

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591432

研究課題名(和文)自己免疫疾患発症における Sox ファミリー分子の役割の解明

研究課題名(英文)Role of Sox transcription factors in the onset of autoimmune diseases

研究代表者

須藤 明 (SUTO, Akira)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：50447306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫疾患の発症を惹起するTh17細胞の分化には、IL-6やIL-21によるStat3の活性化とその下流のTh17細胞系規定転写因子であるROR γ tの発現が必須である。本研究では、Sox5とc-MafがStat3依存的に発現し、両者がROR γ tプロモーターに結合することにより協調的にROR γ tの発現とTh17細胞分化を誘導する事を明らかにした。さらにT細胞特異的Sox5欠損マウスではTh17細胞分化が障害され、実験的脳脊髄炎や遅延型過敏反応が抑制される事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Th17 cells play a pathogenic role in autoimmune diseases. It has been shown that IL-6- and/or IL-21-mediated activation of Stat3 is essential for the expression of ROR γ t, which is a lineage-specifying transcription factor of Th17 cells. In this study, we find that Sox5 and c-Maf are induced in Th17 cells in a Stat3-dependent manner. Sox5 together with c-Maf induce Th17 cell differentiation as downstream effectors of Stat3 and as upstream inducers of ROR γ t. In addition, we find that T cell-specific Sox5-deficient mice exhibit impaired Th17 cell differentiation and are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis and delayed-type hypersensitivity. Taken together, these results suggest that Sox5 and c-Maf cooperatively induce Th17 cell differentiation via the induction of ROR γ t as downstream targets of Stat3.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、膠原病・アレルギー内科学

キーワード：Th17 Sox5 c-Maf

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患は人口の約5%が罹患する多因子疾患であり、遺伝的素因を持つ個体にウイルス感染などの環境要因が加わることにより発症すると考えられているが、その分子基盤は依然不明である。ステロイド薬や免疫抑制薬に加え、近年では生物学的製剤による治療が進歩し、一定の予後の改善がもたらされているが、未だ特異的治療法は存在しない。近年、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を用いた解析により、自己免疫疾患の発症にIL-17やIL-21を産生し病態の惹起に寄与するTh17細胞が病態に深く関与することが明らかにされた(Betelli et al., 2006; Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2006)。そしてTh17細胞の分化にはIL-6またはIL-21によるSTAT3の活性化とその下流のTh17細胞の系列規定転写因子であるROR γ tの発現が必須であることが報告されている(Ivanov et al., 2006, Ciofani et al., 2012)。しかしながら、Th17細胞においてSTAT3の下流のシグナル伝達機構の詳細は不明であった。

そこで本研究者は、IL-6の存在下または非存在下で抗CD3抗体、抗CD28抗体、抗IL-4抗体、抗IFN- γ 抗体にて刺激したCD4陽性T細胞の遺伝子発現プロファイルを検討し、転写因子であるSox5およびc-MafがIL-6刺激により高発現することを見出した。c-MafはTh17細胞で高発現している事を本研究者は報告しており(Hiramatsu et al., 2010)、Batf, Rora, Runx1, Il1r1, Ccr6, and Tnf など様々なTh17関連遺伝子の発現に影響を及ぼしている事が明らかとなっている(Ciofani et al., 2012)。一方、Sox5はDNA結合ドメインであるHMG boxと二量体形成のためのcoiled-coilドメインをもつ転写因子で、転写活性化ドメインをもたないものの、他の転写因子と結合することにより転写活性化や転写抑制に様々な役割が報告されている(Lefebvre, 2010)。しかしながら、T細胞分化におけるSox5の役割は不明であった。

2. 研究の目的

したがって本申請研究では、Th17細胞の分化制御および自己免疫疾患の発症におけるSox5の役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CD4陽性T細胞に発現するSox5アイソフォームの同定

CD4陽性T細胞には既知のSox5アイソフォームの発現が認められなかったため、オリゴキャッピング RACE 法を用いて CD4陽性T細胞に発現する新規 Sox5 アイソフォームを検討した。

