

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860328

研究課題名(和文) 感染時および自己免疫疾患におけるArid5aの生理学的機能の詳細な解明

研究課題名(英文) The pathogenic role of Arid5a in infection and autoimmunity.

研究代表者

増田 和哉 (MASUDA, Kazuya)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・寄附研究部門助教

研究者番号：70722544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫疾患とくに関節リウマチでは炎症性サイトカインの1つであるIL-6の上昇が認められる。我々は、IL-6のmRNAを安定化する分子Arid5aを発見し、生体内のIL-6上昇に寄与することを示した。本課題では、T細胞におけるArid5aがIL-6刺激依存的にStat3のmRNAの安定化を通して自己免疫疾患に関わるTh17細胞を促進誘導することを示した。このようにArid5aは、IL-6産生の増幅のみだけでなくTh17細胞分化を誘導することで、多くの自己免疫疾患に関与していることが予測される。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that high expression of IL-6 is associated with the patients with rheumatoid arthritis. Recently, we found that AT-rich interactive domain containing 5a (Arid5a) stabilize IL-6 mRNA through binding to IL-6 3'UTR, which in turn elevates IL-6 level in vivo. In this study, we demonstrated that IL-6-induced Arid5a in T cells stabilized Stat3 mRNA by inhibiting the function of an RNase Regnase-1, and thereby promoted the differentiation of Th17 cells. Thus, Arid5a contributes to elevation of IL-6 level in vivo, but also drives Th17 differentiation.

研究分野：免疫学(サイトカイン)

キーワード：自己免疫疾患 T細胞過剰活性化 RNA安定性制御 RNA結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

近年我々は、自己免疫疾患や感染時において体内に増加するサイトカイン IL-6 mRNA を安定化する分子 AT-rich interactive domain containing 5a (Arid5a)を発見した。マクロファージをリポ多糖により刺激すると Arid5a が誘導され、IL-6 mRNA の分解を抑制することで、IL-6 産生増加に寄与することが分かった。

2. 研究の目的

自己免疫疾患あるいは感染時、Arid5a 分子の免疫担当細胞における役割を詳細に解明する。特に、マクロファージにおける Arid5a の役割を初めて明らかにしたが、その他の免疫担当細胞たとえば T 細胞における同分子の役割は明らかになっていない。T 細胞における Arid5a の発現、その機能について解析を行う。また、ウイルス感染に伴う免疫細胞活性化機構に Arid5a が関与しているかどうか調べる。

3. 研究の方法

3-1. 脾臓 T 細胞の採取

3-1-1

WT および Arid5a KO マウス脾臓を摘出し、40 μ セルストレイナーにより組織を破碎、精製する。

3-1-2

遠心後、赤血球を溶解し、リンパ球を精製する。

3-1-3

FACS バッファーに再懸濁させた後、FACS 抗体により表面分子 CD4, CD25, CD62L, CD44 を標識する。

3-1-4

FACS により CD4+CD62L+CD44-CD25-細胞を選択し、採取する。

3-2. Th17 細胞への分化あるいは分化過程における Arid5a 発現解析

3-2-1

3-1 により回収した未分化 T 細胞を培養用のディッシュに一定細胞数培養する。培養用のディッシュには、抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体を予めコートしておく。

3-2-2

細胞をサイトカイン IL-6 および TGF- β より共刺激し、2, 6, 12, 24, 48, 72 h 後細胞を回収する。

3-2-3

3-2-2 により回収された細胞から全 mRNA を摘出し、逆転写により cDNA を回収する。qPCR 用の Arid5a, Stat3, Rorc, Il17a のプライマーを準備し、mRNA 量を real-time PCR により比較する。

3-2-4

3-1 により回収した未分化 T 細胞を抗 CD3 および抗 CD28 抗体をコートしたプレートで IL-6 および TGF- β 刺激し(Th17 細胞分化条件)、12 h 後細胞を回収して、Arid5a タンパク量をウェスタンブロットにより確認する。

3-3 mRNA の安定化実験

未分化な T 細胞を Th17 細胞分化条件で培養し、12 h 後に Actinomycin D (ActD)を添加し、さらに 30 分あるいは 1 時間培養する。その後全 mRNA を回収し、Real-time PCR により mRNA 量を比較する。ActD 添加後の mRNA 量減少量の比較によりその半減期を測定する。

3-4 mRNA の 3'UTR における Arid5a の活性評価

3-4-1

標的遺伝子の 3'UTR 活性を評価するため、Luciferase 遺伝子下流に標的遺伝子 3'UTR をクローニングしたベクターを作製する。Arid5a 遺伝子発現ベクターと共に HEK293T 細胞へ遺伝子導入し、24 h ないし 48 h 後のルシフェラーゼ活性をコントロールと比較する。

3-6 Arid5a 欠損 T 細胞における STAT3 活性評価

3-1 により回収した未分化 T 細胞を Th17 分化条件にて培養し、15, 30, 60 分後細胞を回収する。細胞を溶解し、ウェスタンブロット用のサンプルを調整する。

3-7 Arid5a 欠損 T 細胞および WT T 細胞における Th17 分化能の比較

3-1 により回収した未分化 T 細胞を Th17 分化条件にて培養し、2 日後ないし 3 日後の IL-17 mRNA およびタンパク量を測定する。また培養後 5 日後 FACS により IL-17 産生集団を比較する。

3-8 Arid5a 欠損エフェクター T 細胞の Rag2KO マウスへの細胞移入実験

MOG ペプチドおよび完全フロイトアジュバント(CFA)のエマルジョン溶液を WT マウスおよび Arid5a 欠損マウスに皮下注射し、免疫する。11 日後に、リンパ節よりエフェクター CD4 陽性 T 細胞を回収し、細胞を増幅させた後 Rag2KO マウスへ移入させる。その後の EAE スコアを計測する。

3-9 PR8 株を WT および Arid5a 欠損マウスに感染後の生存率比較および肺の病理比較

PR8 株を鼻腔感染させ、その後の生存率を比較する。肺の状態を比較するために、感染後の肺を摘出し、ホルマリン固定の後、HE 染色し、病理を比較する。

4. 研究成果

4-1 T細胞における Arid5a mRNA の発現

未分化T細胞より各種T細胞サブセットにより分化後の Arid5a mRNA 発現比較を行った結果、Th17 細胞分化条件下においてのみ顕著に Arid5a mRNA の発現上昇がみられた (Fig. 1)。

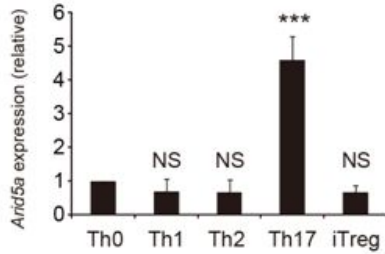


Fig. 1 T細胞における Arid5a mRNA 発現

4-2 Th17 細胞分化過程における Arid5a mRNA 発現の推移

未分化 T 細胞より Th17 細胞に分化後の Arid5a、Rorct、および Il17a mRNA 発現解析を qPCR により行った (Fig. 2)。Arid5a mRNA 発現は、Th17 細胞分化後急速に上昇し、速やかに減少する傾向が得られた (Fig. 2)。

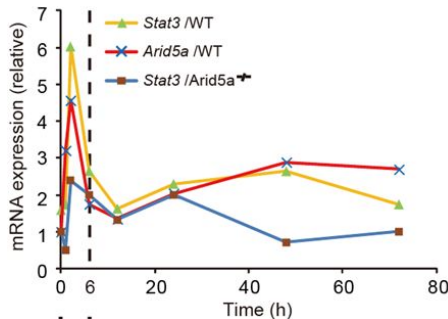


Fig.2 Th17細胞分化過程における Stat3 および Arid5a mRNA

4-3 Th17 細胞分化条件における Stat3 mRNA 安定化実験

未分化 T 細胞より Th17 細胞に分化 12h 後に ActD を加え、一定時間後の mRNA 量を比較した結果、Stat3 mRNA の半減期が Arid5a 欠損 T 細胞において著しく減少した (Fig. 3)。また、Stat ファミリーである、Stat1 および Stat5a mRNA の半減期には影響を及ぼさなかった。

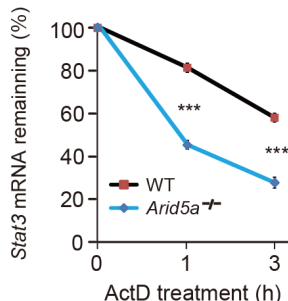


Fig.3 WT および Arid5a 欠損 Th17 細胞分化過程における Stat3 mRNA の半減期

4-4 Stat3 3'UTR に対する Arid5a の活性評価

HEK293T 細胞に Arid5a 発現ベクターおよび STAT3 3'UTR 領域をコードしたベクターを導入し、その活性を調べたところ Arid5a は、STAT3 3'UTR 領域の活性を上昇させた。さらに、STAT3 3'UTR 領域における Arid5a 応答領域を詳細に調べたところ、ステムループ領域を含む特定のサイトを同定することに成功した。その特定の領域において mRNA を分解するタンパク質である Regnase-1 の活性を調べたところ、著しくその領域の活性を抑制した。さらには、Arid5a はその領域において Regnase-1 と競合することも判明した。

4-5 Arid5a 欠損 Th17 細胞における STAT3 量

4-2 により Arid5a 欠損 Th17 細胞において Stat3 mRNA 量の減少が見られたが、STAT3 タンパク量も Th17 分化条件のもとで減少することが確認できた。STAT3 量の減少に伴いリン酸化 STAT3 量も減少した。一方、STAT1 や STAT5 のタンパク量に変化は見られなかったが、STAT1 および STAT5 のリン酸化が WT に比べ増幅されていた。

4-6 WT および Arid5a 欠損 T 細胞の Th17 細胞分化能

未分化 T 細胞から Th17 細胞分化条件のもとで活性化 T 細胞において、Arid5a 欠損 T 細胞では Il17a mRNA 量および IL-17 産生量が有意に減少した。また、Arid5a を欠損した IL-17 産生 T 細胞集団が顕著に減少した。さらに、Arid5a を欠損した T 細胞では、IL-10 をより多く産生することがわかった。このように Th17 細胞分化条件のもとで Arid5a が欠損すると、炎症作用を持つ Th17 細胞集団が抗炎症性の T 細胞に変化した。

4-7 WT および Arid5a 欠損 CD4 エフェクター T 細胞の病原性

EAE 誘導後の鼠径リンパ節および脾臓より WT および Arid5a 欠損 CD4 エフェクター T 細胞を選択し、増幅後 RAG2 欠損マウスに移入したところ Arid5a を欠損した T 細胞では EAE の誘導が抑制された。

4-8 インフルエンザ株誘導後の WT および Arid5a 欠損マウスのフェノタイプ

PR8 株を WT および Arid5a 欠損マウスに鼻腔感染後の生存率を比較したところ、Arid5a 欠損マウスの致死率が減少した。肺の病理を比較したところ、浮腫および炎症細胞の浸潤が抑制されていた。BAL 液中のサイトカイン IL-6 量も抑制されていた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kazuya Masuda, Barry Ripley, Kishan Kumar Nyati, Praveen Kumar Dubey, Mohammad Mahabub-Uz Zaman, Hamza Hanieh, Mitsuru Higa, Kazuo Yamashita, Daron M. Standley, Tsukasa Mashima, Masato Katahira, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Osamu Takeuchi, and Tadimitsu Kishimoto, Arid5a regulates naive CD4⁺ T cell fate through selective stabilization of Stat3 mRNA, *The Journal of Experimental Medicine*, 213: 605-619, 2016

〔学会発表〕(計 1 件)

Kazuya Masuda, Barry Ripley, Kishan Kumar Nyati, Praveen Kumar Dubey, Mohammad Mahabub-Uz Zaman, and Tadimitsu Kishimoto, T-cell intrinsic role of Arid5a as a stability protein of Stat3 mRNA in an IL-6-dependent manner, *The 44th annual meeting of the Japanese society of immunology*, Sapporo, 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 2 件)

名称:新規な敗血症治療剤及び/又はそのスクリーニング方法

発明者:岸本忠三、増田和哉、中外製薬

権利者:同上

種類:特許

番号:2015-083939

出願年月日:2015年04月16日

国内外の別:国外

名称:新規な肺疾患治療剤及び/又はそのスクリーニング方法

発明者:岸本忠三、増田和哉、中外製薬

権利者:同上

種類:特許

番号:2015-132230

出願年月日:2015年06月30日

国内外の別:国外

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

増田和哉 (MASUDA, Kazuya)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教

研究者番号:70722544

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

研究者番号:

(4)研究協力者

岸本忠三 (KISHIMOTO, Tadimitsu)

大阪大学

免疫学フロンティア研究センター

特任教授

研究者番号:10093402

竹内理 (TAKEUCHI, Osamu)

京都大学

ウイルス研究所

教授

研究者番号:10379092