

「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。吉村グループではナイーブヘルパー T 細胞のリプログラミングについては TGF β 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。この過程で胸腺内 nTreg の発生には Smad は必要ないことを見いだした。そこで TGF β に依存せずに Foxp3 の発現を誘導するマスター遺伝子の検索を行っている。次に T 細胞特異的 SOCS1 欠損マウスの解析から SOCS1 が抑制性 T 細胞 (Treg) において Foxp3 の安定性を維持し、Treg において IFN γ 産生を抑制する分子であることを見いだした。また脳虚血モデルを確立し、これまで T 細胞が積極的に関与すると考えられなかった疾患について IL-17 産生 γ δ T 細胞の積極的な関与を証明した。

永井グループではヘルパー T 細胞の分化を規定する樹状細胞の性質を人為的に制御する方法を開発することを目指している。特に細胞内レドックス、酸素濃度、PI3K 経路などに注目して解析を行い、免疫疾患治療への応用をめざして研究を行った。

免疫担当細胞は生体内を循環するが、その間に酸素分圧・レドックス状態の異なる様々な環境に曝される。例えば肺は好氣的条件下であるのに対し、腸管は低酸素状態にある。また、炎症部位においては免疫担当細胞は低酸素状態に曝されることも知られる。従って、生体内における免疫反応の理解にはこのような酸素分圧・レドックス状態を考慮することが必要である。これらの環境要因を考慮に入れて制御性 T 細胞や制御性樹状細胞の誘導を考えるために、レドックスや酸素分圧の違いによる樹状細胞機能や T 細胞分化の制御機構を理解するための研究を行っている。具体的には、様々な酸素濃度における細胞の分化や低酸素センサーである HIF-1 を欠損した T 細胞を用いた検討を行った。PI3K 経路による Treg 分化の制御に関しては、p85 α と p110 γ のダブルノックアウトマウスを作成した。また、Pten^{lox} マウスと Foxp3-Cre マウスや CD11c-Cre マウスを交配し、PI3K の逆反応を行う脱リン酸化酵素である Pten を Treg や樹状細胞において欠損するマウスを作成した。これらのマウスを用いて

Treg や制御性樹状細胞の分化の解析を行う予定である。腸管の免疫関連組織の精査から、新たなリンパ組織を見だし、さらにそのリンパ組織に局在し、Th2 サイトカインを高発現する新たなリンパ球を見いだした。

§ 2. 研究実施体制

(1) 慶応義塾大学「吉村」「永井」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

吉村グループ

- (1) Smad2/3 欠損マウスの解析
- (2) Foxp3 を誘導する新たな因子の探索
- (3) SOCS1、SOCS3 欠損 Treg の機能解析
- (4) 脳梗塞モデルにおける IL-17 産生 γ δ T 細胞の機能解析
- (5) cAMP-c-Fos 経路による樹状細胞改変の試み

永井グループ

- (1) PI3K 経路への干渉による制御性樹状細胞の誘導の試みとその分子機構の解析
- (2) PI3K 経路への干渉や低酸素応答を介したヘルパーT 細胞リプログラムの試み
- (3) レドックスや低酸素応答を介した制御性樹状細胞の誘導の試み
- (4) Th2 サイトカインを産生する新たな細胞集団の同定

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

吉村グループ

(1) Smad2/3 欠損マウスの解析

これまで長らくヘルパーT細胞のドグマとされてきたTh1/Th2の概念にここ数年大きな変化がもたらされている。新しいエフェクターT細胞であるTh17と誘導性の抑制性T細胞、iTregの発見である。Th17はIL-17を高産生するヘルパーT細胞で、自己免疫性脳脊髄炎モデル(EAE)の発症に必要なT細胞として発見された。Th17の初期分化にはTGF β とIL-6が必要でこれがTh17のマスター遺伝子である転写因子ROR γ tを誘導する。さらにIL-23の作用で成熟した炎症性の高いTh17に成熟すると考えられている。我々はTGF β の免疫抑制機構について転写因子のレベルでの解析を行っている。TGF β はSmad2とSmad3を活性化する。T細胞特異的Smad2欠損マウスはEAEが軽症化するが、これはTh17の抑制と関連していた。しかしSmad2、Smad3欠損マウスの解析から

Th17 のマスター遺伝子である ROR γ t の誘導には Smad2/3 は必要ないことが明らかとなった。Smad2 欠損 T 細胞では Th1 や Th2 サイトカインの産生が高くなるために間接的に Th17 分化が抑制されることを見いだした。

