

「アレルギー疾患・自己免疫疾患などの発症機構と治療技術」  
平成 20 年度採択研究代表者

吉村 昭彦

慶應義塾大学医学部・教授

## 細胞内シグナル制御による免疫リプログラミング

### 1. 研究実施の概要

サイトカインとそのシグナル系を中心に免疫系の正と負の応答を明らかにし、免疫応答のプログラムを正から負へと転換することが本研究提案の骨子である。そのために樹状細胞およびヘルパーT細胞に焦点を絞りリプログラミングの方法について検討を行った。まず樹状細胞についてはプロスタグランジン E2 を抑制型に転換する重要な因子として同定し、その細胞内でのシグナル因子として c-Fos を新たに同定した。c-Fos 転写因子は NF- $\kappa$ B と会合し TNF  $\alpha$  や IL-12 を抑制する一方で IL-10 を増加させることから有望なリプログラミング因子と考えられる。そこで c-Fos を樹状細胞で強制発現させたトランスジェニックマウスを作製することを試みており、実際に個体レベルで免疫応答を負の制御できるか検証する予定である。次にヘルパーT細胞のリプログラミングについては TGF  $\beta$  が鍵を握ることから T細胞特異的 Smad2 欠損マウスの作製を行い、Smad2 と Smad3 両者が重複して T細胞の活性化を抑制することを見いだした。しかし TGF  $\beta$  は一旦活性化したエフェクターT細胞を抑制性 T細胞に転換することは出来ない。これは TGF  $\beta$  シグナルがエフェクターでは抑制されるためと考えられる。そこで、Smad 欠損 T細胞を用いたマイクロアレイの解析により Smad2/3 の標的遺伝子を同定しており今後それらの遺伝子を用いて活性化 T細胞を Th0 もしくは抑制性 T細胞に転換できないか検討する。また複数の遺伝子を導入することでエフェクターT細胞に Foxp3 を誘導できないか検討を行っている。

### 2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

#### A. cAMP-c-Fos 経路による炎症性サイトカイン産生抑制の新規機構

To11 様受容体(TLR)シグナル経路は自然免疫において中心的な役割を果たし、また獲得免疫の活性化にも重要である。TLR は LPS などのリガンドが結合することによって活性化され、MyD88 および TRIF の 2 つの経路の活性化を引き起こす。MyD88 と TRIF シグナル経路はそれぞれ転写因子 NF- $\kappa$ B と IRF3 を活性化し、炎症性サイトカイン (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12) やインターフェロンの転写を促進する。これらの炎症性サイトカインの

産生は IL-10 などの抗炎症性サイトカインやプロスタグランジン E2 (PGE2)、ヒスタミン、細胞外 ATP、下垂体アデニルシクラーゼ活性化ペプチド (PACAP) などの様々な化学メディエーターやペプチドによって抑制される。IL-10 は STAT3 を介して炎症性サイトカインの産生を抑制することが明らかになっている。一方、その他のメディエーターは細胞内 cAMP 濃度の上昇を介して抑制する。PGE2 などによって処理された樹状細胞は IL-10 産生抑制性 T 細胞 (Tr1) を誘導することが知られており、cAMP を介した樹状細胞の改変は T 細胞のリプログラミングの観点からも重要と考えられる。しかし cAMP のサイトカイン産生抑制の分子基盤はほとんど理解されていない。

cAMP を上昇させる試薬で処理された抗原提示細胞 (APC) は、共刺激分子の発現レベルが低下し、IL-10 の発現が上昇するため、cAMP による IL-10 の上昇こそが免疫抑制の重要なメカニズムであると示唆されてきた。しかし、我々は本研究で cAMP は IL-10 欠損樹状細胞においても、TNF $\alpha$  と IL-12 の産生を抑制することを示した。従って、IL-10 以外に重要なメカニズムが存在すると考えられた。

まずタンパク合成阻害剤シクロヘキシミドの効果から cAMP が抑制効果を発揮するためには新規タンパク合成が必要と考えられた。そこでマイクロアレイ解析を行った結果、我々は *c-fos* を cAMP による抑制効果を担う因子の候補として同定した。*c-fos* 遺伝子をマクロファージ系の細胞 (Raw 細胞) に強制発現することで LPS による TNF $\alpha$  の誘導を強力に抑制することができた。逆に siRNA により *c-fos* 発現を抑制すると cAMP の抑制効果が失われた。さらに我々は LPS または cAMP 単独刺激と比較して LPS+cAMP 共刺激によって、*c-Fos* タンパク質レベルが極めて増加することを見いだした。

次に我々は *c-Fos* の炎症性サイトカイン産生抑制機構を解析した。*c-Fos* は NF- $\kappa$ B p65 サブユニットと物理的に相互作用することによって、p65 ホモダイマーの TNF $\alpha$  プロモーターや IL-12 プロモーターへのリクルートを阻害していた。また cAMP によって *c-fos* の mRNA が発現誘導され、TLR の下流で活性化された IKK $\beta$  が *c-Fos* を直接リン酸化することによって、*c-Fos* の安定化と蓄積を引き起こすことがわかった。*c-Fos* の複数箇所が IKK $\beta$  によってリン酸化を受けるが、*c-Fos* の 308 番目のセリン残基が IKK $\beta$  によるリン酸化と安定化に必要な残基の一つであることを明らかにした。これらの結果から、我々は *c-Fos* が IKK $\beta$  の新規基質であること、および cAMP による免疫抑制効果を担う因子であると結論づけた。以上の本研究成果は 2009 年 *Immunity* 誌に掲載された (発表論文 1)。

