

**「炎症の慢性化機構の解明と制御」研究領域 領域活動・評価報告書**  
**－平成26年度終了研究課題－**

研究総括 高津 聖志

1. 研究領域の概要

本研究領域は、生体防御反応であるにもかかわらず、炎症が慢性化することによって生体に悪影響を引き起こす現象の実体解明に向けた研究、すなわち、炎症の慢性化とその維持機構、および炎症の慢性化が疾患を惹起・進行・重症化する機構の時空間的な解明に挑戦する研究を対象とします。このような研究を推進することにより、炎症の慢性化が関与するさまざまな疾患や臓器不全の予防や治療、創薬につながる新たな医療基盤の創出を目指します。

具体的には、下記の視点をもった研究を推進します。

- 1) 分子や細胞の階層から迫る研究に加え、組織や臓器の階層から迫る視点
- 2) 細胞や組織、臓器間の相互作用、個体全体でのダイナミクスなど、慢性炎症を複雑系として捉える視点
- 3) エピジェネティクスや機能性非コード RNA など、他生命科学分野からの視点
- 4) 遺伝子産物、生理活性物質、細胞やそれらの動態を検出・測定する技術的な分野からの視点
- 5) 慢性炎症の制御による関連疾患を標的とした創薬などの医療応用を見据えた視点

2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数： 9件(通常型)

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は、「炎症の慢性化機構の解明と制御」領域に設けた選考委員 11 名の協力を得て、研究総括が行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考および総合選考とする。
- 3) 選考にあたっては、さきがけ共通の選考基準(URL : <http://www.jst.go.jp/pr/info/info825/besshi4.html>)に則ると共に、領域の課題達成に向け、3回の選考を通じて幅広い研究課題を採択するように努めた。

4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー・外部評価者3名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。上記選考を経た課題の内、大挑戦型審査会(書類選考会議)へ1課題を推薦した。

選 考	書類選考	面接選考	採択数			
			14件	内 訳	3年型	10件
対象数	201件	29件			14件	内 訳

( )内は大挑戦型としての採択数。

備考:

- 1)平成23年度採択課題の内、以下は今年度事後評価対象としない。
  - ・巻出久美子研究者  
ライフイベントにより研究を一時中断し、終了年度がずれるため。

5. 研究実施期間

平成23年10月～平成27年3月(3年型)

平成23年10月～平成29年3月(5年型)

## 6. 領域の活動状況

領域会議: 8回

研究報告会: 2回

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問: 研究開始時に研究総括、技術参事、事務参事が研究者とその上司を訪問し、さきがけ研究実施にあたっての協力を依頼した。研究総括からは、研究者にこれまでの研究歴などについてのインタビューを行った。さらに、研究室、研究設備等を確認し、研究環境の説明を受け、研究実施に支障がないことを確認した。また、研究実施に必要な事務的な手続きについての説明も行った。

## 7. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(研究報告会、領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(事後評価の流れ)

平成26年12月	評価会開催
平成27年 2月	研究総括による事後評価
平成27年 3月	被評価者への結果通知

## 8. 事後評価項目

- (1) 研究計画書の目標と研究課題に対する達成度
- (2) 外部発表(学術論文、口頭発表など)やプレスリリースと特許などから見た研究成果と発信状況
- (3) 学術賞、学会招待講演、新聞記事など外部からの評価状況
- (4) 達成した研究成果の科学、技術、社会への貢献度
- (5) 世界レベルの若手研究リーダーの輩出の観点から、本さきがけ研究が、研究者としての飛躍につながったか(今後の期待を含む)」

## 9. 評価結果

今年度で終了する研究課題では、腸管における炎症制御機構(腸管上皮に特異発現する転写因子のオートファジー活性化による抗菌作用とインフラマソームの活性化抑制作用、腸管に常在し上皮傷害に対して生体防御の最前線で異物の侵入を監視するマクロファージ亜集団の検討、制御性T細胞を誘導するヒト腸内細菌の同定)、機能性リン脂質のマクロファージ亜集団分化への作用とそれら亜集団の病態との関わり、形質細胞様樹状細胞の活性化抑制分子の機能とその獲得免疫系への影響、リンパ球の体内動態に対する神経性制御機構、免疫系細胞における活性化シグナル分子の新規制御メカニズム、肥満や糖尿病における脂肪組織慢性炎症の病態への関わり、抗原提示細胞による T 細胞活性化調節に関わる分子機能のイメージング解析といった慢性炎症制御に向けた広範な研究が実施された。領域会議等における領域アドバイザーからのアドバイスと共に、研究者間での情報交換・共同研究も活発で、いずれの課題においても質の高い研究が遂行され、多くは当初想定通りの、あるいはそれを超える成果をあげた。一方で、チャレンジングな課題であるために期間内に成果をまとめられなかった課題もあったが、興味深いデータが蓄積されており今後の研究の進展に期待している。研究者別にそれらの研究内容と評価を以下に述べる。

1. 青木 耕史 研究者「腸管上皮細胞の粘膜免疫防御における腸管上皮特異的ホメオボックスタンパク質 CDX2 によるオートファジー制御機構とその役割の解析」

腸管上皮に特異発現するホメオボックス転写因子 CDX2 が、ATG7 に結合してオートファジーを活性化し赤痢菌の細胞内での生存を抑制するほか、転写因子として ICEBERG (CARD18) の発現を上昇させることによりインフラマソームの活性化を抑制して炎症を制御すること、さらには CDX2 変異マウスでは DSS 誘導マウス大腸炎が著しく増悪することを見出している。本研究により、初めて ICEBERG の炎症抑制機能が明らかとなったが、この分子はヒトゲノム特異的な遺伝子であり、CDX2 のより詳細な炎症制御への関与を検討するためには、新たな実験系の工夫などが必要と考えられる。さきがけ研究期間中に異動したにも関わらず、非常に丁寧に着実な研究を継続してきており、今後も残された課題を解決すればさらなる発展が期待できる。

2. 浅野 謙一 研究者「腸管センチネル細胞を標的とした炎症性腸疾患治療法の開発」

CD169 陽性マクロファージが腸管の粘膜筋板近くの粘膜固有層に局在して、自然免疫依存性の炎症性腸疾患における症状の促進に寄与すること、その腸炎促進作用の一端として、上皮傷害に伴い細菌成分(LPS)や死細胞由来の内因性物質(HMGB1)に CD169 陽性マクロファージが反応して CCL8 を高産生し、Ly6C<sup>hi</sup> の炎

症性マクロファージの遊走を促進するためであることを示した。このことにより、CD169 陽性マクロファージや CCL8 が、炎症性腸疾患の治療ターゲットである可能性を示唆した。今後、本知見をヒト炎症性腸疾患において確認し、新規治療法の開発に貢献することを期待できる。

### 3. 新 幸二 研究者「炎症制御に向けた腸管制御性 T 細胞の誘導機構の解明」

無菌マウスなどを用いた実験系で、制御性T細胞を誘導するヒト腸内細菌として、芽胞を形成するクロストリジウム目に属する 17 菌株を同定した。その制御性T細胞の誘導メカニズムとして、17 菌株が産生する短鎖脂肪酸によって刺激された大腸上皮細胞から制御性T細胞の分化に必須のサイトカインである TGF- $\beta$  が強産生されることを見出している。さらに、その 17 菌株の投与により、腸炎モデルや食物アレルギーモデルの病態や症状が抑制されることを確認し、世界的にもインパクトのある発表を行った。現在、本知見の臨床応用に向けた研究を行っており、その展開が大いに期待できる。本課題の研究、さらには研究領域内における他の研究者との共同研究によって、質の高い研究成果の発表を行い国内外において評価され、研究者としての飛躍につながった。

### 4. 佐々木 純子 研究者「マクロファージの活性化調節による慢性炎症の制御」

SHIP1 欠損マウスで見られた肺炎が、マクロファージ(M $\Phi$ )特異的 SHIP1 欠損マウスでは発症しないことから、当初期待された SHIP1 欠損型 M $\Phi$  が肺炎の根本原因であるという仮説は否定された。しかし、高脂肪食負荷によるインスリン抵抗性についての検討では、M $\Phi$  特異的 SHIP1 欠損マウスの脂肪組織における M1M $\Phi$  の増加と M2M $\Phi$  の減少が認められて全身性のインスリン抵抗性が増悪し、一方 M $\Phi$  特異的 PTEN マウスの脂肪組織では M1M $\Phi$  の減少と M2M $\Phi$  の増加が認められ全身性のインスリン抵抗性が改善した。このことから、SHIP1 欠損型 M $\Phi$  と PTEN 欠損型 M $\Phi$  は慢性炎症病態を修飾する M $\Phi$  であることを明らかにすることができた。また、PIP3 分子種の測定系構築に成功して、SHIP1 あるいは PTEN 欠損 M $\Phi$  で蓄積するアシル基などの異なる PIP3 分子種を同定し、それらの分子種により直接 M $\Phi$  の活性化状態を制御できること確認した。今後この新たな測定系を駆使し、炎症病態においてキーとなる PIP3 分子種を見出すことなど、さらなる研究の発展が期待できる。

### 5. 佐藤 克明 研究者「形質細胞様樹状細胞による炎症慢性化機構と制御」

形質細胞様樹状細胞(pDCs)に特異的に発現する分子である Siglec-H を欠損したマウスと pDCs を特異的に消失させたマウスを独自に作製し、pDCs において Siglec-H が有する、(1)TLR7/TLR9-MyD88 依存的な IKK- $\alpha$  と NF- $\kappa$ B の活性化を介する炎症性サイトカイン(I 型インターフェロン)産生の抑制機能、(2)通常型樹状細胞の活性化調節機能や抗原特異的エフェクターCD4<sup>+</sup>T 細胞と CTL の誘導の調節機能を明らかにし発表した。さらに、尋常性乾癬様炎症病態モデルにおいて、pDCs と Siglec-H の免疫病態の形成における役割の解析を行いつつある。これらの結果は、pDC の関与が疑われる自己免疫疾患に対する新たな治療ターゲットを示唆することができた。本さきがけ研究は国内外において評価され、研究者としての飛躍につながった。

### 6. 鈴木 一博 研究者「慢性炎症における免疫細胞動態の神経性制御機構の解明」

交感神経が免疫系に及ぼす影響とそのメカニズムについて研究し、 $\beta$ 2 アドレナリン受容体は刺激を受けて活性化すると、リンパ球のリンパ節への保持に関わるケモカイン受容体(CCR7 および CXCR4)と G タンパク共役型受容体同士で複合体を形成し、ケモカイン受容体の反応性が亢進することにより、リンパ球のリンパ節からの脱出を抑制することを明らかにした。さらに、ヒトの多発性硬化症およびアレルギー性皮膚炎のマウスモデルにおいて、 $\beta$ 2 アドレナリン受容体を介する刺激を加えることより抗原特異的 T 細胞のリンパ節からの脱出と炎症部位への移動が阻害され、その結果として症状の進行が抑制されることを明らかにし発表した。今後、病態はもとより日内変動などの生理的条件下におけるこの交感神経によるリンパ球動態の制御についての研究も予定されており、興味が尽きない。本さきがけ研究は新たな研究分野を開拓するものと国内外において評価され、研究者としての飛躍につながった。

### 7. 田中 貴志 研究者「炎症反応を負に制御する分子機構の解明」

免疫系細胞に発現し炎症反応制御に働く分子として LIM タンパク質ファミリーの解析を行い、PDLIM2 は、LIM ドメインを介してユビキチン化酵素 E1/E2 をリクルートし、樹状細胞においては TLR などのシグナルにより活性化して核内に移行してきた NF- $\kappa$ B(p65)を、T 細胞においては IL-6 などのシグナルにより活性化して核内に移行してきた転写因子 STAT3 をユビキチン化してプロテアソーム分解することで過剰な Th1/17 細胞の分化を負に制御することを明らかにした。また、PDLIM2-NF- $\kappa$ B 複合体のプロテアソームへの輸送には、

HSP70 とプロテアソームに結合する BAG1 と会合する必要があることを見出し、発表している。一方、独自に同定したPDLIM4はT細胞において標的タンパクをユビキチン化することなく細胞質内においてLIMドメインを介してタンパク質脱リン酸化酵素 PTPBL をリクルートし、STAT4/3 を脱リン酸化することにより、Th1/2/17 細胞分化を負に制御することを明らかにした。さらに、PDLIM4 の LIMドメイン内の SNP が関節リウマチやバセドウ病の疾患感受性と相関することなどを明らかにした。今後のマイクロアレイ解析などにより、新規の慢性炎症の機序解明に資する分子の同定が期待できる。

#### 8. 南野 徹 研究者「長寿・老化モデルマウスを用いた慢性炎症機構の解明」

食餌誘導性肥満モデルにおいて、肥満と高カロリー食負荷により老化状態となった脂肪細胞が、p53 依存的にセマフォリン 3E (Sema3E) を分泌し、それに対して Sema3E の受容体であるプレキシシン D1 を高発現する骨髄由来のマクロファージが引き寄せられて脂肪組織に浸潤し、脂肪炎症と糖代謝異常(インスリン抵抗性や耐糖能異常)を引き起こすことを極めて緻密な実験により明らかにした。さらに、糖尿病患者でも血中 Sema3E レベルの上昇を確認しており、ヒトにおいてもこの Sema3E-プレキシシン D1 経路が糖代謝異常に関与している可能性を示唆する発表を行った。その他に、高カロリー食負荷によって糖尿病を発症させたマウスの血管における p53 発現上昇により、血管細胞のグルコース輸送分子 Glut1 産生が障害されると共に、血管細胞での一酸化窒素産生の低下に伴う筋肉細胞内でのミトコンドリア合成抑制の結果として骨格筋におけるエネルギー消費量の低下をも招来することにより、余剰となったカロリーが内臓脂肪として蓄積して脂肪組織における炎症が生じ、肥満や糖尿病がさらに進行する悪循環が起こることを見出して発表している。以上のように、本領域の戦略目標に貢献する老化・生活習慣病における慢性炎症の関与について成果をあげ、国内外で評価され、研究者としての飛躍につながった。

#### 9. 横須賀 忠 研究者「MAPK 経路の分子イメージングによる T 細胞活性化遷延機構の解明」

抗原提示細胞により T 細胞が活性化される際のシグナル分子の動態を独自の分子イメージング技術を駆使して解析し、(1) 活性化 T 細胞において PD-1 のリガンドが存在する時に PD-1 は TCR と同一のクラスターを形成し、PD-1 の細胞内チロシンモチーフのリン酸化に誘導された SHP2 がリクルートされ MAPK 経路の中心分子 Erk を脱リン酸化して T 細胞機能を抑制すること、(2) リンパ球特異的なアクチン脱キャッピングタンパク質 Rltpr が、CD28 と PKC $\theta$  および足場タンパク質 Carma1 と共に複合体を形成し NF- $\kappa$ B 経路を介して T 細胞を活性化させる機能と CD28 のインターナリゼーションに関与するアクチン重合を促進させる機能とを同時に担っていること、(3) 制御性 T 細胞に発現する CTLA-4 が PKC- $\eta$  と特異的に会合し免疫シナプス面に集まって細胞間の局所接着を亢進させ、抗原提示細胞上の CD86 分子をトロゴサイトーシスすることにより抗原提示細胞機能を抑制することを見出し発表した。今後、さらに MAPK 経路活性化に重要な Ras の活性化の一部を担うリンパ球特異的な RasGRP1 の時空間的な細胞内局在の解析などを通じて、T 細胞活性化制御の分子ターゲットを見出し慢性炎症の抑制へ応用することが期待できる。なお、最近承認された抗 PD-1 抗体による抗がん療法の高い臨床効果の作用メカニズムを説明する上で重要な PD-1 シグナルを明確に示したため、その発表を行った論文は多数引用され、学会の招待講演や著書の依頼が増加しており、研究者としての飛躍につながったことも付記したい。

#### 10. 評価者

研究総括 高津 聖志 富山県薬事研究所 所長

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成26年3月末現在)

烏山 一	東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 教授
佐田 政隆	徳島大学 大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授
反町 典子	(独)国立国際医療研究センター研究所 プロジェクト長
戸邊 一之	富山大学 医学部 第一内科 教授
長田 重一	京都大学 大学院医学研究科 教授
福井 宣規	九州大学 生体防御医学研究所 教授
古市 泰宏	(株)ジーンケア研究所 取締役会長
三浦 正幸	東京大学 大学院薬学系研究科 教授
宮坂 信之	東京医科歯科大学 名誉教授
宮園 浩平	東京大学大学院医学系研究科 教授

山村 隆 (独)国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 部長

外部評価者(五十音順。所属、役職は平成23年3月末時点)

糸山 泰人 (独)国立精神・神経医療研究センター病院 院長  
今井 浩三 東京大学医科学研究所附属病院 病院長/教授  
岡田 弘晃 東京薬科大学薬学部 教授  
澁谷 正史 上武大学 副学長  
高井 俊行 東北大学加齢医学研究所 教授  
竹縄 忠臣 神戸大学大学院医学研究科 特命教授  
福森 義信 神戸学院大学薬学部 教授  
藤田 禎三 福島県立医科大学 教授  
藤田 尚志 京都大学ウイルス研究所 教授  
前田 瑞夫 理化学研究所基幹研究所 主任研究員  
向田 直史 金沢大学がん進展制御研究所 教授  
村上 伸也 大阪大学大学院歯学系研究科 教授  
山本 雅 東京大学医科学研究所 教授  
義江 修 近畿大学大学院医学系研究科 教授  
吉開 泰信 九州大学生体防御医学研究所 教授

(参考)

件数はいずれも、平成26年9月末現在。

(1)外部発表件数

	国内	国際	計
論文	22	37	59
口頭	75	31	106
その他	0	0	0
合計	97	68	165

(2)特許出願件数

国内	国際	計
1	1	2

(3)受賞等

- ・浅野 謙一  
日本免疫学会 第7回研究奨励賞(平成24年)
- ・新 幸二  
理研研究奨励賞(平成26年)  
日本ビフィズス菌センター研究奨励賞(平成26年)  
ゴットフリード・ワグネル賞(平成26年)
- ・佐藤 克明  
RIKEN RCAI The Excellent Paper Award 2011(平成23年)  
慶應医学会感謝状(平成25年)
- ・鈴木一博  
日本免疫学会 第7回研究奨励賞(平成24年)
- ・横須賀 忠  
千葉医学会賞(基礎医学部門)(平成24年)

(4)招待講演

国際 18件  
国内 34件

別紙

「炎症の慢性化機構の解明と制御」領域 事後評価実施 研究課題名および研究者氏名

(3年型)

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成27年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
青木 耕史 (兼任)	腸管上皮細胞の粘膜免疫防御における腸管上皮特異的ホメオボックス蛋白質 CDX2 によるオートファジー制御機構とその役割の解析 (福井大学 医学部)	福井大学医学部 医学科 教授 (京都大学 大学院医学研究科 助教)	40
浅野 謙一 (兼任)	腸管センチネル細胞を標的とした炎症性腸疾患治療法の開発 (東京薬科大学 生命科学部)	東京薬科大学 生命科学部 准教授 (同上)	39
新 幸二 (兼任)	炎症制御に向けた腸管制御性 T 細胞の誘導機構の解明 (慶應義塾大学 医学部)	慶應義塾大学医学部 助教 (東京大学医学部 特任助教(専任))	39
佐々木 純子 (兼任)	マクロファージの活性化調節による慢性炎症の制御 (秋田大学 大学院医学系研究科)	秋田大学 大学院医学系研究科 准教授 (同上 講師)	39
佐藤 克明 (兼任)	形質細胞様樹状細胞による炎症慢性化機構と制御 (宮崎大学 医学部)	宮崎大学 医学部 教授 (独)理化学研究所 免疫アレルギー科学総合研究センター チームリーダー)	40
鈴木 一博 (兼任)	慢性炎症における免疫細胞動態の神経性制御機構の解明 (大阪大学 免疫学フロンティア研究センター)	大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 特任准教授 (同上)	39
田中 貴志 (兼任)	炎症反応を負に制御する分子機構の解明 (独)理化学研究所 統合生命医科学研究センター)	(独)理化学研究所 統合生命医科学研究センター チームリーダー (独)理化学研究所 免疫アレルギー科学総合研究センター ユニットリーダー)	39
南野 徹 (兼任)	長寿・老化モデルマウスを用いた慢性炎症機構の解明 (新潟大学 医学部)	新潟大学 医学部 教授 (千葉大学 大学院医学研究院 講師)	39
横須賀 忠 (兼任)	MAPK 経路の分子イメージングによる T 細胞活性化遷延機構の解明 (独)理化学研究所 統合生命医科学研究センター)	(独)理化学研究所 統合生命医科学研究センター 上級研究員 (同上)	38

# 研究報告書

## 「腸管上皮細胞の粘膜免疫防御における腸管上皮特異的ホメオボックス蛋白質 CDX2 によるオートファジー制御機構とその役割の解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年10月～平成27年3月

研究者: 青木耕史

### 1. 研究のねらい

近年、日本を含めた欧米諸国では、クローン病や潰瘍性大腸炎に代表される炎症性腸疾患への罹患率が著しく増加している。炎症性腸疾患は、小腸や大腸に炎症を発症する慢性炎症性疾患で、再発を繰り返す一方で完治することがなく、根本的治療法の開発が急務な難治性疾患である。しかし、それらの炎症性腸疾患の原因が明らかになっておらず、炎症が慢性化する機構の解明は、重要な課題の一つとなっている。

腸は、内腔と生体を腸粘膜によって隔てている。その腸粘膜において内腔に接しているのが腸上皮細胞である。これまで我々は、その腸上皮細胞に特異的に発現し、腸上皮細胞の生理的および恒常的な機能に不可欠な、ホメオボックス転写因子である CDX2 の機能解析を進めてきた。その CDX2 に結合するタンパク質を質量分析法により解析したところ、細胞内分解システムの一つであるオートファジーの必須酵素 ATG7 に CDX2 が結合することを見出した。この結果と一致して、腸上皮細胞において、CDX2 がオートファジーを活性化することが分かった。近年の研究から、オートファジーに関係する遺伝子の異常が、炎症性腸疾患の発症を促進することや、オートファジーが腸粘膜の細菌感染への防御に働くことにより腸粘膜免疫に重要な役割を果たすことが明らかになっている。そこで、本研究課題では、腸管の上皮細胞に特異的に発現しているホメオボックス蛋白質である CDX2 の機能解析を中心にして、炎症性腸疾患の誘発や炎症の慢性化状態の維持に関わる腸上皮細胞の異常の解明を目標にする。とくに、CDX2 によるオートファジーの活性化が腸管における細菌感染に対して働く役割を明らかにすることにより、腸上皮細胞に備わる感染防御機構の解明を目指す。また、近年の研究から、腸粘膜のマクロファージなどの間質細胞において炎症性シグナルの制御にオートファジーが重要な役割を担うことが明らかになった。一方で、腸上皮細胞における炎症性シグナルの制御機構の解明は遅れている。そこで、本研究課題では、腸上皮細胞の炎症性シグナルの制御における CDX2 の役割や、CDX2 によって活性化するオートファジーの役割を明らかにする。これらの一連の解析を通じて、腸粘膜の炎症の慢性化の原因となり得る腸上皮細胞の異常の解明を進めることにより、炎症性腸疾患の原因の解明を目標にする。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

これまでの研究から、腸粘膜への細菌の感染に対して、腸粘膜のオートファジーが防御能の一つとして働くことや、そのオートファジーの活性が炎症性シグナルの調節に重要な役割を担うことが報告されていた。しかし、腸上皮細胞のオートファジーを制御する機構や腸上皮細

胞から発信される炎症性シグナルの調節機構は不明であった。本研究では、腸管の上皮細胞に特異的に発現しているホメオボックス転写因子 CDX2 が、腸上皮細胞への細菌（赤痢菌）の感染に対して防御的に働くことを明らかにした。さらに、その細菌感染防御が、CDX2 によるオートファジーの活性化を介していることが明らかになった。

腸上皮細胞への細菌感染により、腸粘膜組織では細菌感染に対する防御反応として炎症性シグナルが惹起する。腸上皮細胞では、とくにインフラマソームの活性化により Caspase I が活性化することにより、炎症性シグナルの主要サイトカインの一つである IL18 の成熟型が産生される。本研究により、CDX2 がヒトゲノムに特異的な *ICEBERG (CARD18)* 遺伝子の発現を上昇することにより、Caspase I を抑制することが分かった。その結果、腸上皮細胞における IL18 の産生および分泌量が CDX2 により著しく減少することが分かった。また、DSS 投与により誘発される腸炎が *Cdx2* 変異マウスでは、野生型マウスに比べて著しく増悪することが分かった。これらの一連の実験結果から、CDX2 が腸上皮細胞由来の炎症シグナルの負の制御因子であることや、*ICEBERG* 遺伝子の生理的機能が初めて明らかになった。

さらに、CDX2 が炎症性ケモカインの CXCL1,2,3,5 や CXCL10 の遺伝子発現を顕著に抑制することが遺伝子発現解析により明らかになった。CXCL1 や CXCL5 は、腸粘膜の炎症部に好中球などの免疫細胞を遊走する炎症性ケモカインとして、炎症の誘導に働くことが知られている。これらの結果から、腸上皮細胞において、CDX2 はオートファジーの活性化を介して感染防御に働く一方で、インフラマソームの活性制御や炎症性ケモカインの発現調節などを介して、腸粘膜の免疫防御に働くことで、炎症反応を減弱させていると考えている。

