

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 18 日現在

機関番号：14301
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659500
 研究課題名（和文） IL-17 高産生細胞株の発見とその分子メカニズム解析による新規炎症制御法の開発に関する研究
 研究課題名（英文） A study on the development of new strategy to control inflammation using molecular mechanism of a IL-17 high-producing cell line.
 研究代表者
 臼井 崇 (USUI TAKASHI)
 京都大学・医学研究科・非常勤講師
 研究者番号：90362483

研究成果の概要（和文）：

申請者は膠原病を含む自己免疫性炎症性疾患病態における重要なサイトカインである IL-17 を高産生するマウス T 細胞クローンを分離した。さらに同一起源の IL-17 をほとんど産生しないクローンも複数分離し、それらの形質が安定していることを確認した。これらのクローン細胞を用いて DNA, RNA およびエピジェネティックレベルでの分子機序解析を行なった。結果これらの形質は DNA 配列によって制御されているのではなく、IL-17 プロモーター領域のメチル化・脱メチル化というエピジェネティックレベルで制御されていることが分かった。またその原因候補遺伝子 X をマイクロアレイ解析によって同定した。本発見はこれまでと全く異なる作用機序による薬剤の開発の一助となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

IL-17 is an important cytokine in the pathogenesis of autoimmune inflammatory disease, including collagen disease. We established stable murine T cell clones which produce a large amount of IL-17 as well as its low producer from the same T cell line. Then we can analyzed its molecular mechanisms by DNA sequence, RNA (microarray) and epigenetic levels. Although we could not differences in DNA sequence in the promoter region and the expressions of transcriptional factors, we found methylation and de-methylation status were quite different in these clones. Furthermore, we found gene-X could control it. These findings will lead to new-generation strategy for controlling autoimmune inflammatory disease, including collagen disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：IL-17、マイクロアレイ、エピジェネティック制御、ChiP 解析

1. 研究開始当初の背景

近年、膠原病を含む自己免疫性炎症性疾患において、サイトカインの 1 つである IL-17 を主に産生する Th17 細胞の役割が注目されている。しかし従来の Th1, Th2 細胞と異なり、in-vitro における Th17 の誘導および安定的な維持は明らかに困難・不安定でありその分子メカニズムを解析するツールが不足

していた。

2. 研究の目的

上記背景の中、申請者らは偶然マウス細胞株の中に IL-17 を極めて多量に産生する細胞株を発見し、クローニングすることに成功した。これらのクローン細胞の形質は安定しているため、マイクロアレイ、エピジェネテ

ニック解析によって IL-17 高産生性を獲得した分子メカニズムの解析可能となる。その分子メカニズムが明らかとなれば、新規の IL-17 をターゲットとした免疫制御法が可能になると考えた。

3. 研究の方法

すでに樹立した同じ細胞株を親株とする IL-17A/F 高産生クローン数クローン、およびその対照クローン数株を用いて以下の解析を行なう。

1) 樹立細胞株間のゲノムレベル比較解析

全ゲノムのコピー数の増幅や欠損を包括的かつ高密度に解析できるアジレント社の CGH アレイを施行し、ゲノムレベルでクローン間に差があるかどうかを解析する。

2) 樹立細胞株間の mRNA レベル比較解析

IL-17A/F 高産生株特異的に発現が亢進あるいは低下している遺伝子をピックアップする。次に PCR バリデーション、蛋白レベルのバリデーションを行い、発現ベクター構築による強制発現系、および siRNA/shRNA による knock-down での機能評価を行う。

3) 樹立細胞株間のレポーターアッセイによるシスエレメント機能比較解析

IL-17A, F それぞれのプロモーター領域、および種間で配列が良く保存されている conserved DNA シークエンス領域をクローニングし、ルシフェラーゼレポーターに組み込んだベクターを、樹立した各細胞株に導入し、組み込んだ DNA の機能に細胞株間で差異が存在するかどうかを解析する。これでもし差異があれば、その部位に対するトランスエレメント（転写因子等）が原因であることが分かり、ターゲットを絞ることができる。しかし、差が見いだせなければ他の部位での検証を追加していく。

4) エピジェネティック制御レベルの樹立細胞株間の比較解析

アジレント社の DNA メチル化解析マイクロアレイ、および Chip-on-Chip 解析を行う。特に上記の解析ではそのメカニズムを明らかにすることが困難な場合に、その能力を発揮すると考えている。本解析により、そのメカニズムが DNA のメチル化・アセチル化修飾によるものである場合検出が可能となる。

4. 研究成果

1) 樹立細胞株間のゲノムレベル比較解析

アジレント社の CGH アレイを施行し、大きなゲノム領域の増幅や欠失等が細胞株間で差がないことを確認した。さらに IL-17A/F の各プロモーター領域においても明らかな差異は認められなかった。本解析結果により、これらのクローンの形質がゲノム上のシスエレメントの差異によるものではないことが示唆された。

2) 樹立細胞株間の mRNA レベル比較解析

IL-17A/F 高産生株特異的に発現が極めて亢進あるいは低下している遺伝子 80 個前後をピックアップした。さらに PCR バリデーション、蛋白レベルのバリデーションを行なった結果。特に特徴的な遺伝子を 30 数個まで絞り込んだ。それらを一つ一つ発現ベクター構築による強制発現系の実験を行なったところ遺伝子 X を原因遺伝子の有力候補として見いだした。この遺伝子 X を強制発現させことで、IL-17A/F 低発現細胞株を高発現細胞株に形質転換できることを証明し、さらに前述の絞り込んだ遺伝子 30 数個の過半数の遺伝子発現パターンを IL-17A/F 高発現型に転換できることが分かった。現在さらに siRNA/shRNA による knock-down での機能再確認中である。

3) 樹立細胞株間のレポーターアッセイによるシスエレメント機能比較解析

IL-17A, F それぞれのプロモーター領域、で種間で配列が良く保存されている conserved DNA シークエンス領域をクローニングし、ルシフェラーゼレポーターに組み込んだベクターを、樹立した各細胞株に導入し、組み込んだ DNA（プロモーターシークエンス）の機能に細胞株間で差異が存在するかどうかを解析した結果、特にクローン間で差異は見いだせず転写因子の量的・質的差が原因ではないことが示唆された。

4) エピジェネティック制御レベルの樹立細胞株間の比較解析

以上の結果は、IL-17A/F 高発現および低発現クローン間の差異が、ゲノムシークエンス・転写因子レベルによるものではないことを強く示唆している。さらに遺伝子 X がエピジェネティック制御に関わる可能性が推測されたため、アジレント社の DNA メチル化解析マイクロアレイ、および Chip-on-Chip 解析を行なった。

その結果 IL-17A プロモーター領域においてメチル化 CpG、非メチル化 CpG が両クローン間で大きな差異があることを見いだした。またこの差異は TNF- α プロモーター領域では認められず、サイトカイン特異であることが示唆された。現在このエピジェネティックな変化と遺伝子 X の分子メカニズムについて研究を進めている。

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 9 件）

1. Three Groups in the 28 Joints for Rheumatoid Arthritis Synovitis - Analysis Using More than 17,000 Assessments in the KURAMA Database.

Terao C, Hashimoto M, Yamamoto K, Murakami K, Ohmura K, Nakashima R, Yamakawa N, Yoshifuji H, Yukawa N, Kawabata D, Usui T, Yoshitomi H, Furu M, Yamada R, Matsuda F, Ito H, Fujii T, Mimori T. PLoS One. 2013;8(3):e59341.

2. NEFA/nucleobindin-2 is a target autoantigen of the anti-Wa antibody and is associated with transfer RNA.

Imura Y, Shirai Y, Nojima T, Nakashima R, Yamagata H, Miyachi K, Yoshifuji H, Kawabata D, Ohmura K, Usui T, Fujii T, Mimori T. Mod Rheumatol. 2012 Sep;22(5):685-94.

3. Follistatin-related protein / follistatin-like 1 evokes an innate immune response via CD14 and toll-like receptor

4. Murakami K, Tanaka M, Usui T, Kawabata D, Shiomi A, Iguchi-Hashimoto M, Shimizu M, Yukawa N, Yoshifuji H, Nojima T, Ohmura K, Fujii T, Umehara H, Mimori T. FEBS Lett. 2012 Feb 17;586(4):319-24.

4. Correlation of antinuclear antibody and anti-double-stranded DNA antibody with clinical response to infliximab in patients with rheumatoid arthritis: a retrospective clinical study. Yukawa N, Fujii T, Kondo-Ishikawa S, Yoshifuji H, Kawabata D, Nojima T, Ohmura K, Usui T, Mimori T. Arthritis Res Ther. 2011;13(6):R213.

5. Overexpression of a minimal domain of calpastatin suppresses IL-6 production and Th17 development via reduced NF- κ B and increased STAT5 signals. Iguchi-Hashimoto M, Usui T, Yoshifuji H, Shimizu M, Kobayashi S, Ito Y, Murakami K, Shiomi A, Yukawa N, Kawabata D, Nojima T, Ohmura K, Fujii T, Mimori T. PLoS One. 2011;6(10):e27020.

6. Myelin basic protein as a novel genetic risk factor in rheumatoid arthritis—a genome-wide study combined with immunological analyses.

Terao C, Ohmura K, Katayama M, Takahashi M, Kokubo M, Diop G, Toda Y, Yamamoto N; Human Disease Genomics Working Group; Rheumatoid Arthritis (RA) Clinical and Genetic Study Consortium, Shinkura R, Shimizu M, Gut I, Heath S, Melchers I, Manabe T, Lathrop M, Mimori T, Yamada R, Matsuda F. PLoS One. 2011;6(6):e20457.

7. Interferon-gamma release assay for diagnosing Mycobacterium tuberculosis infections in patients with systemic lupus erythematosus.

Takeda N, Nojima T, Terao C, Yukawa N, Kawabata D, Ohmura K, Usui T, Fujii T, Ito Y, Iinuma Y, Mimori T. Lupus. 2011 Jul;20(8):792-800.

8. The human AIRE gene at chromosome 21q22 is a genetic determinant for the predisposition to rheumatoid arthritis in Japanese population.

Terao C, Yamada R, Ohmura K, Takahashi M, Kawaguchi T, Kochi Y; Human Disease Genomics Working Group; RA Clinical and Genetic Study Consortium, Okada Y, Nakamura Y, Yamamoto K, Melchers I, Lathrop M, Mimori T, Matsuda F. Hum Mol Genet. 2011 Jul 1;20(13):2680-5.

9. A case of antisynthetase syndrome in a rheumatoid arthritis patient with anti-PL-12 antibody following treatment with etanercept.

Ishikawa Y, Yukawa N, Kawabata D, Ohmura K, Fujii T, Usui T, Mimori T. Clin Rheumatol. 2011 Mar;30(3):429-32.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白井 崇 (USUI TAKASHI)

京都大学・医学研究科・非常勤講師

研究者番号：90362483