

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461460

研究課題名(和文) 濾胞ヘルパーT細胞の分化及び関節リウマチ発症におけるBCL-3の役割の解明

研究課題名(英文) Roles of BCL-3 in the development of TFH cells and the pathogenesis of rheumatoid arthritis

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、我々は関節リウマチ(RA)患者におけるトシリズマブ治療の前後でCD4陽性T細胞内で発現が減弱する遺伝子としてBcl-3を同定した。本研究ではBcl-3のRA発症における役割を明らかにすることを目的とし、以下の実験結果を得た。Bcl-3を強制発現させたCD4陽性T細胞での遺伝子発現を網羅的に解析したところ、濾胞ヘルパーT細胞(TFH細胞)分化誘導におけるマスター転写因子であるBcl-6の発現が増強された。Bcl-3を強制発現させたCD4陽性T細胞はTFH細胞に分化した。以上よりBcl-3はTFH細胞分化に重要な働きをすることでRA発症に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have previously shown that expression of the Bcl-3 gene is down-regulated in CD4+ T cells from patients with rheumatoid arthritis (RA) following tocilizumab therapy. The objective of this study was to examine the role of Bcl-3 in the pathogenesis of RA. We examined the roles of IL-6 signaling in the induction of Bcl-3. We analyzed the gene expression profiles of Bcl-3-transduced CD4+ T cells by RNA sequencing. The effects of enforced expression of Bcl-3 on the development of follicular helper T (Tfh) cells were evaluated. IL-6 induced Bcl-3 expression in CD4+ T cells in a STAT3-dependent manner. Transcriptome analysis revealed that the expression of Bcl-6, a master regulator of Tfh cell differentiation, was significantly up-regulated by the enforced Bcl-3 expression. The enforced Bcl-3 expression increased the numbers of IL-21-producing Tfh-like cells. Bcl-3 is involved in the development of Tfh cells and the pathogenesis of RA, presumably by inducing IL-21 production.

研究分野：リウマチ学

キーワード：関節リウマチ Bcl-3 Bcl-6 濾胞ヘルパーT細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、我々は関節リウマチ(RA)患者におけるトシリズマブ治療の前後で CD4 陽性 T 細胞内で発現が減弱する遺伝子として Bcl-3 を同定したが、Bcl-3 の RA 発症における役割については不明であった。

2. 研究の目的

本研究では Bcl-3 の CD4 陽性 T 細胞における役割と RA 発症における役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) IL-6 刺激により CD4 陽性 T 細胞内で Bcl-3 が発現誘導されるか qPCR 法とウェスタンブロッティング法で検討した。

(2) マウスナীব CD4 陽性 T 細胞にレトロウイルスを用いて Bcl-3 を強制発現させたとき、発現誘導される遺伝子群を RNA シークエンシング法を用いて網羅的に解析した。

(3) Bcl-3 と Bcl-6 プロモーターとの結合を ChIP-qPCR にて解析した。

(4) Bcl-3 による Bcl-6 プロモーター活性化をルシフェラーゼアッセイにより検討した。

(5) Bcl-3 による濾胞ヘルパー T 細胞分化における役割を解析した。

4. 研究成果

(1) IL-6/STAT3 シグナルによる Bcl-3 の発現誘導

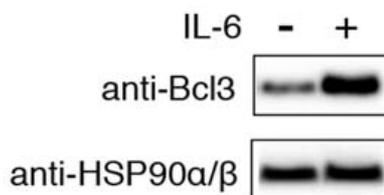


図1

C57/BL6 マウス脾臓よりナীব CD4 陽性 T 細胞を単離し、IL-6 刺激により Bcl-3 が発現誘導されるか否かを抗 Bcl3 抗体を用いたウェスタンブロッティング法により検討した(図1)。コントロールの HSP90a/b は IL-6 刺

