

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790091

研究課題名(和文) IL-23 p19、IL-27 EBI3とこれらの新しい会合分子による免疫応答の制御

研究課題名(英文) Regulation of immune responses by IL-23 p19, IL-27 EBI3 or their new heterodimer

研究代表者

溝口 出 (Mizoguchi, Izuru)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：00569527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、IL-6/IL-12ファミリーサイトカインIL-27とIL-35の共通サブユニットEBI3が、IL-27とIL-35非依存的にEBI3単独で細胞内分子として新たな機能を見出した。つまり、EBI3が、オートファジーによるユビキチン化蛋白質の分解を担うScaffold蛋白質p62/SQSTM1に結合し、腸炎誘導に重要なIL-23レセプターのユビキチン化による蛋白分解を阻害し、IL-23シグナルを増強し腸炎を誘発するという新しい可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we found that the common subunit, EBI3, between the IL-6/IL-12 family cytokines IL-27 and IL-35 plays a novel role as an intracellular molecule in IL-27/IL-35-independent manner. Namely, EBI3 was presumably demonstrated to associate with the scaffold protein p62/SQSTM1, which plays a critical role in the degradation of ubiquitinated protein by autophagy, and therefore inhibit the degradation of ubiquitinated IL-23 receptor, possibly resulting in induction of colitis by augmentation of IL-23 signaling.

研究分野：免疫学

キーワード：IL-27 EBI3 腸炎 IL-23R

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、2つの異なるサブユニットからなるヘテロダイマーであるというユニークな特徴を有し、主にマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞より産生され、ヘルパーT (Th) 細胞の分化誘導やエフェクター機能の制御に重要な役割を担っている。近年、このファミリーサイトカインのサブユニット分子の欠損マウスが作製され、個々のサブユニット分子が既知のサイトカインとして機能しているだけでは説明しきれない現象が見出され、新たな機能的な会合分子の存在やサブユニット単独の機能など、新しい展開が示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究では、予備的実験結果より、IL-27 および IL-35 のサブユニットの1つ EB13 が、IL-27/IL-35 とは関係なく、新たに EB13 単独で細胞内分子として腸炎の誘導を増強している可能性を見出したので、その意義と作用機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ナイーブ CD4⁺T 細胞の免疫不全マウスへの移入による発症する腸炎モデル

野生型 C57BL/6 マウスおよび EB13 欠損マウス (Jackson より購入) 由来ナイーブ CD4⁺T 細胞を AutoMACS Pro (ミルテニーバイオテック) またはフローサイトメーターを用いたソーティングにより精製し、免疫不全 RAG2 欠損マウスの尾静脈より静注し、経時的に体重測定と糞便状態の観察による腸炎症のスコアリングを行った。8 週後、大腸を取り出し、腸の長さの測定、ホルマリン固定後ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色による浸潤細胞の数や腸粘膜の肥厚など組織学的解析を行った。次に、大腸を小さく切断後、コラゲナーゼ D と DNase I で消化し、パーコール比重遠心法により粘膜固有層リンパ球を分離した。さらに、このリンパ球を Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) と Ionomycin で刺激後、抗サイトカイン抗体を用いて、細胞内のサイトカイン染色を行った。また、固相化抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で刺激し、48 時間後の培養上清中のサイトカイン産生量を ELISA を用いて測定した。

(2) Th 分化誘導と機能解析

野生型 C57BL/6 マウスおよび EB13 欠損マウス (Jackson より購入) 由来ナイーブ CD4⁺T 細胞を精製後、Th1 分化条件 (IL-12+抗 IL-4 抗体) 下、非病原性 Th17 分化条件 (TGF-β1+IL-6+抗 IL-4 抗体+抗 IFN-γ 抗体) 下、病原性 Th17 分化条件 (IL-1β+IL-6+IL-23+抗 IL-4 抗体+抗 IFN-γ 抗体) 下、固相化抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で刺激し、3 日後に IL-2 を加え、6 日後に PMA と Ionomycin で刺激後、抗サイトカイン抗体を用いて、細胞内のサイ

トカイン染色を行った。また、固相化抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で刺激し、48 時間後の培養上清中のサイトカイン産生量を ELISA を用いて測定した。