## (2) 詳細

### 「腸上皮細胞への細菌感染に対する CDX2 の感染防御能の解析」

CDX2 に結合するタンパク質分子を質量分析法により解析したところ、CDX2 がオートファジーの必須酵素である ATG7 に結合することや、腸上皮細胞のオートファジーを活性化することが分かった。オートファジーは細胞内の分解システムとして働く一方で、その異常が炎症性腸疾患を含む様々な病態の原因になることが明らかになっている。そこで、腸上皮細胞に感染性の赤痢菌株 YSH6000 を用いて解析を行ったところ、腸上皮細胞に感染した赤痢菌の腸上皮細胞内での生存を CDX2 が抑制することが分かった。さらに、ATG7 に対する shRNA を用いてオートファジーの活性を抑制すると、CDX2 による、細菌の増殖抑制が減弱することがわかった。これらの結果から、CDX2 がオートファジーの活性化を介して腸上皮細胞に感染した細菌の生存を抑制することにより、粘膜免疫防御を強化することが分かった(図 1)。

### 「腸上皮細胞から発信される炎症性シグナルの制御における CDX2 の役割の解析」

近年の研究から、腸粘膜組織のマクロファージなどにおいて、オートファジーが炎症性サイトカインである IL1 $\beta$ などの産生を制御することが報告されている。CDX2 がオートファジーを活性化することから、CDX2 が腸上皮細胞由来の炎症性シグナルを調節することを仮説として解析を進めた。その結果、CDX2 が Caspase I (インフラマソーム) の活性化を抑制することや IL18 の産生を抑制することが分かった。その機序を解明するために cDNA マイクロアレイ解析を行ったところ、CDX2 が発現を最も顕著に誘導する遺伝子として *ICEBERG (CARD18)* を同定



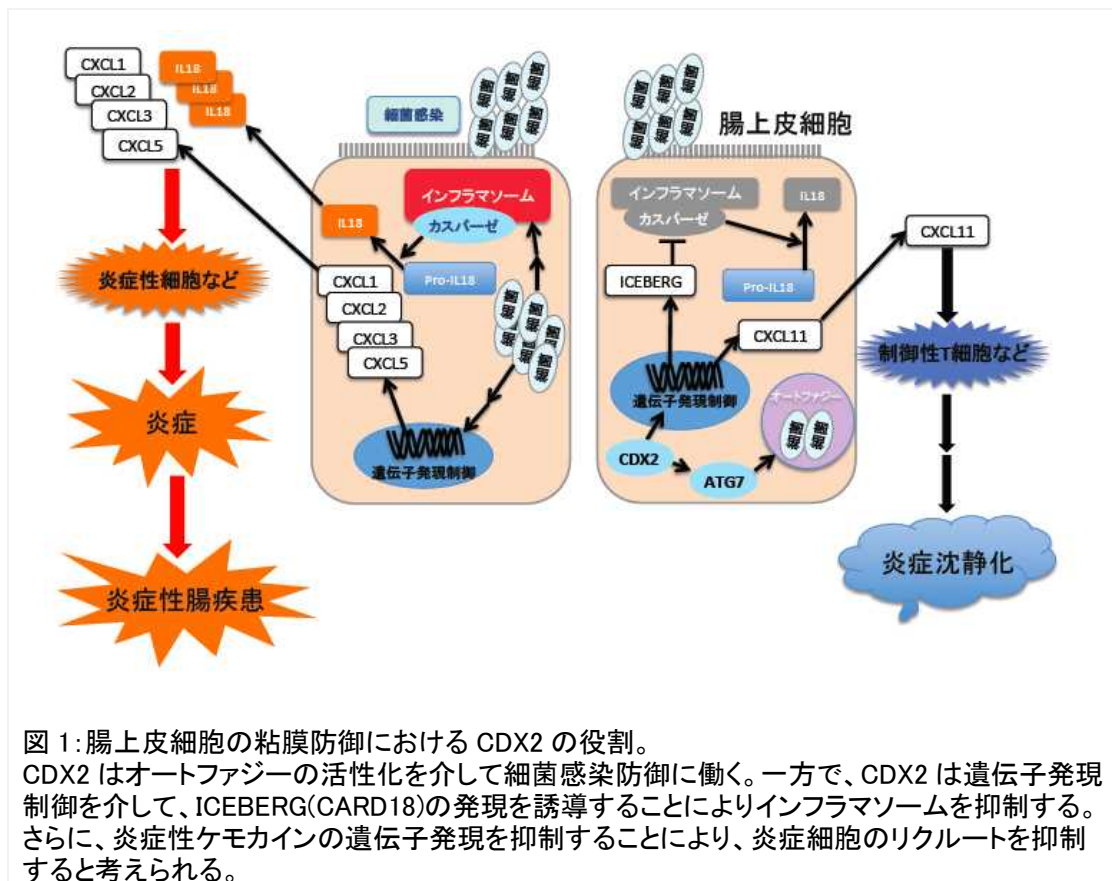
した。また、ICEBERG が腸上皮細胞における細菌感染誘導性のインフラマソームの活性化を抑制することが分かった。ICEBERG 遺伝子は、ヒトゲノムに特異的な遺伝子であり、Caspase I の CARD ドメインのホモロジーサーチにより同定された遺伝子であるが、これまでその生理的機能は全く明らかになっていなかった。これらの解析から、ヒトの腸粘膜において、CDX2 は、ICEBERG の発現調節を介してインフラマソームの活性を制御することにより腸上皮細胞由来の IL18 の産生量を制御することが分かった(図 1)。

また、細菌を腸上皮細胞に感染させた場合の遺伝子発現プロファイルを cDNA マイクロアレイにより解析したところ、腸上皮細胞由来として重要な炎症性ケモカインの発現が CDX2 により調節されていることが分かった。とくに CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5 などの遺伝子発現が CDX2 により顕著に抑制されることが分かった。ヒト由来の腸上皮細胞株に加えてラット由来の腸上皮細胞株でも同様の結果が得られている。詳細な解析は今後の課題であるが、これらの結果から、CDX2 が腸上皮細胞由来の炎症性ケモカインの発現を調節することにより腸粘膜への炎症性細胞の遊走などを制御していると考えている(図 1)。

これらの結果と一致して、*Cdx1<sup>+/-</sup>Cdx2<sup>+/-</sup>* 複合変異マウスに DSS を投与したところ、野生型マウスに比べて短期間に、体重の減少が観察され、生存曲線が短縮されると同時に炎症が増悪することが分かった。これらの遺伝学的解析からも、CDX2 が炎症の抑制因子であると考えている。

#### 「CDX2 によるオートファジー必須酵素 ATG7 の制御機序の解析」

CDX2 によるオートファジー及び ATG7 の活性化機序を解析するために、CDX2 が相互作用する ATG7 複合体に含まれる分子を質量分析法により解析した。その結果、ATG7 と相互作用する候補となる新規タンパク質を約 30 個同定した。それらのタンパク質の中から、ATG7 に結合するタンパク質を 3 個同定した。それらの分子には、機能が未知の分子が 2 個、オートファジーの機能に必須であることがわかっている分子が 1 個含まれていたが、いずれの分子についても、ATG7 との相互作用は報告されていない。また、これらの分子と CDX2 が相互作用することも分かった。CDX2 がこれらの分子との結合を介して ATG7 の活性を制御する可能性やその分子メカニズムの解明については、今後の課題である。



### 3. 今後の展開

本研究課題において、CDX2 が CARD18 の発現上昇を介してインフラマソームの活性を制御することを見出した。今後、腸上皮細胞におけるインフラマソームの活性調節における CARD18 の役割や、炎症性腸疾患の発症における CARD18 の役割を解析する。とくに CDX2 による *CARD18* の発現制御機構、炎症性腸疾患の病態における *CARD18* の発現異常の可能性を検討する。また、マウスにおける *CARD18* の機能的なホモログに相当する遺伝子の同定を進めることにより、個体レベルでの腸上皮細胞におけるインフラマソームの活性制御機構の解明を目指す。

また、本研究課題では、CDX2 が CARD18 に加えて炎症性ケモカインの発現を制御していることを見出した。これらの炎症性ケモカインには、炎症性細胞の遊走に強く関わる CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5 など多く含まれていた。そこで、CDX2 による免疫細胞遊走シグナルの制御機構の解析を通じて、CDX2 による免疫細胞遊走シグナルの制御が炎症性腸疾患の病態に関与する可能性について検討する。

さらに、本研究課題では、CDX2 によるオートファジーの活性の制御機構の解析において、ATG7 に相互作用する新規分子を同定した。今後、本解析で同定した分子の ATG7 の活性制御における役割及び、それらの分子の腸上皮細胞の粘膜免疫における役割の解明を進める。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

本研究課題では、CDX2 がオートファジーを活性化することを見出したことに基づいて、研究課題を想起し、研究を進めた。一方で、領域総括や領域アドバイザーの助言に従って、研究戦

略を修正し、実験を進めたところ、CDX2 が細菌感染の粘膜防御に働くだけでなく、腸上皮細胞における炎症性のシグナルを強く抑制することなどが分かった。現段階では仮説だが、CDX2 が腸上皮細胞から発信される炎症性シグナルの負の制御において主要な役割を担っていると考えている。これらの仮説が解明できれば腸粘膜における慢性炎症の機序解明に貢献できると考えている。これらのことから、研究のねらいを十分に達成する進捗があったと考えている。ただし、研究全体の進捗が課題提案時の予定よりも遅れており、論文報告を行えていないことから、総合的には評価が低い。今後も本研究課題を進めることにより、課題提案時の目標を達成できるように努める。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

腸管上皮に特異発現するホメオボックス転写因子 CDX2 が、ATG7 に結合してオートファジーを活性化し赤痢菌の細胞内での生存を抑制するほか、転写因子として ICEBERG (CARD18) の発現を上昇させることによりインフラマソームの活性化を抑制して炎症を制御すること、さらには CDX2 変異マウスでは DSS 誘導マウス大腸炎が著しく増悪することを見出している。本研究により、初めて ICEBERG の炎症抑制機能が明らかとなったが、この分子はヒトゲノム特異的な遺伝子であり、CDX2 のより詳細な炎症制御への関与を検討するためには、新たな実験系の工夫などが必要と考えられる。さきがけ研究期間中に異動したにも関わらず、非常に丁寧で着実な研究を継続してきており、今後も残された課題を解決すればさらなる発展が期待できる

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Yukiko Nambu, Tatsunari Hayashi, Kyoung-Jin Jang, Koji Aoki, Hiroto Mano, Keiko Nakano, Motomi Osato, Katsu Takahashi, Katsuhiko Itoh, Satoshi Teramukai, Toshihisa Komori, Jun Fujita, Yoshiaki Ito, Akira Shimizu, Manabu Sugai; In situ differentiation of CD8 $\alpha\alpha$  T cells from CD4 T cells in peripheral lymphoid tissues. *Scientific Reports*, 2012; 2: 642.

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:1 件

1.

発 明 者: 青木 耕史、谷田 以誠

発明の名称: ATG7 変異体を用いたオートファジーの抑制方法

出 願 人: 福井大学

出 願 日: 2012/12/21

出 願 番 号: 2012-280082

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

Roles of intestine-specific homeoprotein CDX2 in the intestinal epithelial barrier

Koji Aoki, Shun-ichiro Iemura, Katsuya Okawa, Isei Tanida, Taira Kobayashi, Hitomi Mimuro, Sanada Takahito, Chihiro Sasakawa, Tohru Natume, Makoto M Taketo and Manabu Sugai;

Poster presentation【2LBA-20】第 37 回日本分子生物学会 2014 年 11 月 26 日 横浜(パシ

フィコ横浜)

Roles of intestine-specific homeoprotein CDX2 in the intestinal epithelial barrier

Koji Aoki and Mako Nakaya; Poster presentation (2-E-W25-11-P (2014E-0658)) 第43回日

本免疫学会 2014年12月11日 京都

# 研究報告書

## 「腸管センチネルを標的とした炎症性腸疾患治療法の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 浅野 謙一

### 1. 研究のねらい

近年我が国において、炎症性腸疾患の罹患者数が急増している。根本原因は解明されていないが、何らかの遺伝的要因に加え粘膜免疫機構の異常が発症に関与することが示唆されている。粘膜免疫は病原菌の侵入を厳格に監視する一方、食物や腸内常在細菌など有益な異物に対しては過剰反応しないよう抑制されている。ところが炎症性腸疾患ではこの寛容が破綻し、異常活性化した免疫細胞が自らの粘膜組織を破壊し、持続的な炎症を惹起すると考えられている。この慢性炎症の誘導には腸管の自然免疫細胞(マクロファージや樹状細胞)が重要な役割を担うと想定されているが、消化管には多様なマクロファージの亜集団が混在しており、炎症惹起における各々の役割分担は不明な点が多い。申請者はこれまで、CD169 を表面マーカーとし発現する少数のマクロファージが、異なる組織間あるいは組織と外界の境界領域に存在し、各組織に侵入する病原体(抗原)の性質に応じて適切な免疫応答を誘導する細胞集団であることを明らかにした。これらの知見から、CD169 マクロファージは生体防御の最前線で異物の侵入を監視するセンチネル(「門番」「衛兵」の意)細胞である可能性が示唆された。さらに、マウスにおいて CD169 陽性マクロファージのみを選択的に消失させると、CD169 陰性のマクロファージや CD11c 陽性の樹状細胞が腸管粘膜に正常数存在しているにも関わらず、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)で誘導された腸炎の重症度が劇的に改善することを発見した。これらの知見は、粘膜に局在する CD169 マクロファージが「腸管のセンチネル」として腸炎発症の初動反応を担い、粘膜内の他の免疫細胞の制御に関与している可能性を示唆する。このような背景のもと本研究では、炎症性腸疾患発症の重要な鍵を握ると考えられる新たにカテゴライズされたセンチネル細胞の同定および機能解析を介して、免疫寛容の破綻から慢性炎症に至る過程を分子、細胞レベルで明らかにすることを目指す。具体的には、1)腸管炎症の初動における CD169 マクロファージの役割ならびに、2)CD169 マクロファージによる粘膜免疫系の制御機構を明らかにし、3)慢性炎症状態の解除機序に基づく炎症性腸疾患治療法を開発することを目的とする。

### 2. 研究成果

#### (1)概要

本さがけ研究で、消化管粘膜には CD169 陽性と陰性の 2 種類のマクロファージ亜集団が存在することを発見した。そして 1) CD169 マクロファージが、上皮から離れた粘膜筋板側に局在すること、2)同マクロファージ消失時にはマウスの炎症性腸疾患(DSS 誘導腸炎)が劇的に改善すること、3)上皮傷害時に CD169 マクロファージが CCL8 を産生し、炎症性マクロファージの動員を促進すること、を初めて明らかにした。これらの知見を活用し、CCL8 に対する中和抗体投与が DSS 誘導腸炎の臨床症状を軽減することを証明した。

本研究は、CD169 マクロファージとそれの産生する CCL8 が、炎症性腸疾患に対する新たな治療標的となる可能性を提示する。

## (2) 詳細

研究テーマ A 「各種腸炎モデルにおける CD169 マクロファージの役割の検討」

A-1) CD169 マクロファージは粘膜筋板側に局在する、独立した常在マクロファージ亜集団である。

CD169 マクロファージの機能と局在を詳細に解析するため、まず細胞表面の CD169 分子を感度よく検出できるモノクローナル抗体 (クローン M7) を作製した。新抗体を用いたフローサイトメトリーにより、粘膜の CD169 陽性細胞は骨髄系免疫細胞(CD11b、CD11c 陽性細胞)の約 15%を占めることが分かった。また CD169 マクロファージは F4/80<sup>+</sup>、CD206<sup>+</sup>、SiglecF<sup>-</sup>、Ly6G<sup>-</sup>、Ly6C<sup>-</sup>で、組織常在型の独立したマクロファージ亜集団であることが示された。

続いて粘膜固有層微小環境内での CD169 マクロファージの局在を免疫組織化学で検討した。汎マクロファージマーカーである CX3CR1 陽性のマクロファージが、粘膜固有層全域に分布するのに対し、CD169 マクロファージは腸上皮直下にはほとんど存在せず、上皮から離れた筋板側に偏在することが分かった(図 1)。

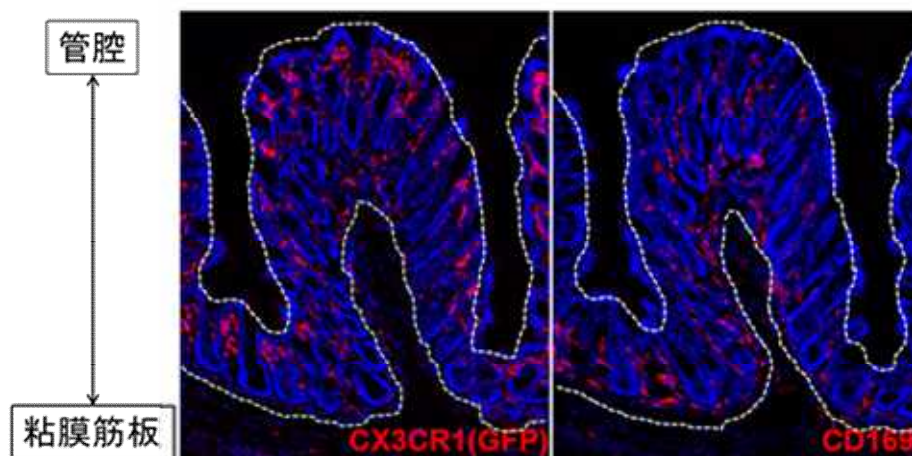


図 1 腸上皮から離れた粘膜筋板側に偏在する CD169 マクロファージ

CX3CR1 陽性のマクロファージが粘膜内にびまん性に分布するのに対し、CD169 マクロファージは上皮の直下にはほとんど存在せず、粘膜筋板側に多く見られる。

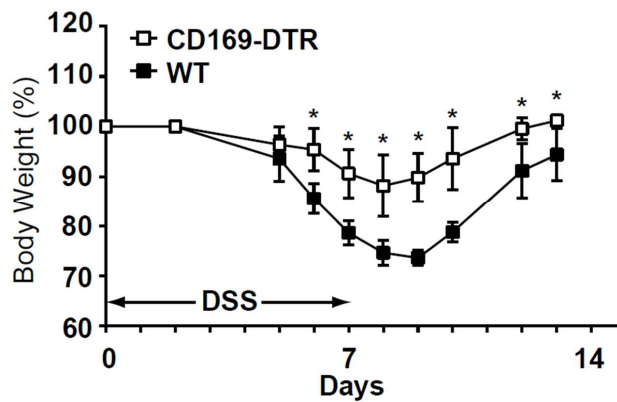
A-2) CD169 マクロファージは自然免疫依存腸炎の発症に重要な役割を担う。

炎症性腸疾患のマウスモデルには、自然免疫依存モデルのデキストラン硫酸(DSS)誘導腸炎と、獲得免疫依存モデルの T 細胞移入腸炎がよく利用されている。

まず DSS 誘導腸炎における CD169 マクロファージの役割を検討した。

ジフテリア毒素(DT)を投与した野生型と CD169-DTR マウスに 3.5%DSS(分子量 5000)を 7 日間飲水投与し、8 日目からは普通水に切り替えた。野生型マウスでは 1 週間で約 30%の体重減少や血便を伴う激しい腸炎が発症したのに対し、CD169-DTR マウスではこれらの臨床

症状が著明に改善した(図 2)。また野生型大腸では、陰窩構造消失、腸上皮脱落、多数の炎症細胞浸潤像を認めたが、CD169-DTR マウスではこれらの病理所見はいずれも軽度であった。



**図 2 CD169 マクロファージ非存在下での炎症性腸疾患抑制**

野生型マウスと CD169-DTR マウスに DT を投与し、3.5%DSS を 7 日間飲水投与した。CD169-DTR マウスでは腸炎に伴う体重減少が著明に改善した。\*P<0.05。

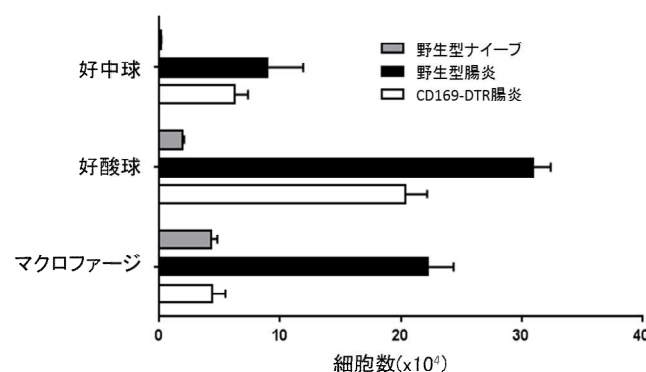
続いて CD169-DTR マウスと RAG 欠損マウスを交配し、リンパ球欠損 CD169-DTR マウスを作製した。これに野生型マウスから分取したナイーブ T 細胞(CD4<sup>+</sup>, CD45Rb<sup>hi</sup>)を移入した。1 週間ごとに DT を投与した群と非投与群の間に有意な体重差を認めなかったことから、CD169 マクロファージは T 細胞移入腸炎の病態形成には必須ではないことが示された。

以上の結果から、以後の研究では自然免疫依存モデルを用いて CD169 マクロファージの役割を検討することにした。

### 研究テーマ B 「腸炎誘導における CD169 マクロファージの機能解析」

B-1) CD169 マクロファージ非存在下では、Ly6C<sup>hi</sup> 炎症性マクロファージの浸潤が抑制される。

DSS 誘導腸炎マウスの大腸を免疫組織化学で検討したところ、野生型マウスでは F4/80 陽性細胞が無数に浸潤していたのに比べ、腸炎の軽度な CD169-DTR マウスでは、細胞浸潤が軽度であった。DSS 誘導腸炎では好酸球や好中球数も増加することが知られているため、浸潤細胞の構成をさらに詳しくフローサイトメトリーで解析した。好酸球や、好中球数は野生型と CD169-DTR マウスの間に大きな差はなかったが、Ly6C<sup>hi</sup>F4/80<sup>+</sup> マクロファージ数が CD169-DTR マウスで著明に減少していた(図 3)。この結果は、CD169 マクロファージが腸炎発症時に何らかのサイトカインを産生し、血流から単球を粘膜に動員する可能性を示唆する。



**図 3 CD169 マクロファージ非存在下での炎症細胞浸潤**

CD169 マクロファージ非存在下では Ly6C<sup>hi</sup> 炎症性マクロファージの浸潤が抑制された。

B-2) CD169 マクロファージは腸炎発症時に CCL8 を高産生する。

そこで、CD169 マクロファージで強発現するサイトカイン遺伝子をマイクロアレイ法で網羅的に検索した。腸炎発症時に CD169 マクロファージ特異的に強発現するサイトカイン遺伝子(18種類)の内、定量 RT-PCR で最も上昇率の高かった CCL8 遺伝子に着目した。

CCL8 の発現をタンパク質レベルで検討するため、同サイトカインを特異的に定量できる ELISA 系を構築した。この実験系を用い、マクロファージ培養上清中の CCL8 濃度を測定したところ、野生型マウスでは腸炎誘導により CCL8 が高産生されるのに対し、CD169-DTR マウスでは、CD169 陰性のマクロファージや樹状細胞が同程度に存在するにも関わらず CCL8 の産生がほぼ完全に消失した。そこでさらに CD169 陽性および陰性のマクロファージをセルソーターで分取し、培養上清中の CCL8 濃度を測定したところ、CD169 陽性分画でのみ CCL8 の産生を認めた(図 4)。以上の結果は、腸管において CD169 マクロファージが CCL8 の主たる産生細胞であることを示す。

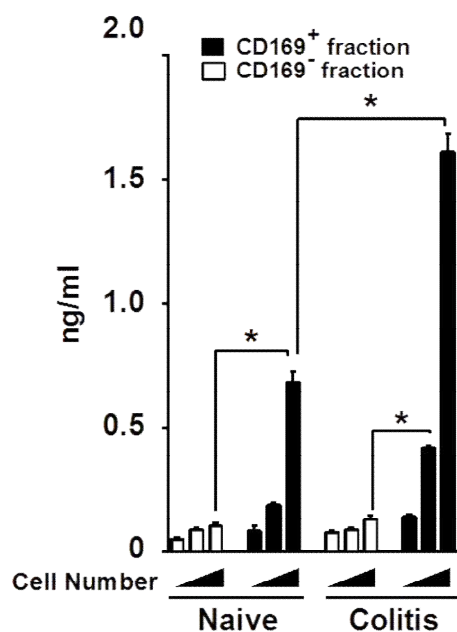


図 4 CD169 マクロファージ選択的な CCL8 産生

大腸粘膜固有層から CD169 陽性および陰性マクロファージをセルソーターで分取し、培養上清中の CCL8 濃度を ELISA で測定した。腸炎発症時に CD169 マクロファージが選択的に CCL8 を高産生する。\*P<0.05。

B-3) CD169 マクロファージは LPS, HMGB1 に応答し、CCL8 を産生する。

我々は以前、骨髄細胞を M-CSF, GM-CSF で培養すると、それぞれ CD169 陽性および陰性の均一なマクロファージを誘導できることを見出している。このマクロファージを *in vitro* で刺激すると、LPS (グラム陰性桿菌構成成分) あるいは HMGB1 (死細胞由来抗原) 刺激時に CD169 陽性マクロファージによってのみ CCL8 が産生されることが分かった。この結果は、CD169 マクロファージが腸内細菌や死細胞に由来する抗原に反応し CCL8 を産生する可能性を示唆する。TNF や IL-6 産生は CD169 陽性と陰性のマクロファージで有意な差はなかった。この結果は CCL8 が通常の炎症性サイトカインとは異なり、腸管免疫の制御に何らかの役割を担う特殊なサイトカインであることを意味する。



B-4) CCL8 は in vitro, in vivo で単球に対する遊走活性を示す。

CCL8 は、マウスで末梢血単球やヘルパーT 細胞の垂集団に対し遊走活性を示すことが報告されている。トランスウェルチャンバーを用い、マウス単球細胞株 WEHI-3 に対する CCL8 の遊走活性を検討したところ、濃度依存性に WEHI-3 を遊走させることが確認できた。

