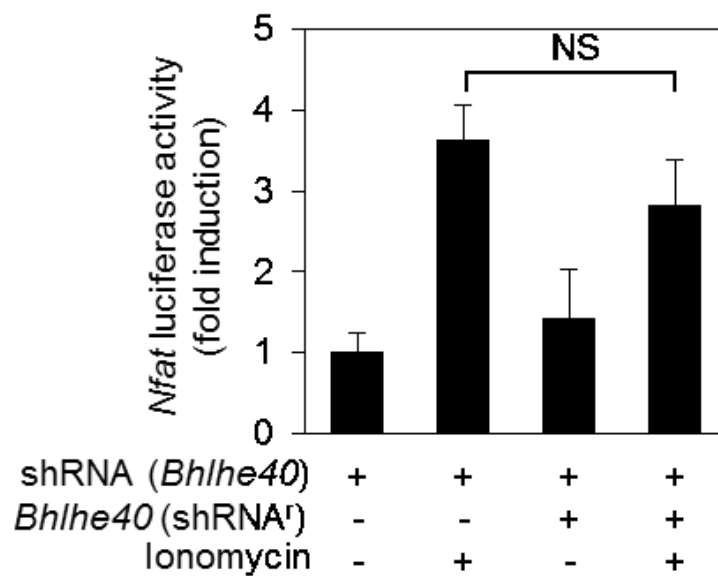


図 29 EL-4 における *Bhlhe40* KD による NFAT 活性の変化

EL-4 の *Bhlhe40* shRNA を恒常発現させた EL-4 に knockdown-resistant *Bhlhe40* (*Bhlhe40* shRNA^f)と NFAT レポーターベクターをトランスフェクションして, ionomycin (500 nM)による刺激を行った. 刺激から 24 時間後の NFAT 活性をルシフェラーゼアッセイで検討した. ルシフェラーゼ活性は β ガラクトシターゼで補正したものをを用いた. EL-4 の *Bhlhe40* shRNA 恒常発現株で未刺激のもの = 1 とした. グラフはルシフェラーゼ活性の平均値と標準誤差を表す. NS は統計学的有意差なしを示す.

4-7 Bhlhe40 は T-bet の存在下において IFN- γ 産生に関与する

これまでの検討から Bhlhe40 は単独では *Ifng* プロモーター活性に影響を与えないことがわかった。このことから、他の転写因子の補因子として働き、IFN- γ 産生に関与すると仮定した。そこで、T 細胞における TCR 刺激の下流因子として働き IFN- γ 産生に重要な働きをする T-bet という転写因子に注目した⁴⁵。

まず、野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウスの iNKT 細胞における T-bet の発現量を評価するために、T-bet の細胞内染色を行った。これにより野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウスの iNKT 細胞における T-bet の発現量に差がないことを確認した (図 30)。

次に、Lenti-XTM 293T に HA タグを付けた Bhlhe40 と Myc タグを付けた T-bet をトランスフェクションし、Myc タグで T-bet を免疫沈降し、T-bet に Bhlhe40 が結合するかどうかを検証した。すると、T-bet に対する免疫沈降により Bhlhe40 が検出されたことから、T-bet と Bhlhe40 が結合する可能性が示唆された (図 31)。さらに、生理的条件下での T-bet と Bhlhe40 の結合の有無を確認するために、iNKT 細胞における内在性の T-bet による共免疫沈降を行った。その結果、生理的条件下においても軽度の T-bet と Bhlhe40 の結合が認められ、さらに、 α -CD3/CD28 Abs による TCR 刺激により Bhlhe40/T-bet の結合が増強されることが示唆された (図 32)。

次に、Bhlhe40/T-bet 相互作用が *Ifng* プロモーター制御に関与するかについて検証した。*Bhlhe40*^{-/-} MEF は元来 Bhlhe40 も T-bet していないことから、*Bhlhe40* と *Tbet* をともに強制発現した際の *Ifng* プロモーター活性を評価した。*Bhlhe40*^{-/-} MEF に *Tbet* や *Bhlhe40* を単独で強制発現しても、*Ifng* プロモーター活性は変化しなかったが、*Tbet* と *Bhlhe40* の共に強制発現すると *Ifng* プロモーター活性が上昇した (図 33)。また、EL-4 は、元来 Bhlhe40 は発現しているが T-bet は発現していない。そこで、*Bhlhe40* shRNA あるいは control shRNA を恒常発現させた EL-4 に対して、T-bet あるいは knockdown-resistant *Bhlhe40* を強制発現させることで *Ifng* プロモーター活性への影響を検証した。これにより、*Tbet* と *Bhlhe40* が共に発現することで *Ifng* プロモーター活性が上昇し、*Bhlhe40* KD により *Ifng* プロモーター活性が低下し、*Bhlhe40* shRNA^r により *Ifng* プロモーター活性の低下がレスキューされた (図 34)。

これらの結果から、Bhlhe40 は T-bet を介して IFN- γ 産生を増強すると考えられた。

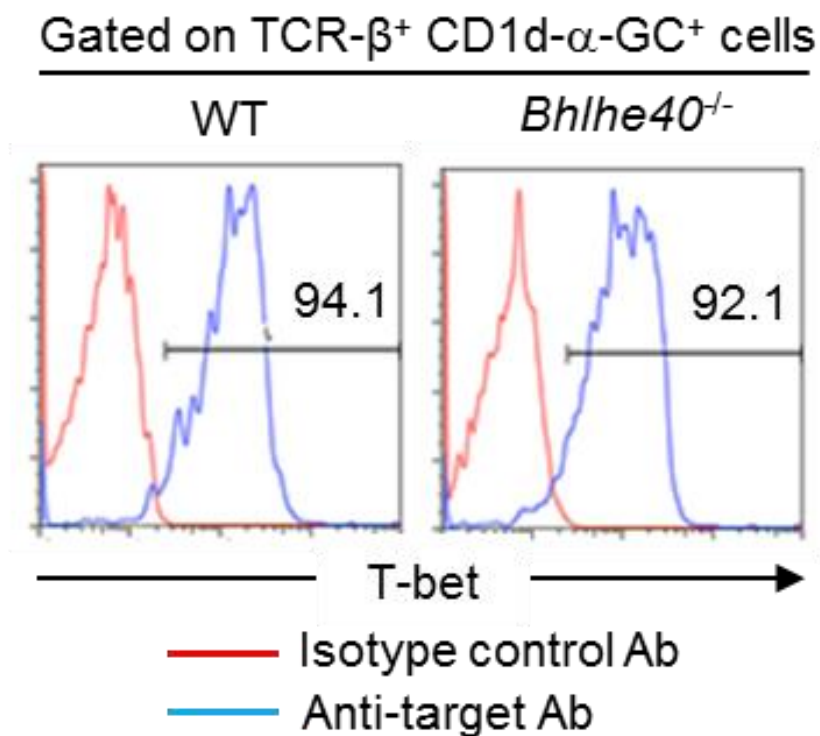


図 30 野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウスの iNKT 細胞における T-bet の発現

野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウスにの脾臓 iNKT (TCR β^+ CD1d- α -GC dimer $^+$)細胞の T-bet の細胞内染色を示す. ヒストグラムは脾臓細胞を TCR β^+ CD1d- α -GC dimer $^+$ でゲートしたのちにアイソタイプコントロールと重ねたものを示す. 数字はアイソタイプコントロールから求められる Target 陽性細胞のゲート内に占める割合 (%)を示す. 3 回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す.

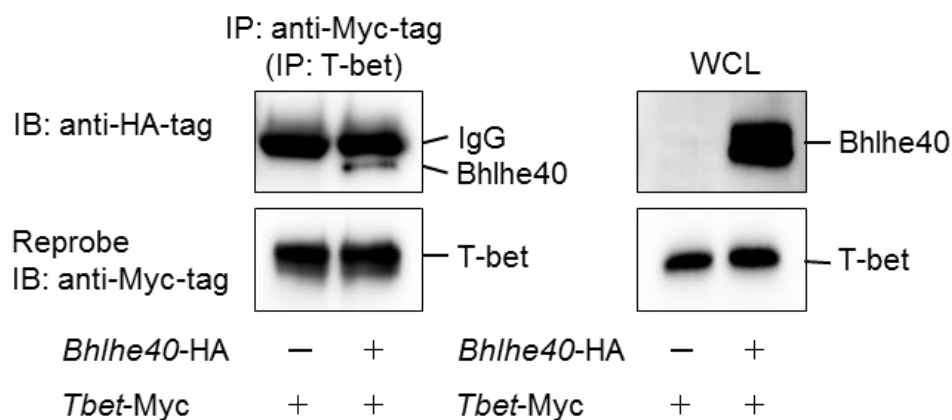


図 31 Lenti-X™ 293T における *Bhlhe40* と *Tbet* 強制発現を用いた *Tbet* による共免疫沈降

Lenti-X™ 293T に HA タグを付けた *Bhlhe40* あるいはコントロールベクターと、Myc タグを付けた *Tbet* をトランスフェクションし、Myc タグで *Tbet* を免疫沈降し、 α -HA Ab あるいは α -Myc Ab でイムノブロットした結果を示す。右図は免疫沈降を行う前の細胞溶解液 (whole cell lysate; WCL) で行った total *Bhlhe40* および *Tbet* を示す。 *Bhlhe40*-HA(-) は実験系とは無関係と考える HA タグのついたタンパクがクローニングされたコントロールベクターのトランスフェクションを指す。3 回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す。

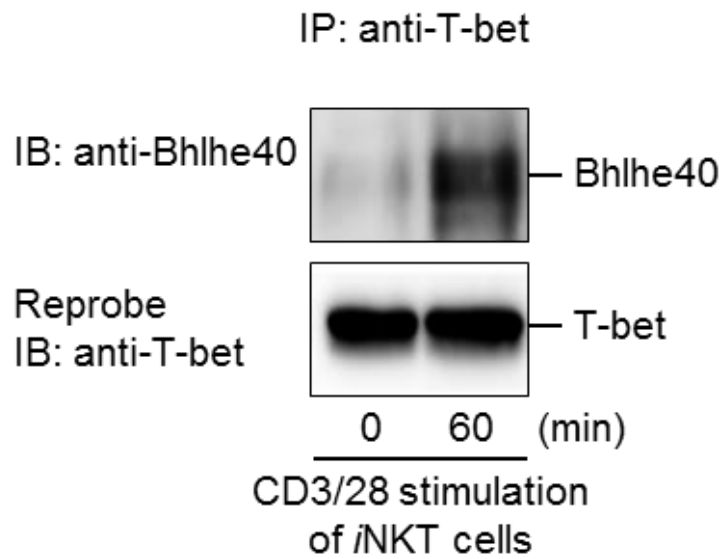


図 32 *i*NKT 細胞における T-bet による Bhlhe40 の共免疫沈降

*i*NKT 細胞を未刺激あるいは α -CD3/CD28 Abs による 60 分間の刺激後における T-bet による共免疫沈降の結果を示す. 3 回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す.

