

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03780

研究課題名(和文) 関節リウマチ病態における転写因子Sox4の時間空間的作用の全貌解明

研究課題名(英文) Investigation of temporospatial dynamics of Sox4 in the pathogenesis of RA

研究代表者

吉富 啓之 (Yoshitomi, Hiroyuki)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：50402920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトTph細胞にて発現する転写因子Sox4とMaf間の制御とヒストン修飾酵素EZH2の機能を解析した。CXCL13産生を担うSox4はB細胞ヘルプを担うMafの発現を低下させた。関節リウマチ滑膜組織の多重免疫染色においても、Maf陽性T細胞とSox4陽性T細胞は異なった分布を示した。ヒストン修飾酵素EZH2の阻害によりTph細胞によるCXCL13の産生は増強した。CD4陽性T細胞のTGF β 、IL-1 β 存在化でのCD3/28刺激はEZH2の発現を増強した。EZH2阻害薬はSox4の発現に影響を与えないものの、CXCL13領域のH3LK27me3のピークを減弱させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Tph細胞はヒトRA研究から同定されたCD4陽性T細胞分画で、CXCL13を大量に産生するなどマウスT細胞には認められない性質を有している。さらにTph細胞は関節リウマチのみならず様々な自己免疫疾患や感染症、悪性疾患などとも関与することが明らかになっている。ヒト免疫細胞を対象とした本研究でTph細胞の免疫分子機構が明らかになることで、将来的に様々なヒト疾患における免疫機構の理解や新しい治療の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the regulation between transcription factors Sox4 and Maf expressed in human Tph cells and the function of histone modification enzyme EZH2. Sox4, responsible for CXCL13 production, downregulated the expression of Maf, responsible for B cell-help functions. In multiple immunostaining of rheumatoid arthritis synovial tissues, Maf-positive T cells and Sox4-positive T cells showed different distributions. Inhibition of the histone modifying enzyme EZH2 enhanced CXCL13 production by Tph cells. CD3/28 stimulation of CD4-positive T cells in the presence of TGF β and IL-1 β enhanced EZH2 expression. EZH2 inhibitors did not affect Sox4 expression but attenuated H3K27me3 peak of CXCL13 region.

研究分野：ヒト免疫学

キーワード：ヒト免疫学 Sox4 PD-1 関節リウマチ 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)関節リウマチ(RA)罹患関節に存在する CD4 陽性 T 細胞の研究から、末梢組織で機能するヒト新規 CD4 陽性 T 細胞分画、peripheral helper T (Tph) 細胞が同定された。Tph 細胞は PD-1^{hi}CXCR5⁺の表現型を示し、RA だけでなく様々な自己免疫疾患、感染症、悪性腫瘍においても重要な役割を果たすことが明らかになっている。Tph 細胞には B 細胞ヘルプ活性を担う転写因子 Maf と CXCL13 産生を担う SOX4 など様々な転写因子が関与することが明らかになってきた。一方で、それらの転写因子が CD4 陽性 T 細胞でどの様に関連することで細胞機能に関わっているのかは明らかでなかった。

(2) ヒストン修飾酵素 EZH2 は H3K27 のトリメチル化を生じることで遺伝子発現を抑制する遺伝子で、ヒト Tph 細胞にて上昇することが知られていた。一方で Tph 細胞における EZH2 の機能は明らかでなかった。

2. 研究の目的

- (1)本研究では、Tph 細胞に関わる転写因子間の制御を明らかにする。
- (2)ヒト CD4 陽性 T 細胞におけるヒストン修飾酵素 EZH2 によるエピゲノム制御を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)ヒト CD4 陽性 T 細胞に転写因子をレンチウイルスベクターにて発現させ RNA の発現を網羅的に解析することにより、転写因子間の発現制御を解析する。さらに発現細胞の分布を RA 滑膜組織の多重免疫染色にて解析する。

(2)Tph 細胞で上昇しているエピゲノム制御分子 EZH2 の作用を、EZH2 阻害薬ならびに CUT&RUN 法を用いて解析する。

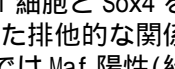
4. 研究成果

(1) 転写因子 Sox4 と Maf の制御機構解析

過剰発現による転写因子制御解析

ヒト CD4 陽性 T 細胞を CD3 ならびに CD28 にて刺激し翌日にコントロール、Sox4 または Maf 発現レンチウイルスベクターにて遺伝子導入を行った。遺伝子導入 4 日後に蛍光タンパク質 Venus を発現する細胞をソーティングし、RNA を抽出した(n=3)。RNA-seq にて網羅的に遺伝子発現を解析したところ、ヒト CD4 陽性 T 細胞に対する Sox4 遺伝子過剰発現は Maf の発現を低下させた。このことは、CXCL13 産生に関与する Sox4 遺伝子が高発現する時には B 細胞ヘルプ活性に関与する Maf 遺伝子発現が低く、Sox4 の発現が低下するにつれ Maf が上昇する事を示唆する。