また、CCL8 を添加したマトリゲルをマウスの皮下に接種し、24 時間後にマトリゲル内に浸潤する細胞の形態をギムザ染色で確認したところ、ほとんどは単核球であることが分かった。

### 研究テーマ C 「特定の腸管マクロファージを標的とした炎症性腸疾患治療法の開発」

ここまでの結果から、CD169 マクロファージが上皮傷害時に CCL8 を産生し、単球由来炎症性マクロファージを血流から動員することが初めて解明された。この CD169 マクロファージによる炎症性マクロファージ動員機序の阻害を目的として、抗 CCL8 モノクローナル抗体を作製し、DSS 腸炎誘導マウスに投与した。驚いたことに、抗 CCL8 抗体投与マウスではアイソタイプ IgG 投与群に比べ、体重減少、組織破壊が改善し、組織でのエフェクターサイトカイン(IL-17) 産生量が有意に減少した(図 5)。以上の結果から、CD169 マクロファージとそれの産生する CCL8 は炎症性腸疾患の治療標的として有望である可能性を示唆する。

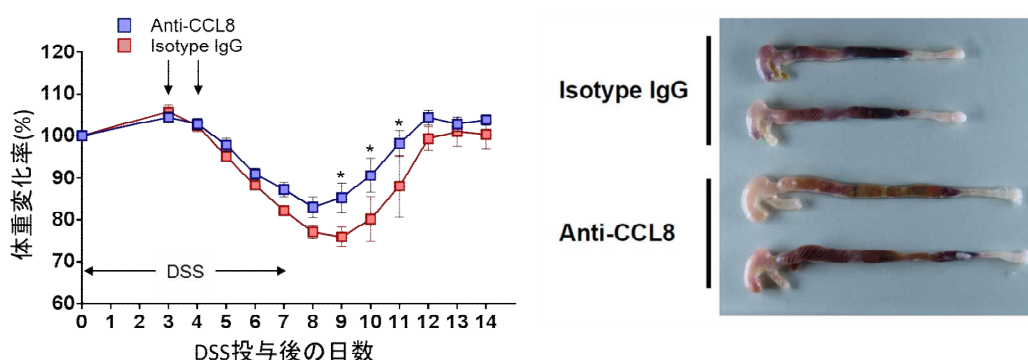


図 5 抗 CCL8 抗体投与による DSS 誘導腸炎抑制

(左)抗 CCL8 抗体 100mg を 2 日間静脈内投与したマウスではアイソタイプ IgG 投与群に比べ、体重減少(左)、血便・大腸の短縮(右)が軽度だった。

### 3. 今後の展開

近年登場した抗 TNF  $\alpha$  抗体製剤は、炎症性腸疾患の疾患概念や、治療戦略に劇的な変化をもたらした。しかしながら日和見感染症など重篤な副作用も多く、免疫学的機序に基づく新たな治療方法の開発が待望されている。

炎症性腸疾患の発症には粘膜に常在する自然免疫細胞が重要な役割を担うと想定されているにも関わらず、特定の細胞集団を標的とした炎症性腸疾患の治療法はこれまで開発されていなかった。本研究は CD169 マクロファージが上皮傷害とそれに伴う腸内細菌侵入を感知し、CCL8 を産生して炎症性マクロファージの動員を促進することを示し、抗 CCL8 抗体がマウスの DSS 誘導腸炎を抑制することを明らかにした。炎症性腸疾患患者の生検組織で CCL8 が高発現するとの報告があることから、ヒトにおいても CCL8 が炎症性腸疾患の治療標的となりうるか臨床検体をを用い検討したい。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

「研究目的の達成状況」

- ・ 腸炎発症の初動を担うセンチネル: CD169 マクロファージの同定と機能解析
  - ・ 腸上皮傷害から慢性炎症に至る分子メカニズムの解明
  - ・ 「センチネル」を標的とした炎症性腸疾患治療法: 抗 CCL8 抗体療法の開発
- については研究開始当初の目標をおおむね達成できた。

「今後の見込み」

抗 TNF 抗体の登場は炎症性腸疾患患者の予後改善に劇的な進歩をもたらしたが、免疫力低下に伴う日和見感染症など重篤な副作用も少なくない。消化管の特定の細胞集団を標的とした炎症性腸疾患治療法はまだなく、本研究成果は同疾患に対する新しい治療戦略構築に大きな進歩をもたらすことが期待できる。

「反省点」

さきがけで得られた研究成果を他分野の研究者と共有し、新たな研究領域の創設に発展させるなどの活動を、本研究期間中に十分行えなかった。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

CD169陽性マクロファージが腸管の粘膜筋板近くの粘膜固有層に局在して、自然免疫依存性の炎症性腸疾患における症状の促進に寄与すること、その腸炎促進作用の一端として、上皮傷害に伴い細菌成分(LPS)や死細胞由来の内因性物質(HMGB1)にCD169陽性マクロファージが反応してCCL8を高産生し、Ly6Chi の炎症性マクロファージの遊走を促進するためであることを示した。このことにより、CD169陽性マクロファージやCCL8が、炎症性腸疾患の治療ターゲットである可能性を示唆した。今後、本知見をヒト炎症性腸疾患において確認し、新規治療法の開発に貢献することを期待できる。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 論文(原著論文)発表

1. Karasawa K, Asano K, Moriyama S, Ushiki M, Monya M, Iida M, Kuboki E, Yagita H, Uchida K, Nitta K, Tanaka M. 'Vascular-Resident CD169-Positive Monocytes and Macrophages Control Neutrophil Accumulation in the Kidney with Ischemia-Reperfusion Injury.' J. Am. Soc.Nephrol. 2014 (Online publication ahead of print)

##### (2) 特許出願

なし。

##### (2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

2012年 第35回 日本分子生物学会年会(口頭発表、筆頭演者、福岡)  
第41回 日本免疫学会(口頭発表、神戸)  
2013年 第36回 日本分子生物学会年会(口頭発表、筆頭演者、神戸)  
第42回 日本免疫学会(口頭発表、幕張)  
2014年 第37回 日本分子生物学会年会(ポスター発表、横浜)

受賞

2012年 日本免疫学会 第7回研究奨励賞

# 研究報告書

## 「炎症制御に向けた腸管制御性T細胞の誘導機構の解明」

研究タイプ:通常型

研究期間:平成23年10月～平成27年3月

研究者:新幸二

### 1. 研究のねらい

クローン病や潰瘍性大腸炎に代表される慢性炎症性腸疾患は、免疫系の異常により発症する難治性疾患であり、病因の解明と根治的な治療法の確立が強く求められている。腸管免疫系は腸管内腔に生息する有用な腸内細菌に対しては寛容状態を維持し過剰に反応しないよう制御されている。一方、経口的に侵入してくる病原性微生物に対しては迅速に排除するため、ある程度活性化された状態を保持している必要がある。このように、腸管では免疫系の寛容状態と活性化状態の微妙なバランスの維持機構が備わっており、このバランスが崩れ持続的な活性化状態になると炎症性腸疾患が引き起こされると考えられている。近年、この腸管免疫系の形成・活性化さらにはバランスの維持に腸内細菌が重要な役割を担っていることが明らかになってきている。これまでの研究で我々は免疫系の抑制に重要な制御性T細胞(Treg細胞)がマウス腸内細菌のうちクロストリジウム属に属する細菌群によって誘導されていることを明らかにした。実際、炎症性腸疾患の患者の腸内細菌叢の構成割合が健常者とは異なっていること、クロストリジウム属細菌が炎症性腸疾患の患者で減少していることが報告されている。そのため、Treg細胞を誘導する細菌群の減少が腸管Treg細胞の減少につながり、免疫系の制御が効かなくなり炎症性腸疾患の発症につながることを予想された。そこで、炎症性腸疾患の治療法確立を目指し、現在まだ明らかになっていないヒト腸内細菌の内Treg細胞を誘導する細菌を同定およびTreg細胞の誘導メカニズムの解明を目的とし本研究を行った。

### 2. 研究成果

#### (1)概要

まず、ヒトの腸内細菌の中にTreg細胞を誘導する細菌が存在しているかを検討するため、健常者の便を腸内細菌が存在していない無菌マウスに経口投与し、ヒトの腸内細菌が定着したマウスを作製した。このヒト腸内細菌定着マウスは無菌マウスと比較して大腸のTreg細胞が多く存在していたことから、ヒトの腸内細菌の中にTreg細胞を誘導する細菌が存在していることが明らかになった。またクロロホルム処理(芽胞を形成しない細菌を死滅させる)をした後、無菌マウスに投与するとさらに強いTreg細胞の増加が確認できたことから、Treg細胞を強く増加させる菌は芽胞形成菌であることが示唆された。次にクロロホルム処理投与マウスの腸内細菌を希釈し無菌マウスに投与することを数回繰り返し、Treg細胞誘導能を保持しつつ細菌数を絞り込むことに成功した。そのマウスの盲腸内容物から腸内細菌を単離・培養し、17種類の細菌株が強いTreg細胞の誘導能を持っていることが明らかになった。この17菌株はすべてクロストリジウム目に属する細菌であり、短鎖脂肪酸を高産生することでTreg細胞の分化・増殖を促進していることが明らかになった。また、この17菌株はTreg細胞の増加とともにTreg細胞からの抗炎症性サイトカインであるIL-10の産生も増強することがわかり、炎

症の抑制に重要な役割を担っていることが強く示唆された。そこで、この17菌株が炎症抑制効果を持っているかについて病態モデルを用いて検討した。通常のSPFマウスに17菌株を投与すると、TNBS腸炎モデルと全身性のOVA誘導性アレルギーモデルにおいてコントロール群と比較して有意に炎症の抑制効果が見られた。以上のことから、ヒト由来Treg細胞誘導17菌株は炎症の抑制効果をもつことが明らかになり、今後様々な炎症疾患の治療法や予防法の開発につながると期待される。

## (2) 詳細

### 研究テーマA「ヒトのTreg誘導能を持つ腸内細菌の解析」

#### 1. Treg誘導能を持つヒト腸内細菌の同定

我々は以前にマウス腸内からTreg細胞を誘導する46株のクロストリジウム属細菌を同定したが、ヒト腸内にもTreg細胞を誘導する細菌が存在しているのか、それはどのような細菌種かについては不明であった。そのため、まずヒト腸内にTreg細胞誘導細菌が存在しているのかを解析するため、腸内細菌がない無菌マウスに健常者の便を経口投与しヒト腸内細菌定着マウスを作製した。このヒト腸内細菌を定着させたマウスは無菌マウスと比較して大腸のTreg細胞が多く存在していたことから、ヒト腸内にもマウスにおいてTreg細胞を誘導する細菌が存在していることが明らかになった。また、このヒト腸内細菌定着マウスの大腸には炎症惹起に働くIL-17産生性のTh17細胞も多く誘導されていたことから、このマウスの腸内細菌の中にはTreg細胞を誘導する細菌とTh17細胞を誘導する細菌の両方が含まれていると考えられた。そこでTreg細胞を誘導する細菌のみをセレクションするため、クロロホルム処理をしたヒト便を無菌マウスに投与し

た。クロロホルム処理は芽胞形成菌のみを選択的にセレクションする方法であり、以前のマウスTreg細胞誘導細菌を同定したときに用いた方法である。その結果、予想通りクロロホルム処理ヒト便定着マウスではTreg細胞のみが

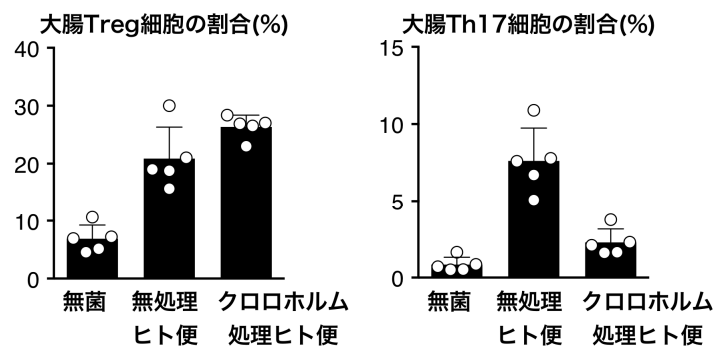


図1. クロロホルム処理ヒト便はTreg細胞を特異的に誘導する。

誘導され、Th17細胞は全く誘導されなかった(図1)。これらのことから、ヒト腸内細菌の内、クロロホルム耐性の芽胞形成菌がTreg細胞を特異的に誘導することがわかった。クロロホルム処理ヒト便定着マウスの腸内には、次世代シーケンサーを用いた解析から約100種類の細菌が存在していたため、希釈投与を数回行うことによりTreg細胞誘導細菌の候補を減らした後、希釈便投与マウスの盲腸内容物を様々な寒天培地に塗布し細菌の単離を行った。その結果、16S rRNA 遺伝子の解析から合計31菌株が単離でき、相同性が近い菌株を除いた17菌株をTreg細胞誘導菌候補として特定した。この17菌株はクロストリジウムクラスターIV、XIVa、XVIII に属す

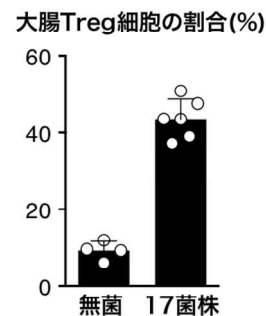


図2. 単離したヒト腸内由来17菌株のみで大腸Treg細胞が強く誘導する。

る菌で希釈投与マウスの主要な構成細菌種であった。そこで、培養した17菌株を無菌マウスに経口投与しこれら17菌株のみでTreg細胞が誘導できるかを検討した結果、強いTreg細胞誘導が確認できた(図2)。また同時にこの17菌株はTreg細胞の免疫抑制機能を担うIL-10の産生やCTLA-4の発現を促進することも明らかになり、17菌株はTreg細胞の増加とともに抑制機能の増強にも寄与することが明らかになった。

## 2. ヒト腸内由来17菌株のTreg細胞誘導メカニズムの解明

腸内細菌と密接に関わっている腸管上皮細胞に着目し解析を行った。まず、大腸上皮細胞株(HCT8)に17菌株定着マウスの盲腸内容物抽出液で刺激を行うと、活性化型TGF- $\beta$ の産生が促進されることがわかった。腸内細菌が生成し上皮に影響を与え増殖やバリア機能の強化に役立つものとして、短鎖脂肪酸がよく知られている。実際、17菌株定着マウスの盲腸内容物中には酢酸、酪酸、プロピオン酸が高濃度に含まれており、短鎖脂肪酸が上皮からの

TGF- $\beta$ の産生に関与していることが疑われた。そこでHCT8細胞株を短鎖脂肪酸で刺激を行ったところTGF- $\beta$ が強く産生されることがわかり、17菌株によるTreg細胞誘導は短鎖脂肪酸を介して行われていることが強く示唆された。また、17菌株定着マウスの大腸Treg細胞を17菌株で刺激を加えた時に強い応

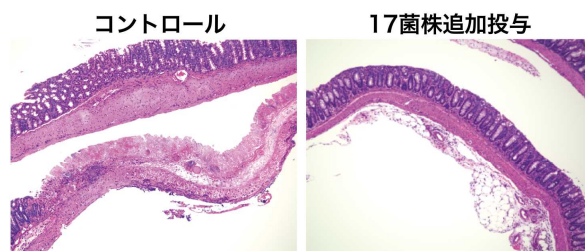


図3.17菌株はTNBS腸炎を抑制する。

答が確認できたことから、17菌株により誘導されたTreg細胞は17菌株由来の抗原を認識していると考えられる。

## 3. ヒト腸内由来17菌株による炎症抑制作用の検討

単離した17菌株がTreg細胞の増加および抑制機能の増強を行うことから、17菌株投与により炎症性腸疾患の発症が抑えられることが予想された。そこでマウスモデルを用いて検討を行った。まず、SPFマウスに週3回4週間投与すると17菌株がSPFマウスにもある程度定着し、大腸Treg細胞を上昇させることが分かった。この17菌株追加投与マウスとコントロールのSPFマウスを用いて、TNBSを投与することにより腸炎を誘発した。その結果、17菌株追加投与マウスにおいて有意に炎症が抑えられていた(図3)。同様に、OVA誘発下痢モデルでも検討した結果、17菌株を追加投与することにより下痢の症状が抑えられることが明らかになった。また、興味深いことに全身性のアレルギーを引き起こした場合においても17菌株追加投与マウスにおいて血中のOVA特異的IgEが低かったことから、17菌株は腸管だけでなく全身性の炎症も抑制可能であることが明らかになった。

### 研究テーマB「Treg細胞の性質・機能解析」

Treg細胞には胸腺で分化発生する胸腺Treg(tTreg)と末梢でナイーブT細胞から分化誘導される末梢Treg(pTreg)の2種類存在していることが知られている。しかしながら、現在ではこれら2種類のTreg細胞を簡単に見分ける手段がないため、特異的マーカーの特定が求められている。そこで、pTreg細胞しか存在していないことが報告されているCarma1(TCRの下流アダプター分子)欠損マウスのTreg細胞を解析すると、HeliosというtTregで特異的に発現していると考えられていたタンパク質の発現に特徴があることが分かった。通常の野生型マウスでは大腸Treg細胞はHeliosの発現がhigh、mid、lowと3つに分かれるが、Carma1欠

損マウスのTreg細胞にはhighとlowしか存在していなかった。つまり、Helios<sup>mid</sup>のTreg細胞がCarma1欠損マウスで特異的に消失していた。このことから、Helios<sup>mid</sup>のTreg細胞が胸腺由来のtTregの可能性が高いと考えられる。現在、Heliosレポーターマウスの作製を行っているところであり、今後解析予定である。また、同時にIL-10レポーターマウスからIL-10産生Treg細胞を単離し、IL-10産生に関与する遺伝子の特定作業を進めている。

### 3. 今後の展開

本研究ではヒト腸内由来のTreg細胞を誘導する17菌株を同定し、炎症抑制効果を有することを証明できた。今後はこの17菌株を用いた臨床応用に向け研究を進めたい。17菌株を腸内細菌が存在している SPF マウスに投与した場合には定着率が悪いため、一度抗生剤で腸内細菌を減少させてからの投与を検討する。また、経口的や経肛門的などどのような投与方法が良いかを検討する。現在、偽膜性腸炎において便移植(健常者の便懸濁液を腸管内腔に移植)が極めて良好な結果を示すことが報告されている。そこで偽膜性腸炎のマウスモデル(C. difficile感染)において17菌株が抑制効果を持つかを検討する。さらには自己免疫疾患や炎症性腸疾患の発症に関与していると考えられているTh17細胞についてもヒト腸内由来のどのような細菌が誘導に関与しているのかを明らかにしていきたい。tTreg細胞とpTreg細胞の性質、機能解析については、レポーターマウスの作製や遺伝子欠損マウスの作製を通して、詳細な性質や機能の違いを解明できるようアプローチしていきたい。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

腸内細菌叢の異常が様々な炎症性疾患の発症に関与していることが強く示唆されている。ヒトのTreg誘導能を持つ腸内細菌の解析に関しては、制御性T細胞を誘導するヒト腸内細菌の単離同定に成功し、同定した17菌株が様々な炎症モデルにおいて抑制効果を有していることを証明でき、ほぼ研究計画通りに進み結果を得ることができた。本研究成果から、炎症性腸疾患のみならず全身の炎症性疾患への創薬ターゲットとして腸内細菌が有望であり、今後の炎症性疾患の治療法や予防法への応用が期待できると考えられる。Treg細胞の性質・機能解析に関しては、本来の予想された成果を出すまでには至らなかったが、非常に興味深い解析結果が出ており一定の目的は達成できたと考えている。

腸内細菌の宿主への影響を解明する上で本さきがけ領域内の研究者との共同研究に発展し、腸内細菌が肝臓がんの発症に関与していることを明らかにできた。また、これまで自分たちでは解析ができなかった質量分析を用いた解析も、領域内の研究者との共同研究で実施することができ非常に有意義な連携ができた。

#### (2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

無菌マウスなどを用いた実験系で、制御性T細胞を誘導するヒト腸内細菌として、芽胞を形成するクロストリジウム目に属する17菌株を同定した。その制御性T細胞の誘導メカニズムとして、17菌株が産生する短鎖脂肪酸によって刺激された大腸上皮細胞から制御性T細胞の分化に必須のサイトカインであるTGF- $\beta$ が強産生されることを見出している。さらに、その17菌株の

投与により、腸炎モデルや食物アレルギーモデルの病態や症状が抑制されることを確認し、世界的にもインパクトのある発表を行った。現在、本知見の臨床応用に向けた研究を行っており、その展開が大いに期待できる。本課題の研究、さらには研究領域内における他の研究者との共同研究によって、質の高い研究成果の発表を行い国内外において評価され、研究者としての飛躍につながった。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Kawamoto S, Maruya M, Kato LM, Suda W, Atarashi K, Doi Y, Tsutsui Y, Qin H, Honda K, Okada T, Hattori M, Fagarasan S. Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. *Immunity* 41, 152-165, 2014
2. Narushima S, Sugiura Y, Oshima K, Atarashi K, Hattori M, Suematsu M, Honda K. Characterization of The 17 strains of regulatory T cell-inducing human-derived Clostridia. *Gut Microbes* 5, 333-339, 2014
3. Obata Y, Furusawa Y, Endo TA, Sharif J, Takahashi D, Atarashi K, Nakayama M, Onawa S, Fujimura Y, Takahashi M, Ikawa T, Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T, Tajima S, Masumoto H, Ohara O, Honda K, Hori S, Ohno H, Koseki H, Hase K. The epigenetic regulator Uhrf1 facilitates The proliferation and maturation of colonic regulatory T cells. *Nat Immunol.* 15, 571-579. 2014
4. Atarashi K\*, Tanoue T\*, Oshima K\*, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, Fukuda S, Saito T, Narushima S, Hase K, Kim S, Fritz JV, Wilmes P, Ueha S, Matsushima K, Ohno H, Olle B, Sakaguchi S, Taniguchi T, Morita H, Hattori M, Honda K. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* 500, 232-236. 2013
5. Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, Kanda H, Sato S, Oyadomari S, Iwakura Y, Oshima K, Morita H, Hattori M, Honda K, Ishikawa Y, Hara E, Ohtani N. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature* 499, 97-101. 2013

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:1 件

1.

