

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670476

研究課題名(和文) エピジェネティック制御による選択的サイトカイン発現調節機構の解明とその治療応用

研究課題名(英文) Epigenetic analysis of selective control of IL-17 production, and search for new strategy to treat chronic inflammation in collagen-diseases.

研究代表者

臼井 崇 (Usui, Takashi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・その他

研究者番号：90362483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は膠原病の慢性炎症維持に重要であるIL-17およびGM-CSFの制御機構・治療介入研究を行った。マウスT細胞株を多量のIL-17を産生している細胞と産生しない細胞にクローニング後、網羅的解析施行し、遺伝子Xが、IL-17プロモーター領域のCpGメチル化を介して制御していることを明らかにした。次にその炎症性サイトカインとしての重要性が報告されてきているGM-CSFの機能解析をSKG間質性肺炎モデルマウスを用いて行った。予想に反しIL-17の寄与は低く、GM-CSFが主たる炎症維持因子であることを証明した。以上の知見はヒト難治性膠原病病態に対する新規治療法の可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：IL-17 and the GM-CSF are important cytokines to maintain chronic inflammation of collagen diseases. In this project, we analyzed the mechanisms of production in-vitro and the treatment/intervention effects in-vivo of these cytokines. First, we established murine T cell clones which produce large amount of IL-17, and non-producer clones also. We found that gene-X controlled it through the methylation of the GC island of the IL-17 promoter domain. Second, we analyzed function of IL-17- and GM-CSF-producing cells using chronic/progressive interstitial pneumonitis model (SKG+zaymosan). We found the contribution of IL-17 was relatively low and GM-CSF was essential of this model. These findings suggest the new strategies to treat human collagen diseases which are un-met.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：GM-CSF IL-17 エピゲノム制御 ヘルパーT細胞 間質性肺炎

1. 研究開始当初の背景

膠原病の中で、関節リウマチ診療においては生物学的製剤の目覚ましい効果によって難治性病態は克服されつつあるが、膠原病全体で俯瞰すると、全身性エリテマトーデス SLE・強皮症・多発性筋炎やそれらに合併する難治性間質性肺炎に対する治療の進歩は著しく遅れているといっても過言ではない。これらの難治性病態の中心は慢性炎症であり、その病態解析を踏まえた新規治療法の開発が急務である。

我々は以前よりヘルパーT(Th)細胞の解析を行いTh1,Th分化のメカニズムを解析してきた。近年、これらの細胞に加えIL-17を産生するTh17細胞や、GM-CSFを産生するThGという細胞群が慢性炎症維持に関わっているとの知見が増えている。つい最近まで、"Th1病"とされてきた関節リウマチや多発性硬化症が,"Th17病"として認識され始め、さらに最近になって、"ThG病"であるとの報告がされ、まだ論議の最中である。

腫瘍・移植・感染免疫においてもこれらのTh細胞、および制御性T細胞反応がこれらの病態形成・制御に重要な役割を果たしていることが分かってきている。さらにはリンパ濾胞においてIL-21等を産生する特殊なヘルパーT細胞であるTfhが同定され、これら多様なエフェクターおよび制御性T細胞群も含めたCD4+ T細胞の相互制御機構の解明とその臨床応用が現在、免疫学における最も重要な課題の一つとなっている

2. 研究の目的

本研究の目的は、未だにその本質が不明である、IL-17産生ヘルパーT細胞の分化メカニズムを、申請者が偶然発見したIL-17A/F高産生マウスT細胞株とそのクローンを用いて、ゲノムレベル・エピジェニックレベル・転写因子レベルで網羅的に解析し、その遺伝子発現ネットワークを明らかにすること、およびIL-17とGM-CSFにターゲットを絞り、我々が開発した慢性進行性致死の間質性肺炎モデルマウスを用いてin-vivoにおける、IL-17、GM-CSFの寄与度を解析することである。本研究から得られる知見はIL-17やGM-CSFがその病態に深く関わっているとされる、関節リウマチやその他多くの慢性炎症性疾患治療に有効な新制御法の発見に寄与する。

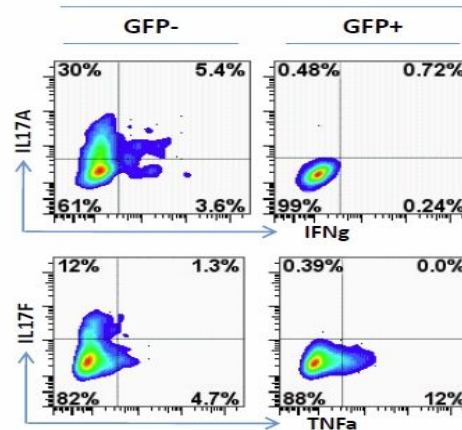
3. 研究の方法

- 1) マウスT細胞株(EL4)の再クローニング
我々は、偶然EL4の細胞内サイトカイン染色解析でIL-17を極めて多量に産生する細胞が存在することを発見し、これを限界希釈法でクローニングした。同時に非産生細胞株も得た。
- 2) 樹立細胞株間のゲノムレベル比較解析
上記細胞株間で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、有意な増幅や欠失等が無いことを確認した。

