

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07947

研究課題名(和文) IL-27/IL-35共通サブユニットEBI3による新しい蛋白質発現の制御機構

研究課題名(英文) A novel role for EBI3, a common subunit of IL-27 and IL-35, as an intracellular molecule in the augmentation of IL-23Ra protein expression

研究代表者

溝口 出 (Mizoguchi, Izuru)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：00569527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Epstein-Barr virus-induced gene 3 (EBI3)がCD4+T細胞中で、細胞内分子として、蛋白質の高次構造形成に重要な分子シャペロンであるカルネキシンへの結合を介し、IL-23R の蛋白質レベルでの発現を増強するという新しい機構を明らかにした。さらに、ヒトのゲノムワイド関連解析により明らかになったIL-23R G149R変異体を用いた解析より、この部位がEBI3のIL-23R への結合する領域で、ヒトの腸炎発症へのEBI3の関与も示唆された。

研究成果の概要(英文)：We explored an intracellular role of Epstein-Barr virus-induced gene 3 (EBI3) independent of function as cytokines. EBI3-deficient naive CD4+ T cells had reduced interferon (IFN)- γ production and failed to induce T cell-dependent colitis in mice. Similarly reduced IFN- γ production was observed in vitro in EBI3-deficient CD4+ T cells differentiated under pathogenic helper T 17 polarizing conditions with IL-23 because of decreased expression of IL-23 receptor (IL-23R) at the protein level but not the mRNA level. EBI3 augmented IL-23R expression via binding to the chaperone molecule calnexin and to IL-23R. However, EBI3 poorly augmented the expression of G149R, an IL-23R variant that protects against the development of human colitis, because binding of EBI3 to the variant was significantly reduced. These results suggest that EBI3 plays a critical role in augmenting IL-23R protein expression via calnexin under inflammatory conditions.

研究分野：Immunology

キーワード：EBI3 IL-23Ra カルネキシン

1. 研究開始当初の背景

IL-6/IL-12 ファミリーのサイトカインは、2つの異なるサブユニットからなるヘテロダイマーであるというユニークな特徴を有し、主にマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞より産生され、ヘルパーT (Th) 細胞の分化誘導やエフェクター機能の制御に重要な役割を担っている。最近、我々は、IL-27 および IL-35 のサブユニットの1つ EB13 が、IL-27/IL-35 とは関係なく、CD4⁺T 細胞内で EB13 単独で細胞内分子として腸炎発症を増強する新しい現象を見出した。

2. 研究の目的

本研究では、最近、我々が見出した上述の細胞内分子として EB13 が腸炎発症を増強する現象の作用機序とその生理的意義を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

(1) プライマリーCD4⁺T 細胞の活性化

野生型 C57BL/6 マウスおよび EB13 欠損マウス (Jackson より購入) 由来ナイーブ CD4⁺T 細胞を精製後、固相化抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で刺激し、3 日後に IL-2 を加え、経時的に細胞溶解液を調製した。3 日後に、プロテアソーム阻害剤 (MG132) およびリソソーム阻害剤 (Pepstatin A, E64d)、蛋白質合成阻害剤 (シクロヘキシミド) を加え培養後、細胞溶解液を調製した。細胞溶解液を電気泳動後、EB13 および IL-23R α 、IL-12R β 1 に対する抗体を用いたウェスタンブロット解析により、それぞれの分子の蛋白質レベルでの発現を調べた。同様に RNA も回収し、リアルタイム RT-PCR により mRNA レベルでの発現を調べた。

(2) ヒト胎児腎細胞株 HEK293T 細胞を用いた再構成系での解析

HEK293T 細胞にタグ付きの IL-23R α -HA および IL-12R β 1-FLAG、EB13 の発現ベクターを Fugene 6 を用いて遺伝子導入後、48~72 時間後に細胞溶解液を調製し、上述と同様に、それぞれの蛋白質レベルでの発現をウェスタンブロット解析により、mRNA レベルでの発現をリアルタイム RT-PCR により調べた。抗体に反応したウェスタンブロットのバンドの強度は、ChemiDOc XRS (Bio-Rad) を用いて定量した。また、分子同士の会合は、免疫沈降反応後、ウェスタンブロットにより解析した。

