

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2014～2015  
課題番号：26860744  
研究課題名(和文) 関節リウマチにおけるARID5の役割の解明

研究課題名(英文) Role of ARID5 in Rheumatoid Arthritis

## 研究代表者

古田 俊介 (Furuta, Shunsuke)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・特任講師

研究者番号：10422221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトおよびマウスのTh17細胞においてARID5Aの高発現を認めた。Stat3の阻害実験、及びRORgt欠損マウスのCD4陽性T細胞を用いた解析からARID5Aの発現はIL-6/Stat3経路により直接誘導されることが明らかとなった。マウスCD4陽性T細胞にARID5Aを強制発現させるとIL-17、IL-17F、IL-22の産生は抑制され、一方、IL-21の産生は増強された。ARID5AとRORgtの共発現実験により、ARID5Aは直接RORgtに結合すること、ARID5AはRORgtによるIL-21産生抑制を阻害することで、IL-21産生を亢進させることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：ARID5A was highly expressed in human and murine Th17 cells. Analysis with a Stat3 inhibitor and RORgt-deficient CD4 T cells revealed that the IL-6/Stat3 pathway directly induced ARID5A expression in CD4 T cells. Retrovirus-mediated induction of ARID5A in CD4 T cells resulted in the suppression of IL-17, IL-17F and IL-22 production but in the acceleration of IL-21 production. We also found that ARID5A directly bound to RORgt and inhibited RORgt-mediated suppression of IL-21 promoter activation, resulting in the acceleration of IL-21 expression. These results suggest that ARID5A functions as a switch molecule of IL-17-IL-21 balance in murine Th17 cells.

研究分野：膠原病

キーワード：内科 膠原病内科 関節リウマチ ARID5 CD4陽性T細胞

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)は、本邦で約70万人の患者が存在すると推測される、関節滑膜の炎症と骨破壊を主体とする自己免疫疾患である。関節の炎症・破壊による身体機能低下は患者QOLの低下のみならず、労働力損失という観点から社会的にも大きな問題となっている。かつてはTh1細胞がRAの病態形成に中心的な役割を果たしていると考えられていたが、近年ではTh1細胞に加えTh17細胞の重要性も広く認識されている。Th17細胞分化に重要な役割をはたすIL-6シグナルを阻害する生物学的製剤トシリズマブ(TCZ:ヒト化抗IL-6受容体抗体)が高い有効性を示すこともRAの病態形成にTh17細胞が深く関与していることを示唆している。このような背景のもと、本研究者らはTCZの薬効予測ならびに作用メカニズムの解明を目的として、既存治療に抵抗性を示すRA患者にTCZを投与し、投与前及び投与3ヶ月後の末梢血CD4陽性T細胞における発現遺伝子をDNAマイクロアレイにて網羅的に比較した(千葉大倫理審査872)。その結果、TCZ有効例ではTCZ投与後に複数のTh17細胞関連遺伝子の発現低下に加え、これまで免疫系細胞における機能が不明であったARID(AT-rich interactive domain-containing protein)ファミリーに属するARID5AとARID5Bの発現が著明に低下していることを見出した。

ARIDファミリーは、15個のメンバーより形成される核内蛋白であり、ゲノムDNAのATに富む領域に結合し、細胞の分化・増殖を含む様々な機能に関与することが示されている。

ARID5Aは、エストロゲン受容体からのシグナル(Mol Endocrinol 2005)や軟骨細胞におけるSox9を介したシグナル(Mol Biol Cell 2011)の調節に関与することが示されているが、免疫系細胞における機能は不明であった。一方、本研究者らは、本申請研究の予備実験におい