(3) 免疫沈降反応とウエスタンブロット解析

既報の p62/Sequestosome 1 (SQSTM1) 遺伝子の配列より PCR を用いてその cDNA をクローニングし、FLAG のタグ付きの発現ベクターに入れて p62/SQSTM1 発現ベクターを構築した。次に、EB13 の発現ベクターと共にヒト胎児腎細胞 HEK293T に Fugene 6 を用いて一過性に遺伝子導入し、48 時間後細胞溶解液を調製し、抗 FLAG 抗体 (シグマ社) および抗 EB13 抗体 (Santa Cruz 社) 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、それぞれ反対の抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。

(4) 蛍光免疫組織学的手法による蛋白質の共局在解析

EB13 発現ベクターを HEK293T 細胞に Fugene 6 を用いて一過性に遺伝子導入し、次に、サイトスピンを用いてスライドガラスの上に単層塗抹標本作製し、蛍光標識した抗 FLAG 抗体と抗 EB13 抗体、核を DAPI で染色し、顕微鏡下で観察した。

4. 研究成果

(1) T 細胞での EB13 の役割

野生型 C57BL/6 マウス由来ナイーブ CD4⁺T 細胞を固相化抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で刺激すると、経時的に EB13 の mRNA および蛋白レベルでの発現増強が誘導されたが、この時、p35 および p28 の発現は殆ど見られなかった。そこで、次に、この T 細胞での EB13 の役割を、免疫不全マウスヘナイーブ CD4⁺T 細胞を移入して発症させる腸炎モデルを用いて検討した。その結果、EB13 発現が欠失していると、体重減少の阻害や、腸の短縮の抑制、腸のホルマリン固定後 HE 染色による組織学的解析による炎症誘導の軽減が見られ、腸炎の誘導が抑制されることを見出した。この時、腸の粘膜固有層リンパ球を調製し、PMA と Ionomycin で刺激し、サイトカインの細胞内染色を行ったところ、IFN-γ⁺IL-17⁺CD4⁺T 細胞の割合の低下と、反対に IFN-γ⁺IL-17⁺CD4⁺T 細胞の割合の増加が見られ、Th17 細胞の可塑性が低下していた。さらに、この粘膜固有層リンパ球を固相化抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で刺激すると、IFN-γ や GM-CSF、TNF-α 産生が低下していた。

次に、in vitro で野生型および EB13 欠損マウス由来ナイーブ CD4⁺T 細胞を、T 細胞・NK 細胞を除去し放射線照射した脾臓細胞を抗原提示細胞として抗 CD3 抗体で種々の Th 分化条件下で刺激し、細胞内のサイトカイン染色を行うと、病原性 Th17 分化条件下で刺激した時に、上述の in vivo と同様に EB13 発現が

欠失していると IFN- γ ⁺IL-17⁺CD4⁺T 細胞の割合が低下した。この現象は、非病原性 Th17 分化条件下では差がみられなかった。そこで、次に、この IFN- γ ⁺IL-17⁺CD4⁺T 細胞の割合の低下が、EBI3 がサイトカイン様に細胞外に分泌されて効いているのかについて調べた。GFP のトランスジェニックマウスより精製したナイーブ GFP⁺EBI3^{+/+}CD4⁺T 細胞と、EBI3 欠損マウス由来のナイーブ GFP⁺EBI3^{-/-}CD4⁺T 細胞を等量混ぜた共培養系と、それぞれ個別の培養系で、病原性 Th17 分化条件下で刺激したところ、共培養系でも個別培養系と同様に、IFN- γ ⁺IL-17⁺CD4⁺T 細胞の割合が低下した。このことより、EBI3 は細胞外へ分泌されて効いているのではなく、細胞内分子として効果を発揮している可能性が示唆された。

以上の様に、IFN- γ 発現の低下が IL-23 を用いる病原性 Th17 分化条件下でのみ見られ、さらに、最近明らかになった Th17 細胞の可塑性には IL-23 シグナルが重要であること (Hirota et al. Nat Immunol 2011) などより、次に、IL-23 のシグナル伝達を調べた。その結果、IFN- γ 産生の上流のシグナルである転写因子 T-bet 発現や STAT3 のリン酸化、さらに、IL-23 レセプター (R) 発現が低下していた。