上述と同様に HEK293T 細胞に一過性に遺伝子導入し、48~72 時間後細胞溶解液を調製し、タグに対する抗体および抗 EB13 抗体 (Santa Cruz 社) と Protein G アガロースビーズ (GEヘルスケア社) を用いて免疫沈降反応を行い、それぞれ反対の抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。

(3) 蛍光免疫組織学的手法による蛋白質の

共局在解析

上述と同様に、HEK293T 細胞に Fugene 6 を用いて一過性に遺伝子導入し、72 時間後、細胞内での発現は、パラホルムアルデヒドによる固定と Triton による膜の透過処理後、蛍光標識した抗 FLAG 抗体と抗 EB13 抗体、核を DAPI で染色し、サイトスピンを用いてスライドグラスの上に単層塗抹標本を作製し、顕微鏡下で観察した。細胞表面上での発現は、固定化および透過処理の操作を除いて、同様に解析した。

(4) FACS による細胞表面および細胞内での蛋白質発現解析

上述と同様に、HEK293T 細胞に Fugene 6 を用いて一過性に遺伝子導入し、72 時間後、細胞内での発現は、固定後、抗 FLAG 抗体または抗 EB13 抗体による染色、次に、それぞれの抗体に対するビオチン化抗体、さらに、蛍光標識したアピチンを加え、FACSCanto II (BD Biosciences) で分析し、FlowJo (Tree Star) で解析した。

4. 研究成果

(1) 活性化したプライマリーCD4⁺T 細胞での EB13 発現

まず、野生型および EB13 欠損マウス由来ナイーブ CD4⁺T 細胞を、抗 CD3/抗 CD28 抗体で刺激すると、野生型 CD4⁺T 細胞では、EB13 の発現増強と、それに伴い IL-23R α および IL-12R β 1 の発現が増強された。しかし、EB13 欠損 CD4⁺T 細胞では、EB13 発現の欠損により IL-23R α 発現増強が mRNA レベルでは変わらなかったが、蛋白質レベルで顕著に低下していた。この低下は、プロテアソームやリソソーム阻害剤を用いた解析より、プロテアソームでの分解の亢進によるものであり、さらに、蛋白質合成阻害剤を用いた解析より蛋白質の安定性の低下によるものであった。

(2) 再構成系による EB13 による IL-23R α 発現増強

次に、HEK293T 細胞を用いた再構成系によるウェスタンブロット解析により、EB13 はその発現量に比例して、IL-12R β 1 の発現は変わらないが、IL-23R α 発現を、mRNA レベルでは変わらないが蛋白質レベルで増強した。同様な結果が、蛍光免疫組織学的手法や FACS 解析により得られ、STAT 反応性配列をルシフェラーゼ遺伝子に繋いだリポーター遺伝子を用いた解析によっても、IL-23 のシグナルが増強されることがわかった。

(3) 分子シャペロンであるカルネキシンの関与

その機構としては、免疫沈降反応により EB13 が、蛋白質の高次構造の形成に重要な分子シャペロンであるカルネキシンにもペプチドを介して結合することがわかった。CRISPR/Cas9 を用いてカルネキシン遺伝子を

欠失した HEK293T 細胞を作製し、同様な実験を行ったところ、EBI3 による IL-23R α 発現増強効果が見られなくなった。

(4) EBI3 の IL-23R α G149R 変異体への結合

次に、IL-23R α のどの領域に EBI3 が結合するかを調べるために、IL-23R α の全長と細胞外領域だけの可用性 IL-23R α への結合を免疫沈降反応により比較検討すると、細胞外領域に結合することがわかった。

近年、次世代シーケンサーやゲノムワイド関連解析 (GWAS) により、ヒト炎症性腸疾患発症と負の相関性がある IL-23R α の 3 つの変異体が報告された (Sivanesan et al. J Biol Chem. 2016)。これらの変異体は、蛋白質レベルでの発現安定性が低下していた。そこで、最後に、その内の細胞表面に存在する IL-23R α G149R 変異体の発現ベクターを作製し、再構成系を用いて EBI3 による発現増強効果を調べた。その結果、この G149R 変異体には、EBI3 の結合性が低下し、発現増強効果も減弱していたことより、この領域が、EBI3 の結合する領域と考えられた。以上の結果より、EBI3 とヒトでの腸炎発症との関連も示唆された。