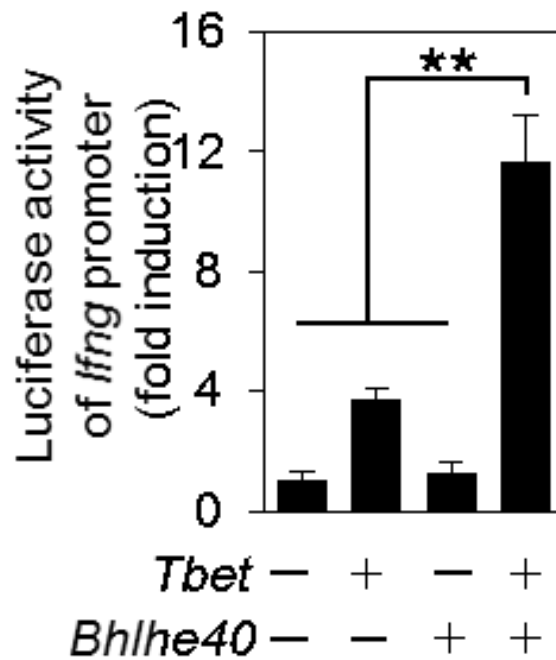


図 33 *Bhlhe40*^{-/-}MEF における *Bhlhe40* と *Tbet* 強制発現による *Ifng* プロモーター活性の変化

Bhlhe40^{-/-}MEF に *Bhlhe40* あるいは *Tbet* 発現ベクターと *Ifng* プロモーター-ルシフェラーゼレポーターベクターをトランスフェクションして、48 時間後の *Ifng* プロモーター活性をルシフェラーゼアッセイで検討した。ルシフェラーゼ活性は β ガラクトシターゼで補正したものをを用い、*Bhlhe40*^{-/-}MEF にコントロールベクターをトランスフェクションしたもの = 1 とした。グラフはルシフェラーゼ活性の平均値と標準誤差を表す。*Bhlhe40*^{-/-}MEF にコントロールベクターをトランスフェクションしたものを(-)として示している。**は T 検定で比較した際 p 値が 0.01 未満のものを示す

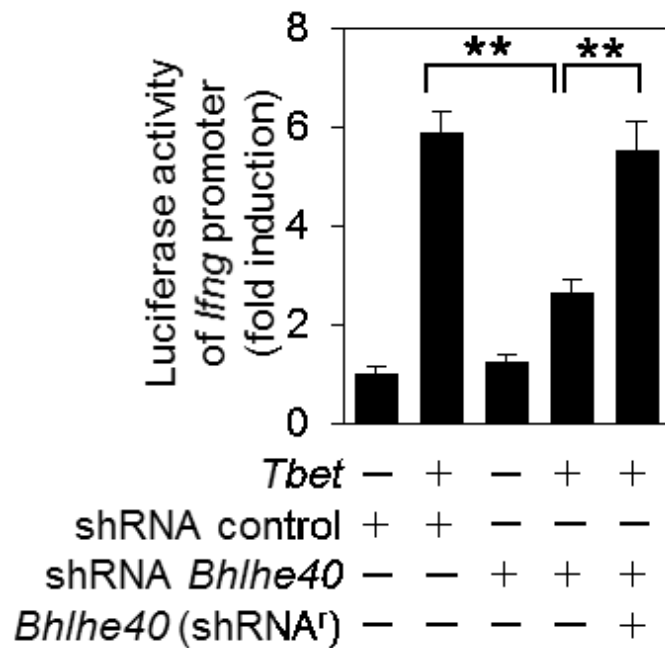


図 34 EL-4 における T-bet 強制発現と *Bhlhe40* KD による *Ifng* プロモーター活性の変化

Bhlhe40 shRNA あるいは control shRNA の恒常発現株とした EL-4 に knockdown-resistant *Bhlhe40* (*Bhlhe40* shRNA^f)あるいは T-bet 強制発現ベクターを一過性トランスフェクションし、トランスフェクション 48 時間後の *Ifng* プロモーター活性をルシフェラーゼアッセイで検討した。ルシフェラーゼ活性は β ガラクトシターゼで補正したものを用いた。EL-4 に control shRNA のみをトランスフェクションしたもの =1 とした。グラフはルシフェラーゼ活性の平均値と標準誤差を表す。**は T 検定で比較した際 p 値が 0.01 未満のものを示す。

4-8 Bhlhe40 は IL-12 刺激による *Ifng* 産生も制御する

iNKT 細胞は、TCR 刺激以外でも活性化されサイトカインを産生することが知られており、そのような働きを持つもののひとつに IL-12 がある³。そこで、IL-12 刺激による IFN- γ 産生は、Bhlhe40 の影響を受けるかどうかについて検討した。

まず、野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウスの iNKT 細胞を IL-12 で刺激した際の *Ifng* mRNA の産生について検討したところ、IL-12 刺激においても、TCR 刺激時と同様に *Bhlhe40*^{-/-}マウスの iNKT 細胞における *Ifng* mRNA の発現が低下していることがわかった (図 35)。

IL-12 は IL-12 受容体に結合し、Jak2/Stat4 経路を介して、IFN- γ 産生に関与するとされている⁴⁶。そこで、*Bhlhe40*^{-/-}MEF に Stat4 と Bhlhe40 を強制発現させて、*Ifng* プロモーター活性を検討した。Stat4 と Bhlhe40 を共に強制発現させても、*Ifng* プロモーター活性に変化は認められなかった (図 36)。さらに、Stat4 においても、T-bet と同様に Bhlhe40 が補因子として働く可能性を考え、Lenti-XTM 293T において Stat4 および Bhlhe40 強制発現による共免疫沈降を行ったが、Stat4 に対する Bhlhe40 の結合は確認できなかった (図 37)。さらに iNKT 細胞における IL-12 刺激下における内在性 Bhlhe40 と Stat4 の結合についても評価したが、結合は確認できなかった (図 38)。

これらのことから IL-12 刺激においては、Bhlhe40 は *Ifng* mRNA の発現に影響を与えるが、下流のシグナル系に影響を与えないことがわかった。さらにこの事実から、今度は、Bhlhe40/T-bet 相互作用が *Ifng* プロモーターのクロマチンリモデリング関与している可能性を考えた。

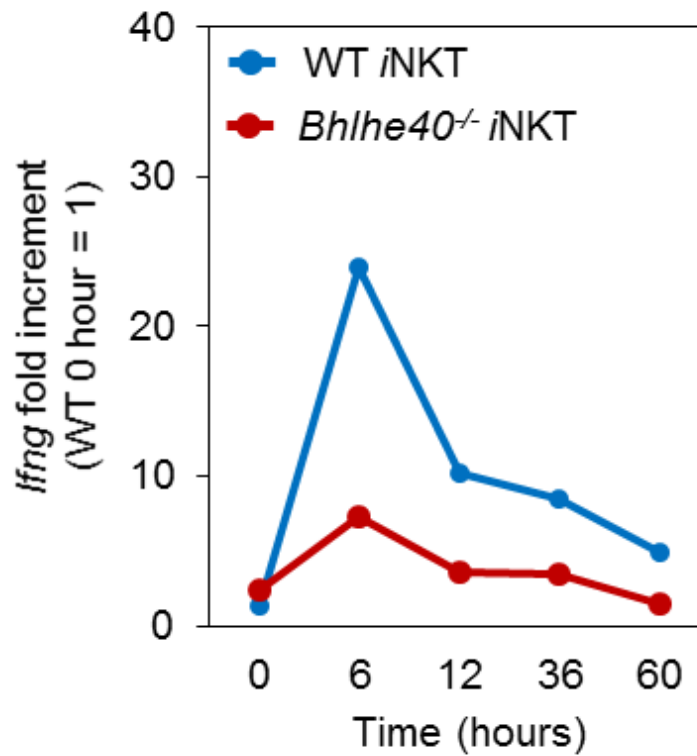


図 35 野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウス iNKT 細胞の IL-12 刺激による *Ifng* mRNA の発現の時間経過による変化

野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウスの脾臓 iNKT (TCR β ⁺ CD1d- α -GC dimer⁺)細胞を *in vitro* 培養条件下において IL-12 で刺激し、0, 6, 12, 36, 60 時間における *Ifng* mRNA の産生量を示す。野生型マウス iNKT 細胞の結果を WT iNKT, *Bhlhe40*^{-/-}マウス iNKT 細胞の結果を *Bhlhe40*^{-/-} iNKT として示す。定量 real-time PCR の結果を野生型 iNKT 細胞の 0 時間 = 1 とした比較 Ct 法により検討したものを示す。3 回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す。

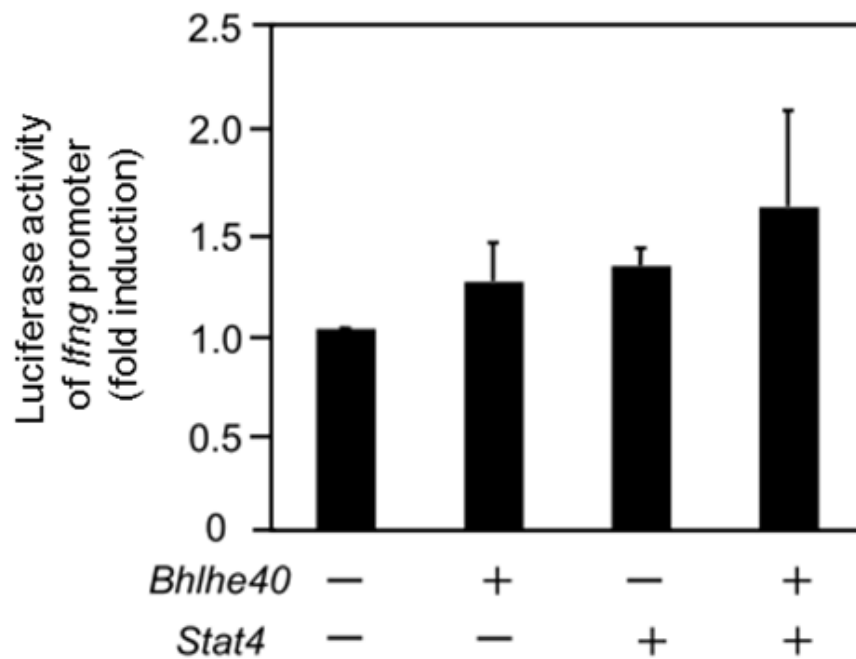


図 36 *Bhlhe40*^{-/-}MEF における *Bhlhe40* と *Stat4* 強制発現による *Ifng* プロモーター活性の変化

Bhlhe40^{-/-}MEF に *Bhlhe40* あるいは *Stat4* 発現ベクターと *Ifng* プロモーター・ルシフェラーゼレポーターベクターをトランスフェクションして、48 時間後の *Ifng* プロモーター活性をルシフェラーゼアッセイで検討した。ルシフェラーゼ活性は β ガラクトシターゼで補正したものをを用い、*Bhlhe40*^{-/-}MEF にコントロールベクターをトランスフェクションしたもの =1 とした。グラフはルシフェラーゼ活性の平均値と標準誤差を表す。*Bhlhe40*^{-/-}MEF にコントロールベクターをトランスフェクションしたものを(-)として示している。

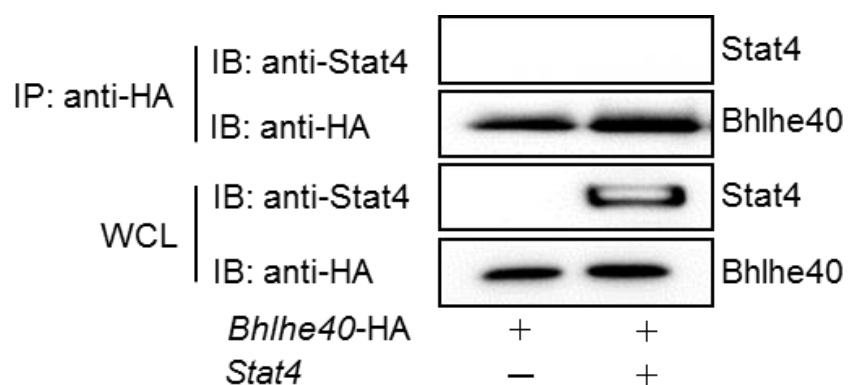


図 37 Lenti-X™ 293T における Bhlhe40 と Stat4 強制発現を用いた, Bhlhe40 による共免疫沈降

上図は Lenti-X™ 293T に HA タグを付けた *Bhlhe40* あるいはコントロールベクターと *Stat4* をトランスフェクションし, HA タグで Bhlhe40 を免疫沈降し, α -HA Ab あるいは α -Stat4 Ab でイムノブロットした結果を示す. 下図は免疫沈降を行う前の WCL で行った total Bhlhe40 および Stat4 を示す. *Stat4* (-) はコントロールベクターのトランスフェクションを指す. 3 回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す.

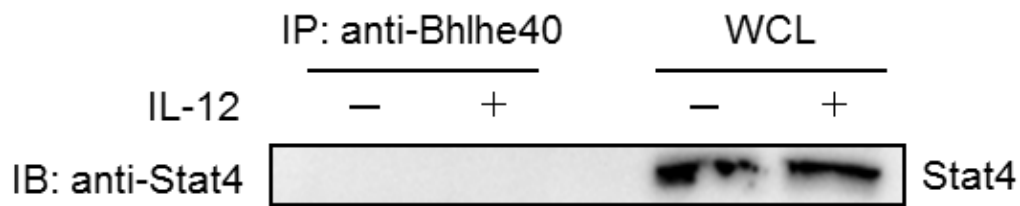


図 38 *i*NKT 細胞における Bhlhe40 による Stat4 の共免疫沈降

*i*NKT 細胞を未刺激あるいは IL-12 刺激後における, Bhlhe40 による免疫沈降の結果を示す. 左側は Bhlhe40 による免疫沈降後のサンプルを Stat4 でイムノブロットしたものを示す. 右側は免疫沈降を行う前の WCL で行った total Stat4 を示す. 3 回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す.

4-9 *Bhlhe40*^{-/-} iNKT 細胞では, *Ifng* 領域のヒストン H3-lysine9 (K9)アセチル化が低下する

Bhlhe40/T-bet 相互作用が, *Ifng* 領域のクロマチンリモデリングへ関与するかを検証するために, 野生型あるいは *Bhlhe40*^{-/-} iNKT 細胞において ChIP をおこなった. *Ifng* 領域の評価に用いたプライマーの増幅領域を図 39, プライマーを表 5 に示す. *Ifng* 領域には T-bet 結合領域 (T-box)が複数存在することが知られている⁴⁷ (図 39). 野生型あるいは *Bhlhe40*^{-/-} iNKT 細胞において, *Bhlhe40* ChIP をおこなったところ, *Bhlhe40* は *Ifng* 領域の T-box に結合していることが示された (図 40).