(2) EBI3 による IL-23R 発現の安定化

この時、リアルタイム RT-PCR 解析により、この IL-23R 発現低下は mRNA レベルでは見られず、さらに、蛋白合成阻害剤シクロヘキシミド処理による IL-23R 蛋白質発現を調べたところ、蛋白質発現の安定性の低下による現象であった。

次に、HEK293T 細胞に IL-23R-FLAG と IL-12R β 1-HA 発現ベクターを遺伝子導入し、IL-23 刺激後 IL-23R のユビキチン化を、細胞溶解液を抗 FLAG 抗体で免沈後抗ユビキチン抗体でウエスタンブロットを行うと、IL-23R のユビキチン化が見られ、この時 EBI3 を共発現させるとユビキチン化が抑制されることを見出した。

(3) EBI3 の p62/SQSTM1 との会合

p62/SQSTM1 は、ユビキチン結合領域とオートファゴソームの主要構成蛋白質の 1 つ LC3 との結合領域を有し、ユビキチン化蛋白質の選択的オートファジーによる分解を担っている。そこで、HEK293T 細胞に、EBI3 と p62/SQSTM1 を発現させると、その細胞溶解液を用いた免疫沈降反応より両者の共沈が見られ、さらに、蛍光免疫組織学的解析より両者がオートファゴソームに共局在していることを見出した。以上より、EBI3 が p62/SQSTM1 に結合し、ユビキチン化や蛋白質の分解を阻害している可能性が示唆された。

(4) 本研究成果の意義と今後の展望

本研究により、EBI3 が T 細胞中で IL-27 や IL-35 などのサイトカインとしてではなく、細胞内分子として、オートファジーによるユビキチン化蛋白質の分解を担う p62/SQSTM1 に結合し、IL-23R のユビキチン化による蛋白分解を阻害し、IL-23 シグナルを増強し腸炎を誘発するという新しい EBI3 単独の機能とその作用機序を明らかにした。今後、さらに詳細な作用機序の解明と、癌などの他の免疫反応における同様な役割の解明が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

1. 徐明利、曲寧、溝口出、古澤純一、千葉祐規乃、伊藤正裕、善本隆之：炎症疾患における Th17 関連サイトカイン IL-17, IL-22, IL-23 の役割、炎症と免疫 23(2), 170-176, 2015. 査読無
2. Ohyashiki JH, Ohtsuki K, Mizoguchi I, Yoshimoto T, Katagiri S, Umezu T, Ohyashiki K. Down-regulated microRNA-148b in circulating PBMCs in chronic myeloid leukemia patients with undetectable minimal residual disease: A possible molecular classifier to stop imatinib safely. Drug Des Devel Ther. 8, 1151-1159, 2014. doi: 10.2147/DDDT.S66812. 査読有
3. Yoshimoto T, Mizoguchi I, Katagiri S, Tauchi T, Furusawa J, Chiba Y, Mizuguchi J, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Immunosurveillance markers may predict patients who can discontinue imatinib therapy without relapse. Oncoimmunology. 2014 May 14;3:e28861. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25057448>. 査読有
4. Terayama H, Yoshimoto T, Hirai S, Naito M, Qu N, Hatayama N, Hayashi S, Mitobe K, Furusawa J, Mizoguchi I, Kezuka T, Goto H, Suyama K, Moriyama H, Sakabe K, Itoh M. Contribution of IL-12/IL-35 common subunit p35 to maintaining the testicular immune privilege. PLoS One. 2014 Apr 23;9(4):e96120. doi: 10.1371/journal.pone.0096120. 査読有
5. Qu N, Xu M, Mizoguchi I, Furusawa J, Kaneko K, Watanebe K, Mizuguchi J, Itoh M, Kawakami Y, Yoshimoto T. Pivotal roles of T-helper 17-related cytokines, IL-17, IL-22 and IL-23, in inflammatory diseases. Clin Dev Immunol. 2013;2013:968549. doi: 10.1155/2013/968549. 査読有
6. Chiba Y, Mizoguchi I, Mitobe K, Higuchi K, Nagai H, Nishigori C, Mizuguchi J, Yoshimoto T. IL-27 enhances the expression of TRAIL and TLR3 in human melanomas and inhibits their tumor growth in cooperating with a TLR3 agonist poly(I:C) partly in TRAIL-dependent manner. PLoS One. 2013; 8(10):e76159. doi: 10.1371/journal.pone.