RA 滑膜組織の多重免疫染色

RA 滑膜組織を Sox4 (赤)、Maf (緑)、CD3 (青)の三重染色にて染色したところ、Maf を高発現する T 細胞と Sox4 を高発現する細胞をみると、で示唆された排他的な関係が示唆された。リンパ濾胞構造の中心部では Maf 陽性 (緑矢印) の T 細胞が多い傾向にあるのに対し、リンパ濾胞の周辺部にかけては Sox4 陽性 (白矢印) の T 細胞が多い傾向にあった (図 1)。すなわち、リンパ濾胞周辺部では Sox4 による CXCL13 産生が優位なのに対して、リンパ濾胞中心部では CXCL13 産生から Maf による B 細胞ヘルプ活性に切り替わる可能性が示唆された。

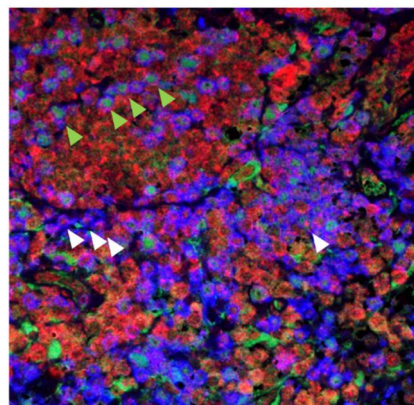


図 1 RA 滑膜多重蛍光免疫染色

RA 炎症関節 CD4 陽性 T 細胞の scRNA-seq 解析

CD4 陽性 T 細胞を RA 炎症関節よりソートした後 Chromium Next GEM 5' プラットフォームにて scRNA-seq を行った。教師なしクラスタリングを行ったところ、FoxP3・CD25 陽性の Treg 分画や PD-1・CXCL13 陽性の Tph 細胞分画が示された (図 2)。一方で、転写因子 Sox4 は scRNA-seq での検出が困難であった。扁桃 CD4 による BCL6 発現など、転写因子の RNA 発現の検出が scRNA-seq で難しい場合があることが知られており、Sox4 もそれに該当すると考えられた。scRNA-seq により同定された Tph 分画からは、Maf、TOX、TOX2 などの転写因子が検出された

(図2) での Sox4 の過剰発現は両者ともに TOX、TOX2 の発現を誘導したが、Maf の過剰発現は TOX、TOX2 の発現に大きな影響は与えなかった。このことから、Sox4 はこれらの転写因子の上流に存在する可能性が示唆された。

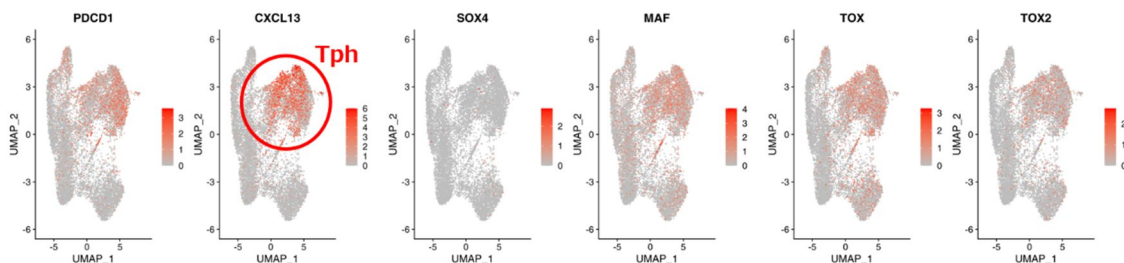


図2 RA罹患関節CD4陽性T細胞のscRNA-seq解析. PD-1ならびにCXCL13を発現するTph細胞を赤丸で示す。Tph細胞によるMaf, TOX, TOX2遺伝子を発現が認められる。

(2) ヒストン修飾酵素 EZH2 による Tph 細胞機能解析

健常人CD4陽性T細胞を様々なサイトカイン存在下でCD3/CD28刺激したところ、CD3/CD28刺激にてEZH2発現が認められTGFとIL-1存在下で増強した(図3)。この条件にEZH2阻害薬を加

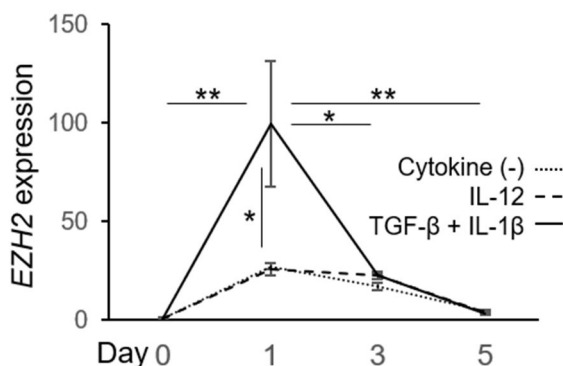


図3 健常人CD4陽性T細胞によるEZH2 mRNAの発現. 示された条件で刺激された健常人CD4陽性T細胞における遺伝子発現をqPCRで測定した。GAPDHにて標準化している。TGF- +IL-1存在下のCD3/CD28刺激24時間後にEZH2の発現が増強している。n=3, *;p<0.05, **:p<0.01

