

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16614

研究課題名(和文) Th17細胞におけるBob1の新規制御機構の解明と疾患関連マーカーへの応用

研究課題名(英文) Elucidation of new control mechanisms of Bob1 in Th17 cells and its application to a disease-related marker

研究代表者

池上 一平 (Ippei, Ikegami)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：80837021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はCD4陽性T細胞での転写共役因子Bob1の機能解明を目的とした。そこで、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)モデルをBob1欠損マウスに誘導したところ、野生型に比べEAE症状発症低下を認め、リンパ組織ではEAE病態形成に重要なIL-17A産生CD4陽性T細胞が減少していた。このことからBob1がIL-17A産生に寄与していることが示された。そして、Bob1はROR $\gamma$ tと結合し、IL-17A産生を調節するという新規メカニズムを発見した(Biochem Biophys Res Commun. 2019)。これを踏まえ、CD4陽性T細胞特異的Bob1欠損マウスを作出し、更なる検討を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Bob1はこれまでB細胞での機能的意義について検討されてきたが、本研究によりBob1はCD4陽性T細胞サブセットのうちTh17細胞のIL-17A産生に寄与することを見出した。Bob1は転写因子Oct1/2との結合様式が知られていたが、Th17細胞のマスター転写因子であるROR $\gamma$ tとBob1が結合し、転写活性を調節するという新規制御機構を初めて見出し、学術的に意義のある結果を得た。病原性CD4陽性T細胞の機能制御は不明な点が多いため、CD4陽性T細胞特異的Bob1欠損マウスを用いた研究により、CD4陽性T細胞が病態形成に寄与する疾患の理解が進み、得られた結果を医療社会に還元できると確信している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed functional analysis of the transcriptional coactivator Bob1 in CD4 positive (CD4+) T cells. We found that Bob1 knock out (KO) mice were resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and the number of IL-17A-producing CD4+ T cell, which is involved in the pathogenesis of EAE, was decreased Bob1 KO mice compared to that in WT mice. These results suggest that Bob1 positively regulates IL-17A production in CD4+ T cells. We revealed new mechanisms that Bob1 enhances IL-17A expression by interacting with ROR $\gamma$ t (Biochem Biophys Res Commun. 2019). Based on these results, we generated CD4+ T cell-specific Bob1 deficient mice further to know the role of Bob1 in CD4+ T cells in vivo.

研究分野：実験病理学

キーワード：Bob1 Th17 EAE Multiple Sclerosis IL-17A

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

抗体産生の恒常性の破綻は、免疫不全症のみならず、自己免疫疾患の病態にも深く関与している。この抗体産生には CD4 陽性ヘルパーT (CD4+ T) 細胞サブセットのうち、濾胞ヘルパーT (Follicular helper T: Tfh) 細胞が B 細胞に働きかけ、抗体の親和性成熟及びクラススイッチの誘導を介し、抗体産生機構を司る重要な細胞として近年同定されている。この Tfh 細胞の機能異常は、自己免疫疾患の発症、病態への関与が強く示唆されている。例えば、自己免疫疾患である IgG4 関連疾患や多発性硬化症 (Multiple Sclerosis: MS) などの疾患では、Tfh 細胞の数や活性化状態が病態の重症度と相関している (Schmitt N. J Nat Sci. 2015、Kamekura R. et al. J Immunol. 2017)。

この Tfh 細胞を中心とした自己免疫疾患の病態に迫るべく、ヒト扁桃由来 Tfh 細胞のトランスクリプトーム解析を行い、Tfh 細胞に特異的に高発現する転写共役因子 Bob1 (遺伝子名: Pou2af1) を同定し、Bob1 が T 細胞抗原受容体 (T cell receptor: TCR) のシグナルを調節することを明らかにした (Yamashita K. et al. Eur J Immunol. 2016)。この解析結果から Tfh 細胞における Bob1 の機能的意義に注目しており、睡眠時無呼吸症候群の肥大扁桃を用いた研究から、Tfh 細胞の Bob1 発現レベルの変動がリンパ濾胞胚中心の異常拡大に関連していることを明らかにした (Matsumiya H. et al. Immunol Lett. 2017)。Bob1 は Tfh 細胞だけでなく、他の CD4+ T 細胞サブセットにも発現することが先行研究より示されている (Zwilling S. et al. Science. 1997、Brunner C. et al. EMBO J. 2007)。これらの報告から、これまで Bob1 は B 細胞における機能解明が主に行われてきたが、B 細胞にとどまらず CD4+ T 細胞サブセットでも機能しており、CD4+ T 細胞を主体とする疾患との関与が示唆される。さらに、ゲノムワイド関連解析により、Bob1 は MS や原発性胆汁性胆管炎との関連が報告されている (Ban M. et al. J Neuroimmunol. 2006、Nakamura M. et al. Am J Hum Genet. 2012)。しかしながら、Bob1 の病原性 CD4+ T 細胞での機能については全く検討されていない。Bob1 が CD4+ T 細胞を如何に制御し、自己免疫疾患の発症に関与しているのか、全く不明である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は病原性 CD4+ T 細胞における Bob1 の機能的意義を明らかにすることである。CD4+ T 細胞サブセットのうち様々な自己免疫疾患との関与が示唆されている Th17 細胞は、マスター転写因子として ROR $\gamma$ t を発現し、ROR $\gamma$ t は Runx1、STAT3、Oct1 と協調して炎症性サイトカインである IL-17A を産生する (Yang XP. et al. Nat Immunol. 2008、Maddur MS. et al. Am J Pathol. 2012、Kim LK. et al. Mol Cell. 2014、Patel DD. et al. Immunity. 2015)。Bob1 は Oct1 の転写活性を調節することから、Bob1 が IL-17A 産生の制御に関わる可能性がある。そこで、本研究では CD4+ T 細胞サブセットの中でも Th17 細胞に焦点を絞り、Bob1 による Th17 細胞の誘導調節機構を明らかにする。本研究にて CD4+ T 細胞での Bob1 の機能を解明することで、CD4+ T 細胞が病因形成に関与する疾患の発症機序の解明及び新規治療法の確立に繋がると確信している。

