

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06570

研究課題名(和文) IL-27サブユニットEBI3による炎症誘導時の新しい蛋白質発現の増強機構

研究課題名(英文) A novel mechanism whereby EBI3, one of IL-27 cytokine subunits, augments target protein expression under inflammatory conditions

研究代表者

善本 隆之 (Yoshimoto, Takayuki)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：80202406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、炎症時には、Epstein-Barr virus-induced gene-3 (EBI3) 発現が誘導され、カルネキシンと共にその標的分子の発現を増強するという新しい蛋白質発現の増強機構を提案し、この概念を広く一般化することを目指している。本研究では、EBI3が会合する分子として、MHCクラスIと選択的オートファジーのカーゴ蛋白質p62/SQSTM1を見出し、その役割について明らかにした。EBI3が、カルネキシンとMHCクラスIに会合し、MHCクラスI発現を増強し、抗原提示能力を増強する可能性と、EBI3がp62への会合を介し、オートファジーを増強し腫瘍増殖を促進する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖蛋白質は、リボソームで生合成されると分子シャペロンであるカルネキシンに結合し、小胞体で種々の修飾を受け高次構造が形成される。最近、我々は、EBI3が、カルネキシンとIL-23Raに結合し、IL-23Raの発現を増強し腸炎発症を促進していることを報告した。本研究では、さらに、EBI3がMHCクラスIやp62に結合し抗原提示能力や腫瘍増殖を促進する可能性を見出した。これまでは、蛋白質の高次構造形成は、主に定常状態での機構であり、感染などによる炎症誘導時にも同じか違うのかの議論が殆どされておらず、本研究は炎症誘導時のEBI3を介した新しい蛋白質発現の増強機構の概念を提案するものである。

研究成果の概要(英文)：We recently proposed a new concept that under the inflammatory conditions the expression of Epstein-Barr virus-induced gene-3 (EBI3) is induced and promotes the protein expression of target molecule with calnexin, and aim at widely generalizing the concept. In the present study, we have found that EBI3 binds to MHC class I and selective autophagy receptor p62/SQSTM1 and elucidated their roles. EBI3 by binding to MHC class I and calnexin up-regulates the expression of MHC class I and augments the antigen-presenting ability. EBI3 by binding to p62 and calnexin up-regulates the expression of p62 and augments the autophagy and resultant tumor growth.

研究分野：免疫学

キーワード：EBI3 カルネキシン 分子シャペロン 蛋白質発現

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

IL-12 サイトカインファミリーは、2つの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ている。このファミリーの1つ IL-27 は、Epstein-Barr virus-induced gene-3 (EBI3) と p28 から構成されるヘテロダイマーで、Th1 細胞の初期分化を促進し、Th1 分化後期や Th2/Th17 分化を抑制し、IL-10 産生する制御性 T 細胞を分化を促進する。我々は、以前に、この EBI3 の欠損マウス由来ナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞を免疫不全マウスに移入すると、腸炎の発症が軽減されることを見出した<sup>1</sup>。その作用機序は、CD4<sup>+</sup>T 細胞が活性化されると EBI3 の発現が誘導され、腸炎などの炎症性疾患の発症に重要な IL-23 受容体のサブユニットの1つ IL-23R $\alpha$  の蛋白質レベルでの発現を増強するためであった。EBI3 は、小胞体で生合成されたばかりの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と IL-23R $\alpha$  に結合し、IL-23R $\alpha$  の発現を増強していることを明らかにした。これまでに、このような生合成されたばかりの蛋白質が、カルネキシンに結合し、蛋白質の正しい高次構造が形成される過程は、定常状態での機構であり、感染などによる炎症誘導時にも同じか違うのかの議論が殆どされてこなかった。この結果は、定常状態では、カルネキシンが蛋白質の正しい高次構造の形成に重要であるが、炎症誘導時には、さらに、EBI3 の発現が誘導されカルネキシンと共にその標的分子の発現を増強するという炎症誘導時での蛋白質発現の増強機構の新しい概念を示唆している<sup>2</sup>。