激前後で同程度発現していたが、Bcl3 は IL-6

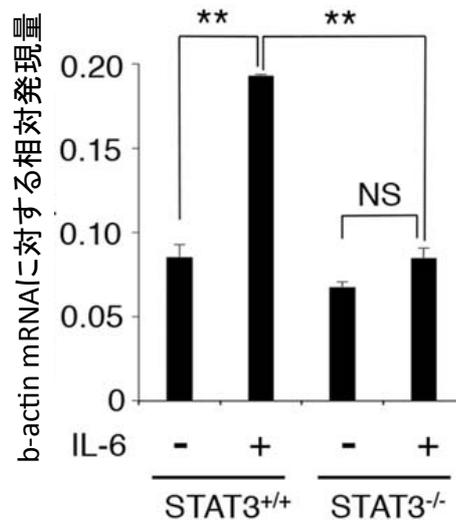


図2

刺激により有意に発現上昇が認められた。

次に IL-6 シグナルの下流分子である STAT3 が Bcl-3 に関与しているか否か明らかにするために STAT3 欠損マウス脾臓よりナীব CD4 陽性 T 細胞を単離し、IL-6 刺激により Bcl-3 が発現誘導されるか否かを qPCR 法により検討した(図2)。野生型マウス由来 CD4 陽性 T 細胞では IL-6 刺激により Bcl-3 mRNA の発現誘導が認められたが、STAT3 欠損マウス由来 CD4 陽性 T 細胞においては、野生型由来 CD4 陽性 T 細胞でみられた IL-6 刺激による Bcl-3 mRNA 発現増強が認められなかった(図2)。以上の結果より CD4 陽性 T 細胞内 Bcl-3 は IL-6/STAT3 シグナルによって発現誘導されていることが示唆された。この結果は、RA 患者におけるトシリズマブ治療の前後で CD4 陽性 T 細胞内 Bcl-3 の発現が減弱することと一致していた。

(2) CD4 陽性 T 細胞内で Bcl-3 に発現誘導される遺伝子群の網羅的解析

CD4 陽性 T 細胞における Bcl-3 の役割を明らかにするために C57/BL6 マウス脾臓よりナীব CD4 陽性 T 細胞を単離し、レトロウイルスを用いて Bcl-3 を強制発現させたとき、発現誘導される遺伝子群を RNA シークエンシング法を用いて網羅的に解析した(図3)。

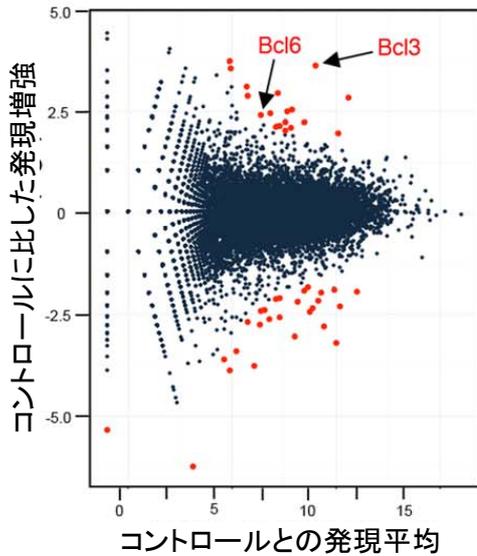


図3

Bcl-3 の強制発現により誘導された遺伝子群のなかには Bcl-3 も含まれており、この系が正しいことが示唆された。興味深いことに濾胞ヘルパー T 細胞のマスター転写因子である Bcl-6 が Bcl-3 の強制発現により発現誘導されることが明らかとなった(図3)。

さらに Bcl-3 の強制発現により発現誘導される遺伝子群の性質を Gene Ontology により分析した(図4)。

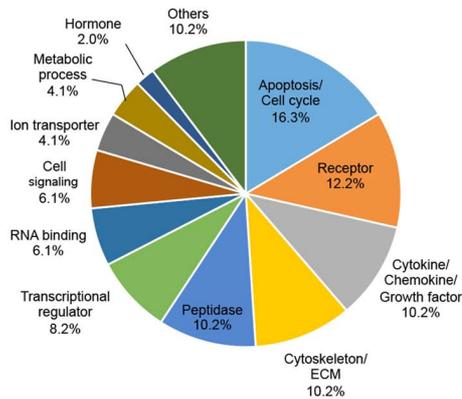


図4

Bcl-3 の強制発現により誘導された遺伝子群では、アポトーシスや受容体などの分子が多く含まれている傾向があった(図4)。

(3) Bcl-3 の Bcl-6 プロモーターへの結合

図3の結果を検証するために Bcl-3 強制発現により Bcl-6 mRNA の発現誘導が起きるかどうか qPCR 法を用いて検討した(図5)。C57/BL6 マウス脾臓よりナイーブ CD4 陽性 T 細胞を単離し、レトロウイルスを用いて