(2) CD4陽性T細胞のSox5の発現におけるStat3の役割の検討

Stat3欠損CD4陽性T細胞を用いて Sox5の発現における Stat3の役割を検討した。

(3) T細胞特異的 Sox5 欠損マウスにおける

EAEの発症および遅延型過敏反応の検討

Th17細胞依存性の自己免疫炎症における Sox5の役割を検討する為に、T細胞特異的 Sox5欠損マウスの EAE および遅延型過敏反応の検討を行った。

(4) Sox5欠損CD4陽性T細胞のTh17細胞分化の検討

in vitroにおいて Sox5欠損CD4陽性T細胞のTh17細胞分化を検討した。

(5) Sox5の過剰発現によるTh17細胞分化の検討

レトロウイルスを用いて CD4陽性T細胞に Sox5 および c-Maf を過剰発現させ Th17細胞分化を検討したところ、Sox5単独では Th17細胞分化誘導されないが、c-Mafと Sox5を共発現させることにより neutral 条件においても Th17細胞分化が誘導される事が判明した。そこで Stat3欠損CD4陽性T細胞および ROR γ t欠損CD4陽性T細胞をもちいて、Sox5および c-Mafによる Th17細胞分化のシグナル伝達経路を検討した。

さらに Sox5および c-Maf を過剰発現した CD4陽性T細胞を用いて、RNA シーケンスおよびクロマチン免疫沈降シーケンスを行い、Sox5と c-Maf による遺伝子発現プロファイルと、Sox5と c-Maf のゲノムへの結合部位を統合的に解析した。

(6) ROR γ tプロモーターの活性化におけるSox5およびc-Mafの役割の検討

CD4陽性T細胞においてレトロウイルスを用いて ROR γ tプロモーターのレポーターアッセイを行い、ROR γ tプロモーターの変異体解析を行うことにより、Sox5および c-Maf の ROR γ tプロモーターへの結合部位を解析した。

(7) Sox5およびc-Mafの結合ドメインの解析

Th17細胞において Sox5 および c-Maf の免疫沈降を行い、Sox5と c-Maf の会合の検討を行った。さらに Sox5 および c-Maf の各種ドメインの欠損変異体を作製し、Sox5と c-Maf の会合に必要なドメインや、Th17細胞分化に必要なドメインを検討した。

4. 研究成果

(1) CD4陽性T細胞に発現するSox5アイソフォームの同定

オリゴキャッピング RACE 法を用いて CD4陽性T細胞に発現する Sox5 を検討した。その結果、IL-6で刺激した CD4陽性T細胞に発現する Sox5 の転写開始点は既報の L-Sox5 (Lefebvre et al., 1998)より 572kb 上流にあり、L-Sox5のエクソン1に相当する13アミノ酸が欠失しており、既知の Sox5 アイソフォームとは違う事が明らかとなった。以下このアイソフォームを Sox5t と記載する。さらに各種臓器における Sox5t および L-Sox5の発現を qPCR 法で検討した所、Sox5t は naive CD4陽性T細胞には発現していないが、IL-6で刺激した CD4陽性T細胞に強く発現していた。一方 L-Sox5 は既報の通り脳や肝臓

で発現していたが、CD4 陽性 T 細胞では発現していなかった。これらの結果、IL-6 で刺激した CD4 陽性 T 細胞に新しい Sox5 アイソフォーム (Sox5t) が発現している事が明らかとなった。

(2) CD4 陽性 T 細胞の Sox5 の発現における Stat3 の役割の検討

Stat3 欠損マウスを用いて Stat3 シグナルが CD4 陽性 T 細胞の Sox5 の発現に関与しているかどうかをウェスタンブロット法にて検討した。Sox5 蛋白の発現は IL-6 で刺激された野生型 CD4 陽性 T 細胞や野生型 Th17 細胞で認められたが、Stat3 欠損 CD4 陽性 T 細胞では認められなかった。これらの結果、CD4 陽性 T 細胞における Sox5 の発現には Stat3 が必要である事が明らかとなった。