(5) 本研究成果の意義と今後の展望

本研究により、EBI3 が T 細胞中で IL-27 や IL-35 などのサイトカインとしてではなく、細胞内分子として、蛋白質の高次構造形成に重要な分子シャペロンであるカルネキシンへの結合を介し、IL-23R α の蛋白質レベルでの発現を増強するという新しい機構を明らかにした。さらに、ヒトのゲノムワイド関連解析により明らかになった IL-23R α G149R 変異体を用いた解析より、この部位が EBI3 の IL-23R α への結合する領域で、ヒトでこの変異体が IL-23R α の蛋白質レベルでの発現安定性の低下により、IL-23 のシグナルが入らず、腸炎発症に抵抗性を示すことより、ヒトの腸炎発症への EBI3 の関与も示唆された。

興味深いのは、その EBI3 が発現増強効果を示す標的分子の特異性である。IL-23R のもう一つのサブユニットである IL-12R β 1 には結合せず、発現増強効果も示さないことより、特異性があることがわかる。現在、さらに、EBI3 が、IL-23R α と同様に結合し、発現増強効果を示す分子を探索中である。

EBI3 の発現は、恒常的ではなく、活性化した CD4⁺T 細胞や成熟化した樹状細胞で見られる。そこで、我々は、現在、以下のような新しい概念を考えている。すなわち、定常状態で蛋白質合成されたばかりの膜蛋白質や可溶性蛋白質の高次構造形成には、カルネキシンが重要な役割を担っている。ところが、炎症が誘導されると、EBI3 の発現が誘導され、恒常的に発現されているカルネキシンに結合し協力して発現誘導される標的分子の蛋白質の高次構造形成をさらに促進するという、炎症時の新しい蛋白質発現増強機構を

EBI3 が担っていると考えている。これまでは、恒常的な場合での蛋白質合成のみが調べられ、炎症誘導時での蛋白質合成の検討はされていない。本研究の成果より、EBI3 を介した炎症時の新しい蛋白質発現増強機構の存在が明らかになった。

さらに、EBI3 は、現在、ヘテロダイマーサイトカインのサブユニットの一つとして報告されているが、元々は、本研究のように、炎症時の蛋白質発現増強を担う過程で、蛋白質合成された p28 に結合したまま、細胞外にまで放出され、可溶性蛋白質であるサイトカイン IL-27 として機能するようになったのではと考えている。同様に、p35 や p19 に結合したままの分子が、IL-35 や IL-39 になった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Orii N, Mizoguchi I, Chiba Y, Hasegawa H, Ohashi M, Xu M, Nagai T, Ochiai M, Mochizuki Y, Owaki T, Yoshimoto T. Protective effects against tumors and infection by IL-27 through promotion of expansion and differentiation of hematopoietic stem cells into myeloid progenitors. *Oncoimmunology* 2018 Jan 15;7(5):e14221892. DOI: org/10.1080/2162402X.2017.1421892. 査読有
2. Chiba Y, Mizoguchi I, Hasegawa H, Ohashi M, Orii N, Nagai T, Sugahara M, Miyamoto Y, Xu M, Owaki T, Yoshimoto T. Regulation of myelopoiesis by proinflammatory cytokines in infectious diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 2018 Apr;75(8):1363-1376. DOI: 10.1007/s00018-017-2724-5. 査読有
3. Chiba Y, Mizoguchi I, Furusawa J, Hasegawa H, Ohashi M, Xu M, Owaki T, Yoshimoto T. Interleukin-27 exerts its antitumor effects by promoting differentiation of hematopoietic stem cells to M1 macrophages. *Cancer Res.* 2018 Jan 1;78(1):182-194. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0960. 査読有
4. Mizoguchi I, Ohashi M, Chiba Y, Hasegawa H, Xu M, Owaki T, Yoshimoto T. Prediction of chemical respiratory and contact sensitizers by OX40L expression in dendritic cells using a novel 3D co-culture system. *Front. Immunol.* 2017 Aug 4;8:929. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00929. 査読有
5. Umemoto T, Matsuzaki Y, Shiratsuchi Y, Yoshimoto T, Nakamura-Ishizu A, Petrich B, Yamato Y, Suda T. Integrin $\alpha\beta$ 3 enhances the suppressive effect of interferon- γ on the maintenance of hematopoietic stem cells. *EMBO J.* 2017 Aug 15;36(16):2390-2403. DOI: 10.15252/embj.201796771. 査読有