さらに, *Bhlhe40* のクロマチン構造に与える影響を検証するために, iNKT 細胞の *Ifng* 領域におけるヒストン H3-K9 アセチル化, ヒストン H3-K4 ジメチル化, ヒストン H3-K4 トリメチル化について検討した. iNKT 細胞における, *Ifng* 領域のヒストン H3-K4 ジメチル化 (図 41), ヒストン H3-K4 トリメチル化 (図 42)は *Bhlhe40* 欠損によって変化しなかった. 一方で, ヒストン H3-K9 アセチル化が *Ifng* 領域の T-box で低下していた (図 43).

一方で, *Il4* 領域には T-bet が結合しないことが知られている^{47,48}. そこで, iNKT 細胞における, *Il4* 領域におけるクロマチン構造に対する *Bhlhe40* の影響を調べることにした. *Il4* 領域の評価に用いたプライマーの増幅領域を図 44, プライマーを表 6 に示す. iNKT 細胞の *Il4* 領域では, ヒストン H3-K4 ジメチル化 (図 45), ヒストン H3-K4 トリメチル化 (図 46), ヒストン H3-K9 アセチル化 (図 47)のいずれにおいても, *Bhlhe40* 欠損の影響は認められなかった. これらの結果から, *Bhlhe40*/T-bet 複合体が *Ifng* 領域の T-box におけるクロマチン構造に重要な働きを担っていることが推定された.

さらに, *Bhlhe40*/T-bet の相互作用の重要性を確認するために, T-bet 陽性あるいは陰性 iNKT 細胞において ChIP をおこなった. マウス生体材料において, iNKT1 は T-bet 陽性, iNKT2 は T-bet 陰性であることが知られている. 当初はこれらの細胞において ChIP を検討したが, iNKT2 は図 6, 図 11 における CD4⁺ IL17RB⁺を指すが, 同図に示すように, TCRβ⁺ CD1d-α-GC dimer⁺ CD4⁺ IL17RB⁺は生体における細胞数が極めて少なく, ChIP を行うことは困難である. そこで, T-bet 陽性あるいは陰性 iNKT 細胞を *in vitro* で増やす独自の培養法を確立した. 具体的には, 野生型マウスの脾臓から T-bet 陽性細胞サブセット (TCRβ⁺ CD1d-α-GC dimer⁺ CD4⁺ IL17RB⁺) と T-bet 陰性細胞サブセット (TCRβ⁺ CD1d-α-GC dimer⁺ CD4⁺ IL17RB⁻)に分離し, それぞれを BMDC と共培養したものを用いた. およそ 3 週間の培養後のこれらの細胞における T-bet の発現を示す (図 48). このことから TCRβ⁺ CD1d-α-GC dimer⁺ CD4⁺ IL17RB⁻サブセットから増やした iNKT 細胞を T-bet positive iNKT, TCRβ⁺ CD1d-α-GC dimer⁺ CD4⁺ IL17RB⁺サブセットから増やした iNKT 細胞を T-bet negative iNKT とし, さらにこれらの細胞の性質を検討するために, *T-bet*, *Bhlhe40*, *Ifng* mRNA の発現量を評価した (図 49). これら

の結果から二つの細胞における T-bet の発現に差があることがわかったことから、これらの細胞を用いて ChIP を行った。まず、*Ifng* 領域における *Bhlhe40* の結合を調べたところ、T-bet negative iNKT において T-box の *Bhlhe40* の結合が低下していた (図 50)。さらに、*Ifng* 領域のヒストン H3-K9 アセチル化、ヒストン H3-K4 ジメチル化、ヒストン H3-K4 トリメチル化についても検討した。T-bet negative iNKT の *Ifng* 領域におけるヒストン H3-K9 アセチル化は *Bhlhe40*⁺ iNKT 細胞のもの (図 40) と類似の傾向を示した (図 51)。また、*Ifng* 領域のヒストン H3-K4 ジメチル化、ヒストン H3-K4 トリメチル化に関しても T-bet negative iNKT において低下が認められた (図 52, 53)。この違いは過去の報告で、T-bet が *Ifng* 領域のメチル化に影響を与えることが報告されており、この違いは、T-bet 陰性の影響によって生じたものと考えられた⁴⁹。

さらに、T-bet positive あるいは T-bet negative iNKT において、*Il4* 領域のヒストン H3-K9 アセチル化、ヒストン H3-K4 ジメチル化、ヒストン H3-K4 トリメチル化について検討したが、いずれも明らかな差は認められなかった (図 54, 55, 56)。

これらの結果から、*Bhlhe40*/T-bet 複合体は *Ifng* 領域における T-box のヒストン H3-K9 アセチル化を変化させ、IFN- γ の産生を増強させていることが示唆された。

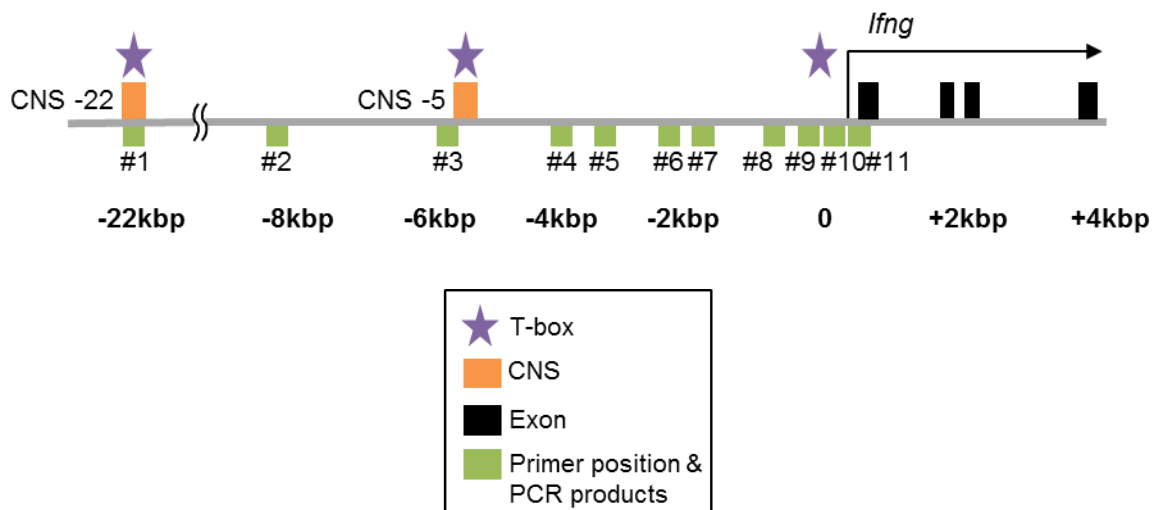


図 39 *Ifng* 領域のプライマー増幅領域と T-bet 結合領域 (T-box)

マウス *Ifng* 領域における表 5 に示したプライマーの Target 領域および T-bet 結合領域 (T-box)を示す. 横軸は *Ifng* の転写開始点を 0 とした時の距離を示す. CNS は conserved non-coding sequence を示す.

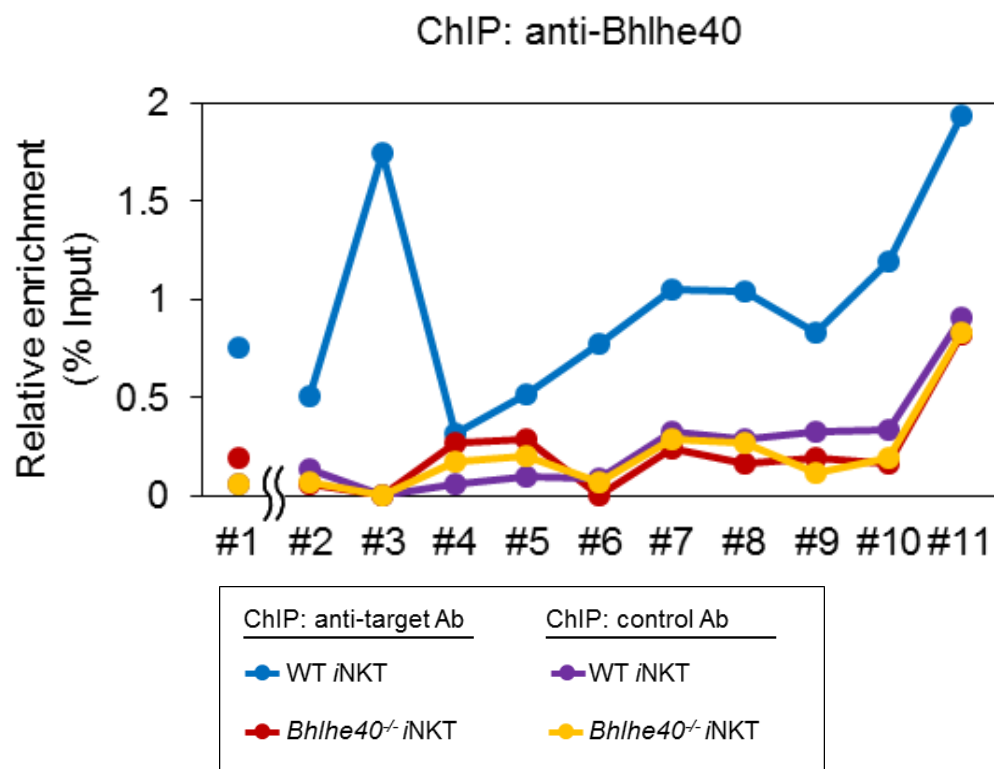


図 40 野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウス iNKT 細胞における *Ifng* 領域の Bhlhe40 ChIP PCR

野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウス iNKT 細胞における anti-Bhlhe40 Ab および, control Ig による ChIP サンプルを用いた *Ifng* 領域の PCR の結果を%Input として示す. 野生型マウス iNKT 細胞によるものを WT iNKT, *Bhlhe40*^{-/-}マウス iNKT 細胞によるものを *Bhlhe40*^{-/-} iNKT として示す. 2 回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す.

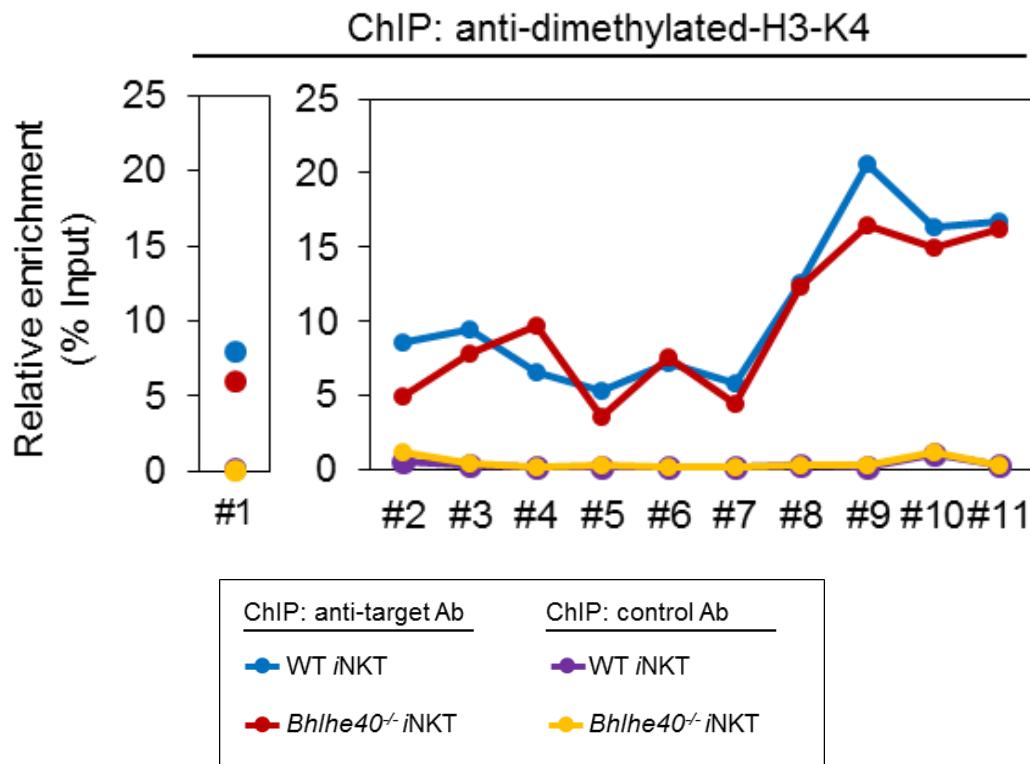


図 41 野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウス iNKT 細胞における *Ifng* 領域のヒストン H3-K4 ジメチル化 ChIP PCR

野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウス iNKT 細胞における anti-dimethylated H3-K4 Ab および, control Ig による ChIP サンプルを用いた *Ifng* 領域の PCR の結果を %Input として示す. 野生型マウス iNKT 細胞によるものを WT iNKT, *Bhlhe40*^{-/-}マウス iNKT 細胞によるものを *Bhlhe40*^{-/-} iNKT として示す. #1 は異なるサンプルを用いて測定したため, 別のグラフとして示す. 2 回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す.