### 3. 研究の方法

#### (1) Bob1 による Th17 細胞の機能調節機構の解明

##### ① 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE) モデル

全身性 Bob1 欠損マウスと比較対象の野生型マウスに MOG ペプチドと百日咳毒素を用いて EAE を誘導し、EAE 症状スコアの観察や脊髄などの病変組織の免疫染色を行った。EAE 症状発症初期の所属リンパ組織細胞をフローサイトメトリーにより解析し、CD4+ T 細胞における IL-17A 産生を評価した。

##### ② in vitro differentiation assay

全身性 Bob1 欠損マウスと野生型マウスより単離したナイーブ CD4+ T 細胞を Th17 細胞へ分化誘導し、得られた細胞について real time PCR により Th17 関連遺伝子発現を検討した。これと合わせて培養上清を用い、CBA assay にて Th17 関連サイトカイン発現量を解析した。

##### ③ レポーターアッセイ

HEK293FT 細胞に I117a 遺伝子上流-6kb をレポータープラスミドに組み込み、ROR $\gamma$ t と Bob1 を強制発現させ、I117a 転写活性に与える影響を検討した。

##### ④ 免疫沈降法、免疫染色

HEK293FT 細胞に HA-ROR $\gamma$ t と Myc-Bob1 を強制発現させ、免疫沈降法を用いて両分子の結合を確認した。また、② in vitro differentiation assay より得られた Th17 細胞を用いて、ROR $\gamma$ t と Bob1 が共沈降するかを確認した。さらに、HeLa 細胞に HA-ROR $\gamma$ t と Myc-Bob1 を強制発現させ、免疫染色により両分子の細胞内における局在を検討した。

#### (2) CD4+ T 細胞特異的 Bob1 欠損マウスの樹立

Bob1 は B 細胞で高発現しており、全身性 Bob1 欠損マウスを用いた研究では Bob1 による B 細胞機能へ及ぼす影響を考慮する必要があったため、CD4+ T 細胞の機能解析が困難であった。そ

ここで、Bob1 flox/flox マウスを作成し、CD4-Cre トランスジェニックマウスと交配することで新たに CD4+ T 細胞特異的 Bob1 欠損マウスの樹立を行った。

#### 4. 研究成果

(1)Bob1によるTh17細胞の機能調節機構の解明 (Bob1 enhances ROR $\gamma$ t-mediated IL-17A expression in Th17 cells through interaction with ROR $\gamma$ t. Biochem Biophys Res Commun. 2019)

##### ①EAE モデル

全身性 Bob1 欠損マウスと比較対象の野生型マウスに EAE を誘導したところ、全身性 Bob1 欠損マウスでは EAE 症状スコアの低下ならびに症状発症率の低下を認めた。さらに、所属リンパ節ならびに脾臓における IL-17A 産生 CD4+ T 細胞が減少していた。一方、IFN $\gamma$  産生 CD4+ T 細胞は両群で変化はみられなかった。先行研究より B 細胞を欠損する  $\mu$ MT マウスを用いて本研究と同一手法で EAE を誘導し、症状の発症を認めたことから (Hjelmström P. et al. J Immunol. 1998)、B 細胞は本研究で用いた EAE モデルの症状発症に関係しないと考える。これらの実験事実より、CD4+ T 細胞における Bob1 が IL-17A 産生を正に制御し、EAE 症状発症に寄与することを明らかにした。