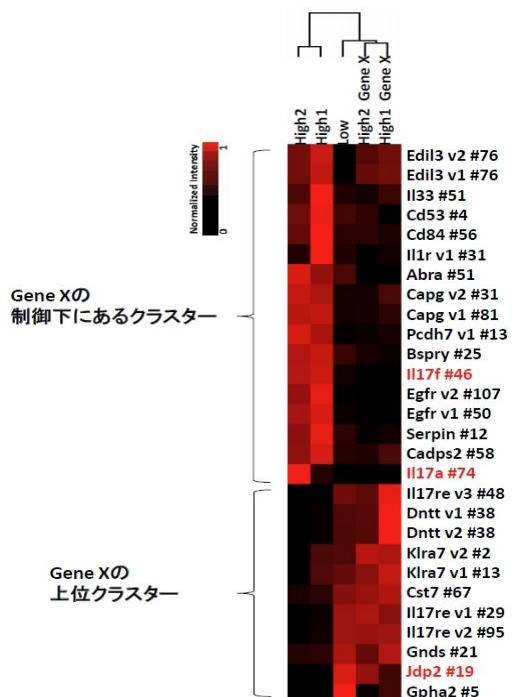
- 3) 樹立細胞株間のmRNAレベルでの比較解析
IL-17A/F高産生株特異的に発現が極めて亢進あるいは低下している遺伝子40個前後に絞り込み、PCRバリデーションを行った。そこからさらに4つの候補遺伝子を絞り込み、各過剰発現およびノックダウン実験系を組み解析した。その結果、Gene Xを過剰発現させると、IL-17高産生細胞株を非発現細胞株に転換できることを発見した(図1)。

図1
Gene X



さらに、Gene XをIL-17高産生株に強制発現させることで、40個抽出した寄与候補遺伝子群の約60%をIL-17非発現細胞株型に転換できることを発見した(図2)。

図2

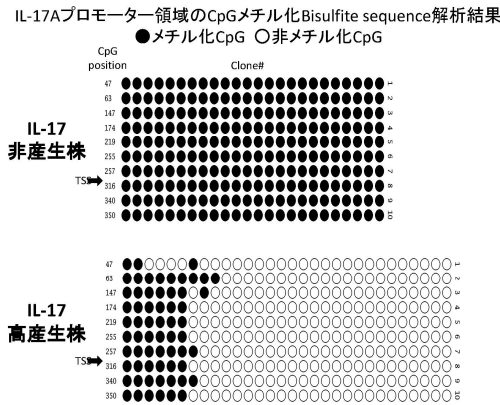


以上の結果は Gene X が本細胞株における IL-17 産生制御の主要な寄与因子であることを強く示唆している。

4) エピジェネティック解析

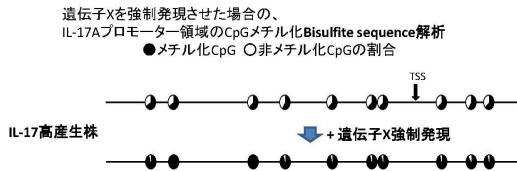
次に Gene X がどのように IL-17 産生を制御しているのかについてレポーターアッセイによるプロモーターのシスエレメント機能を比較解析したが差異を認めなかった。しかしプロモーター領域の CpG アイランドのメチル化が両細胞株間で大きく異なることを見いだした(図 3)。

図 3



さらに、遺伝子 X 過剰発現によりそれが根本的に制御されることを発見した(図 4)。

図 4



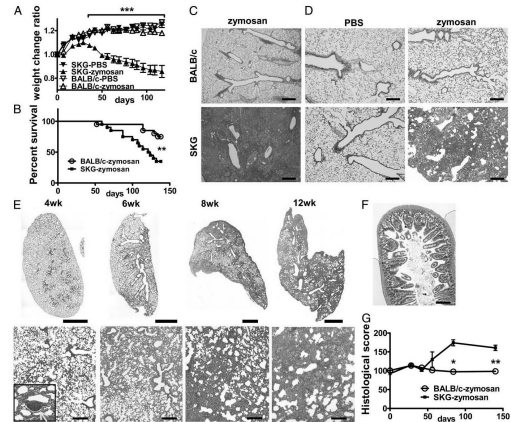
以上の結果は、本細胞株において Gene X が IL-17 プロモーター領域の CpG メチル化・脱メチル化を直接的に調節することで IL-17 産生・非産生性を制御していることを示している。

5) 難治性間質性肺炎モデルの作成・解析

マウスにおいて数ヶ月レベルで進行する慢性炎症モデルはこれまで存在しなかったが、これも偶然に、関節炎モデルマウスである SKG マウスにザイモザン投与すると、関節炎と共に、5 ヶ月に渡る慢性進行性かつ致死的な間質性肺炎を呈することを発見した(図 5)。その病態解析のため肺浸潤細胞の細胞学的解析を行い、IL-17, GM-CSF 産生 Th 細胞および IL6 産生マクロファージの関与が示唆さ