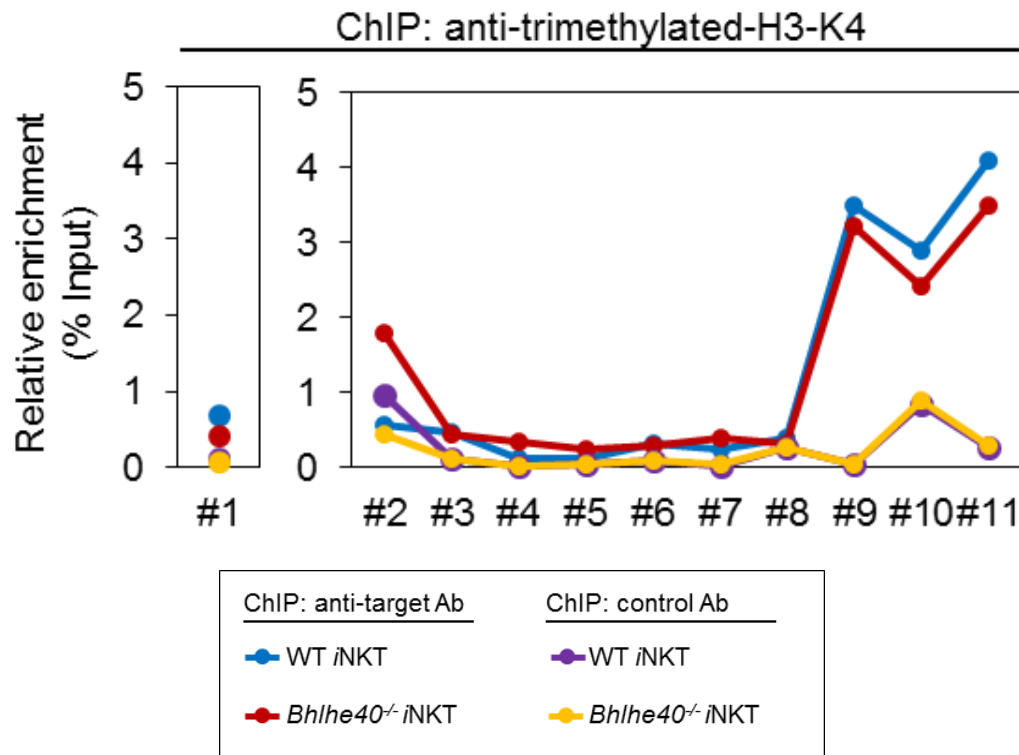


図 42 野生型および *Bhlhe40*^{-/-} マウス iNKT 細胞における *Ifng* 領域のヒストン H3-K4 トリメチル化 ChIP PCR

野生型および *Bhlhe40*^{-/-} マウス iNKT 細胞における anti-trimethylated H3-K4 Ab および, control Ig による ChIP サンプルを用いた *Ifng* 領域の PCR の結果を %Input として示す. 野生型マウス iNKT 細胞によるものを WT iNKT, *Bhlhe40*^{-/-} マウス iNKT 細胞によるものを *Bhlhe40*^{-/-} iNKT として示す. #1 は異なるサンプルを用いて測定したため, 別のグラフとして示す. 2 回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す.

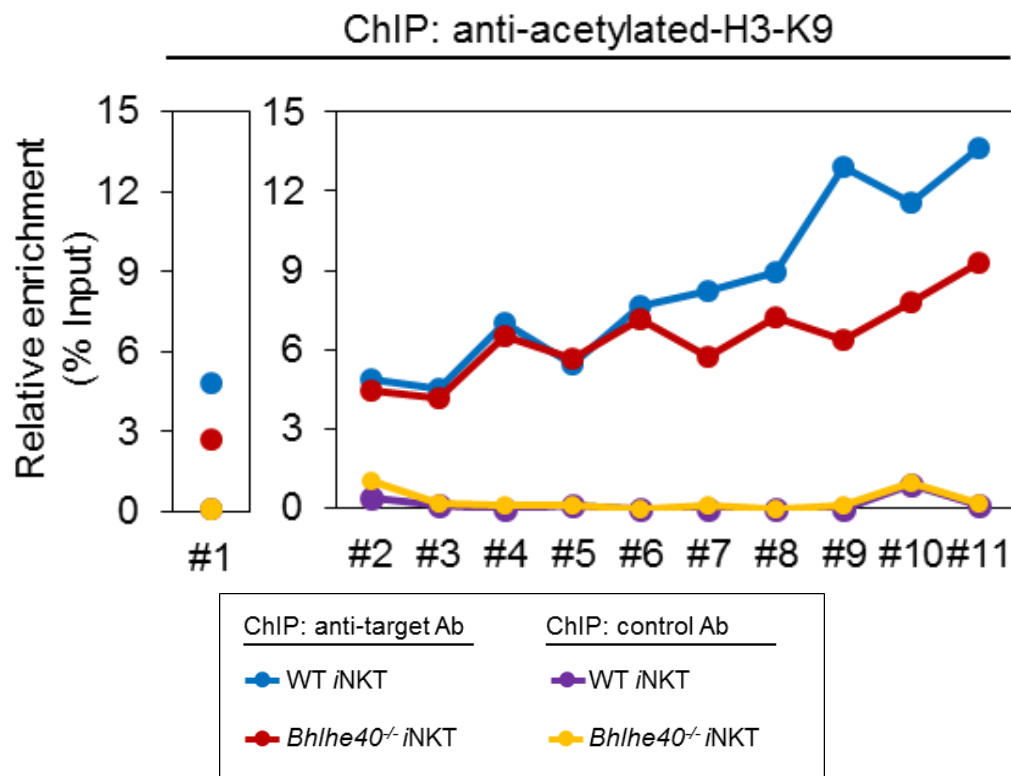


図 43 野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウス iNKT 細胞における *Ifng* 領域のヒストン H3-K9 アセチル化 ChIP PCR

野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウス iNKT 細胞における anti-acetylated H3-K9 Ab および, control Ig による ChIP サンプルを用いた *Ifng* 領域の PCR の結果を %Input として示す. 野生型マウス iNKT 細胞によるものを WT iNKT, *Bhlhe40*^{-/-}マウス iNKT 細胞によるものを *Bhlhe40*^{-/-} iNKT として示す. #1 は異なるサンプルを用いて測定したため, 別のグラフとして示す. 2 回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す.

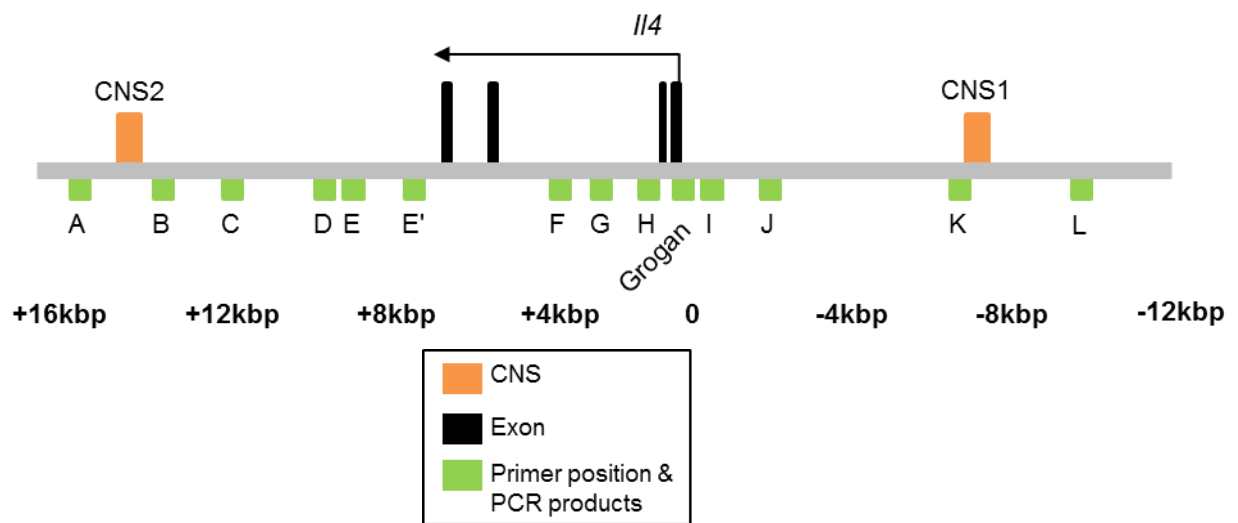


図 44 *Il4* 領域のプライマー増幅領域

マウス *Il4* 領域における表 6 に示したプライマーの Target 領域を示す. 横軸は *Il4* の転写開始点を 0 とした時の距離を示す.

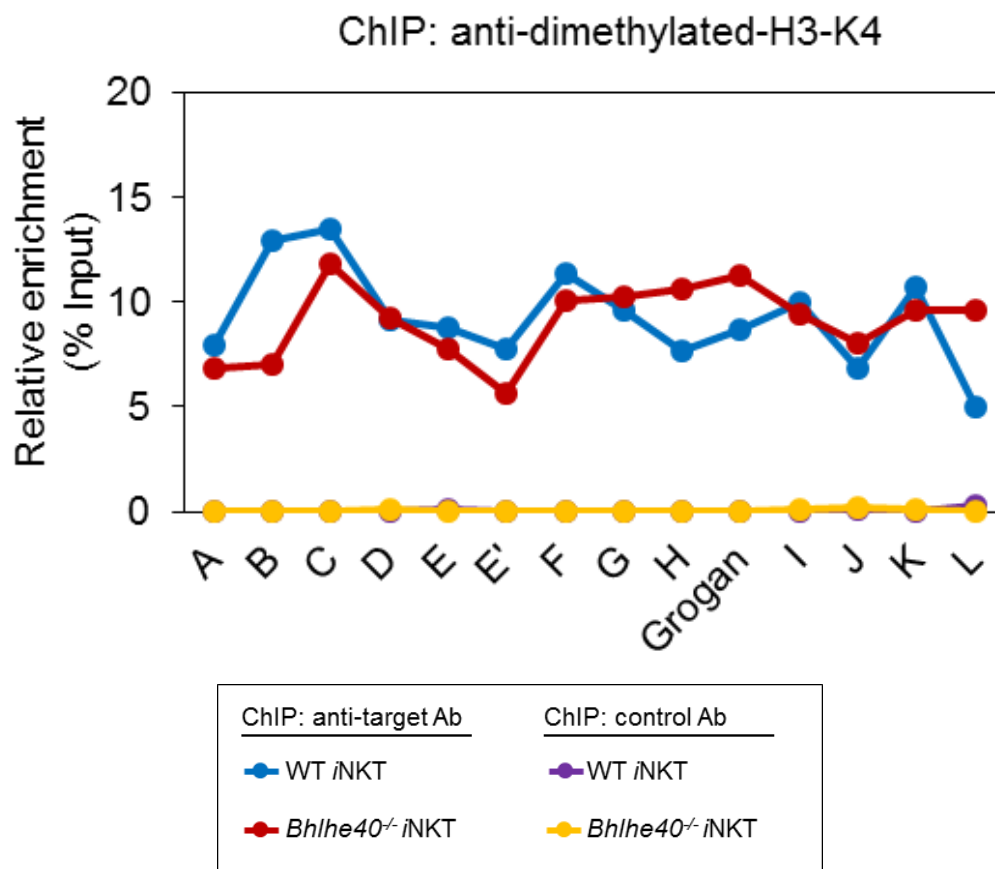


図 45 野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウス iNKT 細胞における *Il4* 領域のヒストン H3-K4 ジメチル化 ChIP PCR

野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウス iNKT 細胞における anti-dimethylated H3-K4 Ab および, control Ig による ChIP サンプルを用いた *Il4* 領域の PCR の結果を%Input として示す. 野生型マウス iNKT 細胞によるものを WT iNKT, *Bhlhe40*^{-/-}マウス iNKT 細胞によるものを *Bhlhe40*^{-/-} iNKT として示す.