Bcl-3 を強制発現させ qPCR 法により Bcl-6 mRNA の発現量を検討したところ、Bcl-3 発現 CD4 陽性 T 細胞では、コントロールウイルス感染細胞に比して有意に Bcl-6 mRNA の発現が増強していた(図5)。以上の結果より、図3の結果と合わせ、Bcl-3 は Bcl-6 の発現を誘導していることが明らかとなったが、Bcl-3 が直接 Bcl-6 の誘導を制御しているか否かについては不明であった。

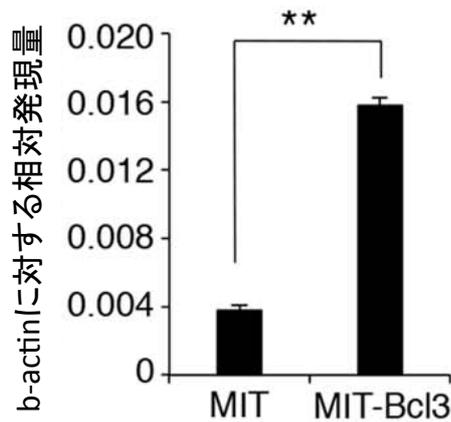


図5

そこで次に我々は、*BCL6* 遺伝子のプロモーター部位に Bcl-3 が結合するかどうか、ChIP-qPCR 法にて検討した(図6)。C57/BL6 マウス脾臓よりナイーブ CD4 陽性 T 細胞を単離し、レトロウイルスを用いて HA-Bcl-3 を強制発現させ、FACS ソーティングにより感染細胞を単離し、PMA と ionomycin により刺激後、抗 HA 抗体で免疫沈降し、*BCL6* 遺伝子のプロモーター部位に相当するいくつかの塩

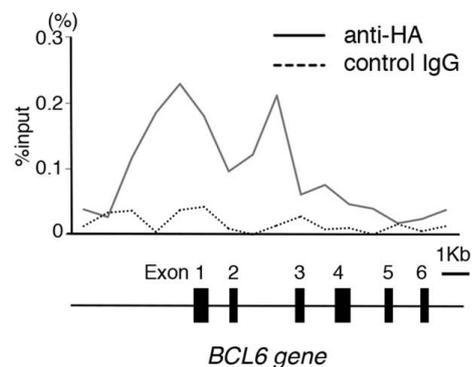


図6

基配列に対して qPCR 法を行った。コントロールとして、control IgG によって免疫沈降した検体に対して同様に qPCR を行った。図6に示す通り、control IgG によって免疫沈降した検体では *BCL6* 遺伝子のプロモーター

部位の qPCR でシグナルは検出できなかったが、抗 HA 抗体で免疫沈降したサンプルでは、*BCL6* 遺伝子のプロモーター部位の qPCR でシグナルの増強が観察された(図6)。

この結果より、Bcl-3 は *BCL6* 遺伝子のプロモーター部位に直接結合することが明らかとなった。

(4) Bcl-3 による Bcl-6 プロモーター活性化

次に我々は Bcl-3 が *BCL6* 遺伝子のプロモーター部位に直接結合するだけでなく、*BCL6* 遺伝子のプロモーターを活性化することができるか否かについて検討した。