てARID5AがマウスヘルパーT細胞のうちTh17細胞のみに高発現することを見出しており、ARID5AがTh17細胞の機能を制御することによりRAの病態に関与していると仮説をたてた。また近年、Genome-Wide Association Study(GWAS)によりARIDファミリーのうち、ARID5Aと最も相同性が高いARID5BがRAと関連することが報告された(Nat Genet 2012)。しかし、Th17細胞の分化および機能発現におけるARID5AとARID5Bの役割、さらにRAの病態形成へのARID5AとARID5Bの関与は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、Th17細胞の分化・増殖・機能発現とRAの病態形成におけるARID5AとARID5Bの役割を解明し、RAの新規治療標的を見出すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1): Th17細胞におけるARID5Aの発現機構の解析

野生型マウスよりナイーブCD4陽性T細胞を純化し、IL-6の存在下および非存在下、STAT3阻害薬(STAT3阻害薬)の存在下および非存在下で抗CD3抗体で刺激し、ARID5Aの発現をreal-time PCR法により検討した。

野生型マウス、及びROR $\gamma$ t欠損マウスからナイーブCD4陽性T細胞をMACSにて単離し、Th17細胞誘導条件(IL-6+TGF- $\beta$ )下で抗CD3抗体で刺激し、ARID5Aの発現をreal-time PCR法で検討した。

以上の解析により、Th17細胞におけるARID5Aの発現誘導がSTAT3依存性的か否か、ROR $\gamma$ t(Th17細胞分化)依存性的か否かが明らかとなる。

### (2): Th17細胞分化におけるARID5Aの役割の解析

野生型マウス、及びROR $\gamma$ t欠損マウスから単離したナイーブCD4陽性T細胞を抗CD3抗体で刺激する際にレトロウイルスを用いてARID5Aを発現させ、細胞内サイトカイン染色にてTh17細胞分化を評価した。

内在性に産生されたIL-6がTh17細胞分化に影響する可能性を考慮し、(1)の実験系に

IL-6 中和抗体を投与し、同様に細胞内サイトカイン染色にて Th17 細胞分化を評価した。

免疫沈降法により ARID5A と Th17 細胞分化の master regulator である ROR $\gamma$ t との結合を解析した。

### (3) ARID5A による IL-21 産生機構の解析

本研究者は予備実験において Th17 細胞誘導条件下で ARID5A を発現させた細胞では、IL-21 産生細胞が増加することを見出した。そこで本研究においてその分子機構を解析する。

ARID5A の発現により内在性に産生された IL-6 が IL-21 産生を誘導している可能性を考え、IL-6 中和抗体の存在下において、ARID5A を強制発現させた CD4 陽性 T 細胞を IL-21+TGF- $\beta$  の存在下で培養し、IL-21 産生を細胞内染色にて評価した。

ARID5A が IL-21 プロモーターを直接活性化するか否かを、レポーターアッセイにて検討した。

ARID5A 依存的な IL-21 産生誘導における ROR $\gamma$ t の役割を明らかにするため、同様にレポーターアッセイを用いて ARID5A と ROR $\gamma$ t の共発現の影響を検討した。

## 4. 研究成果

本研究者が所属する研究室では、関節リウマチ患者における IL-6 シグナル選択的阻害剤トシリズマブの作用メカニズム解明のため、DNA マイクロアレイを用いて末梢血 CD4 陽性 T 細胞の遺伝子発現を網羅的に解析した。その過程で、トシリズマブ有効例において IL-6 シグナル阻害後に発現が低下する遺伝子を複数同定した (データ未発表)。それらの遺伝子のうち機能の詳細が不明であった ARID5A/B について着目し、その機能を解析した。本研究課題に先立ち、本研究者が行った予備的検討では、ヒトの CD4 陽性 T 細胞を Th0/Th1/Th2/Th17 の各条件下で培養したところ、Th17 条件下でのみ ARID5A の発現増強を認めた。マウスでも同様の結果であった。