6. Shimoura N, Nagai H, Fujiwara S, Jimbo H, Yoshimoto T, Nishigori C. Interleukin (IL)-18, cooperatively with IL-23, induces prominent inflammation and enhances psoriasis-like epidermal hyperplasia. *Arch. Dermatol. Res.* 2017 May;309(4):315-321. DOI: 10.1007/s00403-017-1735-2. 査読有
 7. Hasegawa H, Mizoguchi I, Chiba Y, Ohashi M, Xu M, Yoshimoto T. Expanding diversity in molecular structures and functions of the IL-6/IL-12 heterodimeric cytokine family. *Front. Immunol.* 2016 Nov 4;7:479. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00479. 査読有
 8. Kimura Y, Nagai N, Tsunekawa N, Sato-Matsushita M, Yoshimoto T, Cua D, Iwakura Y, Yagita H, Okada F, Tahara H, Saiki I, Irimura T, Hayakawa Y. IL-17A-producing CD30+ V δ 1 T cells drive inflammation-induced cancer progression. *Cancer Sci.* 2016 Sep;107(9):1206-14. DOI: 10.1111/cas.13005. 査読有
 9. Furusawa J, Mizoguchi I, Chiba Y, Hisada M, Kobayashi F, Yoshida H, Nakae S, Tsuchida A, Matsumoto T, Ema H, Mizoguchi J, Yoshimoto T. Promotion of expansion and differentiation of hematopoietic stem cells by interleukin-27 into myeloid progenitors to control infection in emergency myelopoiesis. *PLoS Pathog.* 2016 Mar 18;12(3):e1005507. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005507. 査読有
 10. Miki K, Nagaoka K, Bohnenkamp H, Yoshimoto T, Maekawa M, Kamigaki T. Dendritic cells pulsed with PepTivator[®] Ovalbumin induce both OVA-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells and cause antitumor effects in a mouse model of lymphoma. *MACS&more* 2016 17(1):7-10. 査読無
 11. Yoshimoto T, Chiba Y, Furusawa J, Xu M, Tsunoda R, Higuchi K, Mizoguchi I. Potential clinical application of interleukin-27 as an antitumor agent. *Cancer Sci.* 2015 106(9):1103-1110. DOI: 10.1111/cas.12731. 査読有
 12. Mizoguchi I, Chiba Y, Furusawa J, Xu M, Tsunoda R, Higuchi K, Yoshimoto T. Therapeutic potential of interleukin-27 against cancers in preclinical mouse models. *Oncoimmunology* 2015 May 27;4(10):e1042200. DOI: 10.1080/2162402X.2015.1042200. 査読有
 13. Toyotoa H, Yanase N, Yoshimoto T, Harada M, Kato Y, Mizoguchi J. Vaccination with OVA-bound nanoparticles encapsulating IL-7 inhibits the growth of OVA-expressing E.G7 tumor cells in vivo. *Oncol. Rep.* 2015 33(1):292-296. DOI: 10.3892/or.2014.3603. 査読有
- [学会発表] (計 45 件)
1. Mizoguchi I, Ohashi, M., Hasegawa, H., Chiba, Y., Orii, N., Kan, S., Xu, M., Ochiai, N., Owaki, T., and Yoshimoto T. A novel role for EB13 to augment IL-23R α protein expression through a lectin chaperone calnexin. 東京医科大学記念館ポスター発表懇談会(2018)
 2. 善本隆之: 炎症時の新しい蛋白質発現の増強機構、平成 26 年度選定戦略的研究基盤形成支援事業「機能性磁性ナノビーズ技術を基盤とする難治性疾患におけるタンパク質分解機構の解明と新規治療法の開発」進捗状況報告会(2018)
 3. 善本隆之: 炎症性腸疾患発症に関与する IL-23R 蛋白質の新しい発現安定化機構、平成 26 年度選定戦略的研究基盤形成支援事業「機能性磁性ナノビーズ技術を基盤とする難治性疾患におけるタンパク質分解機構の解明と新規治療法の開発」中間報告会(2017)
 4. 溝口出、千葉祐規乃、長谷川英哲、大橋美緒、中村涼乃、折井直子、干詩宇、徐明利、大脇敏之、善本隆之: IL-27/IL-35 共通サブユニット EB13 による IL-23R の新しい蛋白質発現安定化機構、第 6 回医薬工 3 大学包括連携推進シンポジウム(2017)
 5. Yoshimoto T. Advances in cancer immunotherapy. Institute of Medical University 1st International Symposium on Roles of Aging and Cancer. 2017.
 6. Mizoguchi I, Ohashi, M., Hasegawa, H., Chiba, Y., Xu, M., and Yoshimoto T. A novel role for Epstein-Barr virus-induced gene 3 to augment IL-23 receptor α protein expression through a lectin chaperone calnexin. 第 46 回日本免疫学会総会・学術集会(2017)
 7. 溝口出: 炎症時の新しい蛋白質発現の増強機構、Annual Meeting 2017 医学総合研究所 研究発表会 (2017)
 8. 善本隆之: IL-27/IL-35 共通サブユニット EB13 による新しい蛋白質発現の増強機構、平成 26 年度選定戦略的研究基盤形成支援事業「機能性磁性ナノビーズ技術を基盤とする難治性疾患におけるタンパク質分解機構の解明と新規治療法の開発」第 1 回進捗状況報告会(2016)
 9. 溝口出、千葉祐規乃、徐明利、古澤菜奈子、大橋美緒、善本隆之: EB13 のカルネキシンへの結合を介した IL-23R 発現の増強と腸炎発症促進、東京医科大学記念館ポスター発表懇談会(2016)
 10. Yoshimoto T, Ohashi, M., Hasegawa, H., Chiba, Y., Xu, M., and Mizoguchi I. Establishment of a novel in vitro evaluation system for the prediction of respiratory sensitizing potential of chemicals. ICCA-LRI and NIHS Workshop. 2016.