発 明 者: Kenya Honda, Koji Atarashi, Takeshi Tanoue, Masahira Hattori, Hidetoshi Morita

発明の名称: Human-derived bacteria that induce proliferation or accumulation of regulatory T cells

出 願 人: University of Tokyo, School Corporation, Azabu Veterinary Medicine Educational Institution

出 願 日: 2012 年 11 月 29 日

出 願 番 号: PCT/JP2012/007687



(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

**主要な学会発表**

1. Atarashi K, Tanoue T, Nagano Y, Honda K. Induction of intestinal Regulatory T cells by Human Clostridium species. 第 41 回日本免疫学会学術集会、神戸、2012 年 12 月 7 日
2. 新幸二 腸内細菌による T 細胞応答の誘導 第 46 回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会、神奈川県伊勢原市、2013 年 1 月 25 日(招待講演)
3. Atarashi K, Human clostridium species promote intestinal accumulation of Treg cells. Keystone Symposium, The Gut Microbiome: The Effector/Regulatory Immune Network, Taos (USA) 2013 年 2 月 11 日
4. 新幸二 腸管 T 細胞の活性化機構における腸内細菌の役割 JCHM 第二回シンポジウム、東京、2014 年 11 月 28 日(招待講演)

**受賞**

1. 新幸二 制御性 T 細胞を誘導するヒトの腸内細菌の同定と培養に成功 理研研究奨励賞 2014 年 3 月 31 日
2. 新幸二 腸内細菌による腸管T細胞の誘導機構の解明 日本ビフィズス菌センター研究奨励賞 2014 年 6 月 11 日
3. 本田賢也、新幸二、田之上大 免疫系に強く影響を与える腸内細菌株の単離 ゴットフリード・ワグネル賞 2014 年 6 月 18 日

# 研究報告書

## 「マクロファージの活性化調節による慢性炎症の制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 佐々木 純子

### 1. 研究のねらい

活性化 MΦは機能の観点から炎症性メディエーターを産生する M1MΦと組織修復に関与する M2MΦの大きく2つに分類される。傷害部位から産生される液性因子により M1MΦあるいは M2MΦへと活性化され、炎症の起始, 増悪, 減弱, 終結の過程で重要な働きをする。慢性炎症を基盤とする生活習慣病やがんなどの病巣には, M1/M2MΦが存在し, 病態の進行に寄与することが明らかにされつつあり, MΦの活性化制御は慢性炎症に関わる病態の新しい治療戦略として期待される。

このような観点から近年, MΦの活性化を制御する細胞内因子についての解析が進められている。我々は MΦの活性化を制御する細胞内因子として, 新たにホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸(PIP<sub>3</sub>)に着目した。PIP<sub>3</sub>は生体膜構成脂質の 0.01%にも満たない極微量なリン脂質であるが, 特異的に結合するタンパク質の局在や活性化を介して様々な細胞生理応答を調節する, 重要な情報伝達物質である。中でも血液細胞特異的に発現する PIP<sub>3</sub> ホスファターゼである SHIP1 の欠損マウスでは, 線維化を伴う致死性の肺炎を 100%の確率で認め, 病態の発症には MΦの異常な活性化が関与することが示唆されている。しかし我々の検討では, SHIP1 欠損 MΦは既報とは異なる MΦへと活性化すること, さらに別の PIP<sub>3</sub> ホスファターゼである PTEN 欠損 MΦは, SHIP1 欠損 MΦとは異なる MΦへと活性化するという予備知見を得た。そこで本研究では SHIP1 欠損 MΦと PTEN 欠損 MΦの違いに着目し, 新規のイノシトールリン脂質解析技術の開発を通して, MΦの活性化を制御する PIP<sub>3</sub>分子種を見出すとともに, その分子機構を解明する。そして PIP<sub>3</sub>分子種による慢性炎症の制御を試みる。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

論文投稿準備中なので, 一部名称を化合物 X と表記したことをご了承ください。

SHIP1 欠損 MΦは M1MΦの性質を強く持つ MΦへ活性化するのに対し, PTEN 欠損 MΦは M2MΦの性質を強く持つ MΦへ活性化することを見出した。MΦ特異的遺伝子欠損マウスを用いた解析から, これらの MΦは慢性炎症の根本原因ではないが, 慢性炎症病態を調節することを明らかにした。

PIP<sub>3</sub>分子種を定量的に検出可能とする新たな解析技術の開発に成功し, SHIP1 欠損 MΦと PTEN 欠損 MΦでは異なる PIP<sub>3</sub>分子種が蓄積することを見出した。各々の PIP<sub>3</sub>分子種の下流ではそれぞれ分子 X と AKT が活性化され, その結果 SHIP1 欠損 MΦと PTEN 欠損 MΦは異なる MΦへと導かれると考えられた。さらに PIP<sub>3</sub>分子種の細胞内への直接導入は, MΦの活性化を制御し得ること, また, 生体レベルで PIP<sub>3</sub>分子種を変動させると, SHIP1 欠損マウスの表現型が部分的に回復するという結果から, PIP<sub>3</sub>分子種は MΦの活性化を規定し, 慢性

炎症を制御し得ることが示唆された。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A 「SHIP1 欠損 MΦ と PTEN 欠損 MΦ の性状解析」

PIP<sub>3</sub> 脱リン酸化酵素である SHIP1 と PTEN の遺伝子欠損骨髄細胞を用いて、M1/M2MΦ マーカーの発現解析と LPS 刺激に伴うサイトカイン産生について解析した。SHIP1 欠損 MΦ は M2 マクロファージマーカーである Arg 1 の発現は亢進したものの、その他の M2MΦ マーカー (Ym1, CD206, CD163) の発現はコントロールと比べて減少していた。また、IL-10 の発現低下、IL-12 の発現亢進、LPS 刺激による TNF-α 産生が亢進しており、SHIP1 欠損 MΦ は既報と異なり、M1MΦ の性質を強く持つ MΦ へ活性化すると考えられた。一方 PTEN 欠損 MΦ については上記 4 種の M2MΦ マーカーの発現亢進が認められ、IL-10 の発現亢進、LPS 刺激による TNF-α 産生が低下しており、M2MΦ の性質を強く持つ MΦ へ活性化すると考えられた。

SHIP1 欠損骨髄細胞はミエロイド系細胞への分化が亢進していること、また SHIP1 欠損マウスの個体内 (脾臓、肺、血中など) では MΦ の数が増加していること、T 細胞や B 細胞特異的 SHIP1 欠損マウスや W/W<sup>m</sup> マウスとの交配により肥満細胞を除去しても肺炎を発症することから、MΦ が肺炎の発症に関わることが示唆された。そこで肺炎発症・進行における SHIP1 欠損型 MΦ の役割を解析するために、MΦ の枯渇実験を行った。CD11b-DTR マウスを用いて SHIP1 欠損マウスより MΦ を除去すると、体重減少の抑制と生存期間の延長が認められ、SHIP1 欠損型 MΦ は少なくとも病態の進行に関与すると考えられた。しかしながら個体の小さいマウスにおいては、ジフテリアトキシンそのものの毒性が懸念されたため、SHIP1 flox マウスを新たに作出し、CD11b-cre トランスジェニックマウスを用いて MΦ 特異的 SHIP1 欠損マウス (CD11b-cre SHIP1<sup>flox/flox</sup>) を作製した。ところが CD11b-cre SHIP1<sup>flox/flox</sup> は肺炎を発症せず、SHIP1 欠損型 MΦ は肺炎の根本原因ではないことが明らかとなった (図 1)。

SHIP1 欠損型 MΦ は慢性炎症を惹起しないが、慢性炎症病態を制御する可能性がある。この点を明らかにするために、M1/M2MΦ の機能が確立している高脂肪食負荷によるインスリン抵抗性について、CD11b-cre SHIP1<sup>flox/flox</sup> マウスと CD11b-cre PTEN<sup>flox/flox</sup> マウスを用いて検討した。その結果コントロールマウスに比べ、CD11b-cre SHIP1<sup>flox/flox</sup> マウスでは脂肪組織における M1MΦ (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) の増加と M2MΦ (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>) の減少が認められ、全身性のインスリン抵抗性が増悪していた。一方 CD11b-cre PTEN<sup>flox/flox</sup> マウスでは脂肪組織における M1MΦ の減少と M2MΦ の増加が認められ、全身性のインスリン抵抗性は改善した。以上の解析から、SHIP1 欠損型 MΦ と PTEN 欠損型 MΦ は慢性炎症を引き起こす根本原因ではないが、慢性炎症病態を修飾する MΦ であることを明らかにすることができた。

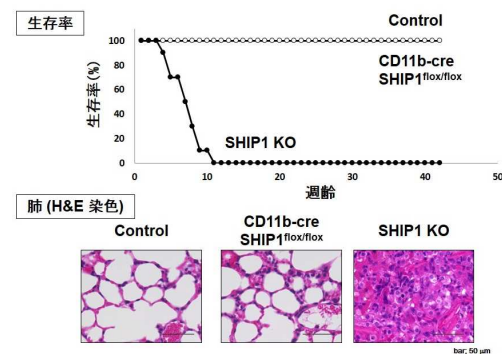


図 1 MΦ 特異的 SHIP1 欠損マウスは肺炎を発症しない

## 研究テーマ B 「SHIP1 欠損 MΦ と PTEN 欠損 MΦ が異なる MΦ へ活性化する分子機構」

SHIP1 と PTEN はともに PIP<sub>3</sub> 脱リン酸化酵素であるにも関わらず、各々の遺伝子欠損 MΦ が異なる MΦ へと活性化するのはなぜであろうか。その分子メカニズムとして、蓄積する PIP<sub>3</sub> 分子種の違いを予想した。これを解明するために、アシル基を保持した状態の PIP<sub>3</sub> 分子種を、定量的に検出可能とする新たな解析技術の開発に取り組んだ。固相抽出法による PIP<sub>3</sub> 画分の濃縮、水酸基のメチル化によるイオン化効率の向上、三連四重極型質量分析計を用いた選択反応モニタリング法を確立し、高感度の測定系構築に成功した(図2)。この測定法を用いて SHIP1 欠損 MΦ および PTEN 欠損 MΦ で蓄積する PIP<sub>3</sub> 分子種を解析したところ、SHIP1 欠損 MΦ では 38:4 PIP<sub>3</sub> が増加したのに対し、PTEN 欠損 MΦ では様々な種類の PIP<sub>3</sub> 分子種が増加することを見出した。このような違いは、薬剤誘導性に SHIP1 と PTEN を発現誘導する HEK293 細胞を用いた解析においても確認できた。リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* の脱リン酸化活性測定の結果、SHIP1 と PTEN では PIP<sub>3</sub> 分子種に対する脱リン酸化活性が異なることが確認され、このことが蓄積する PIP<sub>3</sub> 分子種の違いを導くものと考えられた。これまでの報告によると、SHIP1 と PTEN の下流ではともに AKT が活性化するとされている。そこで腹腔常在細胞における AKT の活性化を調べたところ、PTEN 欠損腹腔常在細胞でのみ AKT の活性化亢進が認められた。SHIP1 欠損腹腔常在細胞では AKT は活性化しておらず、分子 X が活性化していることを見出した。阻害剤や二重変異マウスを用いた表現型回復実験から、SHIP1 の下流では分子 X が、PTEN の下流では AKT が活性化することが明らかとなった。さらにこれらの分子の PIP<sub>3</sub> 分子種への結合を解析したところ、AKT はいずれの PIP<sub>3</sub> 分子種へも同程度の結合能を示したのに対し、分子 X は 38:4 PIP<sub>3</sub> に強く結合することを見出した。以上の解析から、SHIP1 欠損 MΦ と PTEN 欠損 MΦ が異なる MΦ へ活性化する分子機構を明らかにすることができた。

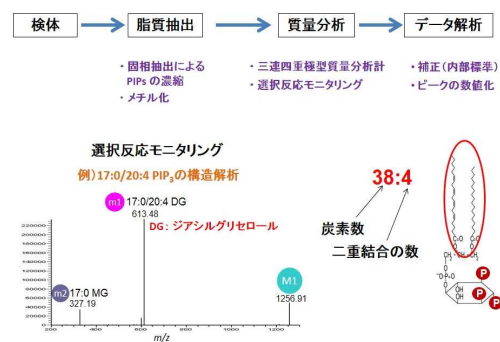


図2 PIP<sub>3</sub> 定量解析系の確立

## 研究テーマ C 「PIP<sub>3</sub> 分子種による MΦ の活性化制御と慢性炎症制御」

PIP<sub>3</sub> 分子種により直接 MΦ の活性化を制御できるのであろうか。この点を明らかにするため、PIP<sub>3</sub> 分子種の細胞内直接導入を試みた。Echelon 社の Shuttle PIPs Kit に添付のキャリアータンパク質を用いて MΦ に導入したところ、PIP<sub>3</sub> 分子種が効率よく細胞内に取り込まれることが確認できた。LPS 刺激による TNF- $\alpha$  産生にて評価したところ、SHIP1 欠損 MΦ で蓄積した PIP<sub>3</sub> 分子種導入により TNF- $\alpha$  産生は増加し、PTEN 欠損 MΦ で蓄積した PIP<sub>3</sub> 分子種導入により TNF- $\alpha$  産生は減少した。このことから、PIP<sub>3</sub> 分子種は直接 MΦ の活性化を制御できると考えられた。

マウス個体レベルで PIP<sub>3</sub> 分子種の変動を導くために、LPIAT1 (lysophosphatidylinositol

acyltransferase 1)を利用した。LPIAT1 はリゾホスファチジルイノシトールの sn-2 位特異的にアラキドン酸(20:4)を導入する酵素である。LPIAT1 欠損マウスは中枢神経の異常と早期致死となる(論文 1)が、LPIAT1 ヘテロ欠損マウスでは酵素活性が半減しているものの健常である。そこで LPIAT1 ヘテロ欠損マウスを使用した。SHIP1 欠損 MΦ で蓄積する 38:4 PIP<sub>3</sub> のアシル基組成は 18:0/20:4 PIP<sub>3</sub> であることを確認した。SHIP1 欠損マウスを LPIAT1 テロ欠損バックグラウンドにすると、18:0/20:4 PIP<sub>3</sub> が減少し、肺炎の軽減、延命が認められ、MΦ の表現型も回復した。以上の結果から、PIP<sub>3</sub> 分子種は慢性炎症病態を制御し得ると考えられた。

### 3. 今後の展開

本研究により、PIP<sub>3</sub> 分子種による MΦ の活性化機構の一端が明らかになった。PIP<sub>3</sub> は SHIP1 や PTEN 以外にも多数の酵素により代謝される。今後はこれらの PIP<sub>3</sub> 代謝酵素と PIP<sub>3</sub> 分子種、MΦ の活性化機構との関連を解明し、特に病気の根本原因となる PIP<sub>3</sub> 分子種と MΦ のサブポピュレーションを見出したいと考えている。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

本さきがけ研究期間内に、高感度の PIP<sub>3</sub> 測定系の構築、MΦ の活性化を制御する PIP<sub>3</sub> 分子種の同定、その分子機構解明と至り、研究目的をほぼ達成できたと考えている。これらのデータをまとめて直ちに論文投稿する予定である。ただ一点、当初の目論見が外れて慢性炎症を惹起する MΦ の解析には至らなかった。今後種々の PIP<sub>3</sub> 代謝酵素について解析を進め、慢性炎症の根本原因となる MΦ を見出したいと考えている。

これまで一種類と考えられていた PIP<sub>3</sub> を、アシル基の観点から多種類と捉え、生理機能の違いを見出した本研究の成果は、MΦ の活性化のみならず、多岐にわたる細胞生理応答に関する重要な知見をもたらしたと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

SHIP1欠損マウスで見られた肺炎が、マクロファージ(MΦ)特異的SHIP1欠損マウスでは発症しないことから、当初期待されたSHIP1欠損型MΦが肺炎の根本原因であるという仮説は否定された。しかし、高脂肪食負荷によるインスリン抵抗性についての検討では、MΦ特異的SHIP1欠損マウスの脂肪組織におけるM1MΦの増加とM2MΦの減少が認められて全身性のインスリン抵抗性が増悪し、一方MΦ特異的PTENマウスの脂肪組織ではM1MΦの減少とM2MΦの増加が認められ全身性のインスリン抵抗性が改善した。このことから、SHIP1欠損型MΦとPTEN欠損型MΦは慢性炎症病態を修飾するMΦであることを明らかにすることができた。また、PIP<sub>3</sub>分子種の測定系構築に成功して、SHIP1あるいはPTEN欠損MΦで蓄積するアシル基などの異なるPIP<sub>3</sub>分子種を同定し、それらの分子種により直接MΦの活性化状態を制御できること確認した。今後この新たな測定系を駆使し、炎症病態においてキーとなるPIP<sub>3</sub>分子種を見出すことなど、さらなる研究の発展が期待できる。

### 5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Lee HC, Inoue T, **Sasaki J**, Kubo T, Matsuda S, Nakasaki Y, Hattori M, Tanaka F, Udagawa O, Kono N, Itoh T, Ogiso H, Taguchi R, Arita M, Sasaki T, Arai H. LPIAT1 regulates arachidonic acid content in phosphatidylinositol and is required for cortical lamination in mice. *Mol Biol Cell*. **23**; 4689–4700, 2011
2. Takasuga S, Horie Y, **Sasaki J**, Sun-Wada GH, Kawamura N, Iizuka R, Mizuno K, Eguchi S, Kofuji S, Kimura H, Yamazaki M, Horie C, Odanaga E, Sato Y, Chida S, Kontani K, Harada A, Katada T, Suzuki A, Wada Y, Ohnishi H, Sasaki T. Critical roles of type III phosphatidylinositol phosphate kinase in murine embryonic visceral endoderm and adult intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **110**; 1726–31, 2013
3. Fujioka Y, Tsuda M, Nanbo A, Hattori T, **Sasaki J**, Sasaki T, Miyazaki T, Ohba Y. A Ca(2+)-dependent signaling circuit regulates influenza A virus internalization and infection. *Nat Commun* **4**; 2763–2768, 2013

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 佐々木 純子 マクロファージの活性化と慢性炎症 千里ライフサイエンスセミナー、大阪、2012年7月
2. Junko Sasaki. Macrophage Activation by Phosphoinositides. *Frontiers in Immunology and Inflammation: From Molecules to Disease (JST-CREST International Symposium)*, 東京、2013年2月
3. 佐々木純子、中西広樹、高須賀俊輔、佐々木雄彦 イノシトールリン脂質によるマクロファージの活性化と寿命制御、第86回日本生化学会大会、神奈川、2013年9月
4. 佐々木純子、中西広樹、佐々木雄彦 質量分析法によるホスホイノシタイドの解析「修飾シグナル病」第3回公開シンポジウム シグナル伝達解析技術と数理モデルの最先端、東京、2014年1月
5. 佐々木純子、佐々木雄彦 マクロファージの活性化と慢性炎症 別冊 *BIO Clinica* 2 (2); 116–121 (2013)

# 研究報告書

## 「形質細胞様樹状細胞による炎症慢性化機構と制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 佐藤 克明

### 1. 研究のねらい

樹状細胞(dendritic cells; DCs)は樹状突起を有する系統マーカー陰性、MHCクラスII陽性の抗原提示細胞であり、通常型樹状細胞(conventional DCs; cDCs)と形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid DCs; pDCs)に大別されるサブセットから構成され、自然免疫と獲得免疫を繋ぐ最も強力な抗原提示細胞と考えられている。

pDCs は cDCs とは異なり Toll 様受容体 (TLR)のなかでエンドソームに取り込まれた病原体の核酸を認識する TLR7 と TLR9 のみを高発現し、多量の I 型 IFN (interferon)を産生する高度に専門化した抗原提示細胞である。これら TLR リガンド刺激による MyD88 依存的細胞内シグナル伝達では IKK (IkB kinase)- $\alpha$ /IRF (IFN regulatory factor)-7 の活性化が I 型 IFN の産生に必須であり、NF- $\kappa$ B の活性化が炎症性サイトカインの産生に重要であることが報告されている。従って、pDCs はこの特性により病原体感染防御に重要であることが推察されている。また、pDCs は炎症反応により破壊された自己細胞由来の核酸も同様に認識して I 型 IFN や炎症性サイトカインを産生する。全身性エリテマトーデスや尋常性乾癬は I 型 IFN 介在性自己免疫疾患でその病態形成には自己反応性  $T_H1$  細胞・ $T_H17$  細胞や細胞傷害性 T 細胞(CTL)が関与することが知られており、炎症組織に pDCs が選択的に集積していることが報告されている。このことから申請者は pDCs の炎症性自己免疫病態の形成での役割について、pDCs が外来・自己核酸の認識により過度のサイトカインを産生することにより炎症反応を惹起・慢性化させ、同時に自己成分の自己反応性 T 細胞への抗原提示により自己免疫応答の惹起・進行・重症化を導く可能性を考えた。

本提案では、pDCs の特異的発現分子“Siglec-H”の欠損マウスと pDCs 特異的消失マウスを用いて炎症制御の破綻による炎症の慢性化とこれによる自己免疫病態の惹起・進行・重症化に対する pDCs の役割とその分子基盤を解明することを目標とする。

### 2. 研究成果

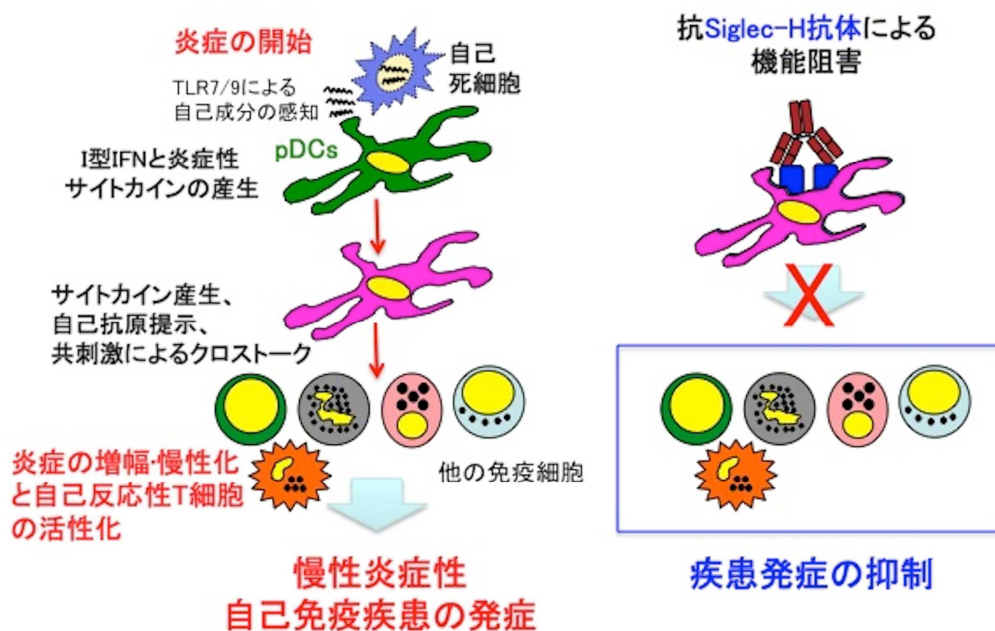
#### (1) 概要

本研究では Siglec-H 欠損マウスと pDCs 特異的消失マウスを用いて、炎症の慢性化とこれによる自己免疫病態の発症・増悪における pDCs の役割とその Siglec-H を介する分子基盤の解明に着眼し、自己免疫疾患の病態を理解することにより pDCs を標的とした分子疾患制御法の確立を試みた。

その結果、pDCs において Siglec-H は TLR7/TLR9-MyD88 依存的な IKK- $\alpha$  や NF- $\kappa$ B の活性化を阻害して I 型 IFN や炎症性サイトカインを抑制する機能抑制性分子であることが判明した。生体内 TLR7/TLR9 依存性炎症反応において pDCs は主要なサイトカイン産生細胞であり、この産生は Siglec-H により制御されることを明らかにした。また、pDCs は TLR7/TLR9 依存性炎症環境において、cDCs の活性化に関与することが示された。一方、pDCs は Siglec-H

の制御下において抗原特異的エフェクターCD4<sup>+</sup>T細胞の誘導とCTLの生成に寄与することを示した。さらに、TLR7リガンド誘発性尋常性乾癬様炎症においてpDCsはI型IFNや炎症性サイトカインの産生を介して病態の発症・増悪に関与し、この免疫病態は抗Siglec-H抗体の投与により緩和することを明らかにした。

以上の結果から、pDCsの慢性炎症性自己免疫病態の形成での役割について、pDCsが自己核酸の認識により過度のサイトカインを産生することにより炎症反応を惹起・慢性化させ、同時に自己成分の自己反応性T細胞への抗原提示により自己免疫応答を誘導して慢性炎症性自己免疫疾患の惹起・進行・重症化を導く機構が推察された(下左)。また、抗Siglec-H抗体によるpDCsの機能阻害に基づいた慢性炎症性自己免疫疾患の制御が可能であることが示唆された(下右)。



## (2) 詳細

### (1) 研究テーマ A

- 1) Siglec-H 欠損の pDCs の TLR7 依存性活性化に及ぼす効果の解明
- 2) pDCs の Siglec-H を介する TLR7 依存性炎症応答制御の解明

#### [研究成果]

1-1) Siglec-H 欠損 pDCs は野生型 (WT) pDCs と比較して、TLR7 リガンドの Imiquimod (IMQ) 刺激後、I 型 IFN と IL-12p40 の産生能の著しい亢進を示した。さらに、WT pDCs への抗 Siglec-H 抗体の処理は IMQ 誘導性の I 型 IFN と IL-12p40 の産生を著しく抑制した。

1-2) WT pDCs では IMQ 刺激後、IKK- $\alpha$  のリン酸化、IKK- $\alpha$  と IRF-7 との結合が認められるとともに I $\kappa$ B のリン酸化とユビキチン化によるその分解を示した。一方、Siglec-H 欠損 pDCs では WT pDCs と比較して、IMQ 刺激による IKK- $\alpha$  のリン酸化、IKK- $\alpha$  と IRF-7 との結合が著しく亢進し、それとともに I $\kappa$ B のリン酸化による NF- $\kappa$ B の活性化もより増強していた。

2) WT マウスでは IMQ/D-GalN の投与により血清中での I 型 IFN、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12p40 の産生が誘導され、投与後 24 時間以内に炎症性ショックにより全例死亡した。一方、Siglec-H



欠損マウスではこれら血清中サイトカイン産生の著しい亢進が認められ、若干早い死亡が観察された。しかしながら、pDCs 特異的欠損マウスでは I 型 IFN のほぼ完全な産生抑制、炎症生サイトカインについては部分的な産生抑制が認められ、死亡率の低下が示された。

[研究目的の達成状況]

- 1) Siglec-H は、pDCs の TLR7-MyD88 依存的な IKK- $\alpha$  と NF- $\kappa$ B の活性化を阻害してサイトカイン産生を抑制することが明らかとなった。また、抗 Siglec-H 抗体は pDCs の機能を阻害するアンタゴニスト抗体であることが判明した。
- 2) 生体内において pDCs は TLR7 リガンド刺激に対する主要なサイトカイン産生細胞であり、この産生は Siglec-H により制御されることが明らかとなった。

(2) 研究テーマ B

- 1) 炎症応答における cDCs と pDCs のクロストークに及ぼす Siglec-H 欠損と pDCs 消失の効果の解明
- 2) 抗原特異的 CD4<sup>+</sup>T 細胞の活性化に及ぼす Siglec-H 欠損と pDCs 消失の効果の解明
- 3) 抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の活性化/CTL の誘導に及ぼす Siglec-H 欠損と pDCs 消失の効果の解明

[研究成果]

1) 生体内での IMQ 誘導性炎症環境において、WT マウスの cDCs と pDCs の MHC クラス II と共刺激分子の発現増強と比較して、Siglec-H 欠損マウスの cDC と pDCs ではさらなる増強を示し、pDCs 特異的欠損マウスの cDCs ではこれら分子の発現の減弱を示した。一方、WT マウスの cDCs と pDCs と比較して、Siglec-H 欠損マウスの cDC と pDCs では CD4<sup>+</sup>T 細胞活性化能のさらなる増強を示し、pDCs 特異的欠損マウスの cDCs では減弱を示した。

2) IMQ 誘導性炎症環境では、WT マウスの抗原特異的 CD4<sup>+</sup>T 細胞の増殖能と IFN- $\gamma$  産生能、および CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>T<sub>H</sub>1 細胞生成能と比較して、Siglec-H 欠損マウスでは増強、pDCs 特異的欠損マウスでは減弱を示した。

3) IMQ 誘導性炎症環境では、WT マウスと比較して Siglec-H 欠損マウスと pDCs 特異的消失マウスで著しい抗原特異的 CTL 誘導の低下が認められた。

[研究目的の達成状況]

- 1) 炎症環境では、cDCs の活性化には pDCs が必要であり、pDCs は cDCs のヘルパー機能を示すことが明らかとなった。
- 2) pDCs は Siglec-H 制御下において活性化後、サイトカイン産生に基づいて抗原特異的エフェクター CD4<sup>+</sup>T 細胞を誘導することが考えられた。
- 3) 生体内において pDCs は抗原クロスプレゼンテーションを介して CD8<sup>+</sup>T 細胞を活性化し、CTL の生成に寄与することが明らかとなった。

### 3. 今後の展開

これまでの研究成果を踏まえ、尋常性乾癬の発症・増悪機構における pDCs の役割のさらなる解明を目指して、Siglec-H 欠損マウスと pDCs 特異的消失マウスを用いたマウス尋常性乾癬様炎症モデルにおいて、免疫病態の形成におけるサイトカイン及び共刺激分子の関与とともに

pDCs と免疫細胞とのクロストークの意義を明らかにする。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

設定した研究目的については上述の通り、ほぼ達成状況にある。研究の進め方については、研究代表者単独で計画され、研究協力者3名(研究補助者名、博士課程大学院生2名)の協力のもと有効な研究実施体制にて円滑に遂行された。研究経費については主として研究課題の遂行に必要な機器類や研究試薬を含む消耗品費に使用されたことから、研究費執行状況は妥当であると考えられる。

本研究課題では慢性炎症性自己免疫病態の形成におけるpDCsの意義とpDC機能阻害に基づいた病態制御を示した。従って、pDCs機能制御に関する新技術の創製は将来的に加齢に伴う慢性自己免疫疾患の創薬開発を可能とし、高齢化社会に必要な先制的医療の基盤技術の創出に大きく資することが期待できる。さらに、結果として慢性自己免疫疾患に関わる医療費、QOLの低下等、その経済的・社会的損失等の諸問題の解決へ積極的に貢献する可能性を有する。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

形質細胞様樹状細胞(pDCs)に特異的に発現する分子であるSiglec-Hを欠損したマウスとpDCsを特異的に消失させたマウスを独自に作製し、pDCsにおいてSiglec-Hが有する、(1) TLR7/TLR9-MyD88依存的なIKK- $\alpha$ とNF- $\kappa$ Bの活性化を介する炎症性サイトカイン(I型インターフェロン)産生の抑制機能、(2)通常型樹状細胞の活性化調節機能や抗原特異的エフェクターCD4+T細胞とCTLの誘導の調節機能を明らかにし発表した。さらに、尋常性乾癬様炎症病態モデルにおいて、pDCsとSiglec-Hの免疫病態の形成における役割の解析を行いつつある。これらの結果は、pDCの関与が疑われる自己免疫疾患に対する新たな治療ターゲットを示唆することができた。本さきがけ研究は国内外において評価され、研究者としての飛躍につながった。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 論文(原著論文)発表

1. Fukaya, T., Murakami, R., Takagi, H., Sato, K., Sato, Y., Otsuka, H., Ohno, M., Hijikata, A., Ohara, O., Hikida, M., Malissen, B., and Sato, K. Conditional ablation of CD205<sup>+</sup> conventional dendritic cells impacts the regulation of T cell immunity and homeostasis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012, 109, 11288-11293.
2. Takagi, H., Fukaya, T., Eizumi, K., Sato, Y., Sato, K., Shibasaki, A., Otsuka, H., Hijikata, A., Watanabe, T., Ohara, O., Kaisho, T., Malissen, B., and Sato, K. Plasmacytoid dendritic cells are crucial for the initiation of inflammation and T cell immunity in vivo. *Immunity*. 2011, 35, 958-971.