### (1) Th17 細胞における ARID5A の発現制御機構の解析

マウス CD4 陽性ヘルパー T 細胞を用いた解析において、IL-6 刺激により Th17 細胞で ARID5A の発現が誘導されることが明らかと

なった。そこで IL-6 シグナルの下流に存在する Stat3 が、IL-6 による ARID5A の発現誘導に必須か否かを Stat3 阻害薬 (Stat3 inhibitor) を用いて検証した。その結果、Th17 細胞誘導条件 (IL-6+TGF- $\beta$ +anti-IFN- $\gamma$ +anti-IL-4) で培養した CD4 陽性 T 細胞における ARID5A の発現誘導は Stat3 inhibitor の添加により有意に抑制されることが明らかとなった (図 1)。

ARID5A の発現増強が Th17 細胞誘導条件下で認められることより、Th17 細胞への分化が ARID5A の発現増強に必須なのか否かを Th17 細胞の master regulator である ROR $\gamma$ t を欠損するマウスの CD4 陽性 T 細胞を用いて検討した。その結果、Th17 細胞誘導条件下における ARID5A の発現誘導は、ROR $\gamma$ t 欠損マウスにおいても野生型マウスと同様に認められた (図 2)。以上の結果より ARID5A の発現は Th17 細胞において IL-6-STAT3 シグナル依存的に誘導されるが、ROR $\gamma$ t の発現、或いは Th17 細胞への分化は ARID5A の発現誘導に必ずしも必要ないことが明らかとなった。

図 1

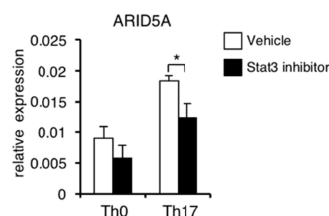
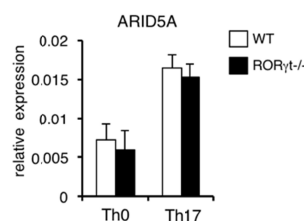


図 2

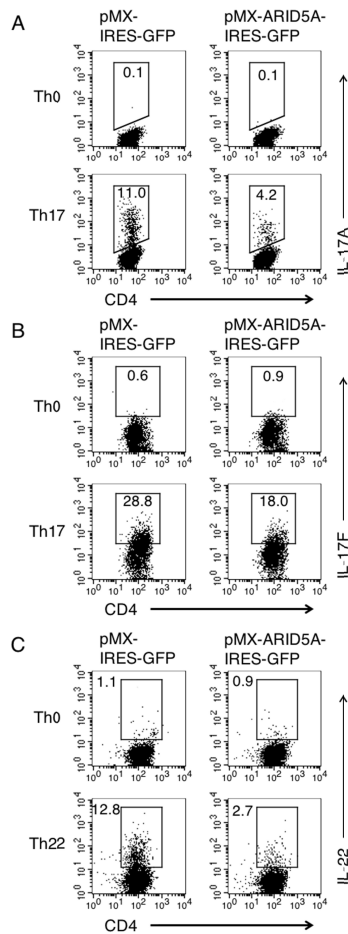


### (2) Th17 細胞分化における ARID5A の役割の解析

野生型マウス由来のナイーブ CD4 陽性 T 細胞を抗 CD3 抗体で刺激する際にレトロウイルスを用いて ARID5A を発現させ、細胞内サイトカイン染色にて Th17 細胞分化を評価した。ARID5A を強制発現させた CD4 陽性 T 細胞では、Th17 細胞分化誘導条件下における IL-17A と IL-17F の産生、及び Th22 細胞分化誘導条件

下における IL-22 の産生が低下していた (図 3)。さらに免疫沈降法により、ARID5A が ROR $\gamma$ t と直接結合することを確認した (data not shown)。以上の結果より、ARID5A は ROR $\gamma$ t に結合することで Th17 細胞分化を抑制していると考えられた。