### 2. 研究の目的

我々は、炎症時には、EBI3 発現が誘導されカルネキシンと共にその標的分子の発現を増強するという新しい蛋白質発現の増強機構を提案し、この概念を広く一般化することを目指している。本研究では、EBI3 が会合する分子として、MHC クラス I と選択的オートファジーのカーゴ蛋白質 p62/SQSTM1 について、その役割や意義について明らかにした。

### 3. 研究の方法

#### (1) EBI3 による MHC クラス I への会合を介した抗原提示能力の増強

まず、野生型マウスと EBI3 欠損 (Jackson Laboratory より購入) マウス、IL-27 受容体のサブユニットの1つ WSX-1 欠損マウス (佐賀大学吉田先生より分与) の骨髓細胞を、GM-CSF で7日間分化誘導し、抗 CD11<sup>+</sup>抗体と磁気ビーズを用いて AutoMACS Pro で CD11<sup>+</sup>未成熟 DC を精製した。次に、それぞれの未成熟 DC を、LPS+抗原として OVA<sub>257-264</sub> ペプチドで刺激し 24 時間後、MHC クラス I の上に乗った OVA<sub>257-264</sub> ペプチドの複合体の発現を、その複合体を特異的に認識する抗体 (clone# 25-D1-16) を用いて FACS で解析を行った。また、LPS+OVA 蛋白質で刺激し 24 時間後、さらに、OT-I マウス由来ナイーブ CD8<sup>+</sup>T 細胞を IL-2 存在下に加え、3 日後の <sup>3</sup>H-thymidine の細胞内への取り込みで細胞増殖を定量した。マウスメラノーマ腫瘍 B16F10 細胞に、EBI3 の発現ベクターおよびコントロールベクターを Fugene 6 を用いて遺伝子導入し安定発現細胞株を複数作製した。これらの細胞を IFN- $\gamma$  で刺激し、次の日に MHC クラス I 発現を FACS で解析した。B16F10 細胞およびヒト胎児腎細胞株 HEK293T 細胞へ EBI3 発現ベクターを量を変えて遺伝子導入し、48 時間後細胞溶解液を調製し、電気泳動後、MHC クラス I および EBI3、アクチンに対する抗体を用いてウェスタンブロットにより発現解析を行った。EBI3 とカルネキシンの発現ベクターを一過性に遺伝子導入した HEK293T 細胞をチェンバースライド (Nunc Lab-Tek) の上で培養し、パラホルムアルデヒドで固定後 Triton X-100 で透過処理し、異なる蛍光色素で標識した MHC クラス I と EBI3、カルネキシンに対する抗体で免疫染色し、蛍光顕微鏡で細胞内での発現解析を行った。通常のプレートで HEK293T 細胞に同様に遺伝子導入し、48 時間後細胞溶解液を調製し、EBI3 に対する抗体を用いて免疫沈降反応を行い、電気泳動後、カルネキシンと MHC クラス I に対する抗体でウェスタンブロットで会合を解析した。

#### (2) EBI3 による p62 への会合を介したオートファジーの増強と腫瘍増殖の促進

まず、HEK293F 細胞に EBI3 および p62、または p28 の発現ベクターを一過性に遺伝子導入し、細胞溶解液を EBI3 に対する抗体で免疫沈降反応後、p62 または p28 に対する抗体を用いたウェスタンブロットで解析した。野生型マウスおよび EBI3 欠損マウス由来ナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞を固層化した抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で刺激 3 日後の細胞溶解液を EBI3 に対する抗体で免疫沈降反応後、p62 に対する抗体を用いたウェスタンブロットで解析した。B16F10 細胞に EBI3 を遺伝子導入後チェンバースライド上で培養し、異なる蛍光色素で標識したオートファゴソームのマーカ蛋白質 LC3 および p62、EBI3 に対する抗体で免疫染色後、蛍光顕微鏡により局在かを解析した。次に、EBI3 およびコントロールベクターを遺伝子導入した細胞をオートファジーの誘導剤 Rapamycin で刺激し 24 時間後、細胞溶解液を調製し p62 および LC3 に対する抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。EBI3 およびコントロールベクターを遺伝子導入した細胞を、細胞数と培養時間を変えて培養し、増えた細胞数を比較した。