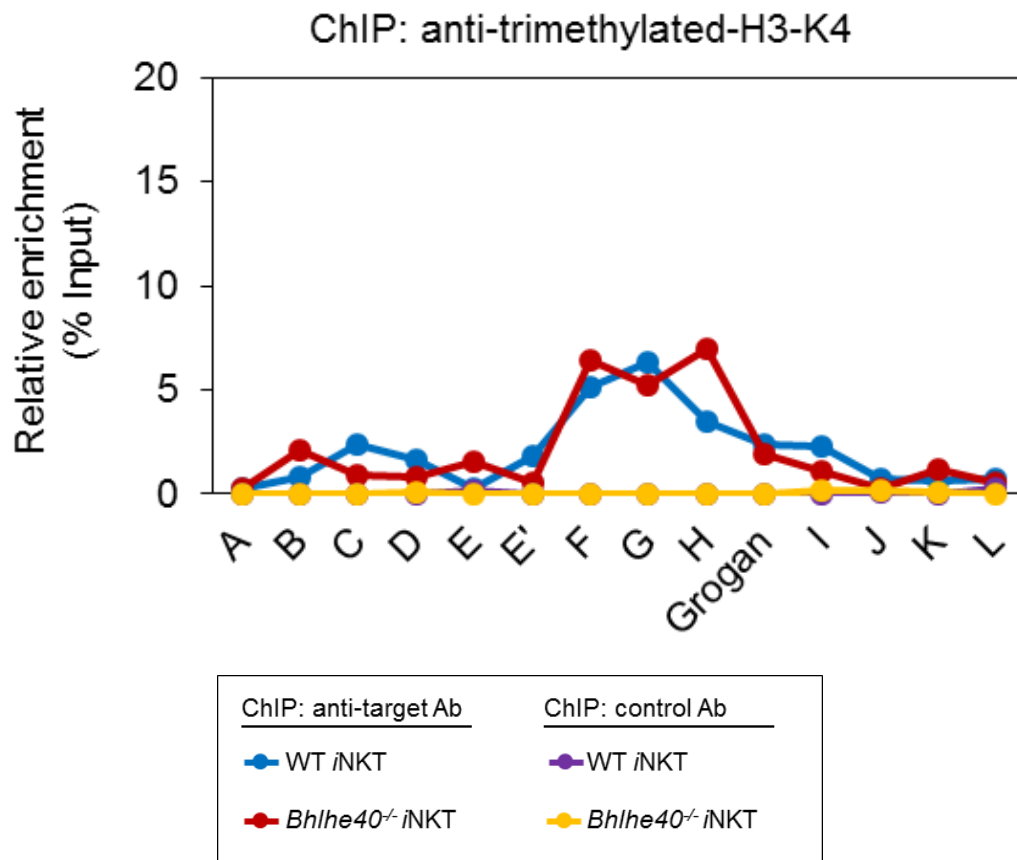


図 46 野生型および *Bhlhe40*^{-/-} マウス iNKT 細胞における *Il4* 領域のヒストン H3-K4 トリメチル化 ChIP PCR

野生型および *Bhlhe40*^{-/-} マウス iNKT 細胞における anti-trimethylated H3-K4 Ab および, control Ig による ChIP サンプルを用いた *Il4* 領域の PCR の結果を %Input として示す. 野生型マウス iNKT 細胞によるものを WT iNKT, *Bhlhe40*^{-/-} マウス iNKT 細胞によるものを *Bhlhe40*^{-/-} iNKT として示す.

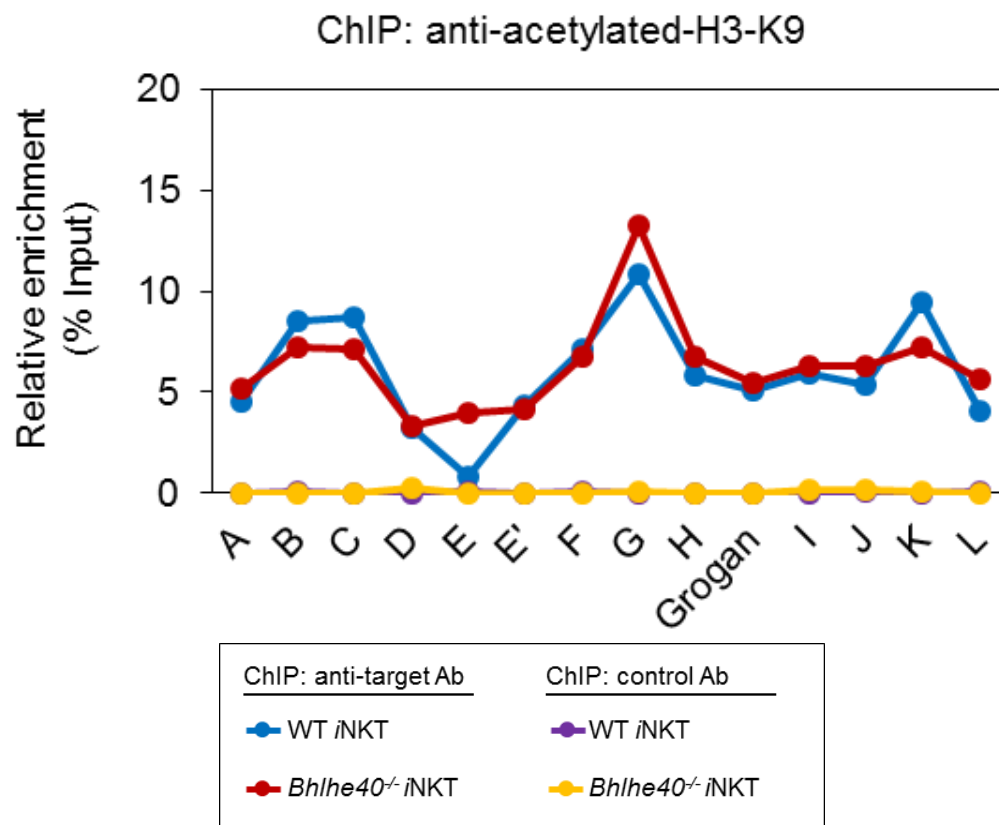


図 47 野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウス iNKT 細胞における *Il4* 領域のヒストン H3-K9 アセチル化 ChIP PCR

野生型および *Bhlhe40*^{-/-}マウス iNKT 細胞における anti-acetylated H3-K4 Ab および, control Ig による ChIP サンプルを用いた *Il4* 領域の PCR の結果を%Input として示す. 野生型マウス iNKT 細胞によるものを WT iNKT, *Bhlhe40*^{-/-}マウス iNKT 細胞によるものを *Bhlhe40*^{-/-} iNKT として示す.

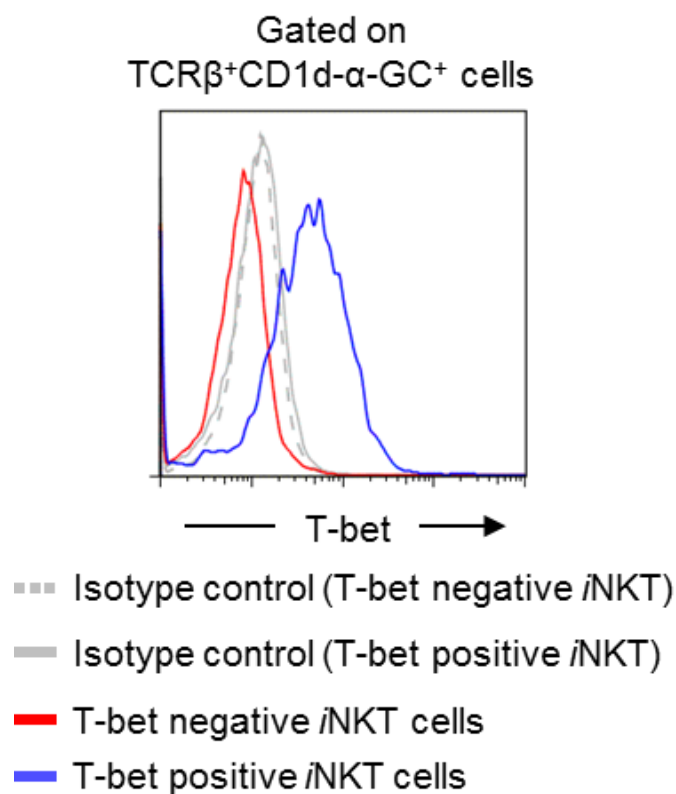


図 48 T-bet positive および negative iNKT における T-bet の発現

in vitro で 3 週間培養した T-bet positive および T-bet negative iNKT の T-bet の細胞内染色を示す。ヒストグラムは培養細胞を TCR β ⁺CD1d- α -GC dimer⁺でゲートしたのちにアイソタイプコントロールと重ねたものを示す。数字はアイソタイプコントロールから求められる Target 陽性細胞のゲート内に占める割合 (%)を示す。3 回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す。

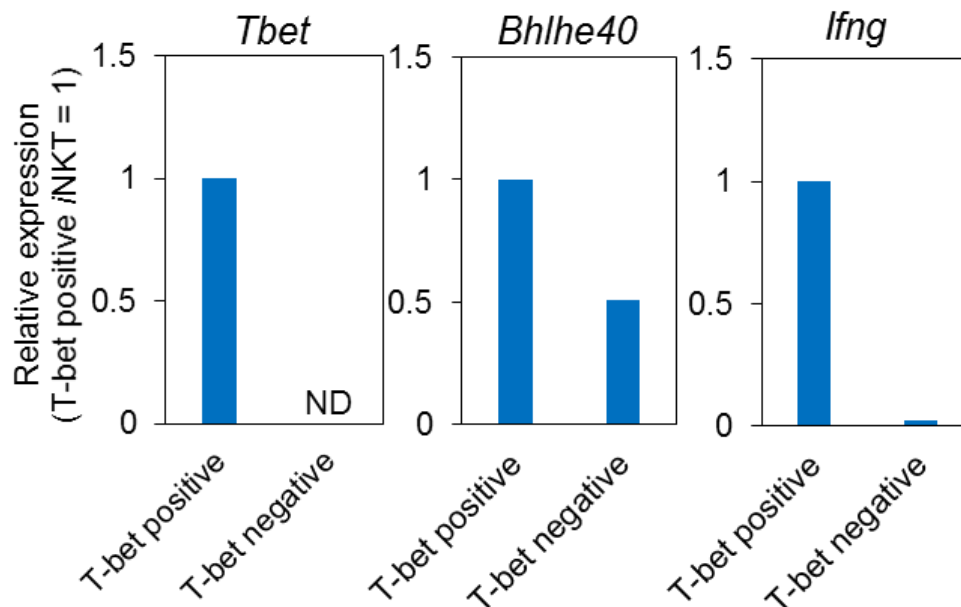


図 49 Tbet positive および negative iNKT における *Bhlhe40*, *Ifng*, *Tbet* mRNA の発現量の比較

Tbet positive および negative iNKT における *Bhlhe40*, *Ifng*, *Tbet* の mRNA の発現量を示す。Tbet positive は Tbet positive iNKT を指し、Tbet negative は Tbet negative iNKT を指す。定量 real-time PCR の結果を Tbet positive iNKT = 1 とした比較 Ct 法により検討したものを示す。ND は un-determined を示す。3 回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す。

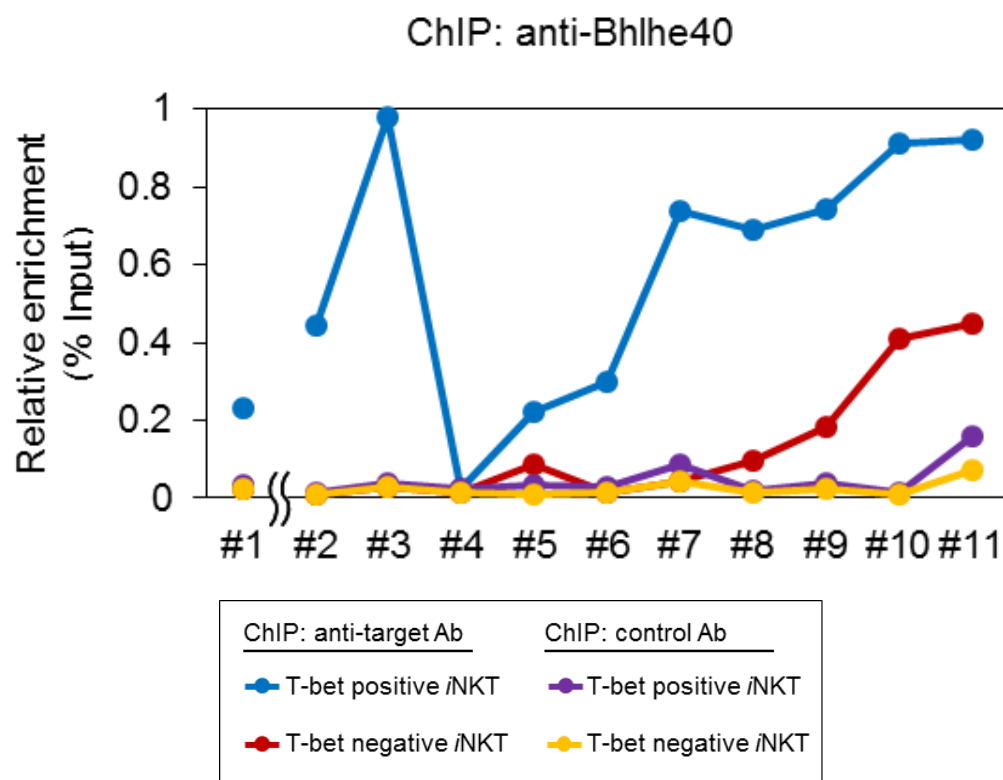


図 50 T-bet positive および negative iNKT における *Ifng* 領域の Bhlhe40 ChIP PCR

T-bet positive および T-bet negative iNKT における anti-Bhlhe40 Ab および, control Ig による ChIP サンプルを用いた *Ifng* 領域の PCR の結果を%Input として示す. 2 回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す.