(2)特許出願

該当無し。

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な招聘講演

1. 佐藤克明, 樹状細胞による感染防御, 日本農芸化学会 2014 年度大会キリン株式会社ランチョンセミナー<ウイルス感染防御と乳酸菌>, 東京, 2014.
2. 佐藤克明, 樹状細胞による免疫応答制御, 武田薬品工業研究所第 3 回免疫研究者招待セミナー, 藤沢, 2013.
3. Sato, K., Plasmacytoid dendritic cells in innate and adaptive immunity, The 21th International Symposium of Macrophage Molecular and Cellular Biology, Tokyo, Japan, 2013.
4. 佐藤克明, 樹状細胞と免疫療法, 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会シンポジウム, 東京, 2013.
5. 佐藤克明, Plasmacytoid dendritic cells in innate and adaptive immunity, 大阪大学免疫学フロンティア研究センターセミナー, 大阪, 2012.

受賞

1. Katsuaki Sato, RIKEN RCAI The Excellent Paper Award 2011 (March 23, 2012)
2. 佐藤克明, 慶應医学会感謝状(2013 年 3 月 12 日)

著作物

1. 佐藤克明, 樹状細胞と免疫療法. アレルギー科, 63(7):914-919, 2014.
2. 佐藤克明, 形質細胞様樹状細胞による免疫応答の制御, 感染・免疫・炎症, 43(2): 69-71, 2013.
3. 佐藤克明・高木秀明, 形質細胞様樹状細胞による T 細胞の反応の制御, 臨床免疫・アレルギー科, 58(5):503-507, 2012.
4. 佐藤克明, 樹状細胞サブセットによる免疫応答制御, 医学のあゆみ, 243(1):73-77, 2012.
5. 高木秀明・佐藤克明, 形質細胞様樹状細胞の生体での炎症反応と T 細胞の免疫応答における役割, ライフサイエンス統合データベースセンターライフサイエンス新着論文レビュー, <http://first.lifesciencedb.jp/archives/4086>, 2012.

プレスリリース

1. 2011 年 12 月 16 日, 化学工業日報, 9 面
2. 2012 年 1 月 13 日, 科学新聞, 4 面
3. 2012 年 6 月 26 日, 日刊工業新聞, 19 面
4. 2012 年 7 月 11 日, 化学工業日報, 9 面
5. 2014 年 1 月 31 日, 産経新聞, 9 面

その他:

# 研究報告書

## 「慢性炎症における免疫細胞動態の神経性制御機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 鈴木 一博

### 1. 研究のねらい

「病は気から」という諺にも示されるように、神経系による免疫系の制御機構が存在することは古くから広く知られている。事実、リンパ節をはじめとするリンパ器官には種々の神経細胞が投射しており、免疫細胞上にはそれらの神経細胞から分泌される神経伝達物質に対する受容体が発現している。しかし、神経系からのインプットが免疫系からのアウトプットにどのようにして変換されるのか、その細胞および分子レベルでのメカニズムは今なお十分に理解されていない。交感神経と副交感神経から成る自律神経系は、ストレスや情動による中枢神経系の活動性の変化を他の生体システムに伝達する主要な経路であることから、神経系による免疫制御にも深く関与すると考えられている。特に交感神経は、慢性関節リウマチや多発性硬化症といった慢性炎症性疾患の病態との関連性が示唆されてきたにもかかわらず、そのメカニズムは不明であった。そこで私は、交感神経が免疫系に及ぼす影響とそのメカニズムの解明に着手した。

交感神経が免疫系に及ぼす影響を調べるに当たって、私は交感神経から分泌されるノルアドレナリンの受容体の一つである  $\beta_2$  アドレナリン受容体がリンパ球上に発現していることに着目した。交感神経が興奮したのと似た状況を作り出すため、マウスに  $\beta_2$  アドレナリン受容体の選択的な刺激薬を投与したところ、血液中およびリンパ液のリンパ球数が急激に減少することが確認された。このことは、交感神経がリンパ球の体内動態の制御に関与することを示唆している。そこで我々(研究者本人、研究補助員 2 名、学生 1 名)は、交感神経による免疫・炎症制御のメカニズムをリンパ球動態という切り口で解明することを目的として、交感神経によるリンパ球動態制御の細胞基盤と分子基盤、さらにその炎症性疾患の病態における意義について検討した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

交感神経によるリンパ球動態制御の細胞基盤について解析した結果、交感神経からの入力がリンパ球上に発現する  $\beta_2$  アドレナリン受容体を介してリンパ球のリンパ節からの脱出を抑制することが明らかになった。そのメカニズムとして、交感神経によるリンパ球動態制御の分子基盤について検討した結果、 $\beta_2$  アドレナリン受容体がリンパ球のリンパ節への保持に関わるケモカイン受容体 CCR7 および CXCR4 と複合体を形成すること、 $\beta_2$  アドレナリン受容体の活性化に伴ってこれらのケモカイン受容体の反応性が亢進することを見出した。これらのことから、 $\beta_2$  アドレナリン受容体とケモカイン受容体の物理的かつ機能的なクロストークによってリンパ球のリンパ節への保持が促される結果、リンパ節からの脱出が抑制されることが明らかになった(図)。

さらに、交感神経によるリンパ球動態制御の炎症性疾患の病態における意義を、T細胞依存性の炎症性疾患モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎および皮膚の遅延型過敏反応を用いて検討した。その結果、いずれのモデルにおいても $\beta_2$ アドレナリン受容体の刺激によって症状の進行が抑えられることが確認された。さらに皮膚の遅延型過敏反応のモデルを用いて、 $\beta_2$ アドレナリン受容体の活性化が抗原特異的なT細胞の体内動態に及ぼす影響について解析したところ、 $\beta_2$ アドレナリン受容体を介する刺激によって抗原特異的T細胞のリンパ節からの脱出が抑制され、炎症部位への移動が妨げられることがわかった。これらのことから、交感神経からの入力に伴う抗原特異的T細胞の動態変化が炎症を抑制する方向に作用することが示唆された。

この研究成果は、The Journal of Experimental Medicine 電子版に2014年11月24日付で掲載された。

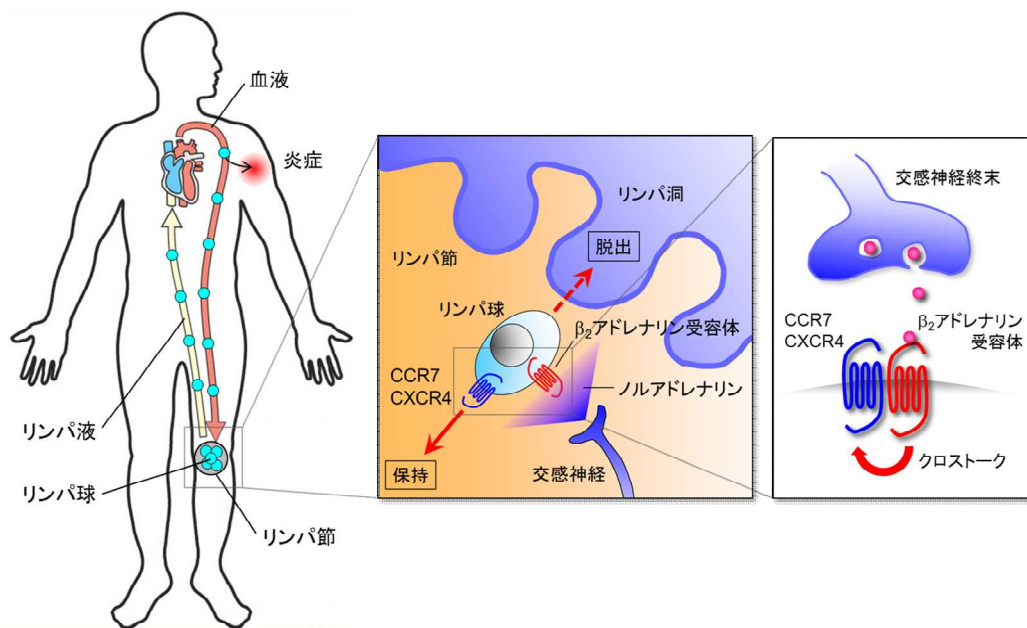


図. 交感神経によるリンパ球動態の制御

## (2) 詳細

### ① 交感神経によるリンパ球動態制御の細胞基盤

マウスに $\beta_2$ アドレナリン受容体刺激薬を投与することによって血液およびリンパ液中のリンパ球数が減少するメカニズムを細胞レベルで解明するに当たって、この $\beta_2$ アドレナリン受容体刺激薬の作用が、リンパ球に発現する $\beta_2$ アドレナリン受容体に媒介されているのか、あるいは非血液細胞上に発現する $\beta_2$ アドレナリン受容体に媒介されるのかを明らかにすることを試みた。そのために、 $\beta_2$ アドレナリン受容体刺激薬の作用が $\beta_2$ アドレナリン受容体の遺伝子欠損マウスでは完全に消失することを確認した上で、骨髄キメラマウスを用いた実験を行った。致死量の放射線を照射した野生型マウスに、 $\beta_2$ アドレナリン受容体欠損マウスの骨髄細胞を移入し、血液細胞上に $\beta_2$ アドレナリン受容体が発現していない状況を作り出したところ、 $\beta_2$ アドレナリン受容体刺激薬の作用がほとんど消失した。一方、 $\beta_2$ アドレナリン受容体欠損マウスをレシピエントとして骨髄キメラマウスを作製し、非血液細胞上に $\beta_2$ アドレナリン受容

体が発現していない状況にした場合には、野生型マウスをレシピエントとした場合と同等の作用が認められた。これらのことから、 $\beta_2$  アドレナリン受容体刺激薬の投与が血液・リンパ液中のリンパ球数に及ぼす影響の大部分は、血液細胞上に発現する  $\beta_2$  アドレナリン受容体に媒介されることが明らかになった。

リンパ球はリンパ節からリンパ液中に脱出し、リンパ液が血液と合流するのに伴って血流に乗り、再びリンパ節に戻る(再循環)という形で全身を巡回している。そこで我々は、 $\beta_2$  アドレナリン受容体が刺激されることによって血液とリンパ液中のリンパ球数が共に減少するのは、リンパ節からのリンパ球の脱出が抑制されるためではないかと推測した。この仮説を検証するため、リンパ球が血液中からリンパ節に進入する際に必須の接着因子  $\alpha 4$  および  $\alpha L$  インテグリンの中和抗体をマウスに投与することによって、リンパ球のリンパ節への進入を遮断し、その一定時間後にリンパ節に残存するリンパ球の数を測定するという方法を用いて、リンパ球のリンパ節からの脱出頻度を評価した。その結果、 $\beta_2$  アドレナリン受容体刺激薬を投与することによって、より多くのリンパ球がリンパ節に残存することが確認され、 $\beta_2$  アドレナリン受容体を刺激することによってリンパ球のリンパ節からの脱出が抑制されることが証明された。

次に我々は、交感神経からの生理的なレベルの  $\beta_2$  アドレナリン受容体を介する入力があるリンパ球のリンパ節からの脱出に関するか検討した。まず  $\beta_2$  アドレナリン受容体を欠損するリンパ球あるいは野生型のリンパ球をマウスに移入し、それらのリンパ節からの脱出頻度を評価したところ、 $\beta_2$  アドレナリン受容体欠損リンパ球は野生型のリンパ球に比べてリンパ節から脱出しやすいことがわかった。また、交感神経に選択的に取り込まれる神経毒 6-hydroxydopamine を投与することによって交感神経を除去したマウスにおいても、リンパ球のリンパ節からの脱出が亢進した。これらの結果から、交感神経から  $\beta_2$  アドレナリン受容体を介して供給される生理的なレベルの入力もまたリンパ球のリンパ節からの脱出を抑制することが示された。

以上の結果から、交感神経からの入力があるリンパ球上に発現する  $\beta_2$  アドレナリン受容体を活性化し、リンパ球のリンパ節を介する再循環を調節することによって、リンパ球の体内動態の恒常性維持に寄与していることが明らかになった。しかし、交感神経がリンパ節のどこでどのようにリンパ球と相互作用しているのか、その実態は現時点では不明であり、今後の検討課題の一つである。

## ② 交感神経によるリンパ球動態制御の分子基盤

リンパ球のリンパ節からの脱出頻度は、リンパ球のリンパ節からの脱出を促すスフィンゴシン 1 リン酸受容体 S1PR1 を介するシグナルと、リンパ球のリンパ節への保持を促すケモカイン受容体 CCR7 および CXCR4 を介するシグナルのバランスで決定される。そこで我々は、これらの走化性因子受容体のシグナルがリンパ球上に発現する  $\beta_2$  アドレナリン受容体の活性化に伴ってどのように変化するか検討した。その結果、CCR7 および CXCR4 を介する small GTPase Rac1 の活性化、およびリンパ球の走化性が  $\beta_2$  アドレナリン受容体を刺激することによって亢進することがわかった。一方、S1PR1 を介するリンパ球の反応には影響は認められなかった。これらの結果から、 $\beta_2$  アドレナリン受容体の活性化に伴って CCR7 および CXCR4 の反応性が選択的に増強されるというシグナル伝達のクロストークが存在することが示され

た。さらに、リンパ球における CCR7 の欠損、あるいは CXCR4 の特異的阻害剤の投与によって、 $\beta_2$  アドレナリン受容体刺激薬によるリンパ球のリンパ節からの脱出を抑制する効果が減弱することが判明し、 $\beta_2$  アドレナリン受容体の活性化に伴うリンパ球動態の変化が CCR7 と CXCR4 に依存することが確認された。

アドレナリン受容体とケモカイン受容体はいずれも G タンパク共役型受容体であるが、異なる G タンパク共役型受容体どうしが複合体を形成し、受容体間でシグナル伝達のクロストークが起こることが知られている。そこで、 $\beta_2$  アドレナリン受容体とケモカイン受容体の物理的な相互作用について免疫沈降法を用いて検討したところ、 $\beta_2$  アドレナリン受容体が CCR7 および CXCR4 と選択的に複合体を形成することが示唆された。我々は、この受容体間の物理的な相互作用が、シグナル増強作用の基盤になっていると推測している。

以上の結果から、 $\beta_2$  アドレナリン受容体と CCR7 および CXCR4 のクロストークがリンパ球のリンパ節への保持を促すシグナルを増強する結果、リンパ球のリンパ節からの脱出が抑制されることが示された。しかし本研究では、 $\beta_2$  アドレナリン受容体とケモカイン受容体のクロストークの分子機序を明らかにするまでには至らなかった。

### ③ 交感神経によるリンパ球動態制御の炎症性疾患の病態における意義

さらに我々は、 $\beta_2$  アドレナリン受容体によるリンパ球の動態制御が炎症性疾患の病態においてどのような意味を持つのか検討した。ヒトの多発性硬化症のマウスモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎、およびアレルギー性皮膚炎のマウスモデルである皮膚の遅延型過敏反応において、 $\beta_2$  アドレナリン受容体刺激薬を投与したところ、いずれの炎症性疾患モデルにおいても症状の進行が抑制された。一方、 $\beta_2$  アドレナリン受容体欠損マウスでは野生型マウスに比べて症状が増悪した。これらのことから、 $\beta_2$  アドレナリン受容体のシグナルは炎症を鎮静化することが確かめられた。

これらの炎症性疾患モデルでは、免疫部位の所属リンパ節でエフェクター細胞に分化した抗原特異的 T 細胞が、特異抗原の存在する中枢神経系あるいは皮膚に移動して炎症を誘導することで病態が形成される。そこで我々は、皮膚の遅延型過敏反応の実験系を利用して、抗原特異的 T 細胞の体内動態における  $\beta_2$  アドレナリン受容体の役割について検討した。その結果、 $\beta_2$  アドレナリン受容体刺激薬の投与によって、抗原特異的 T 細胞のリンパ節からの脱出が抑制され、炎症部位である皮膚への到達が妨げられることがわかった。一方、 $\beta_2$  アドレナリン受容体を欠損する抗原特異的 T 細胞は、野生型の抗原特異的 T 細胞よりもリンパ節から脱出しやすく、炎症部位に到達しやすいことが判明し、生理的なレベルの  $\beta_2$  アドレナリン受容体を介する入力もまた抗原特異的 T 細胞の動態に関与することが明らかになった。これらのことから、交感神経からの入力に伴う抗原特異的 T 細胞の動態変化が T 細胞依存性の炎症を抑制する方向に作用することが示唆された。

## 3. 今後の展開

本研究では、交感神経がリンパ節のどこでどのようにリンパ球と相互作用するのか、その実態を明らかにするには至らなかった。そこで我々は、2 光子励起蛍光顕微鏡を用いた生体イメージングを用いて、生きたマウスのリンパ節における交感神経とリンパ球の相互作用を可視化することによって、交感神経によるリンパ球動態制御の実態を解明することを計画している。

また、 $\beta_2$  アドレナリン受容体の活性化がケモカイン受容体の反応性を増強するメカニズムは不明である。我々は、両受容体間のクロストークに関与する分子の同定を進めており、今後これらの分子の機能解析を通じて $\beta_2$  アドレナリン受容体-ケモカイン受容体間クロストークの分子機序を明らかにしたい。

さらに重要な課題は、本研究で明らかになった交感神経によるリンパ球動態制御が生理的にどのような意義を有しているかを明らかにすることである。交感神経の活動性は、1 日の内で身体活動性の高い時間帯に上昇し、身体活動性の低い時間帯に低下するという日内変動を示す。そこで我々は、この交感神経活動の概日リズムと免疫応答の関連性に注目して交感神経によるリンパ球動態制御の生理的意義を明らかにすることを試みる。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

いくつかの問題点が未解明のまま残されているものの、交感神経によるリンパ球動態制御の細胞・分子基盤とその炎症性疾患の病態における意義を明らかにすることができたため、本研究の目的は概ね達成できたと考えている。本さがけ研究の開始時期が研究室の立ち上げの時期と重なったこともあり、研究費は生物学的実験の遂行に必須の基本的な機器、および本研究の目的に特化した機器・消耗品の購入のために効果的に使用することができた。本研究は研究者本人、技術補助者 2 名、学生 1 名という体制で行われたが、研究計画と予算の規模に照らして適切であったと考えられる。

本研究を足掛かりとして、ストレスあるいは情動が交感神経を介して免疫機能にどのように反映されるのか、まさに「病は気から」を明確な分子の言葉で語る事が可能になると予想される。それが実現すれば、交感神経による免疫制御に関わる分子を標的として、ストレス応答を人為的にコントロールするという新しいコンセプトに基づいた病気の予防・治療法の開発につながると期待される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

交感神経が免疫系に及ぼす影響とそのメカニズムについて研究し、 $\beta_2$ アドレナリン受容体は刺激を受けて活性化すると、リンパ球のリンパ節への保持に関わるケモカイン受容体(CCR7 およびCXCR4)とGタンパク共役型受容体同士で複合体を形成し、ケモカイン受容体の反応性が亢進することにより、リンパ球のリンパ節からの脱出を抑制することを明らかにした。さらに、ヒトの多発性硬化症およびアレルギー性皮膚炎のマウスモデルにおいて、 $\beta_2$ アドレナリン受容体を介する刺激を加えることより抗原特異的T細胞のリンパ節からの脱出と炎症部位への移動が阻害され、その結果として症状の進行が抑制されることを明らかにし発表した。今後、病態はもとより日内変動などの生理的条件下におけるこの交感神経によるリンパ球動態の制御についての研究も予定されており、興味が尽きない。本さがけ研究は新たな研究分野を開拓するものと国内外において評価され、研究者としての飛躍につながった

#### 5. 主な研究成果リスト



(1)論文(原著論文)発表

Nakai, A., Hayano, Y., Furuta, F., Noda, M. and **Suzuki, K. (Corresponding author)**  
Control of lymphocyte egress from lymph nodes through  $\beta_2$ -adrenergic receptors.  
**J. Exp. Med.** Published online on November 24, 2014.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. **鈴木一博**.「アドレナリン受容体とケモカイン受容体のクロストークによるリンパ球動態制御」, 第37回 日本分子生物学会年会 ワークショップ:免疫受容体による細胞間コミュニケーションの新しい地平線, パシフィコ横浜, 横浜, 2014年11月26日.
2. **Suzuki, K.** Adrenergic control of lymphocyte trafficking. France-Japan Immunology Meeting, Royal Cottage Hotel, Cassis, France, October 23, 2014. Invited.
3. **Suzuki, K.** Imaging the immune system and beyond. The 37<sup>th</sup> Naito Conference, Hilton Niseko Village, Hokkaido, Japan, July 17, 2014. Invited.
4. **Suzuki, K.** Nakai, A. and Hayano, Y. Adrenergic control of lymphocyte dynamics. The 9<sup>th</sup> IMS-JSI International Symposium on Immunology, Pacifico Yokohama, Kanagawa, Japan, June 27, 2014. Invited.
5. **Suzuki, K.** Nakai, A. and Hayano, Y. Adrenergic control of B cell egress from lymph nodes. The 42<sup>th</sup> Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Makuhari Messe, Makuhari, Chiba, Japan, December 13, 2013.

