

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：11501  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22590432  
 研究課題名（和文）IL-21 による Ape1/Ref-1 を介した新たな TH17 細胞誘導制御機構の解析

研究課題名（英文）TH17 cell induction through IL-21-Ape1/Ref-1 pathway.

### 研究代表者

浅尾 裕信 (ASAO HIRONOBU)  
 山形大学・医学部・教授  
 研究者番号：80250744

研究成果の概要（和文）：私達は IL-21 が多機能蛋白 Ape1/Ref-1 の発現を誘導することを見いだした。また Ape1/Ref-1 はそのレドックス制御活性により、ERK1/2 を介する IL-21 情報伝達経路に必須な役割を担っていた。Ape1/Ref-1 のヘルパーT細胞の分化・活性化におよぼす影響を検討するため、Ape1/Ref-1 のレドックス制御活性を抑制したところ、in vitro で活性化した CD4 陽性 T 細胞からの IFN- $\gamma$  産生が上昇し、TH1/TH17 バランスへの影響が認められた。次に IL-21 アイソフォームを T リンパ球特異的に発現するマウスを樹立したところ、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) により誘導される大腸炎は悪化し、TH17 細胞が強く誘導された。現在このマウスに対して Ape1/Ref-1 阻害薬を投与し、in vivo での Ape1/Ref-1 の機能を解析している。

研究成果の概要（英文）：We found that IL-21 induced Ape1/Ref-1 protein and that the redox regulatory activity of Ape1/Ref-1 was essential for IL-21-induced ERK1/2 activation. To investigate the functional role of Ape1/Ref-1 in T cell differentiation and activation, we treated CD4<sup>+</sup> T cell with Ape1/Ref-1 redox inhibitor. The inhibitor upregulated IFN- $\gamma$  production from CD4<sup>+</sup> T cell, therefore Ape1/Ref-1 might control TH1/TH17 balance. We are now researching that the inhibitor can modulate DSS-induced colitis in IL-21 isoform transgenic mice, which show more severe phenotype of colitis with TH17 cell accumulation than the wild type mice.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：免疫学

キーワード：サイトカイン

#### 1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎やクローン病に代表される炎症性腸疾患 (IBD) は近年増加傾向にあり、

その病態の把握、より良い治療法の開発は大変重要な課題である。IBD 増加の背景として、腸内細菌の変化や食物の欧米化などが挙げ

られ、タイプ1ヘルパーT細胞 (TH1) 細胞の異常な活性化が原因と考えられてきた。しかし炎症性T細胞であるタイプ1ヘルパーT細胞TH17の機能異常も病態形成に重要であることが明らかになってきた。

TH17細胞はCD4陽性ナイーブT細胞からTGF- $\beta$ やIL-6、IL-21存在下に分化し、IL-23により維持される。私達はこれらサイトカインの中でIL-21がTH17細胞自身からも産生され、TH17細胞に作用することを報告している (Int Immunol 2007,19:1191)。TH17細胞を抑制し過剰な炎症を抑制するために、IL-21の情報伝達系の抑制が効果的と考えられる。事実、中和抗体によるIL-21のin vivoでの抑制は、関節リウマチなどTH17細胞が関わる炎症性疾患モデルマウスの症状を改善することが報告されている (Arthritis Rheum 2007,56:1152)。

私達はIL-21の情報伝達系の解明のため、IL-21情報伝達に関わる新たな分子の検索を行い、その中でApurinic/aprimidinic endonuclease1/redox factor-1 (Ape1/Ref-1)を同定した。そこでApe1/Ref-1の機能を制御することによりIL-21情報伝達系やTH17分化誘導系をコントロールすることが出来るのではないかと考えている。

## 2. 研究の目的

(1) IL-21トランスジェニックマウス (Tg)を用いた炎症性腸疾患モデルの確立。In vivoでのIL-21の炎症性腸疾患への関与を検討するため、IL-21Tgの作製を試みた。野生型IL-21を発現するTgを作製することは出来なかったが、私達が以前発見したIL-21アイソフォームを発現するIL-21isoTgを作製した。このマウスにおいて炎症性腸疾患が野生型と比較し悪化するならば、Ape1/Ref-1の機能を解析するモデルマウスとして使用することが可能なのではないかと考えられる。