(3) T 細胞特異的 Sox5 欠損マウスにおける EAE の発症および遅延型過敏反応の検討

Th17 細胞依存性の自己免疫炎症における Sox5 の役割を検討する為に、T 細胞特異的 Sox5 欠損マウスを作製し EAE の発症を検討した。その結果、T 細胞特異的 Sox5 欠損マウスでは野生型マウスを比較して、EAE の発症が有意に抑制されおり、組織学的にも脊髄の炎症細胞浸潤や脱髄が抑制されており、また脳脊髄中に浸潤した CD4 陽性 T 細胞の IL-17 や IFN- γ の産生が有意に低下していることが明らかとなった。

従来、遅延型過敏反応は Th1 反応と考えられていたが、近年 Th17 細胞が遅延型過敏反応の増悪に関与している事が明らかとなっている (Ghilardi et al., 2004; McGeachy et al., 2009)。そこで T 細胞特異的 Sox5 欠損マウスを用いて遅延型過敏反応の発症を検討した。その結果、T 細胞特異的 Sox5 欠損マウスでは野生型マウスを比較して、遅延型過敏反応の発症が有意に抑制されおり、所属リンパ節の CD4 陽性 T 細胞からの IL-17A と IFN- γ の産生が有意に抑制されている事が明らかとなった。以上の結果、Sox5 は in vivo において Th17 細胞分化に重要な役割を果たしている事が明らかになった。

(4) Sox5 欠損 CD4 陽性 T 細胞の Th17 細胞分化の検討

次に in vitro において Sox5 欠損 CD4 陽性 T 細胞のヘルパー T 細胞分化を検討した。その結果、Sox5 欠損 CD4 陽性 T 細胞は、野生型 CD4 陽性 T 細胞と比較して有意に Th17 細胞分化条件下での IL-17A および IL-17F の産生が抑制されていた。一方、Th1 細胞分化、Th2 細胞分化、IL-21 産生 CD4 陽性 T 細胞分化、および誘導性 Treg 細胞分化の障害は Sox5 欠損 CD4 陽性 T 細胞において認めなかった。さらに Th17 細胞分化に関与する転写因子の発現を qPCR 法で検討した所、野生型 Th17 細胞と比較して Sox5 欠損 Th17 細胞で ROR γ t の発現が有意に低下していた。一方、他の Th17 細胞関連転写因子である ROR α , HIF1, c-Maf, BATF, IRF4, I κ b ζ などの発現の変化は認めなかった。

(5) Sox5 の過剰発現による Th17 細胞分化の検討

次に、CD4 陽性 T 細胞に Sox5t を過剰発現させ Th17 細胞分化を検討した。レトロウイルスを用いて Sox5t を CD4 陽性 T 細胞に過剰発現させ、neutral 条件で培養した所、Sox5t 単独では Th17 細胞分化は誘導されなかった。前述のように Th17 細胞では c-Maf が高発現していることから、c-Maf と Sox5t を CD4 陽性 T 細胞に共発現させ neutral 条件で培養した所、興味深いことに強く Th17 細胞分化を誘導する事が明らかとなった。一方、c-Maf を単独で CD4 陽性 T 細胞に過剰発現させても Th17 細胞分化は誘導されなかった。また L-Sox5 と c-Maf の過剰発現でも Sox5t と c-Maf と同様に Th17 細胞へ分化した事より、Sox5t と L-Sox5 で Th17 分化誘導能に差はないと考えられた。

次に c-Maf は IL-21 の産生を誘導することから、Sox5t と c-Maf の過剰発現による Th17 細胞分化が IL-21 に依存するかどうかを IL-21 欠損マウスを用いて検討した。その結果、IL-21 欠損 CD4 陽性 T 細胞においても Sox5t と c-Maf の過剰発現による Th17 細胞分化が認められた事より、Sox5t と c-Maf は IL-21 非依存的に Th17 細胞分化を誘導する事が明らかとなった。