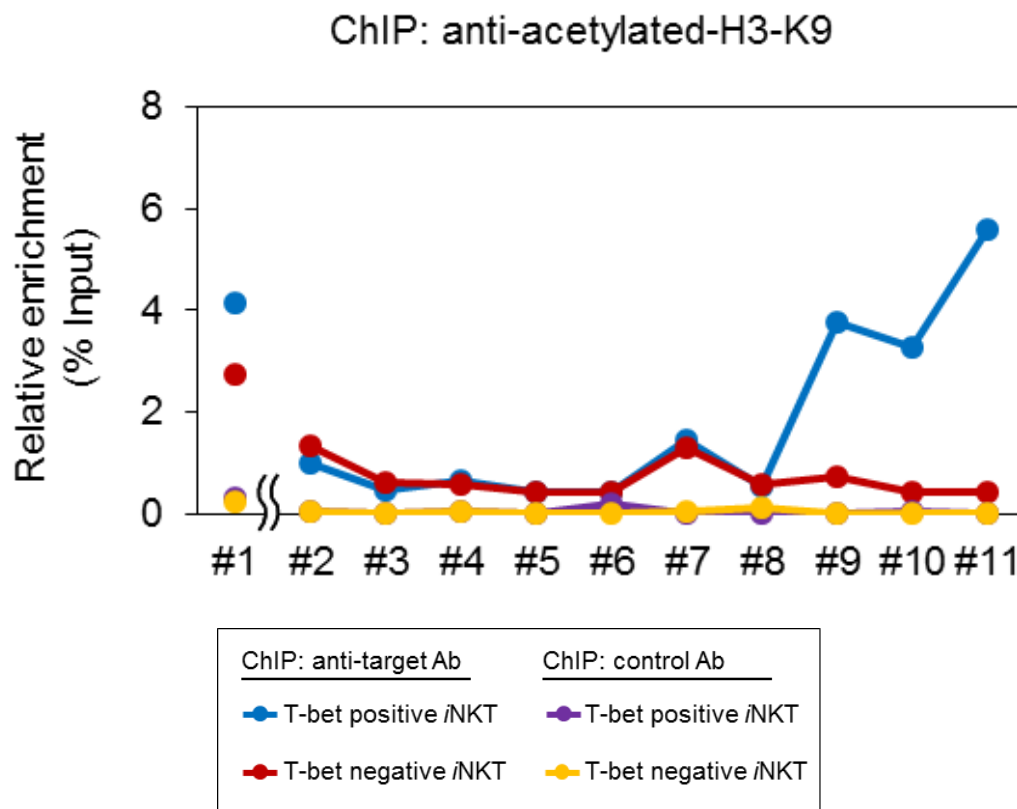


図 51 T-bet positive および negative iNKT における *Ifng* 領域のヒストン H3-K9 アセチル化 ChIP PCR

T-bet positive および T-bet negative iNKT における anti-acetylated H3-K4 Ab および, control Ig による ChIP サンプルを用いた *Ifng* 領域の PCR の結果を%Input として示す. 2 回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す.

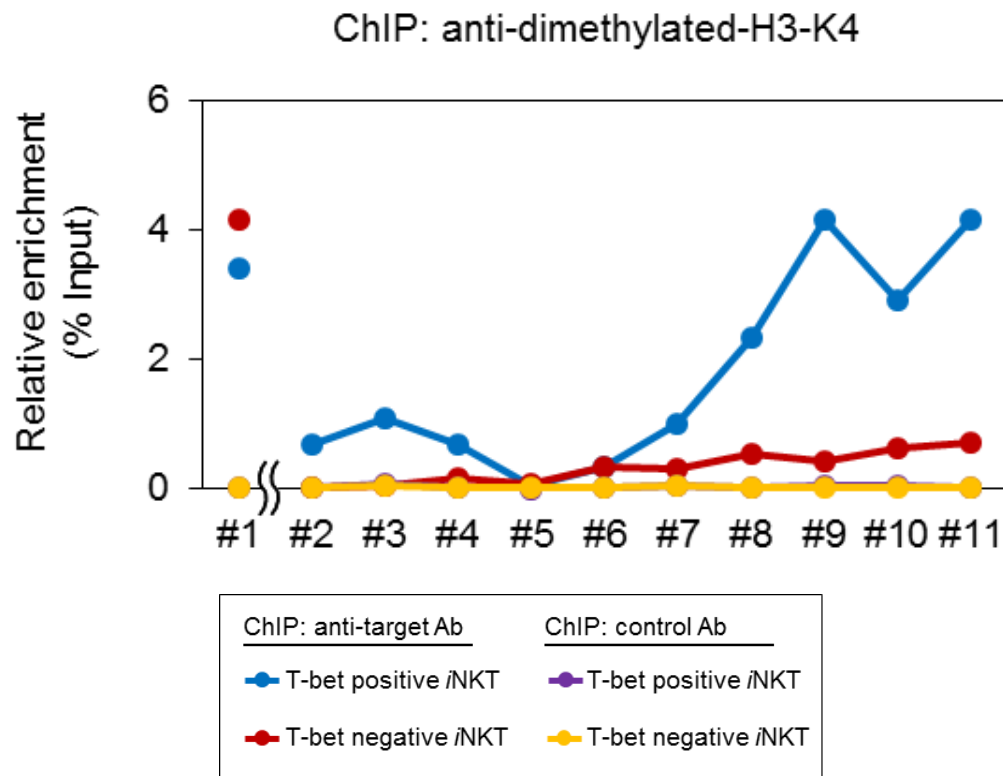


図 52 T-bet positive および negative iNKT における *Ifng* 領域のヒストン H3-K4 ジメチル化 ChIP PCR

T-bet positive および T-bet negative iNKT における anti-dimethylated H3-K4 Ab および, control Ig による ChIP サンプルを用いた *Ifng* 領域の PCR の結果を%Input として示す. 2 回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す.

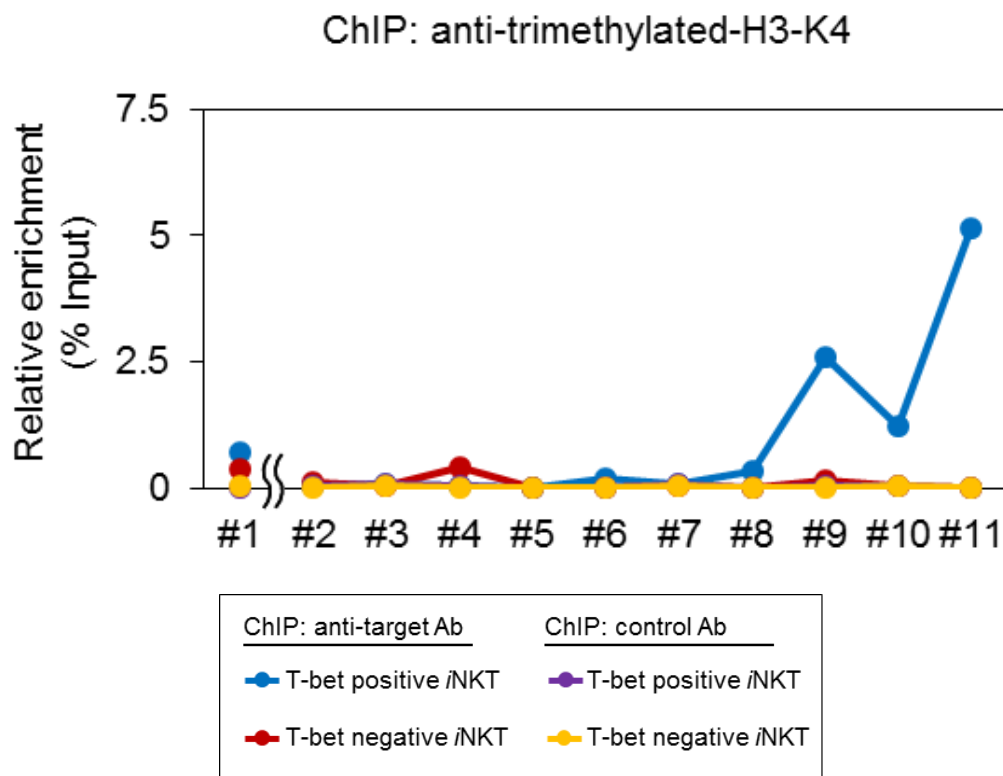


図 53 T-bet positive および negative iNKT における *Ifng* 領域のヒストン H3-K4 トリメチル化 ChIP PCR

T-bet positive および T-bet negative iNKT における anti-trimethylated H3-K4 Ab および, control Ig による ChIP サンプルを用いた *Ifng* 領域の PCR の結果を %Input として示す. 2 回の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す.

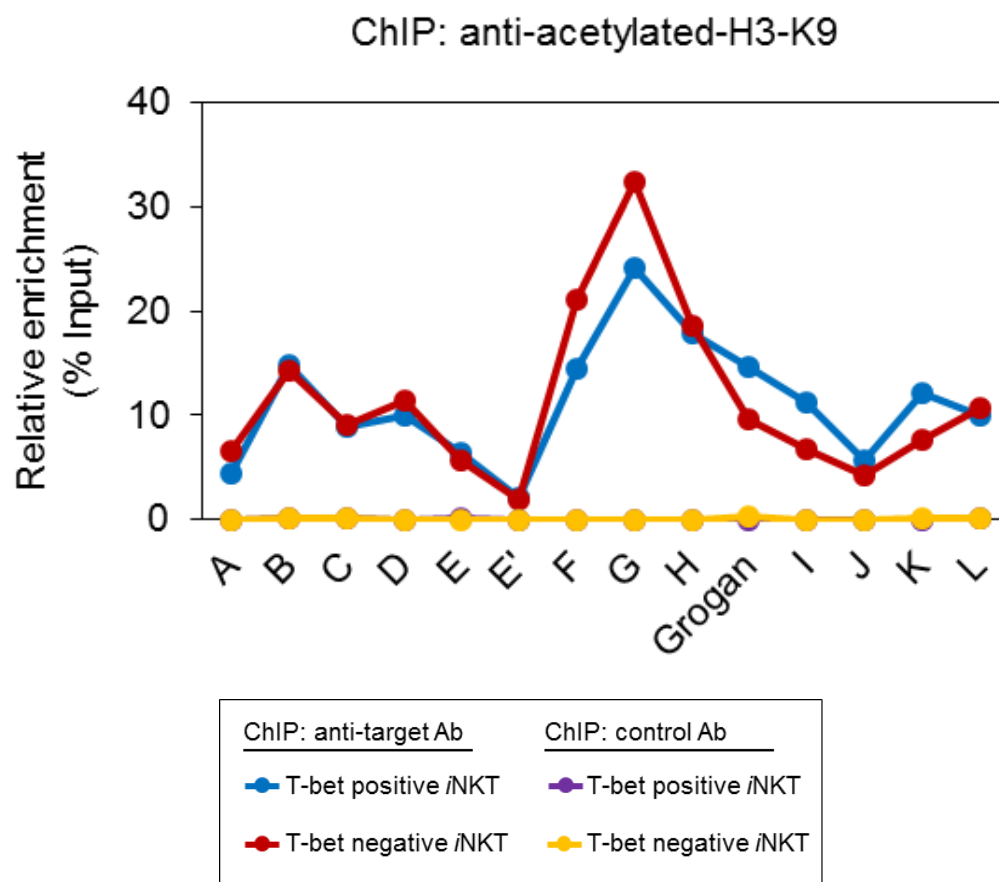


図 54 T-bet positive および negative iNKT における *IL4* 領域のヒストン H3-K9 アセチル化 ChIP PCR

T-bet positive および T-bet negative iNKT における anti-acetylated H3-K4 Ab および, control Ig による ChIP サンプルを用いた *IL4* 領域の PCR の結果を%Input として示す.