(2) IL-21情報伝達系におけるApe1/Ref-1の機能解析。Ape1/Ref-1は活性酸素 (ROS)などで傷付いたDNAを塩基除去修復機構 (BER)により修復する機能の他、レドックス制御機能を併せ持つ多機能分子である。さらにレドックス依存性にAP-1やNF- $\kappa$ B、HIF-1 $\alpha$ 、p53などの転写因子を活性化するが (Antioxid Redox Signal 2009,11:621)、この機能の一部はチオレドキシンやグルタチオンと共に発揮される (Nucleic Acids Res 2008,36:4327)。私達はIL-21依存性B細胞株を用いた研究から、IL-21がApe1/Ref-1のmRNAおよび蛋白の発現を亢進させることを見いだしている。Ape1/Ref-1は多機能蛋白であり、IL-21情報伝達系に対してどのよう

な役割を持つのかを解析する。

(3) T細胞分化・活性化におけるApe1/Ref-1の機能解析。Ape1/Ref-1のT細胞分化・活性化における機能は全く不明である。Ape1/Ref-1のレドックス制御能阻害薬 (Ape1/Ref-1インヒビター)を用いてT細胞の分化・活性化におけるApe1/Ref-1の役割を解析する。特にTH1/TH17系の分化誘導あるいは阻害に注目し、その結果をもとにTH17細胞が引き起こす炎症性疾患の予防や治療法の開発に結びつけたい。

## 3. 研究の方法

(1) IL-21トランスジェニックマウス (Tg)を用いた炎症性腸疾患モデルの確立。野生型マウスあるいは私達が作製したIL-21isoTgに3~5%のDSSを自由飲水させる。1~2週で大腸炎が発症してくるので、その間の体重や便の性状を観察する。また、大腸炎を発症したマウスの腸管や腸間膜リンパ節、脾臓などのリンパ球の性状、サイトカイン産生を調べ、ヘルパーT細胞分化の様子を解析する。

(2) IL-21情報伝達系におけるApe1/Ref-1の機能解析。IL-21依存性増殖をする細胞株BAF21RWT-1を用いて、Ape1/Ref-1を強制発現させる、あるいはshRNAを利用してノックダウンすることによりIL-21情報伝達のどの部分にApe1/Ref-1が関与するのかを解明する。解析には細胞増殖アッセイやイムノプロット法を用いる。またApe1/Ref-1インヒビターを用いて情報伝達能への影響を調べる。

(3) T細胞分化・活性化におけるApe1/Ref-1の機能解析。マウスCD4陽性T細胞を抗CD3抗体と抗CD28抗体、あるいはレクチンにより刺激して活性化する。この時Ape1/Ref-1インヒビターを加え、産生されるサイトカインを測定する。特にIFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17やIL-22などについて細胞内染色法を用いて染色し、フローサイトメトリーにより解析する。また、ヘルパーT細胞分化特異的に活性化される遺伝子として、T-bet、GATA3、ROR $\gamma$ t、Bcl6、Foxp3などをRT-PCR法により測定し、ヘルパーT細胞分化・活性化へのApe1/Ref-1の機能を解析する。また、炎症性腸疾患モデルマウスへApe1/Ref-1インヒビターを投与し、その影響を観察する。