#### 4. 研究成果

##### (1) EBI3 による MHC class I への会合を介した抗原提示能力の増強

我々は、最近、EBI3 がカルネキシンと IL-23R $\alpha$  に会合し、IL-23R $\alpha$  の蛋白質レベルでの発現を増強し、腸炎誘導を重要であることを明らかにした<sup>1</sup>。カルネキシンは、小胞体で生成されたばかりの糖蛋白質の高次構造形成を促進する分子シャペロンで、以前に、MHC クラス I に会合し、その蛋白質レベルでの発現を安定化することが報告されている。そこで、EBI3 による MHC クラス I への会合を介した抗原提示能力の増強の可能性について検討した。まず、野生型と EBI3 欠損マウス、WSX-1 欠損マウスの骨髄由来 CD11<sup>+</sup>未成熟 DC での EBI3 発現をウエスタンブロットで解析すると、未刺激の時には殆ど EBI3 発現が見られないが、LPS で刺激すると強く誘導されることがわかり、その際、WSX-1 を欠失していても EBI3 の発現増強はほぼ同程度であった。次に、それぞれの未成熟 DC を LPS+OVA<sub>257-264</sub> ペプチドで刺激すると、野生型および WSX-1 欠損 DC では、MHC クラス I の上に乗った OVA<sub>257-264</sub> ペプチドとの複合体の発現が増強されたが、EBI3 欠損 DC では、殆どその複合体の発現の増強が見られなかった。また、LPS+OVA 蛋白質で刺激し、OT-I マウス由来ナイーブ CD8<sup>+</sup>T 細胞の増殖能を調べると、野生型 DC に比べ、EBI3 欠損 DC では、増殖誘導能が低下し、WSX-1 欠損 DC では反対に増加していた。後者は、DC 内の内在性の IL-27 が増殖誘導を抑制しているからと考えられる。以上より、DC では Toll 様受容体のリガンドで活性化されると EBI3 発現が誘導され、MHC クラス I の上に乗った OVA<sub>257-264</sub> ペプチドとの複合体の発現を増強し、その結果、抗原提示能が増強されることが示された。

次に、細胞株への遺伝子導入による再構成系を用いて、EBI3 による MHC クラス I 発現増強と両者の会合および共局在について検討した。B16F10 細胞および HEK293T 細胞は、内在性 EBI3 の発現が殆ど見られない。そこで、EBI3 およびコントロールベクターを遺伝子導入した細胞、さらに、それらを IFN- $\gamma$  で刺激した時の MHC クラス I 発現を比べると、IFN- $\gamma$  で刺激すると MHC クラス I 発現が増強されるが、無刺激および IFN- $\gamma$  で刺激後、EBI3 を発現している細胞の方が MHC クラス I 発現がより高かった。また、B16F10 細胞と HEK293T 細胞に EBI3 発現ベクターを一過性に遺伝子導入すると、ウエスタンブロット解析により、EBI3 の発現の増加と共に、内在性 MHC クラス I 発現が増加した。さらに、EBI3 とカルネキシンの発現ベクターを HEK293T 細胞に一過性に遺伝子導入し、異なる蛍光色素で標識した MHC クラス I と EBI3、カルネキシンに対する抗体で免疫染色を行うと、細胞質内で 3 者の局在化が見られた。また、細胞溶解液を EBI3 に対する抗体で免疫沈降反応後、カルネキシンおよび MHC クラス I に対する抗体でウエスタンブロット解析により、3 者が共沈してくることもわかった。以上より、EBI3 が MHC クラス I 発現を増強し、その作用機序として、IL-23R $\alpha$  の発現増強と同様に、カルネキシンを介して MHC クラス I 発現を促進し抗原提示能力を増強している可能性が示唆された。