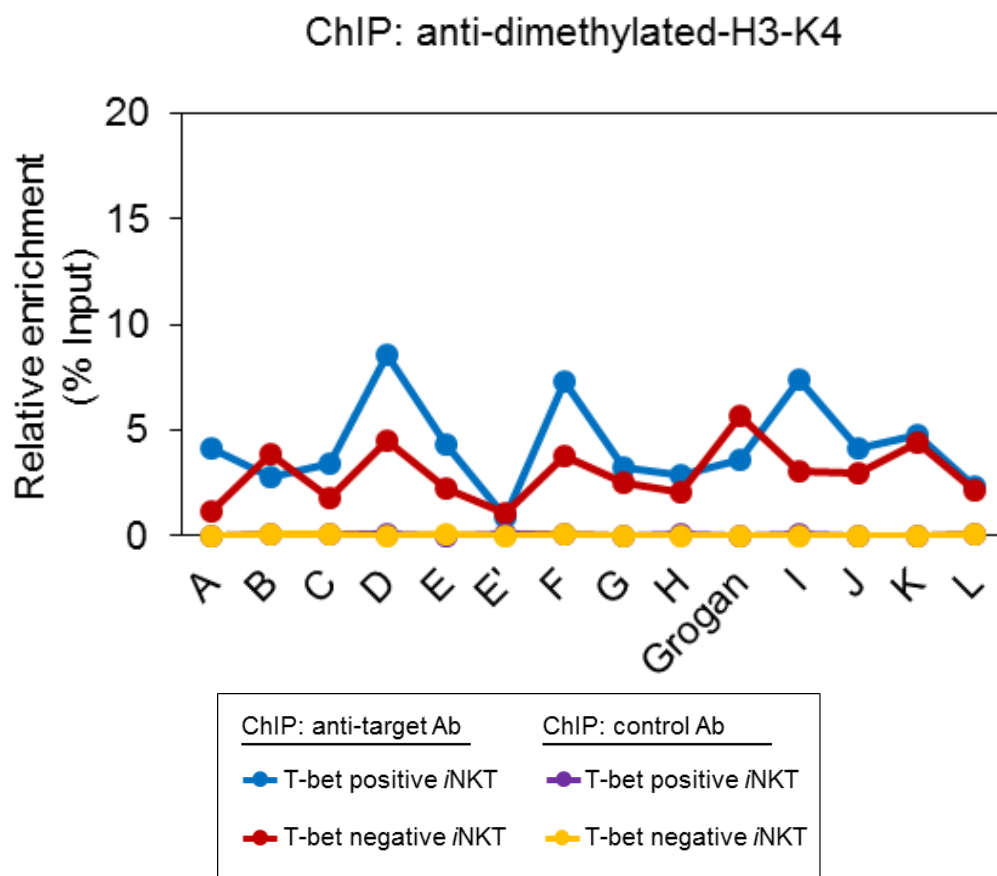


図 55 T-bet positive および negative iNKT における *Il4* 領域のヒストン H3-K4 ジメチル化 ChIP PCR

T-bet positive および T-bet negative iNKT における anti-dimethylated H3-K4 Ab および, control Ig による ChIP サンプルを用いた *Il4* 領域の PCR の結果を%Input として示す.

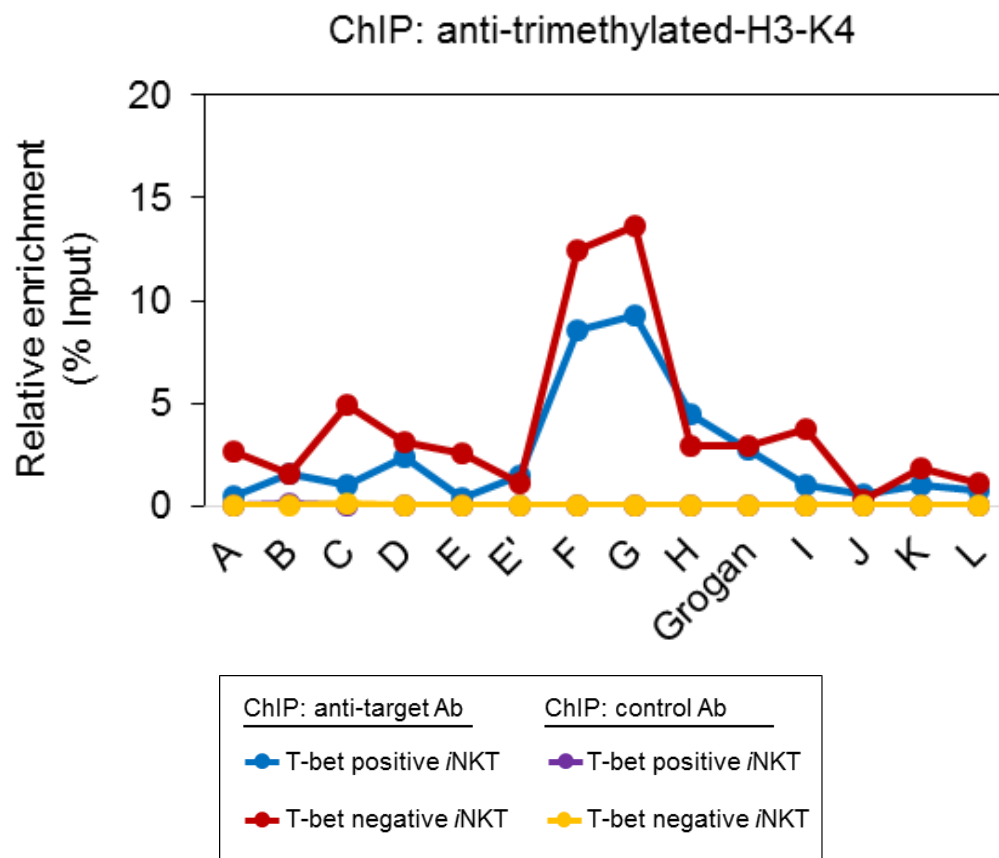


図 56 T-bet positive および negative iNKT における *Il4* 領域のヒストン H3-K4 トリメチル化 ChIP PCR

T-bet positive および T-bet negative iNKT における anti-trimethylated H3-K4 Ab および, control Ig による ChIP サンプルを用いた *Il4* 領域の PCR の結果を%Input として示す.

5. 考察

免疫応答は様々な細胞やさまざまな分子の働きが組み合わさることで、起こるものであり、異物の侵入に対する免疫応答は、まず自然免疫による急速な初期応答から始まる。自然免疫は獲得免疫を活性化させ、異物を排除し、最終的に免疫応答が終息する。これらの過程のいずれかが障害されることで様々な異常が起こるとされている。異物の侵入に正しく反応するためには、初期免疫応答を担う自然免疫の働きが極めて重要である。自然免疫担当細胞の一つである NKT 細胞は、生体内に占める割合は低いに関わらず、糖脂質を認識することにより、すみやかに大量のサイトカインを産生することで、獲得免疫の活性化を誘導する重要な働きを担っている^{50,51}。NKT 細胞の機能は、腫瘍免疫や異物感染において重要なだけでなく³、喘息などのアレルギー性疾患や自己免疫疾患などのさまざまな疾患の発症にも関わりとされている¹³。NKT 細胞の主なサブセットの一つである、iNKT 細胞の特徴的な機能の一つが、刺激にすばやく応答して大量の IFN- γ を産生することであるが、この機能が障害されることは様々な疾患の原因になるとされている。Diabetes-prone non-obese diabetic (NOD)マウスは I 型糖尿病のモデルマウスとして知られるが、このマウスでは NKT 細胞が減少し、サイトカインの産生能が低下している^{52,53}。このマウスに NKT 細胞を移入するあるいは、iNKT 細胞のもつ特徴的な TCR を強制発現させることで、糖尿病の発症を抑制することができる⁵⁴。また、I 型糖尿病患者の末梢血における NKT 細胞の頻度や IFN- γ の産生能の低下が起こっているとされ⁵⁵、これらの異常が認められる場合に I 型糖尿病のリスクになりうることも言われている⁵⁶。これらのことから、iNKT 細胞のもつすばやく大量の IFN- γ を産生することが生体内で重要な働きをしていることがわかるが、iNKT 細胞がどのようなメカニズムで、すばやく大量の IFN- γ を産生するのかは明らかになっていなかった。

本研究では、Bhlhe40 がこの iNKT 細胞の持つ特徴的な IFN- γ 産生において重要な働きを担うことを示した。Bhlhe40 はもともと様々な細胞に発現しており、細胞によって細胞増殖・免疫応答・日内リズムなどのさまざまな生理学的機能を担うことが報告されている^{23,25}。Immunological Genome Project というマウスの免疫担当細胞における遺伝子発現を解析した研究においても、Bhlhe40 は iNKT 細胞で高発現を示すことが示されているが⁵⁰、iNKT 細胞における Bhlhe40 の機能は明らかにされていなかった。本研究ではそれらについての解析を行い、Bhlhe40 欠損が iNKT 細胞の TCR 刺激および IL-12 刺激に伴う IFN- γ 産生に影響を与えることを示した。しかしながら、Bhlhe40 は直接 *Ifng* プロモーター活性には作用せず、さらに TCR の下流シグナルの NF κ B や NFAT、IL-12 受容体の下流の Stat4 シグナル経路には影響を与えないことを示した。

Bhlhe40 が T-bet の補因子として働き、*Ifng* プロモーターの活性にかかわることを示した。

Bhlhe40 は元来 class B E-box 配列に結合し、転写抑制因子として働くことが知られていた¹⁹。しかしながら、最近 Bhlhe40 は transcription factor II B, TATA-binding protein, transcription factor II D などの他の転写因子の補因子として転写制御を行うという報告や^{20,21}, Sp1 結合領域と作用して survivin の発現を亢進させることから、転写活性化作用も有することが報告されている²²。また、T-bet は元来 *Ifng* プロモーターのクロマチンリモデリングに関与することが報告されている⁴⁹。過去の報告では、T-bet は CBP/P300 と結合して、ヒストン H3-K9 アセチル化に関与すると報告されていることから⁵⁷, Bhlhe40 も T-bet-CBP/P300 複合体に関与するの可能性も示唆されるが、それについては今後のさらなる検討が必要である。iNKT 細胞において、*Bhlhe40* 欠損は *Ifng* 領域の T-box におけるヒストン H3-K9 アセチル化に変化をもたらすこと、また T-bet negative iNKT において *Ifng* 領域の T-box における Bhlhe40 の結合が減少し、*Bhlhe40* 欠損時と類似のヒストン H3-K9 アセチル化に変化が起こることから、Bhlhe40/T-bet 複合体が *Ifng* 領域のヒストン H3-K9 アセチル化に重要であることを示した。一方で、クロマチン構造の変化はしばしば基底状態における転写レベルを変化させることが知られているが、我々の実験系においては *Bhlhe40* 欠損における iNKT 細胞の pre-formed *Ifng* mRNA の産生には影響はなかった。また、強制発現株を用いた検討では、レポーターベクターにはクロマチン構造が存在しないことには注意が必要である。これらに関しては今後の検討で明らかにしていきたい。

他の報告において、*Bhlhe40* が Th1 細胞において IFN- γ 産生に関与することが言われており、Th1 および Th17 細胞の働きを介して、*Bhlhe40*^{-/-}マウスは実験的自己免疫脳炎の発症を抑制するとされている⁵⁸。一方で、T-bet 発現 NK 細胞や $\gamma\delta$ -T 細胞などの刺激に伴い大量の IFN- γ を産生する細胞の影響については調べられていない。これらの細胞における、*Ifng* 領域のクロマチン構造がどのようになっているかについても今後検討していきたい。

既報告では、*Bhlhe40* の発現には日内リズムがあるといわれていた¹⁸。しかしながら、本研究においては、明暗周期変化による iNKT 細胞や CD4⁺T 細胞の *Bhlhe40* の発現の日内リズムは認められなかった。このことから、iNKT 細胞の働きが日内リズムの影響を受けないこと示していると考えられる。また、*Bhlhe40* は T 細胞の様々な機能に関与することが言われており、naïve CD8⁺ T 細胞をメモリー T 細胞に変化させるのにも関わりとされている。この働きは日内リズムの影響を受けないとされている⁵⁸⁻⁶⁰。このことから、本研究で示した iNKT 細胞における *Bhlhe40* の IFN- γ 産生に関わる機構も日内リズムの影響を受けないことが示唆される。

本研究では iNKT 細胞における *Bhlhe40*/T-bet 複合体による IFN- γ 産生の分子メカ

ニズムを明らかにした. *i*NKT 細胞における Bhlhe40 の働きを明らかにすることで, 今後自己免疫疾患をふくむさまざまな疾患の病態解明の一助になると考える.