さらに、Th17 細胞分化には Stat3 の活性化が必須である事から、Sox5t と c-Maf の過剰発現による Th17 細胞分化が Stat3 に依存するかどうかを T 細胞特異的 Stat3 欠損マウスを用いて検討した。その結果、Stat3 欠損 CD4 陽性 T 細胞においても Sox5t と c-Maf の過剰発現による Th17 細胞分化が認められた。Sox5 と c-Maf はともに Stat3 で誘導される事より、Sox5 と c-Maf は Stat3 の下流で Th17 細胞分化を誘導し、Stat3 の働きを一部において代償できる事が明らかとなった。

次に Sox5t と c-Maf の過剰発現による Th17 細胞分化の機序を明らかにする為に、Sox5t および c-Maf を過剰発現させ neutral 条件で培養した CD4 陽性 T 細胞を用いて、RNA シーケンス、および Sox5 と c-Maf のクロマチン免疫沈降シーケンスを行い、Sox5 と c-Maf による遺伝子発現プロファイルと、Sox5 と c-Maf のゲノムへの結合部位を統合的に解析した。その結果、Sox5 と c-Maf は ROR γ t のプロモータ領域の同じ部位に結合し、強く ROR γ t mRNA の発現を誘導していた。一方、他の Th17 関連転写因子の発現は Sox5 と c-Maf により誘導されない事が明らかとなった。

さらに、Th17 細胞分化には ROR γ t の発現が必須である事から、Sox5t と c-Maf の過剰発現による Th17 細胞分化が ROR γ t に依存するかどうかを ROR γ t 欠損マウスを用いて検討した。その結果、ROR γ t 欠損 CD4 陽性 T 細胞においては Sox5t と c-Maf の過剰発現による Th17 細胞分化が完全に障害されることが明らかとなった。以上より、Sox5 と c-Maf は Stat3 の下流でかつ ROR γ t の上流で Th17 細胞分化を

誘導している事が明らかとなった。

(6) ROR γ t プロモーターの活性化における Sox5 および c-Maf の役割の検討

次に *Rorc* 遺伝子座への c-Maf の結合における Sox5 の役割を検討するため、Sox5 欠損 CD4 陽性 T 細胞を Th17 条件で 8 時間培養し c-Maf とヒストンアセチル化酵素である p300 の *Rorc* 遺伝子座への結合をクロマチン免疫沈降 qPCR 法で解析した。その結果、Sox5 欠損 CD4 陽性 Th17 細胞では野生型 Th17 細胞と比較して c-Maf の *Rorc* 遺伝子座への結合は著しく減弱し、p300 の結合も阻害される事が明らかとなった。c-Maf は p300 と結合することにより転写活性化を促進する事が報告されていることから (Chen et al., 2002)、Sox5 欠損 Th17 細胞では c-Maf の *Rorc* 遺伝子座への結合が阻害されることにより p300 の動員が阻害されると考えられた。

次に CD4 陽性 T 細胞においてレトロウイルスを用いて ROR γ t プロモーターのレポーターアッセイを行い、-2kb の ROR γ t プロモーターを Sox5 と c-Maf が協調的に活性化する事を見いだした。そして -2 kb ROR γ t プロモーターの予測 Sox5 結合領域と c-Maf 結合領域 (MARE) に変異を導入した Δ Sox5- Δ MARE-ROR γ t プロモーターでは Sox5 と c-Maf による ROR γ t プロモーターの活性化は有意に阻害された。また Th17 細胞における -2 kb ROR γ t プロモーターと Δ Sox5- Δ MARE-ROR γ t プロモーターの活性化を検討した所、 Δ Sox5- Δ MARE-ROR γ t プロモーターでは有意に活性化が減弱していた。以上の結果、Sox5 と c-Maf は協調的に ROR γ t プロモーターに結合することにより、プロモーター活性を亢進する事が明らかとなった。