(2) Foxp3 を誘導する新たな因子の探索

TGF β はナイーブ T 細胞に Foxp3 を誘導することができるが、Th1 などのエフェクターに分化した T 細胞には誘導できない。活性化型 TGF β 受容体 RI をエフェクター T 細胞に強制発現した場合の効果を検討した。その結果 TGF β による Foxp3 の誘導や IFN γ の抑制はナイーブ T 細胞でのみ観察され、一旦活性化された T 細胞に活性化型 TGF β 受容体を発現させても同様の現象はみられなかった。したがって活性化された T 細胞では Smad だけでは Foxp3 を誘導することは難しいと考えられる。

一方で Smad2/3 両欠損マウスでも nTreg の発生は正常に起こっていた。このところから胸腺においては TGF β に依存しない何らかの Foxp3 発現維持機構が存在することが示唆される。そこで完全長 cDNA ライブラリーより nTreg で発現の高い転写因子の cDNA を選択し、Foxp3 プロモーター／ルシフェラーゼによる機能的なスクリーニングを行った。その結果ある転写因子が Foxp3 プロモーターを直接活性化することを見いだした。本遺伝子産物は Runx1 と会合すること、ナイーブ T 細胞に強制発現させると Foxp3 が TGF β 非依存的に誘導されることなどを見いだしている。現在 T 細胞特異的コンディショナル KO マウスを作成中である。

(3) SOCS1、SOCS3 欠損 Treg の機能解析

SOCS1 は JAK/STAT 経路のサイトカイン産生抑制分子であり、SOCS1 をマウス T 細胞で欠損させると、皮膚炎、自己抗体産生の上昇などの SLE 様病態の出現する。一方胸腺中の制御性 T 細胞 (nTreg) 数は上昇していた (*Immunity*. 2009 Jan;30(1):80-91.に報告)。抗 IL-2 抗体を投与すると Foxp3 陽性 nTreg は正常マウスと同等まで低下することから、その機序には SOCS1 欠損 nTreg の IL-2 シグナルの亢進が考えられた。次に SOCS1 の nTreg における役割を解明するために、in vitro、in vivo でその抑制能を検討した。in vitro では、SOCS1 欠損 nTreg と wild type の nTreg (WT nTreg) の抑制力は同等であった。しかし、RAG2 欠損マウスへの naïve T 細胞とそれぞれの nTreg の移入実験では、SOCS1 欠損 nTreg を移入した方が腸炎の抑制効力が劣っていた。そこで、RAG2 欠損マウスへそれぞれの nTreg のみを移入して、nTreg の運命を検討した。CD4+CD25^{bright} 細胞 (2×10^5 個、>95% Foxp3 陽性) を移入した所、6週後に解析すると WT nTreg は 19% Foxp3 陽性を維持しているのに対して、SOCS1 欠損 nTreg は 8%まで Foxp3 陽性率が低下した。これらの結果から、SOCS1 が Foxp3 の安定性に寄与すると考え、その機序について解析中である。

(4) 脳梗塞モデルにおける IL-17 産生 γ δ T 細胞の機能解析

最近脳梗塞における炎症においても T 細胞が促進的な役割を果たすことが明らかにされつつある。これらの炎症性 T 細胞の機能を抑制することができれば、新たな神経保護療法を開発できる可能性

がある。我々は脳梗塞に対する FTY720 (Fingolimod) の治療効果を検討した。FTY720 は脳梗塞内へのマクロファージの浸潤は妨げないが、T 細胞の浸潤を減らし、発症 4 日目の脳梗塞体積を有意に縮小することが分かった。これらの結果から脳内に T 細胞が浸潤することが脳梗塞の病態の進行に重要であると考えられた。

つぎにどのサイトカインが重要かを調べるために、IL-23 や IL-17、IFN γ の遺伝子欠損マウスを用いて脳虚血モデルを作成し、脳梗塞体積を比較した。その結果、IL-23 欠損マウスおよび IL-17 欠損マウスで有意な梗塞体積の減少が認められた。また、IL-23 欠損マウスでは虚血脳内の IL-17 産生細胞が著明に減少することから、脳虚血早期にマクロファージが産生する IL-23 が、脳虚血遅延期に浸潤する T 細胞の IL-17 産生を誘導していると考えられた。一方 IL-17 産生 T 細胞は当初想定していた Th17 ではなく、 $\gamma \delta$ T 細胞であった。TCR $\gamma \delta$ 抗体を投与することによって体内の $\gamma \delta$ T 細胞を除去すると脳内に浸潤した IL-17 産生細胞は著明に減少し、脳梗塞体積も縮小した。これらの結果から脳虚血亜急性期に浸潤した $\gamma \delta$ T 細胞は IL-17 を産生することによって病態を悪化させていると考えられる。抗体による $\gamma \delta$ T 細胞の除去は発症 24 時間を経過してから行った場合でも有意な神経保護効果がみられた。