##### ②in vitro differentiation assay

全身性 Bob1 欠損マウスと野生型マウスより単離したナイーブ CD4+ T 細胞を Th17 細胞へ分化誘導した。分化誘導 5 日後、Th17 細胞のマスター転写因子である ROR $\gamma$ t 発現に変化は見られなかった。しかしながら I117a 遺伝子発現ならびに培養上清中の IL-17A 産生は全身性 Bob1 欠損マウス由来ナイーブ CD4+ T 細胞で低下していた。このことから①の EAE モデルと同様に、Bob1 が IL-17A 産生を正に制御することが示された。

##### ③レポーターアッセイ

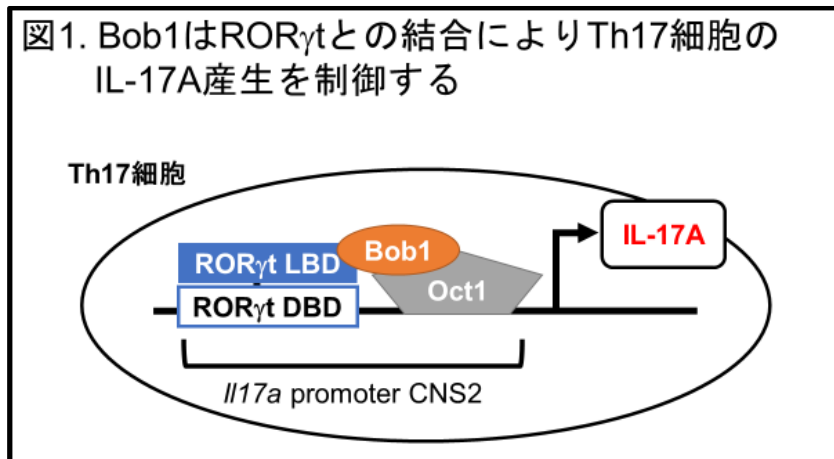
Bob1によるIL-17A産生調節機構を探るために、レポーターアッセイを行った。マウス I117a 転写開始点より上流 6kb をレポータープラスミドに組み込み、これと ROR $\gamma$ t、Bob1 を HEK293FT 細胞に強制発現させた。その結果、ROR $\gamma$ t と Bob1 を共発現させると、Bob1 は導入量に比例して ROR $\gamma$ t の I117a 転写活性を増強させた。Bob1 は DNA 結合ドメインをもたないため、Bob1 との結合が知られる Oct1 の結合配列を検索したところ、I117a 転写開始点より上流 5kb に存在する Conserved Noncoding Sequence (CNS)2 に、ROR $\gamma$ t の結合領域から 60b 下流に Oct1 の結合配列が存在していた。そこで、CNS2 に存在するこの Oct1 配列モチーフ ATTTGCAT を AAAAGCAT に変換した変異体を作成し、レポーターアッセイを行ったところ Bob1 による ROR $\gamma$ t 転写活性の低下がみられた。これと合わせて、Bob1 の Oct1 結合領域に存在する 32 番目のアミノ酸をロイシンからプロリンに変換し、DNA-Oct1-Bob1 の複合体形成ができなくなる変異体 (L32P 体) を作成した。この変異体を用いてレポーターアッセイを行ったところ、野生型の Bob1 と比べ L32P 体では ROR $\gamma$ t の転写増強活性がみられなかった。以上の結果から、Bob1 による ROR $\gamma$ t の転写増強活性は CNS2 の Oct1 結合領域であることが明らかとなった。

##### ④免疫沈降法、免疫染色

HEK293FT 細胞に Myc-Bob1、HA-ROR $\gamma$ t を過剰発現させ、免疫沈降法を行ったところ Bob1 と ROR $\gamma$ t が共沈降した。このことから、Bob1 と ROR $\gamma$ t が結合することが示唆された。また、HeLa 細胞を用いて Myc-Bob1、HA-ROR $\gamma$ t を過剰発現させ免疫染色を行った結果、Bob1 と ROR $\gamma$ t が共局在することが確認された。培養細胞による過剰発現系だけでなく、②の in vitro differentiation assay より得られた Th17 細胞について免疫沈降法ならびに免疫染色を行い、Bob1 と ROR $\gamma$ t が共沈降、共局在する結果を得た。これらの結果から、Bob1 が ROR $\gamma$ t と結合する事実を初めて見出した。Bob1 と ROR $\gamma$ t の結合様式を探るべく ROR $\gamma$ t の変異体 (野生型、DNA 結合ドメイン体、リガンド結合ドメイン体) を作成し、これらを用いて Bob1 と免疫沈降を行ったところ、Bob1 は ROR $\gamma$ t のリガンド結合ドメインと共沈降することが明らかとなった。さらに、HeLa 細胞に Bob1 と ROR $\gamma$ t リガンド結合ドメイン体を過剰発現させて行った免疫染色からも両分子が共局在することが確認された。