(7) Sox5 および c-Maf の結合ドメインの解析
前述の (5) で行ったクロマチン免疫沈降シーケンスの結果、Sox5 と c-Maf がゲノムの同じ部位に結合していることが高頻度で認められたため、Sox5 と c-Maf が会合している可能性が考えられた。そこで Th17 細胞の細胞可溶物を c-Maf で免疫沈降を行ったところ沈降物に Sox5 が同定され、Sox5 と c-Maf が Th17 細胞内で会合している事が明らかとなった。また DNA を介して Sox5 と c-Maf が会合している可能性も考えられた為、DNA をキレートするエチジウムブロマイド (EtBr) の存在下で免疫沈降を行ったが、EtBr の存在下でも Sox5 と c-Maf の会合は同定されたため、Sox5 と c-Maf は DNA を介さずに会合している事が明らかとなった。さらに Sox5 および c-Maf の各種ドメインの変異体を作製し、Sox5 の HMG ドメインと c-Maf の DNA 結合ドメインを介して両者が会合している事が明らかとなった。

得られた成果の国内外における位置づけとインパクトと今後の展望

本研究の結果、Th17 細胞で Sox5 と c-Maf が Stat3 依存的に発現し、両者が ROR γ t プロモーターに結合することにより協調的に ROR γ t

の発現と Th17 細胞分化を誘導する事を明らかにした。Stat3 の下流で ROR γ t の発現誘導をする分子として HIF-1 がすでに報告されているが (Dang et al., 2011)、本研究により Stat3 の下流で ROR γ t を誘導する新たな経路が明らかとなった。近年、すでに Th17 細胞分化した細胞においても ROR γ t の発現を抑制することにより Th17 細胞分化が抑制される事が報告されている事から、ROR γ t の発現制御機構の解明は ROR γ t を標的とした自己免疫疾患治療の基盤を構築する意味においても重要な研究と考えられる。

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 14 件)

IL-21-producing c-Maf-expressing CD4+ T cells induce effector CD8+ T cells and enhance autoimmune inflammation in scurfy mice. Iwamoto T, Suto A, Tanaka S, Takatori H, Suzuki K, Iwamoto I, Nakajima H. *Arthritis Rheumatol*. 2014. 巻不明、ページ不明、査読有、doi: 10.1002/art.38658.

AT-Rich-Interactive Domain-Containing Protein 5A Functions as a Negative Regulator of Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Nuclear Receptor γ t-Induced Th17 Cell Differentiation. Saito Y, Kagami S, Sanayama Y, Ikeda K, Suto A, Kashiwakuma D, Furuta S, Iwamoto I, Nonaka K, Ohara O, Nakajima H. *Arthritis Rheumatol*. 2014.66:1185-94. 査読有、doi: 10.1002/art.38324.

Th2-type inflammation instructs inflammatory dendritic cells to induce airway hyperreactivity. Iwata A, Kawashima S, Kobayashi M, Okubo A, Kawashima H, Suto A, Hirose K, Nakayama T, Nakajima H. *Int Immunol*. 2014.26:103-14. 査読有、doi: 10.1093/intimm/dxt047.

Tumor suppressor p53 inhibits systemic autoimmune diseases by inducing regulatory T cells. Kawashima H, Takatori H, Suzuki K, Iwata A, Yokota M, Suto A, Minamino T, Hirose K, Nakajima H. *J Immunol*. 2013.191:3614-23. 査読有、doi: 10.4049/jimmunol.1300509.

Alteration of circulating miRNAs in SSc: miR-30b regulates the expression of PDGF receptor β . Tanaka S, Suto A, Ikeda K, Sanayama Y, Nakagomi D, Iwamoto T, Suzuki K, Kambe N, Matsue H, Matsumura R, Kashiwakuma D, Iwamoto I, Nakajima H. *Rheumatology (Oxford)*. 2013.52:1963-72. 査読有、doi: 10.1093/rheumatology/ket254.

Role of calcium ionophore A23187-induced activation of IkappaB kinase 2 in mast cells. Hosokawa J, Suzuki K, Nakagomi D,

Tamachi T, Takatori H, Suto A, Nakajima H. Int Arch Allergy Immunol. 2013.161:37-43. 査読有、doi: 10.1159/000350357.

[18F]FDG uptake in proximal muscles assessed by PET/CT reflects both global and local muscular inflammation and provides useful information in the management of patients with polymyositis/dermatomyositis. Tanaka S, Ikeda K, Uchiyama K, Iwamoto T, Sanayama Y, Okubo A, Nakagomi D, Takahashi K, Yokota M, Suto A, Suzuki K, Nakajima H. Rheumatology (Oxford). 2013.52:1271-8. 査読有、doi: 10.1093/rheumatology/ket112.