れた。

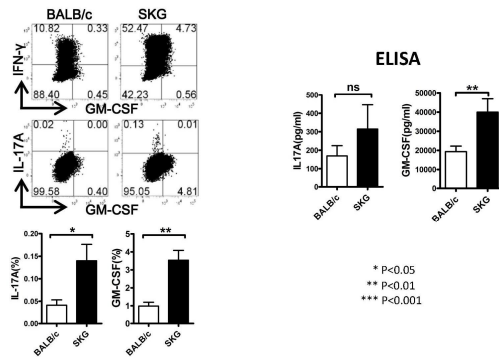
図 5



SKG マウスと同じ遺伝子背景である BALB/c マウスでは同様の処置をしても有意な間質性肺炎を呈しなかった原因として、SKG の T 細胞自体が GM-CSF/IL-17 産生にシフトしていることを見いだした(図 6)。

図 6

SKG naïve T cells are skewed to differentiate into IL-17A and/or GM-CSF producing cells



そこで本モデルマウスに各サイトカイン中和抗体投与介入実験をしたところ、抗 IL-17 抗体では関節炎は軽減するものの、間質性肺炎の進展を押さえることができなかったのに対し、抗 GM-CSF 抗体投与群では関節炎も加え、間質性肺炎の進行を完全に止めることができることが分かった(図 7)。さらに抗 GM-CSF 抗体介入は、予防効果のみならず間質性肺炎発症後に投与しても、その進展を押さえることができることが分かった(図 8)。

図 7

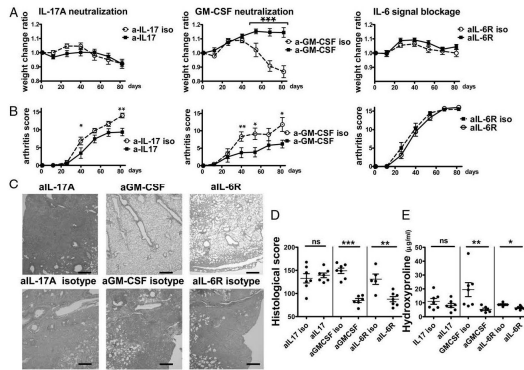
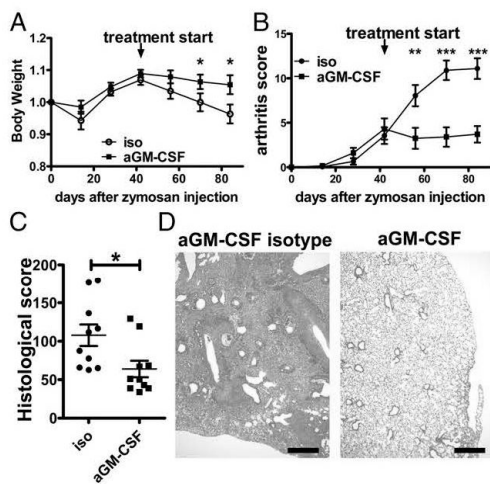


図 8



4. 研究成果

以上の成果は分子レベルでは、Gene X の機能を制御する低分子化合物が見つければ、IL-17 に対する経口分子標的薬として臨床応用につながる成果であり、また抗 GM-CSF 抗体治療は、ヒト関節リウマチのみならず、合併すると予後が悪化する難治性間質性肺炎の治療薬として un-met needs を満たすことが期待できる新規の治療戦略となりえることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1) GM-CSF but not IL-17 is critical for the development of severe interstitial lung disease in SKG mice. Shiom A, Usui T, Ishikawa Y, Shimizu M, Murakami K, Mimori T. *J Immunol*. 2014 Jul 15;193(2):849-59. doi: 10.4049/jimmunol.1303255. Epub 2014 Jun 20. PMID: 24951817

2) Pivotal roles of GM-CSF in autoimmunity and inflammation. Shiom A, Usui T. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:568543. doi:

10.1155/2015/568543. Epub 2015 Mar 8. Review. PMID: 25838639

3) A novel splice variant of human L-selectin encodes a soluble molecule that is elevated in serum of patients with rheumatic diseases. Hirata T, Usui T, Kobayashi S, Mimori T. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Jul 10;462(4):371-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.05.002. Epub 2015 May 14. PMID: 25982478

4) Functional engraftment of human peripheral T and B cells and sustained production of autoantibodies in NOD/LtSzscid/IL-2R (-/-) mice. Ishikawa Y, Usui T, Shiom A, Shimizu M, Murakami K, Mimori T. *Eur J Immunol*. 2014 Nov;44(11):3453-63. doi: 10.1002/eji.201444729. Epub 2014 Sep 19. PMID: 25154613

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1) 第 59 回日本リウマチ学会
2015 年 4 月 22 日
- 2) 第 36 回日本炎症・再生医学会
2015 年 7 月 21 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
該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

臼井 崇 (USUI Takashi)
京都大学・大学院医学研究科・非常勤講師
研究者番号: 90362483

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し