6. 総括及び結論

- IFN- γ 産生能を持つ iNKT 細胞 (iNKT1 および胸腺 Stage 3 iNKT)における *Bhlhe40* の発現量が高いこと
- *Bhlhe40* 欠損は iNKT 細胞の分化・成熟に影響を与えないこと
- *Bhlhe40* は iNKT 細胞の IFN- γ 産生を制御し、抗腫瘍活性を担うこと
- *Bhlhe40* は T-bet 結合し、*Ifng* 領域のヒストン H3-K9 アセチル化を制御することにより IFN- γ 産生に関与すること

本研究では、まず IFN- γ 産生能を持つ iNKT 細胞 (iNKT1 および胸腺 Stage 3 iNKT) における *Bhlhe40* の発現量が高いことを確認した。そこで、*Bhlhe40*^{-/-}マウスを用いて、*Bhlhe40* 欠損は iNKT 細胞の分化・成熟に影響を与えないことおよび *Bhlhe40* は iNKT 細胞の IFN- γ 産生を制御し、抗腫瘍活性を担うことを示した。さらに、*in vitro* の実験を組み合わせ、*Bhlhe40* が T-bet 結合し、*Ifng* 領域のヒストン H3-K9 アセチル化を制御することにより IFN- γ 産生に関与することを示した。これらの検討から、iNKT 細胞における *Bhlhe40* による IFN- γ 産生メカニズムを明らかにした。今後は、このメカニズムと自己免疫疾患の発症機序へ関連など、ヒトの疾患病態の解明の一助となるような研究進展を行っていきたい。

7. 謝辞

稿を終えるにあたり，本研究の機会を与えて頂いた北海道大学大学院医学研究科内科学講座免疫・代謝内科学分野，渥美達也教授に謝意を表します．

本研究全般にわたり直接ご指導ご鞭撻賜りました北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野教授・清野研一郎先生に深く感謝いたします．また，基礎的な部分から直接のご指導頂きました北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野講師（現：理化学研究所統合生命医科学研究センター）・香城諭先生，北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野（現：聖マリアンナ医科大学産婦人科学講座助教）・山中弘之先生に心から感謝いたします．さらに，各種研究材料を提供して頂きました広島大学原爆放射線医科学研究所疾患モデル解析研究分野教授・本田浩章先生，広島大学自然科学研究支援センター生命科学実験部門教授・外丸祐介先生，理化学研究所統合生命医科学研究センター免疫制御戦略研究グループディレクター・谷口克先生に感謝いたします．

最後に本研究を遂行するにあたり，ご助言・ご協力・ご支援頂きました北海道大学大学院医学研究科内科学講座免疫・代謝内科学分野および遺伝子病制御研究所免疫生物分野の全ての皆様に心より御礼申し上げます．

8. 引用文献

- 1 Medzhitov, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819-826 (2007).
- 2 Coquet, J. M. *et al.* Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 11287-11292 (2008).
- 3 Taniguchi, M. *et al.* The regulatory role of Valpha14 NKT cells in innate and acquired immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 483-513 (2003).
- 4 Kitamura, H. *et al.* The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *J. Exp. Med.* 189, 1121-1128 (1999).
- 5 Kojo, S. *et al.* Induction of regulatory properties in dendritic cells by Valpha14 NKT cells. *J. Immunol.* 175, 3648-3655 (2005).
- 6 Terabe, M. & Berzofsky, J. A. The role of NKT cells in tumor immunity. *Adv. Cancer Res.* 101, 277-348 (2008).
- 7 Matsuda, J. L. & Gapin, L. Does the developmental status of Valpha14i NKT cells play a role in disease? *Int. Rev. Immunol.* 26, 5-29 (2007).
- 8 Benlagha, K. *et al.* A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science* 296, 553-555 (2002).
- 9 Constantinides, M. G. & Bendelac, A. Transcriptional regulation of the NKT cell lineage. *Curr. Opin. Immunol.* 25, 161-167 (2013).
- 10 Hu, T. *et al.* Increased level of E protein activity during invariant NKT development promotes differentiation of invariant NKT2 and invariant NKT17 subsets. *J. Immunol.* 191, 5065-5073 (2013).
- 11 Lee, Y. J. *et al.* Steady-state production of IL-4 modulates immunity in mouse strains and is determined by lineage diversity of iNKT cells. *Nat. Immunol.* 14, 1146-1154 (2013).
- 12 Watarai, H. *et al.* Development and function of invariant natural killer T cells producing T(h)2- and T(h)17-cytokines. *PLoS Biol.* 10, e1001255 (2012).
- 13 Berzins, S. P., Smyth, M. J. & Baxter, A. G. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 131-142 (2011).
- 14 Wu, L. & Van Kaer, L. Natural killer T cells and autoimmune disease. *Curr. Mol. Med.*

- 9, 4-14 (2009).
- 15 Bendelac, A., Savage, P. B. & Teyton, L. The biology of NKT cells. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 297-336 (2007).
 - 16 Motohashi, S. *et al.* A phase I-II study of alpha-galactosylceramide-pulsed IL-2/GM-CSF-cultured peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *J. Immunol.* 182, 2492-2501 (2009).
 - 17 Van Kaer, L. alpha-Galactosylceramide therapy for autoimmune diseases: prospects and obstacles. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 31-42 (2005).
 - 18 Honma, S. *et al.* Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature* 419, 841-844 (2002).
 - 19 Li, Y. *et al.* DEC1 negatively regulates the expression of DEC2 through binding to the E-box in the proximal promoter. *J. Biol. Chem.* 278, 16899-16907 (2003).
 - 20 Zawel, L. *et al.* DEC1 is a downstream target of TGF-beta with sequence-specific transcriptional repressor activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 2848-2853 (2002).
 - 21 Shen, M. *et al.* Basic helix-loop-helix protein DEC1 promotes chondrocyte differentiation at the early and terminal stages. *J. Biol. Chem.* 277, 50112-50120 (2002).
 - 22 Li, Y. *et al.* The expression of antiapoptotic protein survivin is transcriptionally upregulated by DEC1 primarily through multiple sp1 binding sites in the proximal promoter. *Oncogene* 25, 3296-3306 (2006).
 - 23 Miyazaki, K. *et al.* The role of the basic helix-loop-helix transcription factor Dec1 in the regulatory T cells. *J. Immunol.* 185, 7330-7339 (2010).
 - 24 Seuter, S., Pehkonen, P., Heikkinen, S. & Carlberg, C. The gene for the transcription factor BHLHE40/DEC1/stra13 is a dynamically regulated primary target of the vitamin D receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 136, 62-67 (2013).
 - 25 Sun, H. *et al.* Defective T cell activation and autoimmune disorder in Stra13-deficient mice. *Nat. Immunol.* 2, 1040-1047 (2001).
 - 26 Cui, J. *et al.* Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 278, 1623-1626 (1997).
 - 27 Watarai, H. *et al.* Generation of functional NKT cells in vitro from embryonic stem cells bearing rearranged invariant Valpha14-Jalpha18 TCRalpha gene. *Blood* 115, 230-237 (2010).
 - 28 Watarai, H. *et al.* Methods for detection, isolation and culture of mouse and human invariant NKT cells. *Nat. Protoc.* 3, 70-78 (2008).
 - 29 Ranganath, S. *et al.* GATA-3-dependent enhancer activity in IL-4 gene regulation. *J. Immunol.* 161, 3822-3826 (1998).

- 30 Szabo, S. J., Gold, J. S., Murphy, T. L. & Murphy, K. M. Identification of cis-acting regulatory elements controlling interleukin-4 gene expression in T cells: roles for NF- κ B and NF-ATc. *Mol. Cell. Biol.* 13, 4793-4805 (1993).
- 31 Bailis, W. *et al.* Notch simultaneously orchestrates multiple helper T cell programs independently of cytokine signals. *Immunity* 39, 148-159 (2013).
- 32 Fields, P. E., Kim, S. T. & Flavell, R. A. Cutting edge: changes in histone acetylation at the IL-4 and IFN- γ loci accompany Th1/Th2 differentiation. *J. Immunol.* 169, 647-650 (2002).
- 33 Grenningloh, R., Kang, B. Y. & Ho, I. C. Ets-1, a functional cofactor of T-bet, is essential for Th1 inflammatory responses. *J. Exp. Med.* 201, 615-626 (2005).
- 34 Lovett-Racke, A. E. *et al.* Silencing T-bet defines a critical role in the differentiation of autoreactive T lymphocytes. *Immunity* 21, 719-731 (2004).
- 35 Baguet, A. & Bix, M. Chromatin landscape dynamics of the Il4-Il13 locus during T helper 1 and 2 development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 11410-11415 (2004).
- 36 Hijikata, A. *et al.* Construction of an open-access database that integrates cross-reference information from the transcriptome and proteome of immune cells. *Bioinformatics* 23, 2934-2941 (2007).
- 37 Maeda, M., Lohwasser, S., Yamamura, T. & Takei, F. Regulation of NKT cells by Ly49: analysis of primary NKT cells and generation of NKT cell line. *J. Immunol.* 167, 4180-4186 (2001).
- 38 Griewank, K. *et al.* Homotypic interactions mediated by Slamf1 and Slamf6 receptors control NKT cell lineage development. *Immunity* 27, 751-762 (2007).
- 39 Stetson, D. B. *et al.* Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function. *J. Exp. Med.* 198, 1069-1076 (2003).
- 40 Fujii, S., Shimizu, K., Kronenberg, M. & Steinman, R. M. Prolonged IFN- γ -producing NKT response induced with α -galactosylceramide-loaded DCs. *Nat. Immunol.* 3, 867-874 (2002).
- 41 Schmieg, J., Yang, G., Franck, R. W. & Tsuji, M. Superior protection against malaria and melanoma metastases by a C-glycoside analogue of the natural killer T cell ligand α -Galactosylceramide. *J. Exp. Med.* 198, 1631-1641 (2003).
- 42 Toura, I. *et al.* Cutting edge: inhibition of experimental tumor metastasis by dendritic cells pulsed with α -galactosylceramide. *J. Immunol.* 163, 2387-2391 (1999).
- 43 Kojo, S. *et al.* Mechanisms of NKT cell anergy induction involve Cbl-b-promoted monoubiquitination of CARMA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 17847-17851 (2009).

- 44 Szabo, S. J., Sullivan, B. M., Peng, S. L. & Glimcher, L. H. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 713-758 (2003).
- 45 Hwang, E. S., Szabo, S. J., Schwartzberg, P. L. & Glimcher, L. H. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science* 307, 430-433 (2005).
- 46 Morinobu, A. *et al.* STAT4 serine phosphorylation is critical for IL-12-induced IFN- γ production but not for cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12281-12286 (2002).
- 47 Szabo, S. J. *et al.* A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655-669 (2000).
- 48 Beima, K. M. *et al.* T-bet binding to newly identified target gene promoters is cell type-independent but results in variable context-dependent functional effects. *J. Biol. Chem.* 281, 11992-12000 (2006).
- 49 Sekimata, M. *et al.* CCCTC-binding factor and the transcription factor T-bet orchestrate T helper 1 cell-specific structure and function at the interferon- γ locus. *Immunity* 31, 551-564 (2009).
- 50 Cohen, N. R. *et al.* Shared and distinct transcriptional programs underlie the hybrid nature of iNKT cells. *Nat. Immunol.* 14, 90-99 (2013).
- 51 Nishimura, T. *et al.* The interface between innate and acquired immunity: glycolipid antigen presentation by CD1d-expressing dendritic cells to NKT cells induces the differentiation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int. Immunol.* 12, 987-994 (2000).
- 52 Fletcher, M. T. & Baxter, A. G. Clinical application of NKT cell biology in type I (autoimmune) diabetes mellitus. *Immunol. Cell Biol.* 87, 315-323 (2009).
- 53 Novak, J., Griseri, T., Beaudoin, L. & Lehuen, A. Regulation of type 1 diabetes by NKT cells. *Int. Rev. Immunol.* 26, 49-72 (2007).
- 54 Lehuen, A. *et al.* Overexpression of natural killer T cells protects Valpha14- Jalpha281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes. *J. Exp. Med.* 188, 1831-1839 (1998).
- 55 Kukreja, A. *et al.* Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J. Clin. Invest.* 109, 131-140 (2002).
- 56 Wilson, S. B. *et al.* Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes. *Nature* 391, 177-181 (1998).
- 57 Chen, G. Y., Osada, H., Santamaria-Babi, L. F. & Kannagi, R. Interaction of GATA-3/T-bet transcription factors regulates expression of sialyl Lewis X homing receptors on

- Th1/Th2 lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 16894-16899 (2006).
- 58 Lin, C. C. *et al.* Bhlhe40 controls cytokine production by T cells and is essential for
pathogenicity in autoimmune neuroinflammation. *Nat Commun* 5, 3551 (2014).
- 59 Hu, G. & Chen, J. A genome-wide regulatory network identifies key transcription
factors for memory CD8(+) T-cell development. *Nat Commun* 4, 2830 (2013).
- 60 Liu, Y. *et al.* DEC1 is positively associated with the malignant phenotype of invasive
breast cancers and negatively correlated with the expression of claudin-1. *Int. J. Mol.*
Med. 31, 855-860 (2013).