①から④の結果から、これまで Oct1/2 との結合が報告されていた Bob1 が ROR $\gamma$ t とも結合し IL-17A 産生を制御するという新規分子機構を見出した (図 1)。

図1. Bob1はROR $\gamma$ tとの結合によりTh17細胞のIL-17A産生を制御する



(2)CD4+ T 細胞特異的 Bob1 欠損マウスの樹立

Bob1 flox/flox マウスを作成し、このマウスと The Jaxson Laboratory より購入した CD4-Cre トランスジェニックマウスを交配し、CD4+ T 細胞特異的 Bob1 欠損マウスを樹立した。

(3)今後の研究展開について

①Bob1 による Th17 細胞の機能調節機構の解明について

図 1 に示すように、Bob1 が Th17 細胞の IL-17A 産生を制御する新規分子機構を同定した。本研究の結果から CD4+ T 細胞における Bob1 発現は多発性硬化症などの Th17 細胞が関与する免疫関連疾患の病態形成に影響を及ぼす可能性が示唆され、臨床的意義について研究を展開したいと考えている。

②CD4+ T 細胞特異的 Bob1 欠損マウスの樹立について

CD4+ T 細胞特異的 Bob1 欠損マウスを樹立したため、全身性 Bob1 欠損マウスでみられた B 細胞における Bob1 の影響を考慮せず、CD4+ T 細胞における Bob1 の機能的意義を検討できるようになった。このマウスを用いて(1)①EAE モデルを実施し、EAE 症状発症は CD4+ T 細胞における Bob1 が重要であることを再度証明したい。一方で、CD4+ T 細胞には転写因子 FoxP3 を発現する制御性 T 細胞が存在する。このような CD4+ T 細胞サブセットを加味した検討を行うべく、CD4+ T 細胞特異的 Bob1 欠損マウスに FoxP3-GFP/DTR レポーターマウスを交配している。これにより作出した個体は、生細胞のまま制御性 T 細胞とそれ以外の CD4+ T 細胞サブセットを分画できるため、CD4+ T 細胞における Bob1 の真の機能に至ると確信している。CD4+ T 細胞における Bob1 の機能的意義を明らかにすることで、CD4+ T 細胞が病因形成に関与する疾患病態の深い理解ならびに新規治療方法の確立の一助となることを目指し、今後も継続して研究を推し進める。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hayato Yabe, Ryuta Kamekura, Motohisa Yamamoto, Kosuke Murayama, Shiori Kamiya, Ippei Ikegami, Katsunori Shigehara, Hiromi Takaki, Hirofumi Chiba, Hiroki Takahashi, Kenichi Takano, Hiroki Takahashi, Shingo Ichimiya	4. 巻 31
2. 論文標題 Cytotoxic Tph-like cells are involved in persistent tissue damage in IgG4-related disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 249 ~ 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2020.1719576	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Satsuki Miyajima, Katsunori Shigehara, Ryuta Kamekura, Hiromi Takaki, Hayato Yabe, Ippei Ikegami, Yuichiro Asai, Hirofumi Chiba, Eiji Uno, Hiroki Takahashi, Shingo Ichimiya	4. 巻 69
2. 論文標題 Activated circulating T follicular helper cells and skewing of T follicular helper 2 cells are down-regulated by treatment including an inhaled corticosteroid in patients with allergic asthma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 66 ~ 77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2019.08.008	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 Ippei Ikegami, Hiromi Takaki, Shiori Kamiya, Ryuta Kamekura, Shingo Ichimiya	4. 巻 514
2. 論文標題 Bob1 enhances ROR t-mediated IL-17A expression in Th17 cells through interaction with ROR t	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1167 ~ 1171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.05.057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fumie Ito, Ryuta Kamekura, Motohisa Yamamoto, Kenichi Takano, Hiromi Takaki, Hayato Yabe, Ippei Ikegami, Katsunori Shigehara, Tetsuo Himi, Hiroki Takahashi, Shingo Ichimiya	4. 巻 207
2. 論文標題 IL-10+ T follicular regulatory cells are associated with the pathogenesis of IgG4-related disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunology Letters	6. 最初と最後の頁 56 ~ 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.imlet.2019.01.008	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢部 勇人、亀倉 隆太、池上 一平、高木 宏美、高橋 弘毅、一宮 慎吾
2. 発表標題 IgG4関連疾患におけるCX3CR1陽性Tph細胞の機能的役割
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会学術集会
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
研究協力者	一宮 慎吾  (ICHIMIYA Shingo)  (30305221)	札幌医科大学・医学部・教授    (20101)	

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