0076159. 査読有
7. Mizoguchi I, Yoshimoto T, Katagiri S, Mizuguchi J, Tauchi T, Kimura Y, Inokuchi K, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Sustained up-regulation of effector natural killer cells in chronic myeloid leukemia after discontinuation of imatinib. *Cancer Sci.* 104, 1146-1153, 2013. doi: 10.1111/cas.12216. 査読有
 8. Shimizu M, Ogura K, Mizoguchi I, Chiba Y, Higuchi K, Ohtsuka H, Mizuguchi J, Yoshimoto T. IL-27 promotes nitric oxide production induced by LPS through STAT1, NF- κ B and MAPKs. *Immunobiology.* 2013; 218:628-634. doi: 10.1016/j.imbio.2012.07.028. 査読有
 9. 千葉祐規乃、溝口出、森嶋紀子、徐明利、善本隆之：サイトカインのすべて IL-27、臨床免疫・アレルギー科、2012; 57 (Suppl. 21):172-183. 査読無
 10. 太田裕士、徐明利、溝口出、高梨正勝、須藤カツ子、黒田雅彦、善本隆之、粕谷和彦、土田明彦、畝崎榮：DCワクチンをリンパ節投与した際の局所滞留性と免疫誘導能の検討、東京医科大学雑誌、2012; 70 (4):444-449. 査読有
 11. 溝口出、森嶋紀子、善本隆之：サイトカインのすべて IL-30、臨床免疫・アレルギー科、57 (Suppl. 21), 188-196, 2012. 査読無
 12. 溝口出、樋口要、大塚裕美、善本隆之：抑制性サイトカインIL-10とIL-35による免疫反応の恒常性の維持、細胞工学、31 (No. 7), 765-771, 2012. 査読無

[学会発表] (計 18 件)

1. Chiba Y, Furusawa J, Mizoguchi I, Xu M, Mizuguchi J, Yoshimoto T. IL-27 exerts potent antitumor activity by promoting the differentiation of hematopoietic stem cells to M1-like antitumor macrophages and their mobilization. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会 (2014)12 月 10-12 日、京都
2. Furusawa J, Chiba Y, Mizoguchi I, Xu M, Mizuguchi J, Yoshimoto T. IL-27 promotes the differentiation of hematopoietic stem cells into multipotent myeloid progenitor cells. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会 (2014)12 月 10-12 日、京都
3. Chiba Y, Mizoguchi I, Hisada M, Tsuchida A, Mizuguchi J, Yoshimoto T. Regulation of antitumor immune responses through differentiation and mobilization of hematopoietic stem cells by IL-27. 第 73 回日本癌学会学術総会 (2014)9 月 25-27 日、横浜
4. Furusawa J, Chiba Y, Mitobe K, Mizoguchi I, Mizuguchi J, Yoshimoto T. IL-27 promotes the differentiation of hematopoietic stem cells into DC progenitor cells. 13th International Symposium on Dendritic Cells, DC2014. Tours, France, Sept. 14-18, 2014.
5. Furusawa J, Mizoguchi I, Mizuguchi J, Yoshimoto T. IL-27 promotes the differentiation of bone marrow cells into DC progenitor cells. 第 42 回日本免疫学会総会 (2013)12 月 11-13 日、幕張
6. Mizoguchi I, Mizuguchi J, Yoshimoto T. EBI3 promotes IL-23-mediated signaling resulting in the development of colitis by enhancing IFN- γ production. 第 42 回日本免疫学会総会 (2013)12 月 11-13 日、幕張
7. Katagiri S, Mizoguchi I, Yoshimoto T, Ohyashiki JH, Tauchi T, Inokuchi K, Ohyashiki K. Long-term up-regulation of effector NK cells in CML after stopping imatinib. 第 75 回日本血液学会学術集会 (2013)10 月 11-13 日、横浜
8. Ohtsuki K, Katagiri S, Mizoguchi I, Yoshimoto T, Ohyashiki JH, Tauchi T, Inokuchi K, Ohyashiki K. Clinical implication of down-regulated miR-148b in CML patients stopping imatinib. 第 75 回日本血液学会学術集会 (2013)10 月 11-13 日、横浜
9. Yoshimoto T, Mizoguchi I, Hisada M, Mizuguchi J. New approach for DC-mediated cancer vaccine using IL-27-expanded myeloid progenitor cells. 第 72 回日本癌学会学術総会 (2013)10 月 3-5 日、横浜
10. Mizoguchi I, Mitobe K, Tsunoda R, Higuchi K, Mizuguchi J, Yoshimoto T. EBI3 functions as an intracellular molecule to regulate the development of colitis in naive CD4⁺CD25⁻ T cells. 15th International Congress of Immunology. Milan, Italy, Aug. 22-27, 2013.
11. Katagiri S, Mizoguchi I, Yoshimoto T, Mizuguchi J, Ohyashiki JH, Tauchi T, Inokuchi K, Ohyashiki K. The percentage of effector populations of NK cells correlated highly with sustained CMR with or without imatinib in chronic myeloid leukemia patients. 18th Congress of the European Hematology Association. Stockholm, Sweden, Jun. 13-16, 2013.
12. Mizoguchi I, Mitobe K, Tsunoda R, Higuchi K, Mizuguchi J, Yoshimoto T. EBI3 functions as an intracellular molecule to regulate the development of colitis in naive CD4⁺CD25⁻ T cells. 第 78 回日本インターフェロン・サイトカイン学会総会(JSICR)/第 21 回マクロファージ分子細胞生物国際シンポジウム(MMCCB)合同学術集会 (2013)5 月 20-21 日、東京
13. Katagiri S, Mizoguchi I, Yoshimoto T, Mizuguchi J, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Activation levels of natural killer cells and CD8⁺ T cells correlate highly with sustained complete molecular response after discontinuation of imatinib in chronic