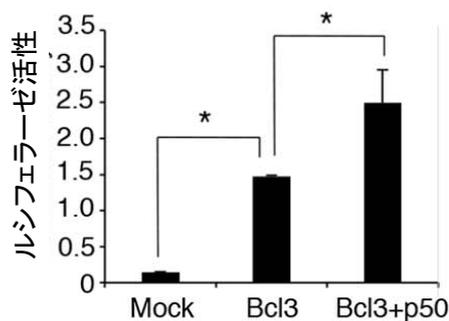


図7

T細胞株である EL4 に Bcl-3 と *BCL6* プロモーターによりルシフェラーゼの発現が活性化されるレポーターを遺伝子導入した後、ルシフェラーゼアッセイにより、細胞抽出液中のルシフェラーゼの活性を測定したところ、図7に示すように、コントロールに比して、Bcl-3 を発現させた EL4 ではルシフェラーゼの活性増強が認められた。Bcl-3 は atypical I κ B ファミリーの遺伝子であり、NF- κ B ファミリーである p50 とヘテロダイマーを形成して標的遺伝子の転写を活性化させることが知られているため、図7の実験において、Bcl-3 と p50 を共発現させてルシフェラーゼ活性を測定したところ、興味深いことに Bcl-3 と p50 を共発現させた EL4 でのルシフェラーゼ活性は Bcl-3 を単独で発現させたものに比して有意にルシフェラーゼ活性の増強が認められた(図8)。これらの結果より、Bcl-3 は *BCL6* 遺伝子のプロモーター部位に p50 とヘテロダイマーを形成して直接結合し、プロモーターを活性化することにより Bcl-6 の発現を誘導していることが明らかとなった。

(5) Bcl-3 による濾胞ヘルパーT細胞分化における役割の解析

Bcl-6 は濾胞ヘルパーT細胞の分化のマスター転写因子であることが知られているが、

Bcl-3 の CD4 陽性 T細胞分化における役割については不明であった。

そこで我々は、Bcl-3 の濾胞ヘルパーT細胞分化への役割を明らかにするため、マウス生体内での濾胞ヘルパーT細胞での Bcl-3 発現について検討した(図8)。

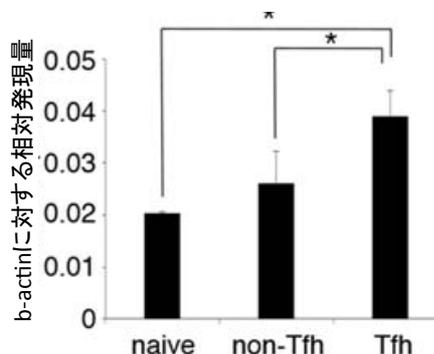


図8

濾胞ヘルパーT細胞、非マウス濾胞ヘルパーT細胞、ナイーブ CD4 陽性 T細胞をマウス生体よりソートし、qPCR 法によって Bcl-3 mRNA の発現を比較検討したところ、図8に示すように濾胞ヘルパーT細胞では、非マウス濾胞ヘルパーT細胞、ナイーブ CD4 陽性 T細胞に比して、有意に Bcl-3 mRNA の発現が上昇していた。以上の結果より Bcl-3 は濾胞ヘルパーT細胞内で重要な役割を果たしていることが示唆された(図8)。

最後に我々は、生体内において Bcl-3 が濾胞ヘルパーT細胞分化に重要な役割を果たしていることを証明するために以下の実験を行った。OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウスである OT-II マウス脾臓よりナイーブ CD4 陽性 T細胞を単離し、レトロウイルスを用いて Bcl-3 を強制発現させ、T細胞欠損マウスである TCR β d 欠損マウスに移植後、OVA で免疫して濾胞ヘルパーT細胞分化を FACS にて検討した(図9)。

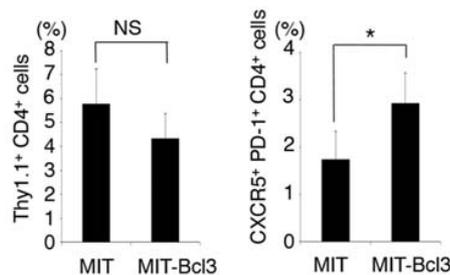


図9

図9で示すように Bcl-3 遺伝子導入 CD4 陽性 T 細胞は、コントロールの細胞より有意に多数の濾胞ヘルパー T 細胞に分化していた(図9)。以上の結果より、Bcl-3 は濾胞ヘルパー T 細胞分化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