受賞

日本免疫学会研究奨励賞(日本免疫学会、2012年)

プレスリリース

1. 「『病は気から』の実験的証明」, 大阪大学, 2014年11月25日.  
<http://www.ifrec.osaka-u.ac.jp/jpn/research/2014/11/20141125-JEM.php>
2. 「『病は気から』の根拠を実験的に証明」, JST, 2014年11月25日.  
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20141125-2/index.html>
3. 「『病は気から』の仕組みの一端を実証」, サイエンスポータル, 2014年11月25日.  
<http://scienceportal.jst.go.jp/>

# 研究報告書

## 「炎症を負に制御する分子機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年10月～平成27年3月

研究者: 田中 貴志

### 1. 研究のねらい

細菌やウイルスなどの病原微生物が生体に侵入すると、樹状細胞は Toll 様受容体(TLR)によってこれを感知し、転写因子 NF- $\kappa$ B を活性化して、IL-6 や IL-12 などの炎症性サイトカインを産生することにより炎症反応を惹起する。さらにこれらのサイトカインは、ヘルパーT 細胞において転写因子 STAT4, STAT6 および STAT3 を活性化し、それぞれ Th1, Th2, Th17 細胞という異なったエフェクターT 細胞への分化を誘導することにより、さまざまな病原微生物の排除を行う。ところが一方では、何らかの原因でこの炎症反応が過剰かつ無制限に活性化されると自己免疫疾患や慢性炎症性疾患を引き起こすことも示唆されている。生体は内因性の負の制御機構により、このような炎症反応を適当な時点で終息させることで病気の発症を未然に防いでいる。すなわち、この負の制御機構の破綻こそが炎症を慢性化させて上記の疾患を発症させる原因であると考えられる。しかしながら、このような免疫系の負の制御の分子機構の詳細は未だ解明されていない。私たちはこれまで、免疫系の複数のシグナル伝達を抑制することにより免疫系全体を負に調節するような因子を同定することを目標に研究を行ってきた。そして、このような因子の1つとして LIM 蛋白ファミリーに属するユビキチンリガーゼ PDLIM2 を同定した。PDLIM2 は、樹状細胞において転写因子 NF- $\kappa$ B をユビキチン化してプロテアソーム依存性に分解することにより炎症反応を負に制御するとともに、ヘルパーT 細胞においては STAT4 および STAT3 をユビキチン化・不活性化することにより Th1 および Th17 細胞分化を抑制する。そこで、本研究においては、この PDLIM2 による炎症反応制御機構を足がかりとして、炎症反応の制御を担う多くの分子群を同定し、炎症反応の負の制御機構の全容を分子レベルで明らかにすることを目指す。まずは、PDLIM2 以外の LIM 蛋白ファミリーに属する因子群の炎症反応を制御する分子機構を明らかにする。さらに、PDLIM2 と結合する分子を探索する方法、および、PDLIM2 欠損マウスの組織や細胞を用いたマイクロアレイ解析により、炎症反応の負の制御を担う新たな分子群、および、逆に炎症の慢性化に関与するような遺伝子群を同定する。最終的には、これらの分子の異常が、ヒトの自己免疫疾患の病因病態形成に関与するのかを解明する。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究においては、まず LIM 蛋白ファミリーの炎症制御における役割を解析した。その結果、PDLIM4 が、PDLIM2 とは異なり、細胞質において LIM ドメインを介して蛋白脱リン酸化酵素 PTPBL をリクルートして STAT4, STAT6 および STAT3 を脱リン酸化することにより、Th1, Th2 および Th17 細胞分化を負に制御することを明らかにした。このことから、LIM 蛋白はそれぞれ異なったメカニズムで炎症反応を負に制御する新たなファミリーであると考えられた。さら

に、ヒトの PDLIM4 の LIM ドメイン内のアミノ酸置換を伴う一塩基多型が、関節リウマチの疾患感受性に関与していることを明らかにした。また、この変異を導入した PDLIM4 では、PTPBL との結合が低下することにより、STAT3 を脱リン酸化・抑制する活性が傷害されていた。以上の結果より、炎症反応シグナルの負の制御因子の機能異常が、ヒトの自己免疫疾患の原因になりうる事が証明された。

LIM 蛋白はアダプター分子としてさまざまな分子と相互作用することにより機能を発揮している。そこで次に、PDLIM2 と会合する分子を網羅的に探索し、この中から、siRNA を用いた細胞レベルの解析により、NF- $\kappa$ B の活性を抑制する分子を同定した。これにより、HSP70、HSP90 などのシャペロン分子群や、Fbxo21 などのユビキチンリガーゼ複合体のコンポーネントなど、約 20 個の分子が新たな炎症反応の制御因子の候補として同定できた。さらにこの中で HSP70 について解析を進めたところ、HSP70 は、PDLIM2 および NF- $\kappa$ B と結合するとともに、プロテアソーム結合蛋白である BAG1 と会合して、PDLIM2-NF- $\kappa$ B 複合体のプロテアソームへの輸送を促進することにより NF- $\kappa$ B の分解不活性化に関与することが明らかになった。また、HSP70 欠損マウスでは、*Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) 投与による炎症性サイトカインの産生・肝臓の炎症性肉芽腫の形成が野生型マウスに比べて著明に亢進していたことから、個体レベルでも HSP70 は炎症反応を負に制御すると考えられた。今後はこれらの得られた分子群について、炎症を制御する分子機構およびヒトの慢性炎症性疾患の病因病態形成への関与について解析を進めていく予定である。

## (2) 詳細

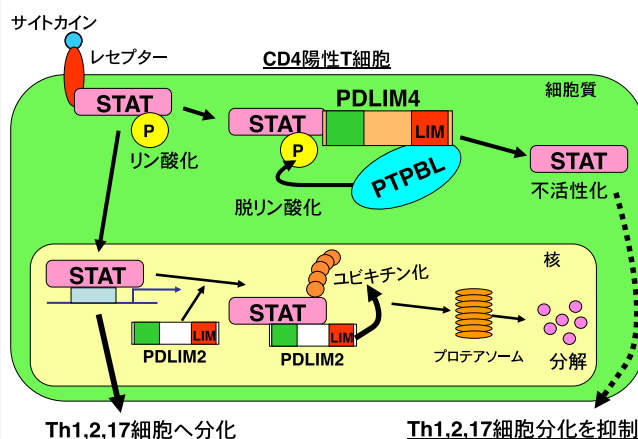
### 研究テーマ1: LIM 蛋白ファミリーによる炎症反応制御機構の解明

・PDLIM4 は STAT を脱リン酸化・不活性化することにより Th1, Th2, Th17 細胞分化を負に制御する

これまでに30種類以上の LIM 蛋白が報告されているが、本研究では、PDLIM2 と同様に PDZ ドメインと LIM ドメインの両方を有する LIM 蛋白(PDLIM1-7)に焦点を当てて解析を行った。まずは、その中でも PDLIM2 と構造的に最も相同性が高い PDLIM4 に関して解析を行ったところ、PDLIM4 が STAT4、STAT6 および STAT3 を介するシグナル伝達を負に制御することを見出した。ところが、PDLIM4 はユビキチンリガーゼ活性を有しておらず、実際 PDLIM4 は

STAT をユビキチン化しなかった。さらに、PDLIM4 は核内ではなく細胞質に存在しており、蛋白脱リン酸化酵素である PTP-BL をリクルートして、STAT の活性化に必須のチロシン残基を脱リン酸化することにより STAT を不活性化した。また、PDLIM4 欠損マウス由来の T 細胞においては、野生型マウス由来 T 細胞と比べて、Th1、Th2 および Th17 細胞分化が亢進しており、

図1 PDLIM2とPDLIM4によるTh細胞分化の負の制御の分子機構



STAT4、STAT6 および STAT3 のチロシンリン酸化も増強していた。さらに、個体レベルでの Th1 および Th17 反応を調べるために、PDLIM4 欠損マウスを用いて実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の実験を行ったところ、野生型マウスと比べて、神経症状が有意に亢進していた。また、個体レベルでの Th2 反応を調べるために、PDLIM4 欠損マウスに腸管寄生虫である *Nippostrongylus brasiliensis* を感染させたところ、野生型マウスと比べて、腸間膜リンパ節における IL-4 や IL-13 などの Th2 サイトカインの産生が亢進しており、それに伴って腸管からの寄生虫の排除も亢進していた。以上より、PDLIM4 は、STAT を脱リン酸化し不活性化することにより、Th1、Th2、Th17 細胞分化を負に制御していることが明らかになった。以上の結果から、LIM 蛋白は、LIM ドメインを介してそれぞれ異なった細胞内因子と結合しこれをリクルートすることにより、それぞれ異なったメカニズムで標的蛋白を不活性化するアダプター分子として機能していると考えられた。

#### ・ヒトの PDLIM4 遺伝子の一塩基多型は関節リウマチの疾患感受性と関連する

さらに PDLIM4 の異常がヒトの自己免疫疾患の病因病態に関与するかどうかを解明するために、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) を行った。その結果、PDLIM4 の LIM ドメイン内のアミノ酸置換を伴う一塩基多型 (SNP) が、関節リウマチの疾患感受性に関与することが明らかになった (オッズ比: 1.13, P 値: 0.0041)。この SNP は、LIM ドメインの N 末端付近にある 259 番目のグリシン残基がシステインに置換されたもので、日本人の約 30% が有する。このアミノ酸置換により、本来は 8 つの保存されたシステイン/ヒスチジン残基を持つ LIM ドメインに、さらにもう 1 つシステインが付加されることになる。このアミノ酸置換を有する PDLIM4 は、野生型の PDLIM4 と比べて PTPBL への結合が低下しており、このため STAT3 を脱リン酸化・不活性化する活性が有意に傷害されていた。このことから、この PDLIM4 の SNP を有する場合、PDLIM4 が STAT3 を不活性化して Th17 細胞分化を負に調節する機能が低下するために上記のような疾患を発症しやすくなると考えられた。以上の結果より、炎症反応を誘導するシグナル伝達を負に制御する因子の機能異常が、ヒトの自己免疫疾患の発症と関連していることが明らかになった。

#### ・その他の LIM 蛋白ファミリーの解析

その他の LIM 蛋白に関しては、現在 PDLIM1 と PDLIM7 に関して解析を進めている。PDLIM1 に関しては、細胞に PDLIM1 を強制発現させると NF- $\kappa$ B の核移行を阻害すること、および、PDLIM1 をノックアウトした樹状細胞においては、逆に NF- $\kappa$ B の核移行が促進されることにより炎症性サイトカインの発現が亢進することが明らかになった。また、PDLIM1 は、PDZ ドメインを介してアクチン結合蛋白である  $\alpha$ -actinin と結合しており、PDZ ドメインを欠失させた PDLIM1 の変異体は、NF- $\kappa$ B の転写活性を抑制する機能が著明に阻害されていた。以上の結果から、PDLIM1 はアクチン線維と相互作用して NF- $\kappa$ B を細胞質内に留めることにより、NF- $\kappa$ B シグナルおよび炎症反応を負に制御していることが示唆された。一方、PDLIM7 は NF- $\kappa$ B の p65 サブユニットをユビキチン化・分解したことから、PDLIM2 と同様ユビキチンリガーゼであると考えられた。さらに、PDLIM7 が PDLIM2 とヘテロダイマーを形成していること、および、PDLIM7 をノックダウンした細胞においては、PDLIM2 が NF- $\kappa$ B p65 を分解する活性が著明に阻害されることから、PDLIM7 は PDLIM2 と協調して NF- $\kappa$ B p65 をユビキチン化・分化・不活性化するこ

とにより炎症反応を負に制御していることが示唆された。以上の結果より、LIM 蛋白はそれぞれ異なったメカニズムで炎症反応を負に制御する新たなファミリーであると考えられた。

## 研究テーマ2： 炎症反応の負の制御を担う新たな分子群の同定

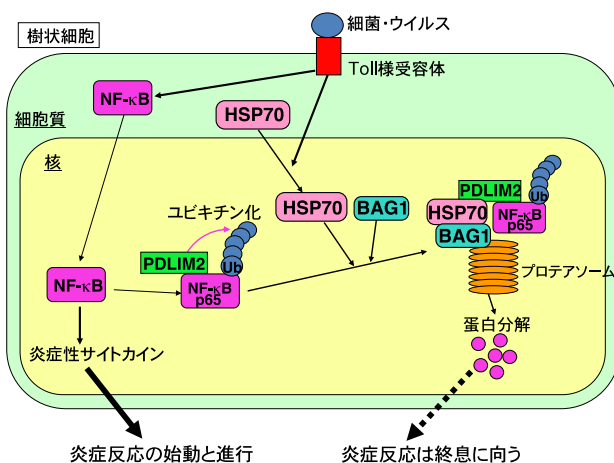
### ・共免疫沈降と質量分析法を用いた PDLIM2 結合タンパク質の同定

LIM ドメインおよび PDZ ドメインはいずれも蛋白蛋白相互作用に関与するドメインであることから、LIM 蛋白はアダプター分子としてさまざまな分子と相互作用することにより機能を発揮していると考えられている。そこで、PDLIM2 と会合し、且つ、炎症反応を負に制御する分子群を網羅的に探索した。具体的には、まず Flag タグを付加した PDLIM2 発現ベクターおよびコントロールベクターを 293T 細胞に強制発現させ、この細胞の全細胞抽出液を抗 Flag 抗体で免疫沈降し、ここから Flag ペプチドを用いて PDLIM2 と特異的に結合するタンパク質を溶出した。そしてこのサンプルに含まれるタンパク質を、質量分析法を用いて特定した。さらに得られた候補因子の中から、siRNA を用いて培養細胞でノックダウンしたときに NF- $\kappa$ B の活性を亢進させる分子を同定した。これにより、HSP70, HSP90, HSP40, HSP105, Apg-1 などのシャペロン分子群や、Fbxo21, Skp1 などのユビキチンリガーゼ複合体のコンポーネントなど、約20個の分子が新たな炎症反応を負に制御する因子として同定できた。HSP70をはじめとするシャペロン分子群は、タンパク質の細胞内品質管理機構においては、変成したタンパク質と結合してその凝集を防ぐことにより、協同して変成タンパク質の分解処理を促進する。よって、NF- $\kappa$ B の不活性化の過程においても、これらのシャペロン分子群が協同して NF- $\kappa$ B の分解・不活性化を促進している可能性が示唆された。また、PDLIM2 などのユビキチンリガーゼは実際には他のいくつかの分子と複合体を形成することにより機能を発揮する。今回同定された Fbxo21 は、F-box 蛋白ファミリーに属しており、F-box 蛋白は、このユビキチンリガーゼ複合体の中で、標的タンパク質との直接の結合を担っていることが知られている。私たちは、Fbxo21 が PDLIM2 と協同してユビキチン化の基質特異性を決定していることを明らかにした。

### ・HSP70 は PDLIM2 と協同して炎症反応を負に制御する(論文リスト1)

さらに、上記の PDLIM2 結合タンパク質の中から、HSP70 に焦点を絞って解析を進めた。HSP70 が細胞を刺激していない状態では細胞質にのみ存在し、細胞をTLRが認識する細菌成分であるLPSで刺激して3-5時間後に核の中へと移行すること、および、HSP70 をノックダウンした細胞においては、PDLIM2 が NF- $\kappa$ B p65 を分解する活性が著明に阻害されることから、PDLIM2 が、細胞を LPS で刺激して3-5時間経過して HSP70 が核に移行するのにともなってはじめて NF- $\kappa$ B の分解を誘導できることが示唆された。また HSP70 が、PDLIM2 および

図2 HSP70による炎症反応制御の分子機構



菌成分であるLPSで刺激して3-5時間後に核の中へと移行すること、および、HSP70 をノックダウンした細胞においては、PDLIM2 が NF- $\kappa$ B p65 を分解する活性が著明に阻害されることから、PDLIM2 が、細胞を LPS で刺激して3-5時間経過して HSP70 が核に移行するのにともなってはじめて NF- $\kappa$ B の分解を誘導できることが示唆された。また HSP70 が、PDLIM2 および

NF- $\kappa$ B と結合するとともに、プロテアソーム結合蛋白である BAG1 と会合して、PDLIM2-NF- $\kappa$ B 複合体のプロテアソームへの輸送を促進することにより NF- $\kappa$ B の分解不活性化に関与することも明らかになった。さらに、ヒトの自己免疫疾患の1つであるサルコイドーシスの原因菌であることが示唆されている *P. acnes* を用いて HSP70 の個体レベルでの炎症反応制御における役割を調べた。その結果、*P. acnes* の加熱死菌を投与した HSP70 欠損マウスにおいては、樹状細胞からの IL-12 および IL-6 の産生が亢進することにより、個体レベルでの Th1 および Th17 細胞分化、および、肝臓での炎症性肉芽腫形成が野生型マウスと比べて亢進していることが明らかになった。これより、HSP70 は個体レベルでも炎症反応を負に制御することが明らかになった。以上の結果より、PDLIM2 と結合する活性を指標にして同定した因子が実際に個体レベルでも炎症反応を制御することが証明された。

### 3. 今後の展開

(1)本研究で同定された新たな炎症反応制御の候補因子に関して、細胞レベルだけでなく個体レベルでの炎症反応制御における役割を解析する。この際、CRISPRなどのゲノム編集機能を利用して、簡潔かつ迅速にノックアウトマウスの作成を行う。さらに、GAWS を用いてこれらの分子の異常が、ヒトの自己免疫疾患の病因病態形成に関与するのかを解明する。

(2)ヒトの自己免疫疾患は感染を契機として発症・増悪する場合が多い。そこで、自己免疫疾患の発症との関連がすでに示唆されている細菌、たとえば、*Helicobacter pylori*, *Porphyromonas gingivalis*, *Mycoplasma fermentans*, *Campylobacter jejuni* を PDLIM2、PDLIM4 および HSP70 欠損マウスに感染させ、内因性の免疫制御異常の宿主において、これらの細菌がどのような病態を引き起こすのかを解析する。

(3)上記の細菌などを感染させた PDLIM2、PDLIM4 および HSP70 欠損マウスの組織や細胞を用いたマイクロアレイ解析により、炎症の慢性化に関与するような遺伝子群、および、自己免疫疾患の病態形成に関連する分子群を同定する。

### 4. 評価

#### (1)自己評価

(研究者)

独自に同定した炎症反応制御因子である PDLIM4 が関節リウマチの疾患感受性と関連することを示すデータが得られたことから、炎症反応シグナルの負の制御因子の異常が自己免疫疾患の病因病態形成に関与することを証明するという当初の目的の1つは達成できた。また、PDLIM2 と結合する因子群を同定するという手法により、LIM 蛋白以外の新たな炎症反応制御因子が同定できた。さらに、この中の1つである HSP70 が、分子レベル・細胞レベルだけでなく、個体レベルでも炎症反応の負の制御に重要であることを明らかにできたことにより、この手法の妥当性を証明できたと考えられる。しかしながら、当初予定していた、マイクロアレイ解析によって炎症の慢性化や自己免疫疾患の発症に関与する因子を同定する計画に関しては、候補遺伝子は得られたものの、それらの解析はまだ途上である。

(2)研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

免疫系細胞に発現し炎症反応制御に働く分子としてLIMタンパク質ファミリーの解析を行い、PDLIM2は、LIMドメインを介してユビキチン化酵素E1/E2をリクルートし、樹状細胞においてはTLRなどのシグナルにより活性化して核内に移行してきたNF- $\kappa$ B(p65)を、T細胞においてはIL-6などのシグナルにより活性化して核内に移行してきた転写因子STAT3をユビキチン化してプロテアソーム分解することで過剰なTh1/17細胞の分化を負に制御することを明らかにした。また、PDLIM2-NF- $\kappa$ B複合体のプロテアソームへの輸送には、HSP70とプロテアソームに結合するBAG1と会合する必要があることを見出し、発表している。一方、独自に同定したPDLIM4はT細胞において標的タンパクをユビキチン化することなく細胞質内においてLIMドメインを介してタンパク質脱リン酸化酵素PTPBLをリクルートし、STAT4/3を脱リン酸化することにより、Th1/2/17細胞分化を負に制御することを明らかにした。さらに、PDLIM4のLIMドメイン内のSNPが関節リウマチやバセドウ病の疾患感受性と相関することなどを明らかにした。今後のマイクロアレイ解析などにより、新規の慢性炎症の機序解明に資する分子の同定が期待できる。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. Tanaka, T., Shibasaki, A., Ono, R., Kaisho, T. HSP70 mediates degradation of the p65 subunit of nuclear factor  $\kappa$ B to inhibit inflammatory signaling. *Sci. Signal.*, in press, 2014.
2. Tanaka, T., Yamamoto, Y., Muromoto, R., Ikeda, O., Sekine, Y., Grusby, M., J., Kaisho, T., Matsuda, T. PDLIM2 inhibits T Helper 17 cell development and granulomatous inflammation through degradation of STAT3. *Sci. Signal.* 4(202), ra85, 2011

### (2)特許出願

なし。

### (2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 主要な学会発表および招待講演

1. 田中貴志「分子から病気へ／炎症反応を負に制御する分子機構の解明とGWASを用いた自己免疫疾患との関連解析」第三回 明石町リウマチ連携セミナー(東京)2014年10月22日。
2. Tanaka, T, "Negative regulation for inflammatory responses and its association with autoimmune diseases." Monash Univ. & RIKEN IMS Workshop (RIKEN, Yokohama, Japan) August 5, 2014
3. Tanaka, T, "Regulation of inflammatory responses by LIM proteins." The 5th LJI-RCAI Workshop "New Horizon in Immune Regulation towards Disease Intervention" (RIKEN, Yokohama, Japan) October 31, 2013.
4. 田中貴志「炎症反応を負に制御する分子機構の解明」大阪南医療センター／Talk with the expert セミナー(大阪)2013年10月11日。

5. Tanaka, T, “Negative regulation of inflammatory responses by LIM proteins.” The 12th Biennial International Endotoxin & Innate Immunity Society Meeting (Tokyo, Japan) October 24, 2012.
6. Tanaka, T, “Clarifying the molecular mechanisms that regulate inflammatory responses.” RIKEN – Novo Nordisk A/S Scientific Forum (RIKEN, Yokohama, Japan) April 19, 2012.
7. 田中貴志「LIM 蛋白ファミリーによる Th 細胞分化の負の制御機構」第 132 回日本薬学会（札幌）2012年 3 月 30 日。
8. Tanaka T, Hirashima T, Kaisho T. PDLIM4 negatively regulates the differentiation of multiple lineages of T-helper cells by dephosphorylation of STAT transcription factors. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, “Th17 Cells in Health and Disease” (Keystone, Colorado, USA) February 8, 2012
9. Tanaka, T, “HSP70 is essential for PDLIM2-mediated termination of NF- $\kappa$ B signaling” University of Michigan–RCMI Joint Workshop (RIKEN, Yokohama, Japan) December 1, 2011.
10. Tanaka, T, Yamamoto Y, Muromoto R, Ikeda O, Sekine Y, Grusby MJ, Kaisho T, Matsuda T. “PDLIM2 inhibits T helper 17 cell development and granulomatous inflammation through degradation of STAT3” 2011 Annual Meeting of the Japanese Society of Immunology/ Symposium #3, Effector T cells (Chiba, Japan) November 28, 2011.

#### 著作物

1. 田中貴志「核内ユビキチンリガーゼ PDLIM2 による Th17 細胞分化と肉芽腫性炎症の負の制御機構」医薬の門社、感染・炎症・免疫、42, 288-295, 2012
2. 田中貴志「核内転写因子を標的とした自然免疫の負の制御機構」医歯薬出版、医学のあゆみ、243, 51-55, 2012

#### プレスリリース

「炎症反応誘導に必須な分子の活性化を抑制する仕組みの一端を解明」（平成26年12月17日）



# 研究報告書

## 「長寿・老化モデルマウスを用いた慢性炎症機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年10月～平成27年3月

研究者: 南野 徹

### 1. 研究のねらい

加齢に伴って、糖尿病や動脈硬化、高血圧などの生活習慣病の罹患率が増加し、その結果、虚血性心疾患や脳卒中の発症の基盤病態となっている。加齢に伴って様々な組織に慢性的な炎症が惹起されることが、これらの生活習慣病の発症・進展の原因となっていることが示唆されているが、その機序は不明である。一方、慢性炎症を含めたこれらの病態は、多くの高齢者において共通に認められることから、老化の形質の一部として捉えることができる。すなわち、次世代の生活習慣病の治療法の開発に向けた究極的な研究ターゲットは、老化や寿命を調節する仕組みそのものであると考えられる。しかし、これまで加齢に伴って個々の病態がどのように変化するかという観点からの研究は行われてきたが、老化・寿命という側面からみれば包括的な研究は行われていない。

通常ヒト正常体細胞は、ある一定回数の分裂増殖後、細胞老化とよばれる分裂停止状態となる。その寿命は培養細胞のドナーの年齢に相関すること、また、早老症候群患者より得られた細胞の寿命は有意に短いことも報告されている。そこで私は、老化研究を「細胞レベルの老化が個体老化の一部の形質、特に病的な形質を担う」という仮説に基づいて始めることにした。

これまで私は、主に老化モデルマウスの解析を通じて、加齢や過食による生活習慣病の発症には、神経・液性因子による臓器間シグナルネットワークと、それらによって制御される組織の p53 依存性老化シグナル活性化に伴う慢性炎症が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。一方、我々が確立した複数の長寿モデルマウスにおいては、加齢に伴う組織の p53 依存性老化シグナルの活性化や慢性炎症亢進が抑制されていることを観察している。そこで、本研究では、長寿・老化モデルマウスを用いて、慢性炎症を惹起する過剰な p53 依存性老化シグナルの上流あるいは下流に存在する分子基盤を探索することによって、生活習慣病における慢性炎症の制御を目指す。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

近年、肥満や糖尿病の患者は劇的に増加しており、現代社会の大きな問題となっている。肥満に関連した脂肪組織の炎症は全身のインスリン抵抗性や糖尿病の発症に深く関与していることが知られている。肥満脂肪では、増大した遊離脂肪酸や酸化ストレスが炎症細胞の浸潤や TNF- $\alpha$ 、CCL2(MCP-1)といった炎症性サイトカインの産生を促進し、過剰に産生された CCL2 が脂肪組織にマクロファージを誘導することでさらに炎症性サイトカインが産生されるという悪循環を生じさせる。炎症が生じた脂肪組織から産生された炎症性サイトカインが全身に循環することで、骨格筋や肝臓といったインスリン標的臓器にも影響を及ぼし、全身のインスリン抵抗性や糖尿病が引き起こされると考えられている。

セマフォリンおよびその受容体であるプレキシンは胎生期の神経発生を制御する反発性神経軸索ガイダンス分子として見出されたが、今日では心血管系、骨格筋、腎臓、神経系といった多種多様な臓器の発生の制御に重要であることがわかっている。セマフォリンは脊椎動物においてはクラス3～クラス7まで存在し、分泌型タンパクであるクラス3セマフォリンはセマフォリン3A～3Gの7つのサブタイプが存在する。クラス3セマフォリンは神経および心血管系の器官形成に重要であるが、細胞増殖や細胞死、遊走などにも関与し、神経疾患や癌などにも関連していることが報告されている。セマフォリン 3E(Sema3E)はその特異的な受容体としてプレキシンD1が知られているが、これらは器官形成だけでなく心血管疾患や腫瘍増殖にも関連していることが知られている。以前我々は、糖尿病では Sema3E の発現が亢進しており、これが虚血組織の血管新生を阻害することを報告した。セマフォリン-プレキシン経路は免疫系の制御に関わっていることも報告されており、このシグナル経路が炎症の制御に関わっていることが示唆されるが、今回我々は肥満時に Sema3E が脂肪組織の炎症と全身のインスリン抵抗性を惹起することを明らかにした。