11. 溝口出、大橋美緒、長谷川英哲、千葉祐規乃、徐明利、善本隆之：アレルギー感作性を *in vitro* で評価する新しい方法の開発、第5回医薬工3大学包括連携推進シンポジウム(2016)
12. Yoshimoto, T., Furusawa, J., Chiba, Y., Xu, M., Hasegawa, H., Nakae, S., Kobayashi, F., Yoshida, H., and Mizoguchi, I. Ohashi, M., Hasegawa, H., and Mizoguchi, I. Promotion of expansion and differentiation of hematopoietic stem cells by IL-27 into myeloid progenitors to control infection in emergency myelopoiesis. Symposium, 16th International Congress of Immunology, 2016.
13. 溝口出、千葉祐規乃、角田廉、徐明利、善本隆之：化学物質の呼吸器感作性 *in vitro* 評価法の開発、第3期LRI研究報告会(2015)
14. Mizoguchi, I., Chiba, Y., Xu, M., and Yoshimoto, T. Binding of Epstein-Barr virus-induced gene 3 to calnexin enhances its chaperone activity and augments interleukin-23 receptor expression, leading to development of colitis. 第44回日本免疫学会総会・学術集会(2015)
15. 善本隆之、千葉祐規乃、角田廉、徐明利、溝口出：化学物質の呼吸器感作性 *in vitro* 評価法の開発、LRIシンポジウム、第28回日本動物実験代替法学会(2015)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝口 出 (MIZOGUCHI, Izuru)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：00569527

(2) 研究分担者

善本 隆之 (YOSHIMOTO, Takayuki)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：80202406