##### (2) EBI3 による p62 への会合を介したオートファジーの増強と腫瘍増殖の促進

EBI3 の最初のクローニングの論文<sup>3</sup>では EBI3 に会合する分子について電気泳動後、バンドを切り出し部分的にアミノ酸配列を決定したが、その中の 1 つが、当時はまだ同定されていなかった p62 と部分配列が一致した。そこで、EBI3 の p62 への会合を介したオートファジーへの関与について検討した。まず、HEK293F 細胞を用いて EBI3 と p62 を強制発現した再構成系で、免疫沈降反応後のウエスタンブロット解析により、EBI3 と p28 の会合 (IL-27 を形成) と同様に両者の会合が見られた。野生型 CD4<sup>+</sup>T 細胞を活性化した細胞溶解液を用いても、両者の会合が見られたが、EBI3 欠損 CD4<sup>+</sup>T 細胞を活性化した細胞溶解液では、両者の会合が見られなかった。さらに、B16F10 細胞に EBI3 を遺伝子導入後、異なる蛍光色素で標識した EBI3 と p62、オートファゴソームのマーカー蛋白質 LC3 に対する抗体で免疫染色するとドット状の局在化が観察された。次に、EBI3 およびコントロールベクターを遺伝子導入した細胞をオートファジーの誘導剤 Rapamycin で刺激すると、コントロールベクターを遺伝子導入した細胞に比べ EBI3 を遺伝子導入した細胞では、無刺激の状態でも LC3-II の発現が高く、Rapamycin 刺激によりさらに高くなる傾向であった。最後に、EBI3 およびコントロールベクターを遺伝子導入した細胞を細胞数と培養時間を変えて培養し、細胞数を比較すると、コントロールベクターを遺伝子導入した細胞に比べ EBI3 を遺伝子導入した細胞では細胞数が多く、EBI3 の強制発現が B16F10 腫瘍増殖を促進していた。以上より、EBI3 が p62 への会合を介し、オートファジーを増強し腫瘍増殖を促進している可能性が示唆された。これら結果は、以前に他のグループより報告された、EBI3 を強制発現した細胞株で増殖が亢進するという結果と一致する<sup>4</sup>。

