

吉村 昭彦
慶應義塾大学医学部・教授

細胞内シグナル制御による免疫リプログラミング

§1. 研究実施の概要

サイトカインとそのシグナル系を中心に免疫系の正と負の応答を明らかにし、免疫応答のプログラムを正から負へと転換することが本研究提案の骨子である。吉村グループではまずサイトカインシグナルの制御因子である SOCS について抑制性 T 細胞 Treg における機能を明らかにした。SOCS1 欠損 Treg は Rag 欠損マウスや試験管内培養によって Foxp3 を失いやすく、かつ IFN γ や IL-17 を自発的に産生し抑制活性が低下していた。よって SOCS1 が nTreg において Foxp3 の安定性およびサイトカイン産生抑制に寄与することが明らかとなった。今後 STAT の関与を含めてその分子機構を解明し、SOCS1 が Treg 機能にどのように機能するかを明らかにする。また逆に SOCS1 を過剰発現させたり、JAK 阻害剤を適量使用することによって Treg の安定性を高め、過剰な免疫応答や移植の拒絶を抑制できないか検討する。

次に新たな Foxp3 発現維持機構を発見するために、nTreg で発現の高い転写因子の cDNA を選択し、Foxp3 プロモーター／ルシフェラーゼによる機能的なスクリーニングを行った。その結果 NR4a2 が Foxp3 プロモーターを直接活性化することを見いだした。今後個体レベルでの NR4a2 の機能解明を行う。さらに本年度特筆すべき成果としては IL-10 や TGF β によらない第三の抑制システムの発見が挙げられる。我々は獲得免疫系(特に Treg)を欠損する Rag 欠損マウスでも自然免疫系の過剰応答が起こらないことに着目し、第二の抑制系の存在を想定した。腸上皮細胞培養液や腸抽出液において樹状細胞やマクロファージの TLR リガンドによる活性化を抑制する因子が存在することを確認した。精製や解析の結果、この因子はプロスタグランジン E2 (PGE2) であることを確認した。Rag 欠損マウスにインドメタシンを投与し PGE2 の産生を抑制したところ極めて重篤な腸炎を発症した。この腸炎は Treg の移入や腸内細菌の除去、あるいは PGE2 受容体 EP4 のアゴニストの投与によって軽快した。よって PGE2-EP4 経路は個体においても IL-10 と独立して機能する抑制系であることが確認された。

永井グループでは、PI3K 経路に注目し、Th17 細胞の分化における PI3K およびその下流に存在する分子である Akt や mTOR の関与について検討を加えた。その結果、Th17 分化が PI3K-Akt-mTOR 経路の支配下にあることを見いだした。さらにその分子メカニズムを検討し、PI3K-Akt-mTOR 経路が転写因子 ROR γ のリン酸化と核内移行を制御していることを明らかにした。mTORC1 の阻害剤である rapamycin が、試験管内のみならず、*in vivo* においても、Th17 分化が抑制されることを EAE モデルならびに腸炎モデルで示した。低酸素条件から再酸素化することで、Th17 分化が促進される現象をさらに解析し、酸素分圧変化による Th17 細胞分化制御機構をさらに検討した。その結果、低酸素条件から再酸素化した際の Th17 分化促進に ROR γ はかかわるが、ROR α はかかわらないこと、HIF-1 α 経路と PI3K-Akt-mTOR 経路が機能することを明らかにした。樹状細胞における PI3K 経路の研究から、下流の mTOR 阻害が IL-12 発現を促進し、GSK3 β 阻害が IL-12 発現を抑制することから、阻害剤を用いた *in vivo* の検討を加え、たしかに *in vivo* においても Th1 反応の制御が可能であることを示した。一連の研究の過程で、TLR を介した樹状細胞の成熟刺激によって、Fas を介した樹状細胞の細胞死が強く増強される現象が見いだされた。