## B. TGF- $\beta$ /Smadによる免疫抑制作用の解析

TGF- $\beta$  は免疫において IL-10 とともに抗炎症性サイトカインとして知られており、その機能は多岐にわたることがわかっている。TGF- $\beta$  1 の KO マウスの解析から TGF- $\beta$  が炎症性腸疾患の抑制や自己免疫疾患の抑制に必須であることは明白であるにもかかわらず、TGF- $\beta$  がどのような分子機構で免疫抑制に寄与するかは解明されていなかった。

しかし、ここ数年抑制性T細胞の分野で大きなブレークスルーがなされた。すなわちT細胞受容体刺激時にTGF- $\beta$ が存在することで、抑制性T細胞のマスター遺伝子である*Foxp3*が誘導されることが示された。本研究ではTGF- $\beta$ によって誘導される*Foxp3*の発現機構とその免疫制御における意義を解明することを目的とし研究を行った。

Foxp3プロモーター領域の解析: Foxp3プロモーター領域10.6 kbをルシフェラーゼ遺伝子につないだレポータープラスミドを作製し、EL4細胞を用いて検討した。その結果、TGF  $\beta$  に応答するのに必要な領域 (Smad結合サイト)、レチノイン酸に応答する領域 (RAE)、STAT6によって抑制される領域などを同定した。TGF  $\beta$  によって活性化される主な転写因子はSmad2とSmad3である。Smad3はDNAに直接結合しうるもののSmad2は他の転写因子と会合することで転写調節を行う。したがってSmad2とSmad3は機能的に異なる可能性が考えられる。しかしSmad3欠損マウスは重篤な自己免疫疾患は発症しない。そこでSmad2とSmad3の機能的相違を解明するためにT細胞特異的Smad2欠損(cK0)マウスを作製した。またSmad3欠損(K0)マウスと交配しSmad2/3両欠損マウスを作製した。

Smad2-cK0マウスとSmad3-K0マウスは正常に発育し自然発症的な重篤な障害は認められなかった。しかしSmad2/3両欠損マウスは生後一ヶ月以内に肝炎を含む炎症性疾患で死亡した。したがって予想外にSmad2とSmad3は両者が重複してT細胞の活性化を抑制することを見いだした。また*Foxp3*の誘導にもSmad2とSmad3両者が必要であることがわかった。一方で*Foxp3*欠損マウス由来のT細胞のTh1への誘導は依然としてTGF  $\beta$  で抑制され、かつ*Foxp3*欠損マウスの重篤な自己免疫疾患はTGF  $\beta$  の頻回投与によって抑制されたことから、TGF  $\beta$  の免疫抑制作用には*Foxp3*以外の機構も重要であることが示唆された。現在マイクロアレイの解析からSmad2/3の標的遺伝子を複数同定しており、今後それらの遺伝子を用いて活性化T細胞をTh0もしくは抑制性T細胞に転換できないか検討する。

### C. T細胞特異的SOCS1欠損マウスの解析

SOCS1はT細胞の活性化を制御し免疫寛容維持に重要な役割を果たす。我々はT細胞特異的SOCS1欠損マウスを作製し解析を行ってきた。IckCreを用いたT細胞特異的SOCS1-cK0マウスではCD4+T細胞についてはナイーブT細胞が著減しメモリー型T細胞に転換していた。また胸腺由来の抑制性T細胞(nTreg)が2倍以上に増加していることもわかった(発表論文2)。今後これらのメカニズムとT細胞制御における意義を明らかにしていく予定である。

## 3. 研究実施体制

### (1)「慶應大学」グループ

- ① 研究分担グループ長: 吉村 昭彦(慶應義塾大学、教授)
- ② 研究項目

1. cAMP による抑制性樹状細胞 (regDC) の誘導機構の解明
2. SOCS1 によるヘルパーT 細胞分化制御機構の解明
3. TGF  $\beta$  のサイトカイン産生抑制機構の解明
4. メモリーやエフェクターに Foxp3 を誘導 (リプログラミング) する方法の開発
5. 強制的 TGF  $\beta$  受容体活性化による免疫抑制
6. 樹状細胞からの TGF  $\beta$  発現の誘導による Treg 誘導の試み

#### 4. 研究成果の発表等

##### (1) 論文発表 (原著論文)

1. Koga K, Takaesu G, Yoshida R, Nakaya M, Kobayashi T, Kinjyo I, Yoshimura A. Cyclic adenosine monophosphate suppresses the transcription of proinflammatory cytokines via the c-Fos protein phosphorylated by IKKbeta *Immunity* 2009 Mar;30(3):372-83.
2. Lu LF, Thai TH, Calado DP, Chaudhry A, Kubo M, Tanaka K, Loeb GB, Lee H, Yoshimura A, Rajewsky K, Rudensky AY. Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. *Immunity*. 2009 Jan;30(1):80-91.

##### (2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)