##### 【参考文献】

1. Mizoguchi I. et al. EBV-induced gene 3 augments IL-23R $\alpha$  protein expression through a chaperone calnexin. *J Clin Invest.* 2020 130(11):6124-6140.
2. Devergne O, et al. A novel interleukin-12 p40-related protein induced by latent Epstein-Barr virus infection in B lymphocytes. *J Virol.* 1996 70(2):1143-1153.
3. Watanabe A. et al. A chaperone-like role for EBI3 in collaboration with calnexin under inflammatory conditions. *Front Immunol.* 2021 12:757669.
4. Nishino R. et al. Identification of Epstein-Barr virus-induced gene 3 as a novel serum and tissue biomarker and a therapeutic target for lung cancer. *Clin Cancer Res* 2011 17(19):6272-86.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Ishihara S, Sato T, Fujikado N, Yoshimoto T, Fukuda S, Katagiri K.	4. 巻 5(1)
2. 論文標題 Rap1 prevents colitogenic Th17 cell expansion and facilitates Treg cell differentiation and distal TCR signaling.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Commun. Biol.	6. 最初と最後の頁 206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03129-x	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 Watanabe A, Mizoguchi I, Hasegawa H, Katahira Y, Inoue S, Sakamoto E, Furusaka Y, Sekine A, Miyakawa S, Murakami F, Xu M, Yoneto T, Yoshimoto T.	4. 巻 12
2. 論文標題 A chaperone-like role for EBI3 in collaboration with calnexin under inflammatory conditions.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 757669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.757669	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 Hasegawa H, Mizoguchi I, Orii N, Inoue S, Katahira Y, Yoneto T, Mingli X, Miyazaki T, Yoshimoto T	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 IL-23p19 and CD5 antigen-like form a possible heterodimeric cytokine and contribute to experimental autoimmune encephalomyelitis development.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 5266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-84624-9	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 Yamanaka G, Takamatsu T, Morichi S, Yamazaki T, Mizoguchi I, Ohno K, Watanabe Y, Ishida Y, Oana S, Suzuki S, Kashiwagi Y, Takata F, Sakuma H, Yoshimoto T, Kato M, Kawashima H	4. 巻 352
2. 論文標題 Interleukin-1 in peripheral monocytes is associated with seizure frequency in pediatric drug-resistant epilepsy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Neuroimmunol.	6. 最初と最後の頁 577475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jneuroim.2021.577475	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 Ito T, Sugiura K, Hamotosegawa A, Ouchi W, Yoshimoto T, Mizoguchi I, Inaba T, Hamada K, Eriguchi M, Koyama Y	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 Microbial antigen-presenting extracellular vesicles derived from genetically modified tumor cells promote antitumor activity of dendritic cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics.	6. 最初と最後の頁 57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics13010057	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 Yoneto T, Hasumi K, Takahashi N, Takeda, Y, Yoshimoto T.	4. 巻 1(2)
2. 論文標題 Case report of surgically treated primary breast lymphoma in a very elderly patient.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medicine: Case Reports and Study Protocols.	6. 最初と最後の頁 e0038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD9.0000000000000038	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 Mizoguchi I, Ohashi M, Hasegawa H, Chiba Y, Orii N, Inoue S, Kawana C, Xu M, Sudo K, Fujita K, Kuroda M, Hashimoto S, Matsushima K, and Yoshimoto T.	4. 巻 130(11)
2. 論文標題 EBV-induced gene 3 augments IL-23R protein expression through a chaperone calnexin.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Invest.	6. 最初と最後の頁 6124-6140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI122732	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 Shindo R, Ohmuraya M, Komazawa-Sakon S, Miyake S, Deguchi Y, Yamazaki S, Nishina T, Yoshimoto T, Kakuta S, Koike M, Uchiyama Y, Konishi H, Kiyama H, Mikami T, Moriwaki K, Araki K, Nakano H.	4. 巻 15
2. 論文標題 Necroptosis of intestinal epithelial cells induces type 3 innate lymphoid cell-dependent lethal ileitis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 536-551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.05.011.	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 Koda Y, Nakamoto N, Chu P, Ugamura A, Teratani T, Shiba S, Taniki N, Sujino T, Miyamoto K, Mikami Y, Suzuki T, Yamaguchi A, Morikawa R, Sato K, Yoshimoto T, Kanai K.	4. 巻 129(8)
2. 論文標題 Plasmacytoid dendritic cells protect against immune-mediated acute liver injury via IL-35.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Invest	6. 最初と最後の頁 3201-3213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI125863.	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 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 2件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 溝口 出、井上楨也、長谷川英哲、片平泰弘、善本隆之
2. 発表標題 IL-27/IL-35共通サブユニットEBI3によるシャペロン分子カルネキシンを介したIL-23Raの新しい蛋白質発現安定化機構
3. 学会等名 第85回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小山義之、伊藤智子、江里口正純、善本隆之、溝口 出、杉浦喜久弥、長谷川 綾、大内若菜、稲葉俊夫
2. 発表標題 ESAT-6抗原提示エクソソームによる免疫活性化
3. 学会等名 第7回日本細胞外小胞学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂本恵梨、片平泰弘、井上楨也、古阪悠馬、渡邊有麻、長谷川英哲、米戸敏彦、徐 明利、溝口 出、善本隆之
2. 発表標題 化粧品美白成分による白斑症誘発の作用機序の解明とそのin vitro評価法の開発
3. 学会等名 第33回日本動物実験代替法学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 善本隆之
2. 発表標題 免疫系on-chipへの期待
3. 学会等名 シンポジウム 細胞アッセイ技術の現状と将来 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 善本隆之
2. 発表標題 炎症誘導時の新しい蛋白質発現増強機構
3. 学会等名 平成26年度選定戦略的研究基盤形成支援事業進捗状況報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上禎也、溝口 出、長谷川英哲、折井直子、川名千晶、米戸敏彦、徐 明利、善本隆之
2. 発表標題 IL-12ファミリーサイトカインの共通サブユニットEBI3による樹状細胞の成熟化におけるMHCクラスI発現の増強
3. 学会等名 第84回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mizoguchi I, Hasegawa H, Orii N, Inoue S, Kawana C, Yoneto T, Xu M, Yoshimoto T.
2. 発表標題 EBI3, one of subunits shared among the IL-12 cytokine family, plays a critical role in up-regulation of MHC class I during DC maturation.
3. 学会等名 17th International Congress of Immunology (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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	溝口 出  (Mizoguchi Izuru)  (00569527)	東京医科大学・医学部・講師    (32645)	

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
---------	---------