図 3



(3) ARID5A による IL-21 産生誘導機構の解析

レトロウイルスを用いて ARID5A を発現させた野生型マウス由来ナイーブ CD4 陽性 T 細胞では、Th0 細胞分化誘導条件下、及び Th17 細胞分化誘導条件下においてコントロール細胞に比して IL-21 産生が亢進した (図 4)。次に ARID5A による IL-21 産生誘導機構を明らかにするため IL-21 プロモーターを用いたレポーターアッセイを行った。その結果、ARID5A は単独では IL-21 プロモーターの活性化を誘導しなかった (図 5)。既報の通り、cMaf は IL-21 プロモーターの活性化を強く誘導した (図 5)。一方、ROR $\gamma$ t は c-Maf による IL-21 プロモーターの活性化を抑制した (図 5)。興味深いことに ARID5A は、ROR $\gamma$ t による IL-21

プロモーターの活性化抑制を阻害した (図 5)。以上の結果より、ARID5A は ROR $\gamma$ t による IL-21 プロモーターの活性化抑制を阻害することにより、IL-21 の産生を亢進させていることが示唆された。

図 4

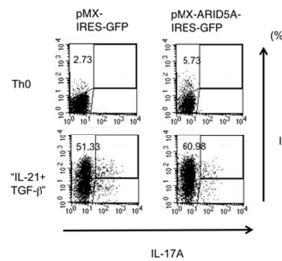
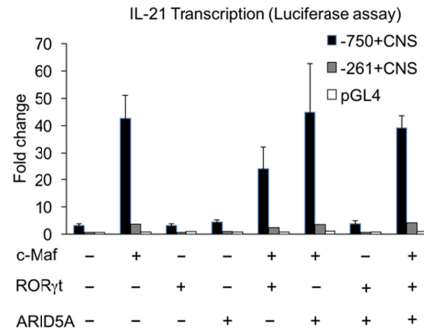


図 5



結語

本研究により ARID5A が ROR $\gamma$ t への結合を介して直接 Th17 細胞分化を抑制していることが明らかとなった。リウマチの病態形成において Th17 細胞が重要であることは既に明らかとなっており、ARID5A はリウマチ治療のターゲットの一つになる可能性がある。ARID5A と高い相同性を有する ARID5B が、ARID5A と同様の機能を持つのか否かに関して現在研究を進めている。

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 3 件)

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

Rheumatol. 2015;67(10):2651-60. doi:  
10.1002/art.39266. (査読あり)

Sanayama Y, Ikeda K, Saito Y, Kagami S,  
Yamagata M, Furuta S, Kashiwakuma D,  
Iwamoto I, Umibe T, Nawata Y, Matsumura  
R, Sugiyama T, Sueishi M, Hiraguri M,  
Nonaka K, Ohara O, Nakajima H.  
Prediction of therapeutic responses to  
tocilizumab in patients with  
rheumatoid arthritis: biomarkers  
identified by analysis of gene  
expression in peripheral blood  
mononuclear cells using genome-wide  
DNA microarray. Arthritis Rheumatol.  
2014 Jun;66(6):1421-31. doi:  
10.1002/art.38400. (査読あり)

Saito Y, Kagami S, Sanayama Y, Ikeda K,  
Suto A, Kashiwakuma D, Furuta S,  
Iwamoto I, Nonaka K, Ohara O, Nakajima  
H. AT-rich-interactive  
domain-containing protein 5A  
functions as a negative regulator of  
retinoic acid receptor-related orphan  
nuclear receptor t-induced Th17 cell  
differentiation. Arthritis Rheumatol.  
2014 May;66(5):1185-94. doi:  
10.1002/art.38324. (査読あり)

[学会発表]

該当なし

[図書]

該当なし

[産業財産権]

該当なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.jp/class/gene/kenkyouseki.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古田 俊介 (FURUTA, Shunsuke)

千葉大学・医学研究院・特任講師

研究者番号: 10422221

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究協力者

中島 裕史 (NAKAJIMA, Hiroshi)

池田 啓 (IKEDA, Kei)

花岡 英紀 (HANAOKA, Hideki)