

## 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 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790464

研究課題名（和文）自己免疫を誘導する IL-6 Amp の標的遺伝子 X の同定

研究課題名（英文）Screening of the target genes of IL-6 Amp that promotes autoimmune diseases

## 研究代表者

小椋 英樹 (OGURA HIDEKI)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20573174

## 研究成果の概要（和文）：

自己免疫疾患や慢性炎症に重要な IL-6 Amp に着目し、IL-6 Amp によって発現誘導される標的遺伝子をゲノムワイドに探索した。その結果、T 細胞集積を促すケモカイン Ccl20 が標的の一つであることが判明し、組織特異的自己免疫疾患に重要な 4 ステップモデルを提唱できた。また、ヒト疾患で高値を示した可溶性分子が IL-6 Amp の制御に重要であることも明らかになりつつあり、新しい創薬の可能性が拓かれた。

## 研究成果の概要（英文）：

IL-6 Amp is important for autoimmune diseases and chronic inflammation. In order to identify the target molecules of IL-6 Amp, several genome-wide screening methods were carried out. As results, an inflammatory chemokine Ccl20 that enhances the recruitment of a subset of T cells is identified as a key target. With those findings, "a four-step model" for organ-specific autoimmune diseases was presented. Finally, a soluble molecule highly presented in the patients with an autoimmune disease was found to be important for regulating IL-6 Amp, that opens new possibilities for the drug development.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：IL-6 アンブ、IL-6 Amp、4 ステップモデル、自己免疫、慢性炎症、線維芽細胞、IL-17、Ccl20

## 1. 研究開始当初の背景

当研究室はこれまで、IL-6 信号伝達分子 gp130 に点変異を導入した F759 マウスにおいて、加齢と共に自己免疫性の関節炎を発症する事を報告した (Atsumi et al., J Exp Med

2006)。この F759 関節炎はヒト関節リウマチに酷似しており、関節組織においてリンパ球の浸潤、パンススの形成、骨破壊等が認められ、サイトカイン信号伝達異常から関節炎を自然発症する初めての動物モデルとして

貴重である。この F759 マウスにおいては負の制御因子 SOCS3 が機能できないため、IL-6/STAT3 信号が増強されていた。以来、当研究室は自己免疫疾患発症機序の解明のため F759 関節炎の発症機序を解析し、2006 年には、過度に CD4+T 細胞に活性化を伴うようなホメオスタティック増殖が誘導されることがこの関節炎発症に重要であり、活性化 CD4+T 細胞から産生される何らかのサイトカインが発症に寄与しているものと考えられた (Sawa et al., J Exp Med 2006)。一方で、IL-17A は近年、自己免疫疾患に重要であるサイトカインとして注目を集めている (Betteli et al., Nat Immunol 2007)。2006 年に IL-17A が T helper 17(Th17)という、これまで知られていた Th1、Th2 とは異なる CD4+T 細胞サブセットから産生されることが報告された。その中で naïve CD4+T 細胞から Th17 細胞への分化には IL-6 と TGF- $\beta$  が必須であることが明らかにされた (Betteli et al., Nature 2006, Veldhoen et al., Immunity 2006)。我々は Th17 分化において、IL-6/Erk や IL-6/STAT3 などの信号経路のうち、IL-6/STAT3 信号経路がその分化に重要であることを試験管内のみならず、生体内でも証明した (Nishihara and Ogura et al., Int Immunol 2007)。

更に我々は近年、F759 関節炎における IL-17A の役割を検討し、次のような知見を得た (Ogura et al., Immunity 2008)。1) IL-17A を欠損した F759 マウスでは関節炎発症が抑制されること、2) 生体内において IL-17A の下流で IL-6 が誘導され、それが F759 関節炎発症に重要であること、3) 試験管内において mouse embryonic fibroblast などの線維芽細胞で、IL-6/STAT3 信号が IL-17A/NF- $\kappa$ B 信号によって誘導される IL-6 や他の NF- $\kappa$ B 標的遺伝子の発現を相乗的に増強させること、4) 線維芽細胞などの非造血系細胞における STAT3 を一型コラーゲンのプロモーターを用いて特異的に欠損した F759 マウス (Col1a-Cre/STAT3<sup>flox/flox</sup>/F759) において、関節炎発症が抑制されること、である。これらのことから、自己免疫疾患において、免疫細胞の攻撃対象となるような線維芽細胞などで IL-17A 刺激を受けて IL-6 が産生され、その IL-6 が更に IL-17A と協調して IL-6 や他の遺伝子の産生を増幅するという、IL-6 の amplification loop(IL-6 Amp)が形成され、それが疾患誘導に重要なのではないかという仮説が立てられた。事実、この仮説を支持するように、Th17 細胞移入による実験的自己免疫性脳脊髄炎モデル EAE の誘導系