## (2) 詳細

### 1) セマフォリン 3E-プレキシン D1 シグナルは肥満時の内蔵脂肪組織で亢進する

肥満脂肪におけるセマフォリンとプレキシンの役割を調べるため、野生型マウスに高脂肪高シヨ糖食を与え、食餌誘導性肥満モデルを作成した。肥満マウスではマクロファージを主体とする炎症細胞浸潤が見られ、TNF- $\alpha$  や Ccl2(MCP-1)などの炎症性サイトカインの発現が著明に亢進していた。さらにインスリン抵抗性や耐糖能異常といった糖代謝異常を来していた。そこで、肥満脂肪における Sema3E やプレキシン D1 の発現を調べたところ、脂肪組織におけるこれらの発現は著明に亢進しており、さらに詳細に解析すると Sema3E は主に脂肪細胞の細胞質で、プレキシンD1は脂肪組織への浸潤細胞、特にマクロファージにおいて発現が亢進していた。その際に血中 Sema3E 濃度も上昇しており、脂肪組織から分泌される Sema3E とマクロファージに発現するプレキシンD1の相互作用が、肥満時の脂肪炎症に関与している可能性が示唆された。さらにヒト糖尿病患者について調べると、糖尿病患者では血中 Sema3E レベルが上昇しており、ヒトの代謝性疾患においてもセマフォリン 3E-プレキシン D1 シグナルが重要な働きをしている可能性が示唆された。

### 2) 脂肪炎症におけるセマフォリン 3E-プレキシン D1 シグナルの役割

肥満におけるセマフォリン 3E-プレキシン D1 シグナルの果たす役割について詳細に検証するため、Sema3E と結合し、その作用を阻害する働きをもつ可溶性プレキシン D1(プレキシン D1-Fc)を肥満モデルマウスに投与した。その結果、投与群の肥満マウスは非投与群と比較し、体重や摂餌量、酸素消費量などの代謝プロファイルは変化しなかったにも関わらず、脂肪組織の炎症は有意に改善し、インスリン抵抗性や耐糖能異常といった糖代謝異常も著明に改善した。

さらに、遺伝的 Sema3E 欠損マウス(Sema3E ホモノックアウトマウス)においても同様に、肥満時の脂肪組織の炎症や糖代謝異常は著明に改善したことから、セマフォリン 3E-プレキシン D1 シグナルは肥満時の脂肪炎症や糖代謝異常を誘導する作用があることが示唆された。

一方、Sema3E を過剰発現した際の脂肪組織への影響を調べるため、脂肪組織特異的 Sema3E 過剰発現マウスを作成した。本モデルマウスでは、通常食を与えたにも関わらず脂肪組織および血中の Sema3E レベルは著明に上昇しており、その脂肪組織ではマクロファージを主体とする炎症細胞浸潤や炎症性サイトカインの発現亢進を認めた。さらに著明な糖代謝異常も来たしたが、これは TNF- $\alpha$  に対する中和抗体の投与によって改善した。

### 3) セマフォリン 3E はマクロファージ誘導因子として働く

マクロファージなどの炎症細胞では、その細胞表面に CCL2 受容体(C-C motif chemokine receptor-2, CCR2)を発現しているため、CCL2 が分泌されるとそれに反応して炎症組織や感染組織に炎症細胞が誘導されることが知られている。そこで培養マクロファージ細胞を用いて細胞遊走アッセイを行い、マクロファージの誘導性について検証したところ、Sema3E は CCL2(MCP-1)と同等にマクロファージを誘導する作用があり、マクロファージのプレキシシン D1 を抑制するとこの作用も抑制されることがわかった(図 3A)。また、肥満モデルの野生型マウスから採取した脂肪組織を培養した上清を用いて細胞遊走アッセイを行った際には培養マクロファージ細胞が誘導されたが、肥満モデルの Sema3E ホモノックアウトマウスから採取した脂肪組織を培養した上清ではマクロファージの誘導は抑制された。

これまでの研究により、Sema3E が神経反発因子として働く際にはプレキシシン D1 / Nrp1(neuropilin 1) / VEGFR2 (vascular endothelial cell growth factor receptor 複合体と作用し、PI3K/Akt シグナル経路を活性化させることが知られている。そこで我々のモデルにおいても検証したところ、Nrp1 や VEGFR2、PI3K、Akt の抑制により、Sema3E のマクロファージ誘導作用は著明に抑制され、Sema3E は plexinD1/Nrp1/VEGFR2 依存的にマクロファージ誘導因子として働くと考えられた。

さらに骨髄細胞で発現するプレキシシン D1 の脂肪炎症における役割を検証するため、プレキシシン D1 に対する shRNA(short hairpin RNA)を導入し、プレキシシン D1 の発現を抑制した骨髄を移植したマウスで肥満モデルを作成したところ、これらのマウスでは肥満時の脂肪炎症は抑制され、糖代謝異常も抑制された。このことから、肥満時にはプレキシシン D1 を介してマクロファージが脂肪組織に誘導されると考えられた。

### 4) p53 の活性化はセマフォリン 3E-プレキシシン D1 シグナルを介して、脂肪炎症を悪化させる

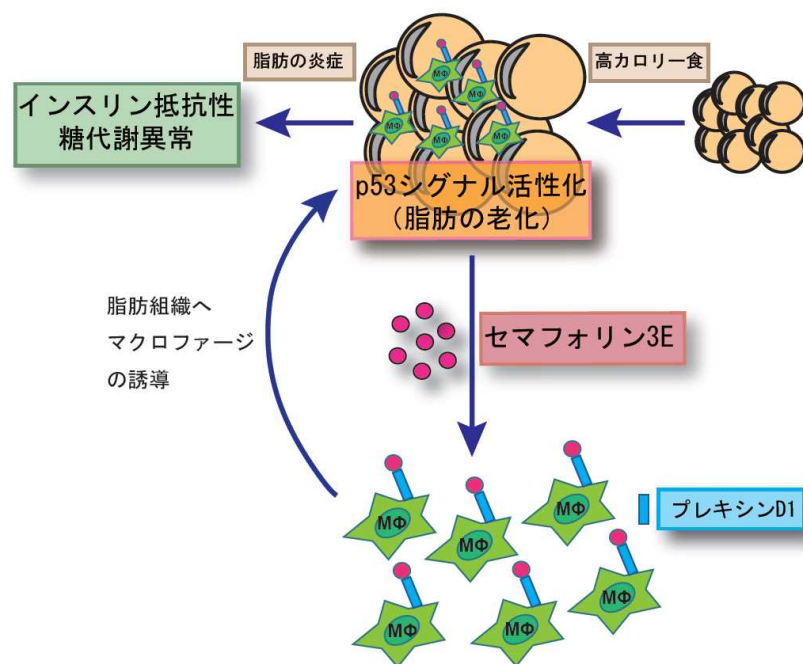
以前我々は、肥満時には酸化ストレスや DNA 損傷が蓄積し、脂肪組織で p53 が活性化すること、活性化した p53 は脂肪組織の炎症を惹起し、全身のインスリン抵抗性を引き起こすことを報告した。そこで p53 と Sema3E の関連性について調べるため、脂肪組織特異的 p53 ノックアウトマウスで肥満モデルを作成したところ、これらのマウスでは肥満時の脂肪組織や血液中の Sema3E レベルの上昇が著明に抑制されており、脂肪炎症や糖代謝異常も抑制されていた。しかし、このマウスにプレキシシン D1-Fc を投与し、セマフォリン 3E-プレキシシン D1 シグナル経路を抑制しても相加的な改善効果はなかった。このことから、セマフォリン 3E-プレキシシン D1 シグナルは p53 依存性の脂肪炎症において、p53 の下流シグナルとして重要な働きをしている可能性が示唆された。

次に、Sema3E による糖代謝制御における p53 活性化の果たす役割について検証するた

め、野生型マウスの脂肪組織に p53 活性化剤であるキナクリンを投与した。その結果、脂肪組織の Sema3E や血中 Sema3E レベルが上昇するとともに、脂肪炎症や糖代謝異常が惹起されたが、これらの変化はキナクリンを投与した脂肪組織特異的 p53 ノックアウトマウスでは起こらず、キナクリンにより誘導される脂肪炎症は p53 依存的なものであると考えられた。また、クロマチン免疫沈降法を用いて検証したところ、p53 は Sema3E のプロモーター領域に結合しており、p53 は Sema3E の発現を直接的に制御している可能性が示唆された。さらに、キナクリンで脂肪組織の p53 を活性化させたマウスに対してプレキシシン D1-Fc や TNF- $\alpha$  に対する中和抗体を投与すると、脂肪炎症や糖代謝異常が改善した。これらの結果から、Sema3E は肥満時の p53 依存性の脂肪炎症において重要な役割を果たしていると考えられた。

### 3. 今後の展開

本研究において我々は、セマフォリン 3E-プレキシシン D1 シグナルが脂肪炎症を惹起し、インスリン抵抗性や糖尿病の発症・進展に重要な役割を果たしていることを明らかにした。Sema3E がプレキシシン D1 陽性マクロファージを誘導し、脂肪組織での p53 活性化が Sema3E によるマクロファージ誘導を促進することで脂肪の炎症や糖代謝異常が惹起されることが明らかになった(図)。癌抑制遺伝子である p53 は、DNA 修復やアポトーシス、老化などに関連し、ゲノムの安定性の維持や発癌の抑制に寄与している。近年、p53 は加齢関連疾患にも関与しているということが知られてきており、加齢に伴って p53 の発現が亢進することや、p53 の持続的な活性化は早期老化を引き起こすこと、老化した心血管では p53 の発現が亢進していることなどが知られており、動脈硬化や心不全といった疾患においても重要な役割を果たしていると考えられる。また、最近では代謝異常や代謝制御との関連性を示唆する報告もされており、以前我々は肥満時に脂肪組織において p53 依存性の炎症が惹起されることを報告している。本研究ではセマフォリン 3E-プレキシシン D1 シグナルが p53 依存性の脂肪炎症において重要な役割を果たし、このシグナルの抑制が肥満時の代謝異常を改善させることを示した。p53 それ自体の抑制は発癌を誘導する可能性も考えられることから、セマフォリン 3E-プレキシシン D1 シグナルの抑制は肥満患者の糖代謝異常に対する新規治療ターゲットとなる可能性が示唆される。



#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

セマフォリンは老化に伴う炎症に重要な役割を持っていることが予想されることから、老化の進んでいる集団を抽出するマーカーとして有用である。さらに、セマフォリンシグナルを標的とした生活習慣病治療開発も有望であり、「生活習慣病における慢性炎症の制御を目指す」という本研究の目的は十分に達成できたと考えられる。またその開発について、既に産学連携の可能性があり、研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果も大きいものとなることが予想される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

食餌誘導性肥満モデルにおいて、肥満と高カロリー食負荷により老化状態となった脂肪細胞が、p53 依存的にセマフォリン 3E (Sema3E) を分泌し、それに対して Sema3E の受容体であるプレキシシン D1 を高発現する骨髄由来のマクロファージが引き寄せられて脂肪組織に浸潤し、脂肪炎症と糖代謝異常(インスリン抵抗性や耐糖能異常)を引き起こすことを極めて緻密な実験により明らかにした。さらに、糖尿病患者でも血中 Sema3E レベルの上昇を確認しており、ヒトにおいてもこの Sema3E-プレキシシン D1 経路が糖代謝異常に関与している可能性を示唆する発表を行った。その他に、高カロリー食負荷によって糖尿病を発症させたマウスの血管における p53 発現上昇により、血管細胞のグルコース輸送分子 Glut1 産生が障害されると共に、血管細胞での一酸化窒素産生の低下に伴う筋肉細胞内でのミトコンドリア合成抑制の結果として骨格筋におけるエネルギー消費量の低下をも招来することにより、余剰となったカロリーが内臓脂肪として蓄積して脂肪組織における炎症が生じ、肥満や糖尿病がさらに進行する悪循環が起こることを見出して発表している。以上のように、本領域の戦略目標に貢献する老化・生活習慣病における慢性炎症の関与について成果をあげ、国内外で評価され、研究者としての飛躍につながった。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 論文(原著論文)発表

1. Yokoyama M, Nakagomi A, Moriya J, Shimizu I, Nojima A, Yoshida Y, Ichimiya H, Kamimura N, Kobayashi Y, Ohta S, Fruttiger M, Lozano G, Minamino T. Inhibition of endothelial p53 improves metabolic abnormalities related to dietary abesity. **Cell Rep** 2014; 7: 1691-1703.
2. Shimizu I, Yoshida Y, Suda M, Minamino T. DNA damage response and metabolic disease. **Cell Metab** 2014; 20: 967-977.
3. Ito TK, Yokoyama M, Yoshida Y, Nojima A, Kassai H, Oishi K, Okada S, Kinoshita D, Kobayashi Y, Fruttiger M, Aiba A, Minamino T. A crucial role for CDC42 in senescence-associated inflammation and atherosclerosis. **PLoS One** 2014; 9: e102186.
4. Shimizu I, Yoshida Y, Moriya J, Nojima A, Uemura A, Kobayashi Y, Minamino T. Semaphorin-induced inflammation contributes to insulin resistance in dietary obesity. **Cell Metab** 2013; 18: 491-504.

5. Nojima A, Yamashita M, Yoshida Y, Shimizu I, Ichimiya H, Kamimura N, Kobayashi Y, Ohta S, Naoaki I, Minamino T. Haploinsufficiency of Akt1 prolongs the lifespan of mice. **PLoS One** 2013; 8: e69178.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

国際学会・シンポジウム招待講演

1. Minamino T. Aging and cardiovascular disease. American Heart Association International Forum, 2012 Scientific Session. 2012/11/4 Los Angeles, USA
2. Minamino T. Lifespan regulatory system as a potential therapeutic target for cardiovascular disease. International Association of Gerontology and Geriatrics 2013/6/23-27 Seoul
3. Minamino T. Role of senescence-associated inflammation in lifestyle-related disease. ISHR 2013 2013/6/29 San Diego
4. Minamino T. Circadian clock and cardiovascular aging. IEEE EMBC 2013 2013/7/3-7 Osaka
5. Minamino T. Role of cellular aging signals in cardiovascular and metabolic disease. BCVS 2013 2013/7/22-24 Las Vegas

国内学会・シンポジウム招待講演

6. Minamino T. 寿命制御と細胞老化シグナル、加齢関連疾患の発症メカニズム 第 33 回日本基礎老化学会 シンポジウム 2011/10/8-9 Biomedical Gerontology 2011; 35: 6.
7. Minamino T. 次世代血管新生治療開発の展望 第 52 回日本脈管学会 シンポジウム 2011/10/20-22 岐阜 プログラム・抄録集 pageS86.
8. Minamino T. Cardiovascular aging and circadian clock 第 76 回日本循環器学会・学術集会 シンポジウム 2012/3/16-18 福岡 プログラム集 p
9. Minamino T. Lifespan regulatory system and cardiovascular disease 第 76 回日本循環器学会・学術集会 Topics 2012/3/16-18 福岡 プログラム集 p249
10. Minamino T. Lifespan regulatory system as a potential therapeutic target for cardiovascular disease 第 76 回日本循環器学会・学術集会 Topics 2012/3/16-18 福岡 プログラム集 p249
11. Minamino T. 臓器間ネットワークによる循環代謝制御 第 85 回日本内分泌学会総会シンポジウム 2012/4/19-21 名古屋
12. Minamino T. 次世代の血管新生治療の開発 第 60 回日本輸血・細胞治療学会総会シンポジウム 2012/5/25-27 郡山 プログラム・抄録集 2012; 58: 220.
13. Minamino T. Akt1 による寿命調節機構 第 12 回日本抗加齢医学会総会シンポジウム 2012/6/22-24 横浜 プログラム・抄録集 p99
14. Minamino T. 脂肪老化制御と生活習慣病 第 12 回日本抗加齢医学会総会 研究助成記念講演 2012/6/22-24 横浜 プログラム・抄録集 p168
15. Minamino T. 老化、細胞死と循環代謝性疾患 第 21 回日本 Cell Death 学会シンポジウム 2012/7/28 名古屋 プログラム・抄録集 p41

16. Minamino T. Regulation of Cardiovascular Metabolism by the Aging Signal Network. 第 35 回日本高血圧学会シンポジウム 2012/9/20-22 名古屋
17. Minamino T. 老化シグナルネットワークによる循環代謝制御 第 33 回日本肥満学会シンポジウム 2012/10/11-12 京都
18. Minamino T. 臓器間老化シグナル制御と生活習慣病 第 16 回日本心血管内分泌代謝学会シンポジウム 2012/11/23-24 東京
19. Minamino T. 高血圧と血管老化のメカニズム 第 20 回日本血管生物医学会シンポジウム 2012/12/5-7 徳島
20. Minamino T. 老化シグナルネットワークによる循環代謝制御 第 35 回日本分子生物学会シンポジウム 2012/12/11-14 福岡
21. Minamino T. Cardiac-adipose vicious cycle is critically involved in the development of heart failure 第 77 回日本循環器学会・学術集会 シンポジウム 2013/3/15-17 横浜
22. Minamino T. Cellular aging signal network and lifestyle-related disease 第 77 回日本循環器学会・学術集会 ミートザエキスパートセッション 2013/3/15-17 横浜
23. Minamino T. 次世代の血管新生治療の開発 第 12 回日本再生医療学会総会 シンポジウム 2013/3/21-23 横浜
24. Minamino T. 臓器連関とインスリン感受性 第 86 回日本内分泌学会総会シンポジウム 2013/4/25-27 仙台
25. Minamino T. 血管老化と NO 第 13 回日本抗加齢医学会ランチョンセミナー 2013/6/28-30 横浜
26. Minamino T. 心-脂肪連関による心不全発症のメカニズム 第 17 回日本心臓リハビリテーション学会シンポジウム 2013/7/13-15 仙台
27. Minamino T. 老化シグナルネットワークによる循環代謝制御 第 86 回日本生化学会大会シンポジウム 2013/9/11-13 横浜
28. Minamino T. 血管老化シグナルネットワークによる循環代謝制御 第 21 回日本血管生物医学会シンポジウム 2013/9/26-28 大阪
29. Minamino T. 次世代の血管新生治療の開発 第 22 回日本形成外科学会基礎学術集会 2013/11/7 新潟
30. Minamino T. 老化からみた心血管治療としてのスタチンの有用性 第 17 回日本心不全学会学術集会 ランチョンセミナー 2013/11/30 大宮
31. Minamino T. 心血管系の老化のメカニズム 第 24 回日本老年医学会九州地方会 2014/3/8 北九州
32. Minamino T. 健康寿命は延伸可能か? 第 14 回日本抗加齢医学会シンポジウム 2014/6/6-8 大阪
33. Minamino T. 細胞老化シグナルによる炎症制御と疾患 第 18 回日本適応学会シンポジウム 2014/6/21-22 東京
34. Minamino T. 老化再生からみた循環器疾患治療 第 32 回日本臨床化学会甲信越支部総会シンポジウム 2014/6/29 上越
35. Minamino T. 細胞老化シグナルによる炎症制御と疾患 第 35 回日本炎症・再生医学会シンポジウム 2014/7/1-4 沖縄

36. Minamino T. 老化の観点から生活習慣病を考える 第 135 回日本内科学会信越地方会特別講演 2014/10/4 松本
37. Minamino T. A critical role of senescence-induced inflammation in cardiovascular disease. 第 18 回日本心不全学会 日本-台湾セッション 2014/10/11 大阪

#### プレスリリース

1. 「糖尿病の発症に関わる新たな分子を発見 -脂肪の老化と炎症を結ぶ鍵分子の同定-」、JST・新潟大学、2013 年 10 月 2 日  
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20131002/index.html>
2. 「血管の老化は、筋肉のエネルギー消費を妨げることを発見 ~肥満や糖尿病を悪化させている可能性~」、JST・新潟大学、2014 年 5 月 23 日  
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20140523/index.html>



# 研究報告書

## 「MAPK 経路の分子イメージングによる T 細胞活性化遷延機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 横須賀 忠

### 1. 研究のねらい

ケミカルメディエーターを主体として惹起される急性炎症に対し、自己免疫疾患やアレルギー、担癌状態など慢性炎症の病態形成にはリンパ球系細胞による獲得免疫系の寄与が大きい。特に炎症局所に浸潤している活性化した T 細胞は、その責任細胞の 1 つと考えられている。また、シグナル伝達研究の見地からは、MAPK 経路、特に胸腺での自己・非自己の認識過程や末梢 T 細胞の生存維持・サイトカイン産生を誘導する Erk の持続的リン酸化は、決定的な T 細胞活性化の指標である。ゆえに、T 細胞の持続的活性化に起因する慢性炎症を制御するためには、不適切な Erk の活性化を回避することが不可欠であり、Erk 活性化に至る詳細なメカニズムの解明が重要であると考えた。一方、T 細胞イメージング研究では、T 細胞と抗原提示細胞との接着面に形成される「免疫シナプス」を“場”として、T 細胞シグナルが惹起されることがわかっている。これまで我々は、抗原提示人工脂質二重膜法を用いた詳細な分子イメージング解析によって、免疫シナプスが T 細胞受容体 (T cell receptor : TCR) 数十個を核とした小さなシグナル伝達分子の集合体「TCR マイクロクラスター」で構成されること、また、TCR マイクロクラスター以外にも NF- $\kappa$ B 活性中心などさまざまなシグナルソームが存在し、時間的空間的に T 細胞の活性化を制御していることを明らかにしてきた。また、各々の分子が正常に機能するには、特にその分子の細胞内局在が重要であり、人為的に分子の場所を操作することで T 細胞の活性化を変えられることも示すことができた。そこで、Erk の活性化制御に関連するシグナルソームとして、① T 細胞シグナル伝達分子の脱リン酸化を担う、T 細胞補助刺激受容体 Programmed-cell death-1 (PD-1) の抑制性クラスターと、② 古典的 MAPK 経路の活性化を制御する Ras 活性化因子 guanyl nucleotide exchange factor (GEF) である Son of sevenless (Sos) と Ras guanyl nucleotide-releasing protein (RasGRP1) からなる新規クラスターに焦点をあて、積極的に抑制性シグナルクラスターを増強、あるいは Sos や RasGRP1 の活性化シグナルクラスターを解離させ、Erk のリン酸化を抑えることができないか、慢性炎症の制御に繋がる T 細胞シグナルソームの分子基盤の解明を本研究のねらいとした。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

研究のねらいで言及したように、おおまかな 2 つの流れにて研究を遂行した。

活性化 T 細胞における負の補助刺激受容体 PD-1 のクラスター形成の詳細と、TCR マイクロクラスターとの関連、T 細胞抑制メカニズム、PD-1 クラスターによって誘導される MAPK 経路の抑制効果、治療でも使用される抗 PD-1/PD-L1 抗体の T 細胞抑制の分子メカニズムを、分子イメージングの見地から解析・解明した。PD-1 とリガンド PD-L1/PD-L2 との結合を機に

PD-1 のクラスター形成が起こること、PD-1 と TCR が同一のクラスターを形成すること、PD-1 の細胞内チロシンモチーフのリン酸化に誘導されエフェクター分子である脱リン酸化酵素 Src homologous 2-domain containing protein tyrosine phosphatase-2 (SHP2)がリクルートすることを明らかにした。PD-1-SHP2 会合のキネティクスを測定し、TCR マイクロクラスターに集まる TCR 下流近傍のシグナル伝達分子と比較、PD-1 に会合する SHP2 の基質となりうる候補分子のリン酸化状態を調べ、CD3 $\zeta$ 鎖から MAPK 経路に至る PD-1 の TCR シグナル抑制効果を評価した。また、疲弊 T 細胞に抗 PD-1/PD-L1 抗体を添加することで、実際に臨床の現場で使用される中和抗体の分子作用機序を明らかにした。

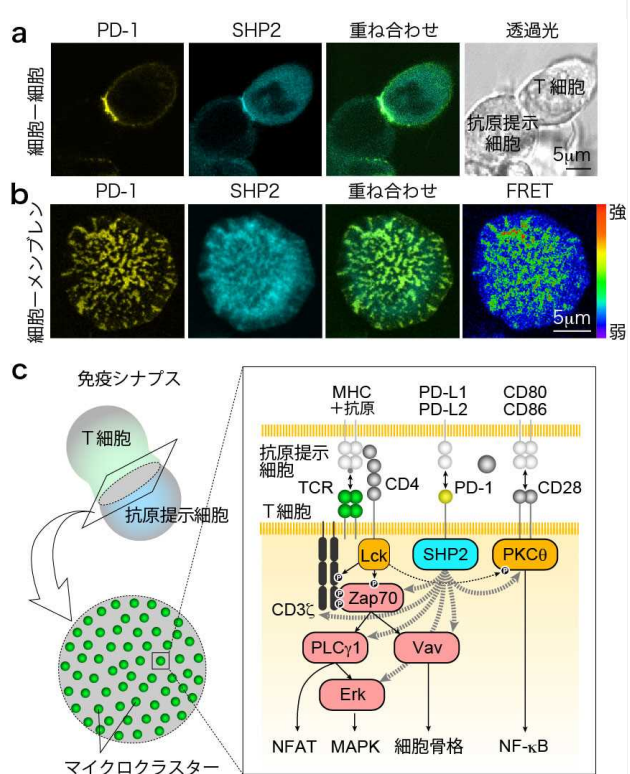
Ras から Erk に至る古典的 MAPK 経路のシグナル伝達分子の網羅的イメージング解析を行い、クラスター形成を伴いコントロールが可能な標的分子の選定を行った。その結果候補となった2つの Ras の GEF、Sos と RasGRP1 に関し、イメージングデータと生理学的実験データとを比較することで、慢性炎症の制御を目的とし、特異的に T 細胞の持続的活性化を抑制するには RasGRP1 が構成する新規クラスターに焦点を絞るべきとの方向性を得た。生化学的、イメージングおよびマスマスペクトロメトリー解析により、RasGRP1 クラスターを支持する2つの細胞骨格分子を同定し、この分子を介し RasGRP1 分子の細胞内局在を制御可能な方法を検討した。実際に RasGRP1 のクラスター形成を人為的に阻害し、MAPK 経路の抑制および T 細胞の生理的活性化を抑える分子メカニズムを明らかにした。