## 4. 研究成果

(1) IL-21トランスジェニックマウス (Tg)を用いた炎症性腸疾患モデルの確立。

① IL-21isoTgを樹立した。IL-21isoTgは正常に生まれるが、生後6週以降体重増加がや

や不良となった。一方末梢での T リンパ球および B リンパ球数の増加が認められた。

② DSS により大腸炎を誘導したところ、Tg では野生型に比べ明らかな体重減少 (図 1) および生存率の減少が認められた。

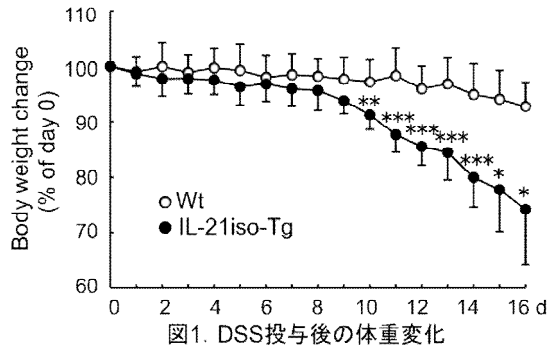


図1. DSS投与後の体重変化

大腸炎を誘導した大腸組織を比較すると Tg で明らかに炎症が強く起こっていることが分かった (図 2)。また大腸組織でのサイトカイン mRNA を測定したところ、Tg では野生型に比較し、明らかな IL-17A、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-4、IL-10 の上昇が認められたが、IFN- $\gamma$  については差がなかった。以上の結果から、IL-21isoTg は TH17 を主体とする大腸炎モデルとして有用であることが分かった (Araki A et al. Cytokine 62, 262-271, 2013)。

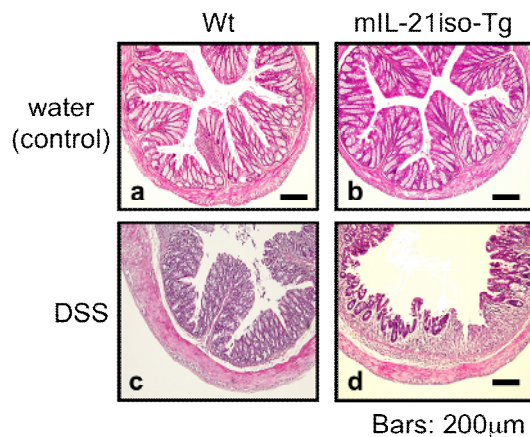


図2. DSS投与後の大腸組織

(2) IL-21 情報伝達系における Ape1/Ref-1 の機能解析。

① IL-21 依存性細胞株 BAF21RWT-1 に Ape1/Ref-1 を強制発現させたところ、IL-21 依存性細胞増殖能が亢進した。次に shRNA を用いて Ape1/Ref-1 をノックダウンした細胞を作製したところ、細胞の増殖能は大きく低下した。また、細胞内情報伝達をイムノブロット解析した結果、Ape1/Ref-1 ノックダウン細胞 (B21RApeKD-12) では ERK1/2 の活性が大きく低下していた (図 3)。一方 IL-21

の主要な情報伝達分子である STAT3 については全く影響を受けていなかった (Juliana FM et al. Biochem Biophys Res Commun, 420, 628-634, 2012)。

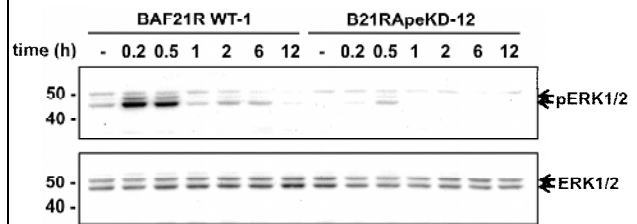


図3. Ape1/Ref-1ノックダウン細胞でのIL-21によるERK1/2活性化

② IL-21 依存性 B 細胞株に Ape1/Ref-1 インヒビターを加えたところ、細胞増殖および ERK1/2 の活性化が著しく低下することが分かった。以上の結果から、Ape1/Ref-1 はレドックス制御能により IL-21 情報伝達系において、ERK1/2 の活性を亢進させることが明らかになった。

(3) T 細胞分化・活性化における Ape1/Ref-1 の機能解析。

マウス脾臓細胞を Ape1/Ref-1 インヒビター存在下にレクチン刺激し、サイトカイン分泌を検討した。その結果、CD4 陽性 T 細胞からの IFN- $\gamma$  産生が亢進することが分かった。この結果は CD4 陽性 T 細胞のみを分取し刺激した場合にも見られたことから、CD4 陽性 T 細胞での Ape1/Ref-1 阻害の結果と考えられる。この系において、現在 IL-17A 産生への影響、IL-21 の関与等を解析中である。Ape1/Ref-1 が IFN- $\gamma$  産生を負に制御し、TH1 分化を抑制すると同時に TH17 分化を促進する可能性があり大変興味深い (未発表データ)。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

① Araki A, Nara H, Rahman M, Onoda T, Li J, Juliana FM, Jin L, Murata K, Takeda Y and Asao H; Role of Interleukin-21 isoform in dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis. Cytokine 査読有, 62, 262-271, 2013.