えたところCXCL13産生が増強したことから、EZH2はTph細胞においてCXCL13産生などの機能を低下させる可能性が示唆された。興味深いことにEZH2阻害薬は転写因子Sox4の発現には影響せずSox4非依存的にCXCL13産生を制御していると考えられた。EZH2によるH3K27のトリメチル化を検討するために、EZH2阻害薬の有無でH3K27me3ピークをCUT&RUN法にて検討したところ、CXCL13領域にH3K27me3のピークを認め、そのピークはEZH2阻害薬にて減弱した(図4)。このことから、EZH2は転写因子Sox4を介さずにCXCL13領域のエピゲノムを直接制御しTph細胞の機能を抑制する役割を持つと考えられた。

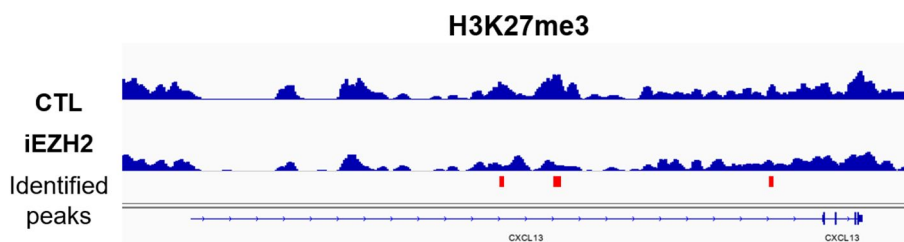


図4 CXCL13領域のH3K27me3ピーク. 赤はHomerプログラムにより検出された、EZH2阻害剤にて有意に低下するH3K27me3ピークを示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hiroyuki Yoshitomi, Hideki Ueno	4. 巻 18
2. 論文標題 Shared and distinct roles of T peripheral helper and T follicular helper cells in human diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular & molecular immunology	6. 最初と最後の頁 523-527
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41423-020-00529-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Hiroyuki Yoshitomi	4. 巻 43
2. 論文標題 CXCL13-producing PD-1hiCXCR5- helper T cells in chronic inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunological medicine	6. 最初と最後の頁 156-160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/25785826.2020.1781998	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshitomi H	4. 巻 10
2. 論文標題 Regulation of Immune Responses and Chronic Inflammation by Fibroblast-Like Synoviocytes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Immunol	6. 最初と最後の頁 1395
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2019.01395	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Okahata A, Ito H, Furu M, Ishikawa M, Fujii T, Hashimoto M, Tanaka M, Morita Y, Azukizawa M, Tomizawa T, Doi K, Nishitani K, Murata K, Yoshitomi H, Mimori T, Matsuda S.	4. 巻 -
2. 論文標題 Soluble Lectin-like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor 1 Predicts the Changes of Rheumatoid Factor Titers in Rheumatoid Arthritis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Rheumatol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/RHU.0000000000001116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉富啓之
2. 発表標題 ヒト自己免疫疾患におけるTph細胞
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉富啓之
2. 発表標題 Human Sox4 facilitates the development of CXCL13-producing helper T cells in inflammatory environments
3. 学会等名 令和元年日本リウマチ財団学術女性受賞者記念講演（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉富啓之、小林志緒、宮川（林野）文、岡畠章憲、土井浩平、西谷江平、村田浩一、伊藤 宣、鶴山竜昭、羽賀博典、松田秀一、戸口田淳也
2. 発表標題 Tph細胞の病態機構制御に関わる転写因子群
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉富啓之、小林志緒、宮川文、岡畠章憲、土井浩平、西谷江平、村田浩一、伊藤宣、鶴山 竜昭、羽賀博典、松田秀一、戸口田淳也
2. 発表標題 関節リウマチ炎症環境によるT細胞の病態機能制御
3. 学会等名 第5回日本骨免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉富啓之
2. 発表標題 異所性リンパ濾胞におけるヘルパーT細胞の病態機構
3. 学会等名 第6回T-cell seminar
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 吉富 啓之, 上野 英樹	4. 発行年 2020年
2. 出版社 リウマチ科	5. 総ページ数 7
3. 書名 【リウマチ性疾患の病態における適応免疫と治療への展望】関節リウマチ病態における適応免疫と治療への展望	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	戸口田 淳也 (Toguchida Junya) (40273502)	京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授 (14301)	
研究分担者	伊藤 宣 (Ito Hiromu) (70397537)	京都大学・医学研究科・特定教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------