B and T lymphocyte attenuator inhibits LPS-induced endotoxic shock by suppressing Toll-like receptor 4 signaling in innate immune cells. Kobayashi Y, Iwata A, Suzuki K, Suto A, Kawashima S, Saito Y, Owada T, Kobayashi M, Watanabe N, Nakajima H. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013.110:5121-6. 査読有、doi: 10.1073/pnas.1222093110.

Therapeutic potential of B and T lymphocyte attenuator expressed on CD8+ T cells for contact hypersensitivity. Nakagomi D, Suzuki K, Hosokawa J, Kobayashi Y, Suto A, Takatori H, Watanabe N, Matsue H, Murphy TL, Murphy KM, Shimada S, Nakajima H. J Invest Dermatol. 2013.133:702-11. 査読有、doi: 10.1038/jid.2012.396.

Bucillamine-induced yellow nail in Japanese patients with rheumatoid arthritis: two case reports and a review of 36 reported cases. Nakagomi D, Ikeda K, Kawashima H, Kobayashi Y, Suto A, Nakajima H. Rheumatol Int. 2013.33:793-7. 査読有、doi: 10.1007/s00296-011-2241-z.

Pre-dinner administration increases the efficacy of proton pump inhibitors on refractory GERD symptoms in connective tissue disease patients. Iwata A, Ikeda K, Hirose K, Takatori H, Takahashi K, Sanayama Y, Tanaka S, Suto A, Nakajima H. Mod Rheumatol. 2013.23:357-64. 査読有、doi: 10.1007/s10165-012-0662-5.

Subtilase cytotoxin enhances Escherichia coli survival in macrophages by suppression of nitric oxide production through the inhibition of NF- κ B activation. Tsutsuki H, Yahiro K, Suzuki K, Suto A, Ogura K, Nagasawa S, Ihara H, Shimizu T, Nakajima H, Moss J, Noda M. Infect Immun. 2012.80:3939-51. 査読有 doi: 10.1128/IAI.00581-12.

Overexpression of ROR γ t under control of the CD2 promoter induces polyclonal plasmacytosis and autoantibody production in transgenic mice. Yoh K, Morito N, Ojima M, Shibuya K, Yamashita Y,

Morishima Y, Ishii Y, Kusakabe M, Nishikii H, Fujita A, Matsunaga E, Okamura M, Hamada M, Suto A, Nakajima H, Shibuya A, Yamagata K, Takahashi S. Eur J Immunol. 2012.42:1999-2009. 査読有、doi: 10.1002/eji.201142250.

Lack of B and T lymphocyte attenuator exacerbates autoimmune disorders and induces Fas-independent liver injury in MRL-lpr/lpr mice. Oya Y, Watanabe N, Kobayashi Y, Owada T, Oki M, Ikeda K, Suto A, Kagami S, Hirose K, Kishimoto T, Nakajima H. Int Immunol. 2011.23:335-44. 査読有、doi: 10.1093/intimm/dxr017.

〔学会発表〕(計1件)

S. Tanaka, K Ikeda, K. Uchiyama, T. Iwamoto, Y. Sanayama, A. Okubo, D. Nakagomi, K. Takahashi, M. Yokota, A. Suto, K. Suzuki, H. Nakajima [18F] FDG uptake in proximal muscles assessed by PET/CT reflects both global and local muscular inflammation and provides useful information in the management of patients with polymyositis/dermatomyositis. EULAR Congress 2013 マドリッド スペイン 2013年6月12日~6月15日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.jp/class/allergy/research/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

須藤 明 (SUTO, Akira)

千葉大学・大学院医学研究院・特任准教授
研究者番号: 50447306

(2)研究分担者

鈴木 浩太郎 (SUZUKI, Kotaro)

千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 90554634

(3)連携研究者

中島 裕史 (NAKAJIMA, Hiroshi)

千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 00322024