DOI: 10.1016/j.cyto.2013.03.006.

② Nara H, Rahman M, Araki A, Jin L, Takeda Y and Asao H; IL-21 isoform is a membrane-bound ligand and activates directly interacted cells. Cytokine 査読有, 61, 656-663, 2013.

DOI: 10.1016/j.cyto.2012.12.010.

③ Juliana FM, Nara H, Onoda T, Rahman M, Araki A, Jin L, Fujii H, Tanaka N, Hoshino T and Asao H; Apurinic/aprimidinic endonuclease1/redox factor-1 (Ape1/Ref-1) is essential for IL-21-induced signal transduction through ERK1/2 pathway. Biochem. Biophys. Res. Commun. 査読有, 420, 628-634, 2012. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.03.051.

④ Nara H, Onoda T, Rahman M, Araki A, Juliana FM, Tanaka N and Asao H; WSB-1, a novel IL-21 receptor binding molecule, enhances the maturation of IL-21 receptor. Cell Immunol. 査読有, 269, 54-59, 2011. DOI: 10.1016/j.cellimm.2011.03.010.

⑤ Nara H, Onoda T, Rahman M, Araki A, Juliana FM, Tanaka N and Asao H; Regulation of interleukin-21 receptor expression and its signal transduction by WSB-2. Biochem. Biophys. Res. Commun. 査読有, 392, 171-177, 2010. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.01.004.

[学会発表] (計 13 件)

① Hidetoshi Nara: The unique action mechanism of IL-21 isoform. 第 41 回日本免疫学会, 2012 年 12 月 6 日, 神戸国際会議場

② Lianjin Jin: SHP-2 phosphatase up-regulates IL-21-induced ERK activity. 2012 年 12 月 6 日, 神戸国際会議場

③ Akemi Araki: Role of IL-21 isoform in dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis. 第 40 回日本免疫学会, 2011 年 11 月 29 日, 千葉幕張メッセ

④ Hironobu Asao: Apurinic/aprimidinic endonuclease1/redox factor-1 (Ape1/Ref-1) is essential for IL-21-induced signal transduction through ERK1/2 pathway. 第 40 回日本免疫学会, 2011 年 11 月 29 日, 千葉幕張メッセ

⑤ Hidetoshi Nara: IL-21 isoform activates STAT3 without secretion. 第 34 回日本分子生物学会, 2011 年 12 月 15 日, パシフィコ横浜

⑥ Lianjin Jin: SHP-2 phosphatase up-regulates IL-21-induced ERK activity. 第 34 回日本分子生物学会, 2011 年 12 月 15 日, パシフィコ横浜

⑦ Hidetoshi Nara: WSB family differentially regulate Interleukin-21 receptor expression and its signal transduction. 14th International Congress of Immunology, August 24<sup>th</sup>, 2010 Kobe International Exhibition Hall, Japan

⑧ Farha M. Juliana: Functional analysis of Apurinic endonuclease 1/Redox effector factor-1 (Ape1/Ref-1) in response to interleukin 21 (IL-21) signaling. 14th International Congress of Immunology, August 24<sup>th</sup>, 2010 Kobe International Exhibition Hall, Japan

[図書] (計 1 件)

① 浅尾裕信, IL-21 レセプターからのシグナル伝達分子, 科学評論社, 59, 288-294, 2013.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浅尾 裕信 (ASAO HIRONOBU)  
山形大学・医学部・教授  
研究者番号: 80250744

### (2) 研究分担者

奈良 英利 (NARA HIDETOSHI)  
山形大学・医学部・助教  
研究者番号: 00375338

### (3) 連携研究者

浅尾 直樹 (ASAO NAOKI)  
東北大学・理学系研究科・教授  
研究者番号: 60241519