においても、IL-6KO マウス、また IL-6 Amp の構成因子である STAT3 を非造血系でコンディショナル・ノックアウトした Col1a-Cre/STAT3<sup>flox/flox</sup> マウスでは WT と比較して EAE の発症が有意に抑制された。これらのことから、自己免疫疾患一般に、IL-17A の下流で IL-6 Amp が形成され、それが疾患誘導に重要であることが示された。

## 2. 研究の目的

自己免疫疾患誘導に重要である IL-6 Amp に焦点を当て、IL-6 Amp によって誘導される遺伝子の中で疾患発症に本当に重要な遺伝子 X を同定し、疾患誘導の作用機序を明らかにするのが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) 標的候補遺伝子のスクリーニング

IL-6 Amp の標的となるような遺伝子の候補を下記の要領でスクリーニングする。これらのスクリーニングは現在までに行われており、既に終了している。ただし、標的遺伝子 X が続く方法で得られなかった場合、他の細胞種を用いる、また IL-6 Amp 依存的炎症を惹起した生体内組織を試料とする等して再度試みる。IL-6 Amp の標的遺伝子 X とは即ち、IL-6 と IL-17A の相乗作用により発現増強される、IL-6 を含めた遺伝子群に含まれるはずである。これまでに試験管内において、不死化したマウス関節滑膜細胞に、IL-6、IL-17A、IL-6+IL-17A で刺激した後、時間系列をとって RNA を回収し、micro-array 法によって発現上昇する mRNA を網羅的に解析した。このマウス関節滑膜細胞は IL-6 と IL-17A の相乗作用が強く認められる細胞であり、WT マウス由来のもの、また F759 マウス由来のものを各数種類準備した。その結果、1)発現の絶対量が高いもの、2) IL-6 単独、IL-17 単独刺激と比較して IL-6+IL-17A 刺激で相乗的に発現増強しているもの、3) 各時間系列に依らず発現増強しているもの、4) 細胞種に依らず発現増強しているもの、という基準を満たす遺伝子のリストが作成された。このリストの上位 10 位以内には IL-6 のようなサイトカインや、CCL20 などのケモカインの他、機能未知の遺伝子も含まれている。CCL20 を例にとると、これらについては既に実験的自己免疫性脳脊髄炎や自己免疫性関節炎モデルなどで病気の誘導に重要であるという報告があり (Hirota et al., J Exp Med 2007, Reboldi et al., Nat Immunol 2009)、このリストを用いる妥当性が強調さ

れる。

## (2) 標的候補遺伝子の判定

標的遺伝子Xの同定のためには簡便かつ迅速な標的候補遺伝子の評価系の確立が重要であり、それについても現在までに終了している。IL-6/STAT3 信号が増強される F759 マウスにおいて、サイトカイン IL-6 と IL-17A を混合して関節局所に注射することにより、関節炎が非常に早期（1週間以内）に発症する事が分かった。このサイトカイン誘導性 F759 関節炎については、WT マウスでは発症が全く認められないことから、a)F759変異によるSTAT3信号の亢進により増強したIL-6 Ampが、関節炎を誘導していることが明らかである。また、関節局所のサイトカイン注射により非常に早期に発症が認められる事から、b)関節局所におけるIL-6 Ampの誘導が関節炎の発症に十分であるものと思われる。すなわち、この系において何らかの方法により関節局所でのみ標的遺伝子Xを発現抑制できれば、関節炎発症が十分に抑制できるものと思われる。

関節局所で任意の遺伝子が発現抑制する方法として、sh-RNA 発現レンチウイルス (MISSION, sigma) を用いて行う。このような方法については既に報告がある (Queenie et al., Proc Natl Acad Sci, 2008)。先に述べたサイトカイン誘導性 F759 関節炎の系で、IL-6 Ampの構成因子であるNF-kBp65と、STAT3それぞれに対するsh-RNAレンチウイルスを関節局所に注射し、関節局所でそれぞれの遺伝子をノックダウンすることにより、関節炎の発症がほぼ完全に抑制された。このことから、この系がIL-6 Ampに依存した疾患の誘導系であることが裏付けられる。これらをポジティブコントロールとして、先のリストを使って標的遺伝子Xを探索する。

はじめに、1)で得られたリストより、各遺伝子に対するsh-RNAレンチウイルスをそれぞれ複数ロット購入し、まず試験管内で培養細胞に対するノックダウン効率を評価する。最もノックダウン効率の高いロットに関して、先の方法で生体内での標的候補遺伝子のノックダウンに用いることとする。現在までに、いくつかの標的候補遺伝子について、試験管内において高いノックダウン効率をもつウイルスを選定済みである。これらについては今後、サイトカイン誘導性 F759 関節炎の系において評価し、関節炎発症が顕著に抑制される標的遺伝子Xを探索していく。標的遺伝子Xが得られた場合は、続けて以下の実験に

移る。

## (3) 標的遺伝子Xの機能解析

遺伝子Xを発現する細胞や炎症時の発現量の変化を、生体内で免疫組織染色やqPCR法により確認する。サイトカイン誘導性 F759 関節炎などにおいて、慢性炎症の惹起に重要である免疫細胞の浸潤度合いや、炎症組織の損傷度合いを評価し、Xの機能を解析していく。

## 4. 研究成果

本研究により、IL-6 Ampの標的遺伝子の一つとして、CCL20を同定した。

試験管内でIL-6とIL-17Aの共刺激で相乗的に発現上昇する遺伝子を網羅的に探索し、CCL20を候補の一つとして絞り込んだ(図1)。

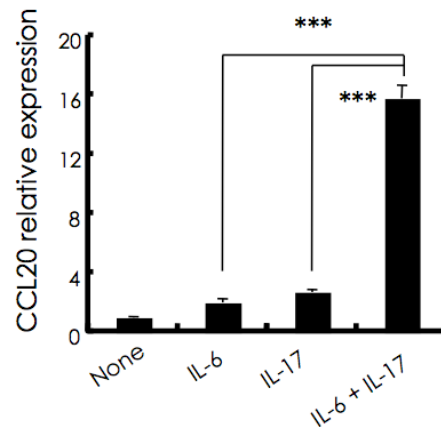


図1

IL-6/STAT3経路が増強したF759マウスは、IL-6Ampに依存して関節炎を自然発症する。関節炎を発症したこれらF759マウスの、関節局所におけるCCL20のmRNA発現は著明に上昇しており、更にその受容体CCR6陽性細胞の集積を認めた。CCL20はTh17細胞を集積するケモカインとして知られる。実際に若齢F759マウスに試験管内で調製したTh17細胞を尾静脈より移入し、CCL20を関節内投与すると、Th17細胞の集積、IL-6Amp依存的な関節炎発症を認めた。また、一番初めにCCL20発現を誘導するIL-6 Ampのトリガーとして、物理的ストレスや関節内微小出血によるTh17細胞の集積を想定し、Th17細胞を尾静脈より移入したF759マウスに関節内微小出血を誘導すると、Th17細胞が集積し、関節炎が誘導された。この系でshRNA発現レンチウイルスにより関節局所でCCL20を発現抑制すると、関節炎が劇的に抑制された(図2)。

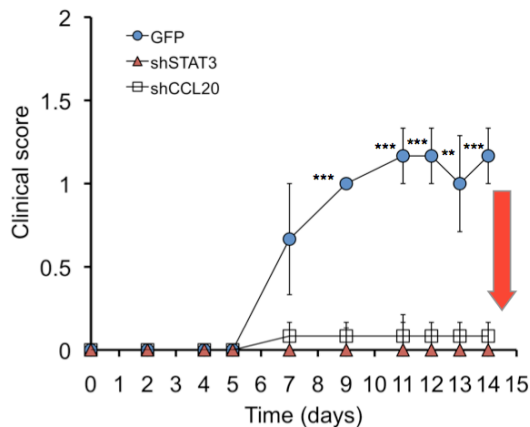


図 2

また、Th17細胞、更にはIL-17AをF759マウスの関節に注射すると関節炎が誘導された。以上よりCCL20はTh17細胞を関節局所に集積し、IL-17A依存的に関節局所でIL-6Ampを増強し、炎症を拡大、自己免疫性関節炎を誘導するものと考えられた。

これらの成果は自己免疫発症機序に新たな概念、4ステップモデルを導入した。4ステップとは即ち、1) CD4+T細胞の活性化、2) 局所的イベントによるCD4+T細胞の集積、3) IL-6 Ampの一過性の活性化、4) 遺伝的・環境的要因によって生じたCD4+T細胞由来サイトカインへの感受性増強によるIL-6 Ampの過剰活性化、である (Murakami M\*, Okuyama Y\*, Ogura H\*, et al. (\* equal contribution), *J. Exp. Med.* 208(1):103-114, 2011)。

更に、IL-6 Amp によって発現上昇する液性因子 Y について解析を行った。サイトカイン投与による関節炎誘導モデルにおいて、関節局所で Y の mRNA 発現は上昇しており、また、shRNA 発現レンチウイルスの関節内注射によってその発症は抑制された。また Y のシグナル特異的な阻害剤を処理すると、関節炎モデル、および多発性硬化症モデル相方においてその発症を抑制した。また試験管内で、Y は線維芽細胞に NF- $\kappa$ B の活性化を誘導し、Ccl20 や IL-6、Y などの各標的遺伝子の IL-17 と IL-6 共刺激による発現を更に相乗的に増強した。重要なことに、Y は種々のヒト自己免疫疾患患者の血清中の濃度が有意に上昇していた。以上から、Y はヒト疾患においても IL-6 Amp の重要な標的で、IL-6 Amp の更なる活性化を介して病気を増悪する役割をもつものと考えられた (論文リバイス中)。これらの成果により、病気の発症機序の基礎的な理解が進むばかりか、それらの治療法や診断マーカーの開発が大きく進展し得ることが期待される。