以上、図1～図9に示す結果より、Bcl-3 は Bcl-6 の発現を直接誘導することにより濾胞ヘルパー T 細胞分化に重要な役割を果たしていることが示唆された。近年、関節リウマチの発症に濾胞ヘルパー T 細胞が重要な役割を果たしていることが明らかになっている。本研究で得られた結果より、Bcl-3 は Bcl-6 の発現を直接誘導することにより濾胞ヘルパー T 細胞分化を促し、関節リウマチの発症を制御していることが示唆された。

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 5 件)

(1) Sashida G, Harada H, Matsui H, Oshima M, Yui M, Harada Y, Tanaka S, Mochizuki-Kaisho M, Wang C, Saraya A, Muto T, Hayashi Y, Suzuki K, Nakajima H, Inaba T, Koseki H, Huang G, Kitamura T, Iwama A. Ezh2 loss promotes development of myelodysplastic syndrome but attenuates its predisposition to leukaemic tranformation. Nat. Commun. 2014. 5:4177. DOI:10.1038/ncomms5177. 査読有り

(2) Tanaka S, Suto A, Iwamoto T, Kashiwakuma D, Kagami S, Suzuki K, Takatori H, Tamachi T, Hirose K, Onodera A, Suzuki J, Ohara O, Yamashita M, Nakayama T, Nakajima H. J Exp Med. 2014. 221:1857-74. DOI:10.1084/jem.20130791. 査読有り

(3) Nakagomi D, Suzuki K, Meguro K, Hosokawa J, Tamachi T, Takatori H, Suto A, Matsue H, Ohara O, Nakayama T, Shimada S, Nakajima H. Matrix metalloproteinase 12 is produced by M2 macrophages and plays important roles in the development of contact hypersensitivity. J Allergy Clin Immunol. 2015. 135:1397-400. DOI: 10.1016/j.jaci.2014.10.055. 査読有り

(4) Meguro K, Suzuki K, Hosokawa J, Sanayama Y, Tanaka S, Furuta S, Ikeda K, Takatori H, Suto A, Sakamoto A, Ohara O, Nakajima H. Role of Bcl-3 in the development of follicular helper T cells and in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Arthritis and Rheumatol. 2015. 67:2651-60. DOI: 10.1002/art.39266. 査読

有り

(5) Meguro K, Nakagomi D, Suzuki K, Hosokawa J, Fukuta T, Yokota M, Maezawa Y, Suto A, Nakajima H. SOCS3 expressed in M2 macrophages attenuates contact hypersensitivity by suppressing MMP-12 production. J Invest Dermatol. 2016. 136:649-57. DOI:10.1016/j.jid.2015.12.010. 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

(1) Meguro K, Suzuki K, Hosokawa J, Sanayama Y, Tanaka S, Furuta S, Ikeda K, Takatori H, Suto A, Ohara O, Nakajima H. Annual Congress of the European League against Rheumatism (国際学会) 2015年6月10日 ローマ イタリア

(2) Tanaka S, Suto A, Iwamoto T, Suzuki K, Takatori H, Tamachi T, Hirose K, Onodera A, Suzuki J, Ohara O, Yamashita M, Nakayama T, Nakajima H. Sox5 and c-maf cooperatively induce Th17 cell differentiation via ROR γ t induction as down stream targets of Stat3. 第43回日本免疫学会総会学術集会 2014年12月12日 国立京都国際会館(京都府京都市)

(3) Meguro K, Suzuki K, Hosokawa J, Yokota M, Takatori H, Nakajima H. Role of tumor suppressor p53 in Tc17 differentiation. 第43回日本免疫学会総会学術集会 2014年12月12日 国立京都国際会館(京都府京都市)

[図書] (計 0 件)

該当なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

該当なし

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

池田 啓 (IKEDA, Kei)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10456014

廣瀬 晃一 (HIROSE, Koichi)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：90400887

(3) 連携研究者

該当なし

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

該当なし

()