myeloid leukemia patients. 2012 ASH Annual Meeting and Exposition. Atlanta GA, USA, Dec. 8-11, 2012.

14. Shimizu M, Mizoguchi I, Mizuguchi J, Yoshimoto T. Induction of nitric oxide by macrophages stimulated with IL-27 and lipopolysaccharide through STAT1, NF-kB and MAPKs. 第 41 回日本免疫学会総会 (2012)12 月 5-7 日、神戸
15. Mizoguchi I, Mizuguchi J, Yoshimoto T. EB13 functions as an adaptor molecule associating with p62/SQSTM1 to regulate the development of colitis in CD4⁺ T cells. 第 41 回日本免疫学会総会 (2012)12 月 5-7 日、神戸
16. Yoshimoto T, Mizoguchi I, Katagiri S, Mizuguchi J, Ohyashiki J, Ohyashiki K. Activation levels of NK and CD8⁺ T cells correlate with sustained CMR after discontinuation of imatinib in CML patients. 第 71 回日本癌学会学術総会 (2012)9 月 19-21 日、札幌
17. Mizoguchi I, Mizuguchi J, Yoshimoto T. Cooperative growth inhibition of human melanomas by IL-27 and a TLR3 agonist poly(I:C) in TRAIL-dependent manner. 第 71 回日本癌学会学術総会 (2012)9 月 19-21 日、札幌
18. 太田裕士、徐明利、溝口出、高梨正勝、須藤カツ子、黒田雅彦、善本隆之、粕谷和彦、土田明彦、畝崎榮：DC ワクチンをリンパ節投与した際の局所滞留性と免疫誘導能の検討、第 132 年会日本薬学会(2012)3 月 28-31 日、札幌

[図書] (計 1 件)

1. Mizoguchi I, Higuchi K, Mitobe K, Tsunoda R, Mizuguchi J, Yoshimoto T. Interleukin-27: Regulation of immune responses and disease development by a pleiotropic cytokine with pro- and anti-inflammatory properties. In Cytokine Frontiers: Regulation of Immune Responses in Health and Disease. Editors: Yoshimoto T, Yoshimoto T. Publisher: Springer, Tokyo, pp. 353-375, 2013.

[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 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

溝口 出 (MIZOGUCHI, Izuru)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号：00569527

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし