

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：15K08433

研究課題名(和文) 新しいIL-6/IL-12ファミリーサイトカインの同定とその機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of a novel IL-6/IL-12 family cytokine

研究代表者

徐 明利 (Xu, Mingli)

東京医科大学・医学部・客員講師

研究者番号：80597964

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、まず、IL-27とIL-35の共通サブユニットEpstein-Barr virus-induced gene 3 (EBI3)が、IL-23のサブユニットの1つp19と結合することを見出し、両者をリンカーを挟んで一本鎖に繋いだ融合分子の発現ベクターを作製しマウスに投与すると、IL-17やGM-CSF等の産生が増強され、自己免疫性肝炎モデルマウスで肝炎発症が軽減することを明らかにした。また、マウス移植腫瘍モデルとしてメラノーマB16F10にこの発現ベクターを遺伝子導入すると腫瘍増殖が軽減された。以上の結果より、EBI3/p19が新しく機能的な会合分子であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we elucidated that Epstein-Barr virus-induced gene 3 (EBI3), a common subunit of IL-27 and IL-35, and p19, one of IL-23 subunits can form a functional heterodimeric cytokine. EBI3 was first revealed to associate with p19, and subsequently hydrodynamic injection of the expression vector of a single chain of EBI3/p19 into mice was shown to augment an antigen-specific production of cytokines such as IL-17 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the draining lymph node cells. Then, transgenic mice over expressing the single chain of EBI3/p19 were established and exhibited resistance to the development of autoimmune hepatitis induced by injection with concanavalin A. Moreover, using a transplantable mouse tumor model of melanoma B16F10, EBI3/p19 was demonstrated to show potent antitumor activity. Currently, more detailed analysis on the molecular mechanism and its physiological role is under investigation.

研究分野：Immunology

キーワード：EBI3 p19 heterodimeric cytokine

## 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、主に抗原提示細胞から産生され、ヘルパーT (Th) 細胞の分化やエフェクター機能の制御など重要な役割を担っている。このファミリーのサイトカインは、構造的に2つの異なるサブユニットからなるユニークなヘテロダイマーである。それ故、既知の分子でも組み合わせを変えることにより新規サイトカインになる可能性が示唆されている (Hasegawa et al. *Front Immunol.* 2016)。当時、我々は、IL-27 と IL-35 の共通なサブユニット EBI3 が IL-23 のサブユニットの1つである p19 と会合することを見出した。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々が見出した上述の EBI3 と p19 の会合分子が、機能的なサイトカインであるかを検討し、その機能と作用機序、生理的意義などを明らかにすることが目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) 発現ベクターの構築

FLAG タグを付けた EBI3 と p19 をリンカー (G4S)<sub>3</sub> を挟んで一本鎖に繋いだ発現ベクターを構築し、塩基配列を確認後、ヒト胎児腎細胞株 HEK293T 細胞に Fugene 6 を用いて遺伝子導入し 48 時間後細胞溶解液を調製し、抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロット解析により、発現を確認した。

### (2) 免疫沈降反応とウェスタンブロット

FLAG または HA などのタグを付加した EBI3 および p19 の発現ベクターを HEK293T 細胞に Fugene 6 を用いて遺伝子導入し、72 時間後その培養上清を回収した。次に、その培養上清を FLAG および HA の抗体と 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、電気泳動・膜へ転写後、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い、2 つの分子の会合を検討した。

### (3) 一本鎖 EBI3/p19 発現ベクターの投与によるサイトカイン産生解析

まず、EBI3/p19 の *in vivo* の作用を検討するため、C57BL/6 マウスを完全フロイントアジュバントを用いてニワトリ卵白アルブミン (OVA) で免疫し、その際、上述の EBI3/p19 発現ベクターおよびコントロールベクターをハイドロダイナミックインジェクション法により尾静注した。1 週間後、所属リンパ節細胞を PMA と Inomycin で活性化後 Brefeldin A で処理し、FACSCantoII (BD Biosciences) と FlowJo (Tree Star) を用いた細胞内染色法で解析し、サイトカイン産生細胞の割合を定量した。また、所属リンパ節細胞を OVA (0~0.3 mg/ml) で再刺激後、72 時間後の培養上清中のサイトカイン産生量を

ELISA (R&D Systems) により定量した。

### (4) EBI3/p19-トランスジェニック (Tg) マウスの作製と機能解析

上述の FLAG タグ付きの一本鎖 EBI3/p19 に肝臓特異的なヒトアミロイド P 蛋白質のプロモーターを繋いだコンストラクトを作製し、C57BL/6 マウスの受精卵にマイクロインジェクションし、EBI3/p19-Tg マウスを 2 系列 (#7 と #55) 樹立した。

自己免疫性肝炎モデルとして、コンカナバリン A (Con A) を静注後、血清中のトランスアミダーゼ (GOT/GPT) 活性、肝臓に浸潤した CD4<sup>+</sup>T 細胞の細胞内サイトカイン染色、リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析、肝臓を固定し HE 染色等の組織化学的解析を行った。

### (5) EBI3/p19 発現腫瘍の作製と腫瘍増殖の解析

腫瘍としてマウスの移植腫瘍であるメラノーマ B16F10 と大腸癌 MC38 を用いて、FLAG-EBI3/p19 発現ベクターおよびコントロールベクターを遺伝子導入後、G418 で薬剤耐性株を樹立した。腫瘍細胞 (5x10<sup>5</sup>) を C57BL/6 マウスの側腹部に皮内注射し、腫瘍の大きさは、経時的にデジタルノギスを用いて定量し、腫瘍体積を計算した。