§ 2. 研究実施体制

(1)「慶應義塾大学」グループ

吉村サブグループ

① 研究分担グループ長: 吉村昭彦 (慶應義塾大学医学部、教授) (研究代表者)

② 研究項目

- ・SOCS の抑制性 T 細胞における機能の解析
- ・新規 Foxp3 誘導因子の解析
- ・樹状細胞抑制因子としての PGE2 の解析
- ・T 細胞リプログラミング法の開発
- ・虚血疾患におけるサイトカインおよびサイトカイン産生細胞の新機能の発見

永井サブグループ

① 研究分担グループ長: 永井 (慶應義塾大学医学部、助教)

② 研究項目

- ・樹状細胞のリプログラミング
- ・PI3 キナーゼの T 細胞分化への意義の解明

§ 3. 研究実施内容

吉村サブグループ

(1) SOCS1 による抑制性 T 細胞の制御

現在抗炎症機能をもつ細胞としては抑制性 T 細胞 (Treg) が中心的であると考えられている。TGF β や IL-10 の供給源としても Treg は重要である。しかし Treg の発生、維持に関する制御機構はほとんど知られていない。これまで SOCS1 の Treg における機能について集中的に解析を行って来た。SOCS1 の nTreg における役割を解明するために、*in vitro*、*in vivo* でその抑制能を検討した。まず Foxp3Cre マウスと交配し Treg 特異的 SOCS1 欠損マウスを作製したところ皮膚炎や肝炎などの自己免疫疾患様の症状を呈した (文献 2)。SOCS1 の nTreg における役割を解明するために、*in vitro*、*in vivo* でその抑制能を検討した。RAG2 欠損マウスへの naïve T 細胞とそれぞれの nTreg の移入実験では、SOCS1 欠損 Foxp3 陽性 nTreg を移入した方が腸炎の抑制効力が劣っていた。そこで、RAG2 欠損マウスへそれぞれの nTreg のみを移入して、nTreg の運命を検討した。GFP でマーキングした Foxp3 陽性 T 細胞 (>99% Foxp3 陽性) を移入した所、4 週後に WT nTreg は約 60% が Foxp3 陽性を維持しているのに対して、SOCS1 欠損 nTreg は 40%にまで Foxp3 陽性率が低下した。SOCS1 欠損 nTreg を移入した Rag 欠損マウスでは Foxp3 陽性、陰性どちらの分画からも IFN γ や IL-17 の産生が認められた。これらの結果から、SOCS1 が nTreg において Foxp3 の安定性およびサイトカイン産生抑制に寄与することが明らかとなった。今後 STAT の関与を含めてこの現象の分子機構を解明し、SOCS1 が Treg 機能にどのように機能するかを明らかにする。また逆に SOCS1 を過剰発現させたり、JAK 阻害剤を適量使用することによって Treg の安定性を高め、過剰な免疫応答や移植の拒絶を抑制できないか検討する。

(2) Foxp3 を誘導する新たな因子の探索

TGF β はナイーブ T 細胞に Foxp3 を誘導することができるが、Th1 などのエフェクターに分化した T 細胞には誘導できない。活性化型 TGF β 受容体 RI をエフェクター T 細胞に強制発現した場合の効果を検討した。その結果 TGF β による Foxp3 の誘導や IFN γ の抑制はナイーブ T 細胞

でのみ観察され、一旦活性化された T 細胞に活性化型 TGF β 受容体を発現させても同様の現象はみられなかった。したがって活性化された T 細胞では Smad だけでは Foxp3 を誘導することは難しいと考えられる。

一方で Smad2/3 両欠損マウスでも nTreg の発生は正常に起こっていた(文献 1)。このことから胸腺においては TGF β に依存しない何らかの Foxp3 発現維持機構が存在することが示唆される。そこで完全長 cDNA ライブラリーより nTreg で発現の高い転写因子の cDNA を選択し、Foxp3 プロモーター/ルシフェラーゼによる機能的なスクリーニングを行った。その結果核内オーファン受容体である NR4a2 が Foxp3 プロモーターを直接活性化することを見いだした(文献 15)。本遺伝子産物は Runx1 と会合すること、ナイーブ T 細胞に強制発現させると Foxp3 が TGF β 非依存的に誘導されることなどを見いだしている。現在 T 細胞特異的コンディショナル KO マウスを解析中である。