## 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 2 件)

- ① Murakami M\*, Okuyama Y\*, Ogura H\*, Asano S, Arima Y, Tsuruoka M, Harada M, Kanamoto M, Sawa Y, Iwakura Y, Takatsu K, Kamimura D, Hirano T (\*equally contributed to this paper.), Local microbleeding facilitates IL-6- and IL-17-dependent arthritis in the absence of tissue antigen recognition by activated T cells, *Journal of Experimental Medicine*, 査読有, 208(1), 2011, 103-114
- ② 小椋 英樹, 村上 正晃, 平野 俊夫, IL-6 誘導性の“炎症アンブ”と自己免疫疾患、*医学のあゆみ サイトカインと疾患*, 査読無, 234, 2010, 495-500

[学会発表] (計 10 件)

- ① 小椋英樹, 村上正晃, 他, A zinc finger motif containing poetin, ZFZ regulates IL-6 amplifier activation via regulating NF- $\kappa$ B activity and promotes an autoimmune arthritis, 第 40 回日本免疫学会学術集会, 2011.11.29, 幕張メッセ
- ② 勝沼功吉, 小椋英樹, 村上正晃, 他, Zinc finger motif containing protein A, ZFA regulates IL-6 amplifier activation via regulating NF- $\kappa$ B activity and promotes an autoimmune arthritis, 第 40 回日本免疫学会学術集会, 2011.11.29, 幕張メッセ
- ③ 諸井亜理紗, 小椋英樹, 村上正晃, 他, A protein kinase, PKX is involved in the development of autoimmune diseases via regulating the IL-6 amplifier activation, 第 40 回日本免疫学会学術集会, 2011.11.29, 幕張メッセ
- ④ OKUYAMA Y, OGURA H, MURAKAMI M, 他, A Four-step Model for MHC Class II-Associated Autoimmune Diseases, 第 40 回日本免疫学会学術集会, 2011.11.28, 幕張メッセ
- ⑤ KAMIMURA D, OGURA H, MURAKAMI M, 他, An ENU-mutant mouse, which increased a stress signaling in naïve T cells, 第 40 回日本免疫学会学術集会, 2011.11.28, 幕張メッセ
- ⑥ H. Ogura, H. Masaya, E. Sanda, Y. Okuyama, D Kamimura, M. Murakami, T. Hirano, A zinc finger motif containing protein regulttes the activation of the IL-6 amplifier, which is a critical for the development of an

autoimmune arthritis、60<sup>th</sup> Fujihara Seminar “Zinc Signaling and Cellular Functions”、2010.10.30、大阪国際会議場

- ⑦ Tsuruoka M, Nakagawa T, Kamimura D, Ogura H, Okuyama Y, Arima Y, Hirano T, Murakami M, IL-6-mediated positive regulation of Foxp3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells is critical for the development of autoimmune diseases、14<sup>th</sup> International Congress of Immunology、2010.8.26、神戸国際展示場
- ⑧ Okuyama Y, Ogura H, Asano S, Kanamoto M, Arima Y, Iwakura Y, Takatsu K, Kamimura D, Murakami M, Hirano T, Specific antigen recognition by CD4<sup>+</sup>T cells is not required for a MHC class II-associated autoimmune arthritis、14<sup>th</sup> International Congress of Immunology、2010.8.24、神戸国際展示場
- ⑨ H. Ogura, M. Murakami, Y. Okuyama, M. Tsuruoka, C. Kitabayashi, M. Kanamoto, M. Nishihara, Y. Iwakura, K. Takatsu, D. Kamimura, T. Hirano、IL-6 plays roles not only for developing Th17 but also for inducing an IL-6 amplifier in autoimmune diseases、14<sup>th</sup> International Congress of Immunology、2010.8.24、神戸国際展示場
- ⑩ M. Harada, M. Nishihara, H. Ogura, N. Ueda, M. Tsuruoka, C. Kitabayashi, F. Fuji, H. Aono, K. Ishihara, E. Huseby, U.A.K. Betz, M. Murakami, T. Hirano、IL-6-mediated STAT3 signaling in T cells directs the development of Th17 with a minimum effect on that of Treg in vivo、14<sup>th</sup> International Congress of Immunology、2010.8.23、神戸国際展示場

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molonc/www/jpn/achievements/4-step-model.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小椋 英樹 (OGURA HIDEKI)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20573174

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：