## (2) 詳細

研究テーマA「負の T 細胞補助刺激受容体 PD-1 の抑制性クラスターの形成と T 細胞制御機構の解明」

T 細胞の活性化を負に制御する副刺激受容体 PD-1 は、その遺伝子欠損マウスが拡張性心筋症や各種炎症症状を呈することから、免疫応答を制御する重要な抑制因子と考えられている。表現型の重要性が示されたことより、臨床応用への研究が先行され、PD-1 に関する基礎研究分野では未解決な部分が多く残されていた。McConnell の人工平面脂質二重膜の実験系に PD-1 のリガンドを新たに導入し、PD-1 分子の挙動をリアルタイムで観察した。PD-1 はリガンドである PD-1 ligand-1 (PD-L1)があるときに、クラスターを形成し、TCR マイクロクラスターと共局在し、免疫シナプスの成熟に伴いシナプス中央部に集まった。また、PD-1 のクラスター形成と同時に、PD-1 下流のエフェクター分子と考えられていたフォスファターゼのうち、SHP2が PD-1 クラスターにリクルートすることを、生化学的およびイメージング解析によって明らかにした。さらに、PD-1 が SHP2 と TCR と共にクラスターを形成することで、CD3 $\zeta$ 鎖から始まる TCR マイクロクラスターに会合する分子の脱リン酸化反応を行い、結果的に MAPK 経路の中心分子 Erk の脱リン酸化に至ることがわかった。分子イメージングの見地から、さらに PD-1 と TCR との共局在が PD-1 の T 細胞抑制機能に不可欠であるか、2つの方法を用いて証明した。1つは、PD-1 のリガンド結合領域を残したまま PD-1 のイムノグロブリン定常領域を伸長し、背の高い PD-1 キメラを用いた実験である。Anton van der Merwe の Kinetic segregation モデル (Nature, 2005) を応用した。本実験方法にて、PD-1 の脱リン酸化反応と T 細胞抑制機能は、PD-1 の単純なクラスタリングだけでなく、TCR マイクロクラスターと共局在することで、機能することがわかった。2つめは、抗 PD-1/PD-L1 抗体を用いる実験モデルで

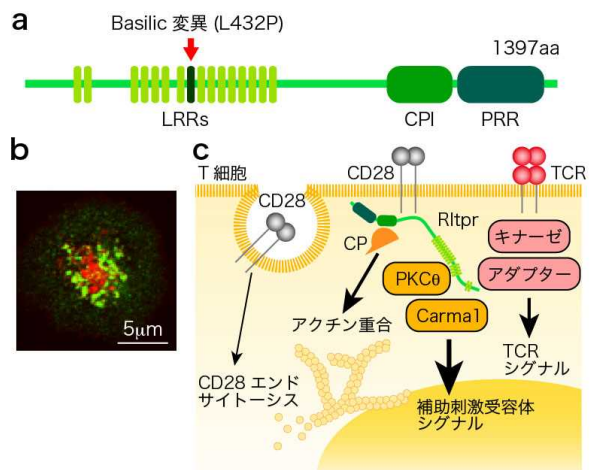
ある。この抗体を用いた免疫療法は、担癌状態の疲弊 T 細胞に対する賦活化療法として期待以上の効果を上げ、現在非常に注目されている。抗 PD-1/PD-L1 抗体による PD-1 機能の抑制も、PD-1 クラスターを解離させることによって起こる、という結論を得た。これらの結果は、T 細胞抑制性クラスター PD-1 の位置やクラスターの形成を変えることで、T 細胞機能の制御を行えることを示唆しており、慢性炎症の病態形成に関わる活性化 T 細胞の制御に応用できると期待される。さらに、一連の研究から、PD-1 のクラスター形成により、T 細胞シグナルが減弱するだけでなく、TCR からの活性化シグナルがオフになることで、免疫シナプスがブレイクすることが分かり、PD-1 には体内での T 細胞動態を制御するという機能を持っていることもわかった。



a T 細胞と抗原提示細胞との間に集まる PD-1 と SHP2  
b 免疫シナプス面で形成される PD-1 と SHP2 のマイクロクラスター  
c PD-1-SHP2 が脱リン酸化する TCR-CD28 下流のシグナル伝達経路

### 研究テーマB「CD28-NF-κB 経路活性化シグナルソームを構成する新規分子の解明」

アルキル化剤 ENU 誘導突然変異マウスとして樹立された、TCR 下流の膜型アダプター分子 linker for activation of T cells (LAT) 変異マウスは、胸腺での自己反応性 T 細胞の排除が不十分なため、末梢において慢性炎症が惹起される。この炎症病態をキャンセルできるような分子機構を明らかにするため、LAT 変異マウスにさらに ENU 誘導突然変異を起こさせ、慢性炎症のないもう1つのライン Basilic マウスを樹立・単離した。Basilic マウスの末梢 T 細胞は、TCR 刺激に対する細胞増殖応答やサイトカイン産生が低く、これまで明らかにされている遺伝子欠損マウスのうち、CD28 欠損マウスと同等の表現型を示すことが分かった。ハプロタイプマッピングと次世代シーケンサーによる解析により、変異のある責任分子が、マウス 8 番染色体上のリンパ球特異的アクチン脱キャッピング分子 RGD (Arg-Gly-Asp)-, leucine-rich repeat (LRR)-, tropomodulin- and prolin-rich region-containing (Rltpr)であることが判明した。Basilic 変異 Rltpr は、キャッピング



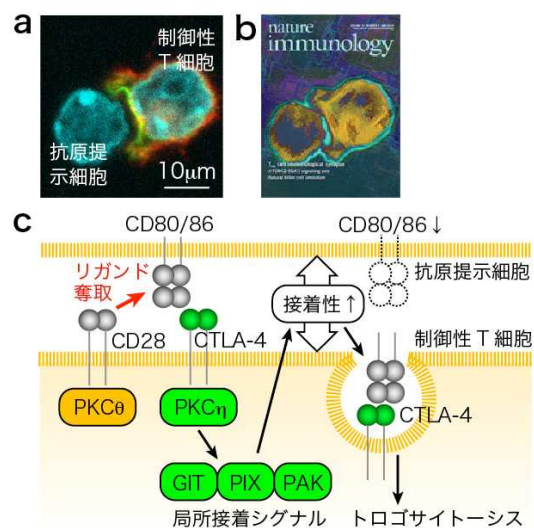
a リンパ球特異的アクチンキャッピングタンパク Rltpr の構造と変異  
b 免疫シナプスに集まる TCR (赤) と Rltpr (緑)  
c Rltpr の NF-κB シグナルソーム形成と CD28 インターナリゼーション

蛋白に結合しアクチン重合の伸長を促す機能は保持しており、そのための T 細胞活性の低下ではなかった。免疫シナプスには、NF- $\kappa$ B 経路の活性中心として正の補助刺激受容体 CD28 と NF- $\kappa$ B 経路の最上流分子 Protein kinase C  $\theta$  (PKC $\theta$ ) と CARD-containing MAGUK protein 1 (CARMA1) の 3 者のクラスターが形成される。McConnell の人工平面脂質二重膜の実験により、この Basiliac 変異 T 細胞では、Rltpr の CD28 へのリクルートは起こるものの、PKC $\theta$  と CARMA1 のクラスター形成は崩壊しており、Rltpr は機能的 NF- $\kappa$ B 活性中心の形成と NF- $\kappa$ B シグナルとに必須の分子であることがわかった。また、Basiliac 変異 T 細胞では、抗 CD28 抗体による CD28 のインターナリゼーションが亢進していたことから、Rltpr はインターナリゼーションに關与するアクチン重合の制御と NF- $\kappa$ B のシグナル伝達を同時に担う、新たなカテゴリーの多機能分子であることがわかった。また、Basiliac 変異が LAT 変異マウスの炎症病態を回避できたことから、慢性炎症に關わる持続的活性化 T 細胞の NF- $\kappa$ B シグナルの抑制への応用も期待される。

### 研究テーマC「新規プロテインキナーゼを介する制御性 T 細胞の免疫抑制機構の解明」

研究テーマBのイメージング研究を含め、我々は、T 細胞の正の補助刺激受容体 CD28 を核とし、PKC $\theta$  と CAMRA1 を構成分子とする NF- $\kappa$ B 経路のシグナル活性中心の存在を明らかにしてきた。T 細胞の負の補助刺激受容体 Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) は、CD28 と同様に免疫シナプスに集まる分子であり、CD28 からリガンドを奪い取ることで T 細胞の活性化を抑制していると考えられているが、下流にエフェクター分子が存在するかは未知である。また、免疫抑制を司る T 細胞サブセット; 制御性 T 細胞に恒常的に発現している CTLA-4 の作用メカニズムも諸説紛々としている。CD28 と CTLA-4 は同じ免疫グロブリンスーパーファミリー分子に含まれるため、その相同性を基に、CD28 下流分子の PKC $\theta$  のアイソザイムとの会合を生化学的に調べたところ、PKC $\eta$  と CTLA-4 との特異的会合を明らかにすることができた。制御性 T 細胞のイメージング解析から、これら 2 つの分子が制御性 T 細胞と抗原提示細胞との間の免疫シナプス面に集まることもわかった。PKC $\eta$  欠損マウスでは、胸腺での制御性 T 細胞の分化誘導は正常であったが、PKC $\eta$  欠損制御性 T 細胞は、レスポ

ンダーCD4 陽性 T 細胞に対する細胞増殖抑制機能が消失しており、また、マウス腫瘍移植実験では、PKC $\eta$  欠損制御性 T 細胞群で、腫瘍の縮小効果、つまり免疫抑制効果の解除が認められた。生化学的解析からは、制御性 T 細胞を抗 CD3 抗体と抗 CTLA-4 抗体で刺激することで、CTLA-4 と局所接着分子群 PAK、PAK-interacting exchange factor (PIX)、G protein-coupled receptor kinase-interacting protein 2 (GIT2) の会合が示され、その結果、制御性 T 細胞の接着性が上昇することが分かった。また、正常マウスの制御性 T

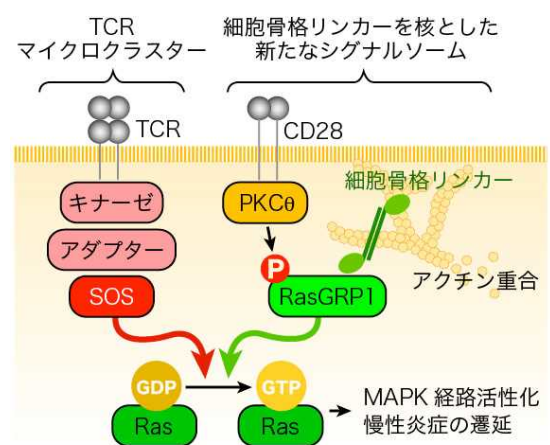


a 制御性 T 細胞と抗原提示細胞の接着面に集まる PKC $\theta$   
b 表紙に採用された図 a (Nat Immunol, 2014, vol.15)  
c CTLA-4-PKC $\eta$ -局所接着シグナルを介する細胞接着の増強とトロゴサイトーシスによる抗原提示細胞上の CD80/86 の低下

細胞は、抗原提示細胞上の CD86 分子を奪い取る(トロゴサイトーシス)能力が高く、その結果抗原提示細胞の機能を抑制することができるが、PKC $\eta$ 欠損制御性 T 細胞は、抗原提示細胞との接着性が弱く、トロゴサイトーシス能も低かった。CTLA-4-PKC $\eta$ -GIT-PIX-PAK 軸を強化することで、制御性 T 細胞の機能を増強し、慢性炎症終息へ応用も期待される。

研究テーマD「2つのシグナルソームによる MAPK 経路活性化の分子基盤の解明と慢性炎症終息への応用」

自己免疫疾患発症を抑える自己・非自己の認識や、炎症の慢性化に関わる T 細胞の持続的活性化には、古典的 MAPK 経路分子 Erk の持続的リン酸化(活性化)が大きく寄与している。従って、Erk の持続的リン酸化を直接制御し、慢性炎症を抑える新規方法を創出するため、Erk の活性化機構を分子イメージングの見地から解析した。Ras 以降のキナーゼのクラスター形成は観察されなかったが、Ras を活性化する 2 つの guanine nucleotide exchange factors (GEFs); Sos と RasGRP1 は、それぞれ個別のシグナルソームを形成することが分かった。Sos は、TCR 下流のアダプター分子と同様に、TCR マイクロクラスターに一過性にリクルートした。RasGRP1 は、網状の構造として免疫シナプス面に現れ、数分のうちに、NF- $\kappa$ B 活性中心と同じ様な輪状の構造となった。RasGRP1 はこれまで、TCR 下流のリパーゼの活性化により生成される膜成分 diacylglycerol (DAG)により細胞膜にリクルートし、特定の構造はとらないと考えられていた。RasGRP1 は、リンパ球特異的に発現し、Ras の活性化を担う GEF であるため、T 細胞活性化の遷延および慢性炎症の終息を目的とするには、RasGRP1 に標的を絞ることが最適と考えた。RasGRP1 の各種ドメイン解析により、RasGRP1 の細胞内局在の制御には、DAG 結合ドメインと C 末端の陽電子荷電領域の 2 つが寄与しており、輪状構造は後者に規定されていることがわかった。そこで、この C 末端陽電子荷電領域をベイトに、会合してくる分子を高感度マスペクトロメーターにて解析したところ、1 つの細胞骨格リンカー分子が同定できた。この細胞骨格リンカー欠損細胞を用いて、これまでと同様のイメージング解析を行った結果、TCR マイクロクラスターや免疫シナプスの形成は野生型と同等であったにもかかわらず、RasGRP1 の輪状構造が退縮していること、また、Erk の持続的リン酸化と T 細胞の抗原反応性が半減していることがわかった。これらの結果から、T 細胞の古典的 MAPK 経路 Erk の活性化は、TCR マイクロクラスターを直接介する Sos のクラスターと、細胞骨格を軸とする RasGRP1 のクラスターの 2 つのシグナルソームによって別個に制御されていることが明らかとなった。さらに、RasGRP1 の既存の細胞膜移行阻害領域を過剰発現させることで、RasGRP1 の活性化を抑制することができたことから、RasGRP1 のクラスターを制御することで、T 細胞活性化の遷延および慢性炎症の終息へ応用できると期待している。



T 細胞 MAPK 経路の活性化を制御する 2 つの Ras 活性化クラスターと細胞骨格

### 3. 今後の展開

本年7月から抗PD-1抗体療法が日本で承認されるなど、免疫チェックポイント制御生物製剤の高い癌治療効果に注目が集まっているが、その分子メカニズムの解明は後れをとってきた。本さきがけ研究において明らかにすることができた、負の補助刺激受容体PD-1のクラスター形成によるT細胞抑制機構の解明は、抗PD-1抗体をヒトに投与する際においても、安全性を示す理解の1つとなったと考えている。しかし、この抗体療法はPD-1クラスター形成を阻害し免疫賦活効果を引き出すことに応用されており、慢性炎症の解決には、今後、アゴニスト抗体や抗PD-1、抗TCR/CD3キメラ抗体を作製するなど、PD-1の抑制効果を誘導できる方法や薬剤を開発する必要がある。抗CD28抗体とは異なり、分子の特性から、抗PD-1アゴニスト抗体は作製が困難と予想され、その上で、本研究にて明らかにできたPD-1のクラスター形成という現象と実験方法は、それら治療を目的とした薬剤や抗体の樹立の際のスクリーニング法として非常に有用と考える。一方、昨今の免疫チェックポイント分子の研究の進展に伴い、PD-1の他、次世代のチェックポイント分子のいくつかが候補にあがってきた。実際に我々の実験系において、クラスターとなるチェックポイント分子も明らかになってきている。また、次世代チェックポイント分子は全て受容体であり、抗体などの生物学的治療薬を開発する上では、細胞内分子に比較して開発の難易度は低いと考える。しかし、PD-1と同様に、それらチェックポイント分子のT細胞抑制機構は多々不明な点が多く、より詳細な分子基盤の研究が必要である。エフェクターT細胞や制御性T細胞を含め、T細胞活性化を制御するシグナルネットワークを明らかにし、より包括的な抗炎症効果を生む分子基盤の創出を考えている。

T細胞MAPK経路の活性化を担う2つのGEFの分子イメージングの結果、T細胞特異的に機能するRasGRP1の新規クラスターを明らかにした。この新規クラスターはこれまでT細胞シグナルとの関連性は示されたことのない細胞骨格リンカーを核としたシグナルソームである。RasGRP1と細胞骨格リンカーとの生化学的会合は示すことができたが、その詳細なドメイン間の結合は、まだ研究が及んでいない。我々のこれまでの研究では、CD28下流のシグナル伝達分子PKC $\theta$ とSrcキナーゼLckとの会合に必須なアミノ酸配列を同定することができた。RasGRP1と細胞骨格リンカーとの最小結合ドメインを同定し、ペプチド治療への応用を検討したい。また、本研究にて、RasGRP1の活性化中心の形成には、上記細胞骨格リンカーの他、細胞接着分子LFA-1からのDAG合成シグナル、また、実際のRasGRP1の活性化(RasGRP1のリン酸化)にはCD28-NF- $\kappa$ B活性中心の形成が必須であることがわかってきた。これらの実験結果より、細胞内ペプチド投与よりも簡便性の高い、抗LFA-1抗体や抗CD28アンタゴニスト抗体、およびそれらのリガンドに対する抗体(抗ICMA-1抗体や抗CD80/86抗体)を用いた、MAPK経路分子の抑制の可能性を検討し、慢性炎症の終息へ向けた治療法の開発へと進めたい。シグナル伝達研究やイメージングの観点からは、これまでシグナルとは関係の少なかった細胞骨格リンカーがT細胞活性化シグナルの核としても機能している、という新しい概念を提唱したことになる。免疫シナプスは、受容体とシグナル伝達分子の活躍の場、という印象が強かったが、近年、ミトコンドリアからのエネルギー供給や、微小管や中心体の構造変化を伴う細胞内物質輸送を含んだ、細胞全体としてのシグナルや代謝、極性を生むダイナミックな変化と捕らえられ、益々ニューロンのシナプスとの相同性が高くなってきている。細胞骨格リンカーは、アクチンや微小管の安定性のみならず、核のメカトランスダクションやそれに基づく核酸の輸送、microRNAや蛋白合成のためのmRNAの放出方向まで規定していると報告されている。細胞骨格リンカーに関連するシグナ

ル伝達分子は RasGRP1 以外にも数多く予想されるため、細胞骨格を介したシグナル伝達のダイナミズムを追跡し、細胞生物学の普遍的概念を生み出したい。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

本研究課題の主要項目である研究テーマDは、本さがけ研究採択後から開始したプロジェクトであり、方向性の定まらないまま模索した期間が長く、領域総括、アドバイザー、他の研究者、特に臨床系の先生方々には多大なストレスをおかけしたことを反省する。しかし、領域会議毎に適確なアドバイスを戴けたこと、また、それを実行し、研究課題に沿った「MAPK を制御する新たなシグナルソームの発見」と「慢性炎症の病態形成に関わる MAPK の制御メカニズムの基盤創出」に関しては、3 年間で研究成果の骨格がまとまり、それら研究目的は概ね達成できたと判断する。本研究にて明らかとなったメカニズムの臨床への応用には時間を要するが、今後の研究目標として遂行し、早期実現を目指したい。本さがけ領域での研究経験や領域会議は、上述のような科学的な有益性だけでなく、異分野の研究者の方々に自分の研究をどのように理解して貰うか、共同研究を進める時に自分に課せられる課題は何か、プレゼンテーションの前提から教育指導を受け改善する機会を与えられた。今後の研究遂行の上での必要な知識や技量を教授戴けたことは財産であり、大変感謝している。実際に共同研究の計画もあり、研究期間終了後も、慢性炎症の解決に向けた研究を率先して進めたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

抗原提示細胞によりT細胞が活性化される際のシグナル分子の動態を独自の分子イメージング技術を駆使して解析し、(1) 活性化T細胞においてPD-1のリガンドが存在する時にPD-1はTCRと同一のクラスターを形成し、PD-1の細胞内チロシンモチーフのリン酸化に誘導されたSHP2がリクルートされMAPK経路の中心分子Erkを脱リン酸化してT細胞機能を抑制すること、(2) リンパ球特異的なアクチン脱キャッピングタンパク質Ritpr が、CD28とPKC $\theta$  および足場タンパク質Carma1と共に複合体を形成しNF- $\kappa$ B経路を介してT細胞を活性化させる機能とCD28のインターナリゼーションに関与するアクチン重合を促進させる機能とを同時に担っていること、(3) 制御性T細胞に発現するCTLA-4がPKC- $\eta$  と特異的に会合し免疫シナプス面に集まって細胞間の局所接着を亢進させ、抗原提示細胞上のCD86分子をトロゴサイトーシスすることにより抗原提示細胞機能を抑制することを見出し発表した。今後、さらにMAPK経路活性化に重要なRasの活性化の一部を担うリンパ球特異的なRasGRP1の時空間的な細胞内局在の解析などを通じて、T細胞活性化制御の分子ターゲットを見出し慢性炎症の抑制へ応用することが期待できる。なお、最近承認された抗PD-1抗体による抗がん療法の高い臨床効果の作用メカニズムを説明する上で重要なPD-1シグナルを明確に示したため、その発表を行った論文は多数引用され、学会の招待講演や著書の依頼が増加しており、研究者としての飛躍につながったことも付記したい。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 論文(原著論文)発表

- |  |
|--|
| 1. Yokosuka T, Takamatsu M, Kobayashi-Imanishi W, Hashimoto-Tane A, Azuma M, Saito T. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. <i>J Exp Med.</i> 2012, 4, 1201-1217.   |
| 2. Liang Y*, Cucchetti M*, Roncagalli R*, Yokosuka T*, Malzac A, Bertosio E, Imbert J, Nijman IJ, Suchanek M, Saito T, Wülfing C, Malissen B, Malissen M. (*equally contributed authors) The lymphoid lineage-specific actin-uncapping protein Rltpr is essential for costimulation via CD28 and the development of regulatory T cells. <i>Nat Immunol.</i> 2013, 14, 858-866. |
| 3. Kong KF, Fu G, Zhang Y, Yokosuka T, Casas J, Canonigo-Balancio AJ, Becart S, Kim G, Yates JR 3rd, Kronenberg M, Saito T, Gascoigne NR, Altman A. Protein kinase C- $\eta$ controls CTLA-4-mediated regulatory T cell function. <i>Nat Immunol.</i> 2014, 15, 465-472.   |
| 4. Hara H, Yokosuka T, Hirakawa H, Ishihara C, Yasukawa S, Yamazaki M, Koseki H, Yoshida H, Saito T. Clustering of CARMA1 through SH3-GUK domain interactions is required for its activation of NF- $\kappa$ B signaling. <i>Nat Commun.</i> in press  |

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

1. 横須賀忠 「TCR マイクロクラスターによる T 細胞活性化の時空間的制御機構」 2013 年 3 月 理研シンポジウム「細胞システムの動態と理論 V」
2. Yokosuka T. “Distinct signalosome formation by two Ras-GEFs to activate the Ras-MAPK pathway in T cell signaling.” 2013 年 12 月 第 42 回日本免疫学会総会
3. Yokosuka T. “Distinct signalosome formation by two Ras-GEFs to activate the Ras-MAPK pathway in T cell signaling.” 2014 年 6 月 第 24 回京都 T 細胞カンファレンス
4. Yokosuka T. “Molecular imaging unveils the dynamic regulation of T cell activation.” 2014 年 7 月 第 18 回日本がん免疫学会総会 会長招待シンポジウム

受賞

5. 千葉医学会賞(基礎医学部門)「T 細胞の抗原認識と免疫応答を司る活性化シグナルユニットの研究」2012 年 6 月

著作物

6. 横須賀忠、齊藤隆、Malissen B 「リンパ球特異的アクチンアンキャッピング蛋白 Rltpr は、補助刺激受容体 CD28 を介する T 細胞活性化と制御性 T 細胞分化に必須である」 2013 年 7 月 ライフサイエンス新着論文レビュー文部科学省委託研究開発事業総合データベースプロジェクト p7390
7. 横須賀忠 「T細胞におけるPD-1 の生理機能と分子基盤」 科学評論社 腫瘍内科 2014 年 第 14 巻 5 号
8. 横須賀忠 「T 細胞活性化におけるチェックポイント」 先端医学社 炎症と免疫 2015 年 第 23 巻 1 月号

プレスリリース



9. 理化学研究所 JST 共同プレスリリース「免疫応答を抑える新たな分子メカニズムを解明」(2012年5月) [http://www.riken.jp/pr/press/2012/20120528\\_2/](http://www.riken.jp/pr/press/2012/20120528_2/)

新聞等掲載

10. 化学工業日報「酵素呼び込み応答遮断」(2012年5月29日)

11. 日経バイオテク ON LINE Vol.2098 WM の憂鬱「Premium 抗 PD-1 抗体の次の挑戦はこれだ」(2014年7月31日、宮田満著)

<https://bio.nikkeibp.co.jp/article/news/20140731/177964/?ST=wm>