最近、 $\gamma \delta$ T 細胞は IL-17 の重要なソースであることが注目されている。ヘルパー T 細胞と比較すると、 $\gamma \delta$ T 細胞は特異的な抗原刺激を必要とせず、IL-23 によって迅速に IL-17 を産生することができる。さらに IL-17 産生性 $\gamma \delta$ T 細胞は抗原刺激を経験していない自然免疫系の細胞であると考えられている。したがって、脳梗塞のような急性炎症の病態では、Th17 よりも $\gamma \delta$ T 細胞がより早期に炎症促進に関与すると考えられる。このような炎症性 T 細胞の機能を調節することにより、脳梗塞の発症 24 時間以後でも開始できるような神経保護療法が開発できる可能性が示唆された。以上の本研究成果は 2009 年 Nature Medicine 誌に掲載された(発表論文 1)。

(5) cAMP-c-Fos 経路による樹状細胞改変の試み

Toll 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、炎症性サイトカイン (TNF α , 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。これら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かった。昨年我々は *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 (*Immunity*. 2009 Jan;30(1):80-91)。 *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 α 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。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 β 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を見いだした。そこで現在このリン酸化サイトに変異を導入したトランスジェニックマウスを作成し解析を行っている。

永井グループ

(1) 低酸素状態における炎症性細胞の挙動についての研究

炎症部位は多くの場合に低酸素状態になることが知られるが、これまでに我々の研究も含め細胞内レドックス状態の違いがサイトカイン発現に大きな影響を与えることが示されてきた。関節リウマチをモデルとしてサイトカインと自然免疫の機能を解析するアプローチから、関節リウマチの炎症部位におけるサイトカインや低酸素の影響を糖の取り込みで検討した。炎症関連細胞の *in vitro* における糖の取り込み能を様々な炎症性サイトカインの存在下や低酸素状態で検討し、さらに FDG-PET による *in vivo* の評価を試みた。その結果、FDG-PET によってパンヌス形成と炎症の活動度を評価できる可能性が示唆された。*in vitro* ではマクロファージと線維芽細胞が高い糖の取り込み能を示し、取り込み能は炎症性サイトカイン TNF α や IL-1 β によってさらに上昇することが示された。炎症部位は一般に低酸素状態になることが知られるが、マクロファージや線維芽細胞による糖の取り込みは酸素分圧の低下によっても上昇することが示された。これらの事実から FDG-PET による造影が関節リウマチの活動度を評価する一つの手段となる可能性が示された(論文2)。

(2) 新しいリンパ組織と新規リンパ球の発見

Th17 や Treg の制御ならびに HIF-1 α の解析には腸管が注目されたため、腸管の免疫関連組織を精査したところ、腸間膜をはじめとする腹腔内の脂肪組織にこれまでに報告がなかったリンパ球集積を発見し、FALC (fat-associated lymphoid cluster) を名付けた。この構造はヒトにもみられた。さらに FALC 中に、分化マーカーを発現せず、c-Kit 陽性、Sca-1 陽性、IL-7 受容体陽性、IL-33 受容体陽性の細胞を見だし、この細胞の機能を精査した。その結果、この細胞群が IL-2 に反応して増殖し、恒常的に IL-5 や IL-13 などの Th2 型のサイトカインを発現することで腹腔内の B1 細胞の増殖維持に重要な役割を果たすこと、また寄生虫感染時の初期に T 細胞とは独立に Th2 サイトカイン、特に IL-13 を高発現し、腸管上皮の杯細胞の過形成を通じて初期の寄生虫感染防御に機能すること、などを明らかにした。これらの性質からこの細胞群は新たなリンパ球サブセットと考えられたことから、「ナチュラルヘルパー細胞」と名付けた(論文4)。

(3) MFG-E8 遮断による樹状細胞機能の亢進

単球や樹状細胞が GM-CSF 刺激によって分泌する MFG-E8 (milk fat globule epidermal growth factor-8) はアポトーシス細胞の表面に表出するフォスファチジルセリンに結合し、さらに単球や樹状細胞表面のインテグリンを介して貪食を促進する。一方、この際のシグナルにより、TGF β の発現を介して Treg を誘導する。この系を特異抗体によって阻害することで、樹状細胞が死細胞を貪食した後のクロスプレゼンテーションを亢進し、より効率の良い細胞傷害性 T 細胞の誘導につながることを示した(論文 1)。この研究は東京大学医科学研究所の地主将久博士ならびに田原秀晃教授が主体