## 4. 研究成果

### (1) EBI3 と p19 の会合

FLAG と HA の異なるタグを付けた EBI3 と p19 の発現ベクターを HEK293T 細胞に遺伝子導入し 72 時間後、培養上清および細胞溶解液を調製し、それぞれのタグに対する抗体を用いた免疫沈降反応により、両者が会合することがわかった。この時、培養上清中へ分泌は、極めて低かった。そこで、その理由として、最近我々が見出した EBI3 が小胞体で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に結合するため (論文投稿中) ではないかと考えた。そこで、次に EBI3 と p19 または p28 遺伝子導入後、細胞溶解液をカルネキシンおよび EBI3、p28 の抗体で免疫沈降反応後ウェスタンブロットで解析すると、上清に高濃度分泌される IL-27 (EBI3/p28) の場合は、内在性カルネキシンと p28 の結合がほとんど見られず、EBI3/p19 の場合は、内在性カルネキシンへの結合が見られた。同様な内在性カルネキシンへの結合は、やはり上清への分泌が悪い IL-35 (EBI3/p35) の p35 でも見られた。以上の結果より、上清への分泌が悪い理由として、内在性カルネキシンへの結合性が高いためと考えられた。

### (2) EBI3/p19 の機能

まず、FLAG 付き一本鎖 EBI3/p19 発現ベクターを構築し、HEK293T 細胞に遺伝子導入し、その培養上清中から抗 FLAG 抗体カラムで精

製しようと試みたが、十分な蛋白量が得られなかった。そこで、EBI3/p19の機能を調べるために、この発現ベクターをハイドロダイナミックインジェクション法によりマウスに投与し、OVAで免疫し誘導される免疫反応への影響を検討した。その結果、所属リンパ節の細胞内サイトカイン産生や、抗CD3抗体による再刺激により培養上清中に分泌されたサイトカイン量をELISAで定量することにより、顆粒球単球コロニー刺激因子(GM-CSF)やIL-17などのTh17様のサイトカイン産生の増強が観察された。これらの結果より、EBI3とp19の会合分子が、機能的なサイトカイン様の分子である可能性が示唆された。

### (3) EBI3/p19-Tgマウスの解析

そこで、種々マウス疾患モデルを用いて、EBI3/p19の病態形成への効果を検討するため、肝臓特異的なプロモーターを用いてEBI3/p19を血中に高濃度有するEBI3/p19-Tgマウスを2系統(#7と#55)樹立した。まず、それぞれの系統マウスの肝臓の細胞溶解液を調製し、ウエスタンブロット解析により、EBI3/p19の蛋白質発現を比べると、#55は#7に比較し約10倍高い発現を示していることがわかった。

次に、Con A投与による自己免疫性肝炎のモデルマウスを用いて、EBI3/p19の肝炎発症への影響を検討した。その結果、EBI3/p19-Tgマウス#7に比べ#55は、血清中のGOT/GPT活性の増強が有意に低下し、肝臓の免疫組織学的解析により、肝炎発症がより軽減されていることがわかった。この時、肝臓内に浸潤した単核球細胞からRNAを調製しリアルタイムRT-PCR解析により、GM-CSFやIL-17の他にIL-22の発現増強も見られた。IL-22は、肝炎発症の抑制効果も知られているため、IL-22の関与を検討するため、現在、IL-22遺伝子欠損マウス(Merck社より分与済)とこれらのTgマウスを交配し、IL-22<sup>-/-</sup>EBI3/p19-Tgマウスを作製中である。

### (4) EBI3/p19の抗腫瘍効果

最後に、EBI3/p19の腫瘍増殖への効果を調べるため、EBI3/p19およびそのコントロールベクターを遺伝子導入したメラノーマ腫瘍B16F10細胞株を2系統ずつ樹立した。まず、*in vitro*での、細胞増殖とMHCクラスI発現を比較したが、有意な差は見られなかった。次に、これらの腫瘍細胞をマウスに植えて、腫瘍の大きさを経時的に測定した。その結果、EBI3/p19-B16F10は、コントロールのVector-B16F10に比べ、腫瘍増殖が顕著に低下していた。現在、IL-22やIL-17、IFN-gなど遺伝子欠損マウスを用いてEBI3/p19が抗腫瘍効果を示す作用機序を検討中である。

### (5) 本研究成果の意義と今後の展望

本研究により、EBI3とp19が会合し機能的

なサイトカイン様の活性を有していることが示された。しかし、その作用機序等に関しては、現在も検討中であり、今後のさらなる検討が必要である。

実は、本研究を行っている間、中国のWangらのグループより、同様な結果が報告され、この会合分子をIL-39と名付けられた(Wang et al. *Eur J Immunol.* 2016)。彼らは、全身性エリテマトーデスのマウスモデルであるSLEマウス由来の活性化したB細胞からEBI3とp19の会合分子が産生され、STAT1/STAT3の活性化を介して、B cell activation factor (BAFF)などの産生を増強し炎症を促進することを報告した(Wang et al. *Clin Exp Immunol.* 2016)。

EBI3/p19(IL-39)の機能や作用機序、生理的意義など、まだまだ不明の点が多いのでさらなる検討が必要である。しかし、本研究でも指摘した組換え精製蛋白の調製方法の開発が、重要な課題の1つであり、現在も検討中である。

### 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  $\alpha\beta3$  enhances the suppressive effect of interferon- $\gamma$  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<sup>+</sup> V $\delta$ 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<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> 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 $\alpha$  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 1<sup>st</sup> 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  $\alpha$  protein expression through a lectin chaperone calnexin. 第 46 回日本免疫学会総会・学術集会(2017)
  7. 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)
  8. 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)
  9. 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.

10. 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)
11. 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, 16<sup>th</sup> International Congress of Immunology, 2016.
12. 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)
13. 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)
14. 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

徐 明利 (XU, Mingli)

東京医科大学・医学部・客員講師

研究者番号：80597964

### (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