となった共同研究である。

(4) ミクログリアを標的とした細胞傷害性 T 細胞の誘導

脳内のミクログリアはマクロファージに類似し、サイトカインを分泌するとともに抗原提示にも機能すると考えられている。リステリア菌の脳内感染系を用い、リステリア脳症においてリステリアを貪食したミクログリアを Fas-FasL 系で傷害する細胞傷害性 T 細胞が誘導されることを明らかにした(論文3)。

(5) 細菌エフェクターによる樹状細胞からの IL-10 発現の調節機構

百日咳菌のモデルである *Bordetella bronchiseptica* を用い、菌体から III 型分泌装置を介して宿主細胞へ注入されるエフェクターの一つである BopN が樹状細胞からの IL-10 発現を亢進し、炎症を抑制することで宿主免疫系から逃れるという宿主免疫回避機構を明らかにし、これが BopN による転写因子 NF- κ B 系への干渉によることを示した(論文5)。この研究は北里大学の永松環奈博士ならびに阿部章夫教授が主体となった共同研究である。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

・論文詳細情報

吉村グループ

1. Shichita T, Sugiyama Y, Ooboshi H, Sugimori H, Nakagawa R, Takada I, Iwaki T, Okada Y, Iida M, Cua DJ, Iwakura Y and Yoshimura A. Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadeltaT cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nature Med.* 2009 Aug;15(8):946-50. doi:10.1038/nm.1999
2. Nakaya M, Hashimoto M, Nakagawa R, Wakabayashi Y, Ishizaki T, Takada I, Komai K, Yoshida H and Yoshimura A. SOCS3 in T and NKT cells negatively regulates cytokine production and ameliorates ConA-induced hepatitis. *J Immunol.* 2009 Dec 1;183(11):7047-53. doi:10.4049/jimmunol.0900547
3. Sekine Y, Ikeda O, Tsuji S, Yamamoto C, Muromoto R, Nanbo A, Oritani K, Yoshimura A and Matsuda T. Signal-Transducing Adaptor Protein-2 Regulates Stromal Cell-Derived Factor-1 α -Induced Chemotaxis in T Cells. *J Immunol.* 2009 Dec 15;183(12):7966-74. doi:10.4049/jimmunol.0902096
4. Messiaen L, Yao S, Brems H, Callens T, Sathienkijkanchai A, Denayer E, Spencer E, Arn P, Babovic-Vuksanovic D, Bay C, Bobele G, Cohen BH, Escobar L, Eunpu D, Grebe T, Greenstein R, Hachen R, Irons M, Kronn D, Lemire E, Leppig K, Lim C, McDonald M, Narayanan V, Pearn A, Pedersen R, Powell B, Shapiro LR, Skidmore D, Tegay D, Thiese H, Zackai EH, Vijzelaar R, Taniguchi K, Ayada T, Okamoto F, Yoshimura A, Parret A, Korf B and Legius E. Clinical and mutational spectrum of Legius syndrome *JAMA* 2009 Nov 18;302(19):2111-8. doi:10.1001/jama.2009.1663
5. Taleb S, Romain M, Ramkhelawon B, Uyttenhove C, Pasterkamp G, Herbin O, Esposito B, Perez N, Yasukawa H, Van Snick J, Yoshimura A, Tedgui A and Mallat Z. Loss of SOCS3 expression in T cells reveals a regulatory role for interleukin-17 in atherosclerosis.

J Exp Med. 2009 Sep 28;206(10):2067-77. doi:10.1084/jem.20090545

6. Ichiyama K, Hashimoto M, Sekiya T, Nakagawa R, Wakabayashi Y, Sugiyama Y, Komai K, Saba I, Möröy T and Yoshimura A. Gfi1 negatively regulates T(h)17 differentiation by inhibiting ROR γ activity. *Int Immunol.* 2009 Jul;21(7):881-9. doi:10.1093/intimm/dxp054

7. Taniguchi K, Ishizaki T, Ayada T, Sugiyama Y, Wakabayashi Y, Sekiya T, Nakagawa R and Yoshimura A. Sprouty4 deficiency potentiates Ras-independent angiogenic signals and tumor growth. *Cancer Sci.* 2009 Sep;100(9):1648-54. doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01214.x

8. Taniguchi K, Sasaki K, Watari K, Yasukawa H, Imaizumi T, Ayada T, Okamoto F, Ishizaki T, Kato R, Kohno R, Kimura H, Sato Y, Ono M, Yonemitsu Y and Yoshimura A. Suppression of Sproutys has a therapeutic effect for a mouse model of ischemia by enhancing angiogenesis. *PLoS ONE.* 2009;4(5):e5467. doi: 0.1371/journal.pone.0005467

9. Mori H, Inoki K, Masutani K, Wakabayashi Y, Komai K, Nakagawa R, Guan KL and Yoshimura A. The mTOR pathway is highly activated in Diabetic Nephropathy and Rapamycin has a strong therapeutic potential *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Jul 10;384(4):471-5. doi:10.1016/j.bbrc.2009.04.136

10. Saeki K, Fukuyama S, Ayada T, Nakaya M, Aki D, Takaesu G, Hanada T, Matsumura Y, Kobayashi T, Nakagawa R and Yoshimura A. A major lipid raft protein raftlin modulates T cell receptor signaling and enhances Th17-mediated autoimmune responses. *J Immunol.* 2009 May 15;182(10):5929-37. doi:10.4049/jimmunol.0802672

11. Fukuyama S, Nakano T, Matsumoto T, Oliver BG, Burgess JK, Moriwaki A, Tanaka K, Kubo M, Hoshino T, Tanaka H, McKenzie AN, Matsumoto K, Aizawa H, Nakanishi Y, Yoshimura A, Black JL and Inoue H. Pulmonary Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS)-1 Induced by IL-13 Regulates Allergic Asthmatic Phenotype. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009 Jun 1;179(11):992-8. doi:10.1164/rccm.200806-992OC

12. Hashimoto M, Ayada T, Kinjyo I, Hiwatashi K, Yoshida H, Okada Y Kobayashi T and Yoshimura A. Silencing of *SOCS1* in macrophages suppresses tumor development by enhancing antitumor inflammation *Cancer Sci* 2009 Apr;100(4):730-6. doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01098.x

13. Atsumi T, Sato M, Kamimura D, Moroi A, Iwakura Y, Betz UA, Yoshimura A, Nishihara M, Hirano T and Murakami M. IFN-gamma expression in CD8+ T cells regulated by IL-6 signal is involved in superantigen-mediated CD4+ T cell death. *Int Immunol.* 2009 Jan;21(1):73-80. doi:10.1093/intimm/dxn125

・ 永井グループ

1. Jinushi, M., Sato, M., Kanamoto, A., Itoh, A., Nagai, S., Koyasu, S, Dranoff, G. and Tahara, H. Milk fat globule EGF-8 blockade triggers tumor destruction through coordinated cell-autonomous and immune-mediated mechanisms. *J. Exp. Med.* 2009 May 11; 206:1317-1326. doi:10.1084/jem.20082614

2. Matsui, T., Nakata, N., Nagai, S., Nakatani, A., Takahashi, M., Momose, T., Ohtomo, K. and Koyasu, S. Inflammatory cytokine and hypoxia contribute to ¹⁸F-FDG uptake by cells involved in pannus formation in rheumatoid arthritis. *J. Nuc. Med.* 2009 May 1; 50:908-914. doi:10.2967/jnumed.108.060103

3. Hayashi, T., Nagai, S., Fujii, H., Baba, Y., Ikeda, E., Kawase, T. and Koyasu, S. Critical roles of NK and CD8⁺ T cells in distinct phases of CNS listeriosis. *J. Immunol.* 2009 May 15; 182:6360-6368. doi:10.4049/jimmunol.0803798

4. Moro, K., Yamada, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., Furusawa, J.-I., Ohtani, M., Fujii, H. and Koyasu, S. Innate production of Th2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit⁺Sca-1⁺ lymphoid cells. *Nature* 2009 Dec. 20; 463(7280):540-U160. doi:10.1038/nature08636

5. Nagamatsu, K., Kuwae, K., Konaka, T., Nagai, S., Watanabe, M., Yoshida, S., Mimuro, H., Koyasu, S. and Abe, A. *Bordetella* evades the host immune system by inducing IL-10 through a type III effector, BopN. *J. Exp. Med.* 2009 Dec. 21; 206:3073-3088. doi:10.1084/jem.20090494.

(4-2) 知財出願

① 平成21年度特許出願件数(国内 1件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 1件)