(3) 自然免疫系寛容維持因子としての PGE2 システムとその IFN γ による破綻機構の発見

Treg などから産生される IL-10 は自然免疫系の過剰な活性化を抑え、腸炎等を抑制することはよく知られている。我々は獲得免疫系(特に Treg)を欠損する Rag 欠損マウスでも自然免疫系の過剰応答が起こらないことに着目し、第二の抑制系の存在を想定した。まず多くの腸炎が腸内細菌に依存して発症することから、TLR の過剰な活性化、すなわち腸炎発症時には TLR 抑制系が破綻することを想定した。そのためまず腸上皮細胞培養液や腸抽出液において樹状細胞やマクロファージの TLR リガンドによる活性化を抑制する因子の検索を行った。確かに腸上皮から TLR 抑制因子が放出されていることを確認した。部分精製や生化学的性質の解析の結果、この因子は PGE2 であることを見いだした。そこで Rag 欠損マウスにインドメタシンを投与し PGE2 の産生を抑制したところ極めて重篤な腸炎を発症した。この腸炎は Treg の移入(すなわち IL-10 の供給)や腸内細菌の除去(TLR を活性化させない)、あるいは PGE2 受容体 EP4 のアゴニストの投与によって軽快した。よって PGE2-EP4 経路は個体においても IL-10 と独立して機能する TLR の抑制系であることが確認された。では腸炎を発症する時はこの経路はどのように破綻しているか? Rag/SOCS1 欠損マウスでも Rag 欠損マウスにインドメタシン投与と非常によく似た腸炎を発症することから SOCS1 が PGE2-EP4 経路の重要な調節因子であることが示唆された。試験管内の解析の結果、SOCS1 欠損樹状細胞は STAT1 が過剰に活性化されており PGE2 による TLR 経路の抑制能が破綻していることがわかった。IFN γ -STAT1 経路は炎症を促進するシステムであるが、STAT1 が抗炎症経路 PGE2-EP4 に拮抗することが明らかとなった。すなわち過剰な IFN γ およびそのシグナルが腸炎を促進するメカニズムのひとつは EP4 シグナルの抑制であることが明らかとなった(文献 12)。今後 EP4 シグナルが樹状細胞を介して T 細胞、特に末梢での抑制性 T 細胞の産生に及ぼす影響を明らかにする。

永井サブグループ

(1) PI3K-Akt-mTORC1 経路による Th17 細胞分化制御機構の解明

PI3K は細胞の増殖や生存に重要な役割を果たす、脂質リン酸化酵素である。免疫系の細胞においても、B 細胞や肥満細胞の分化、樹状細胞からのサイトカイン産生制御など、様々な役割を担うことが示されている。本研究では、Th17 細胞の分化における PI3K およびその下流に存在する分子である Akt や mTOR の関与について検討を加えた。

PI3K 阻害剤を用いた場合、あるいは PI3K の制御性サブユニットである p85 α を欠損するマウス

(p85 α KO マウス)から単離したナイーブ CD4⁺T 細胞を用いて Th17 細胞に分化させた場合、いずれにおいても Th17 細胞分化が抑制されることを明らかにした。また、mTORC1 の阻害剤である rapamycin で処理した場合においても、同様に Th17 分化が抑制されること、またこれとは逆に、Akt-mer (tamoxifen 処理により Akt シグナルを人為的に増強できる) マウス由来ナイーブ CD4⁺T 細胞を用いた場合には、Th17 細胞分化の促進が見られたことから、PI3K-Akt-mTORC1 シグナルが、Th17 分化を正に制御していることが示唆された。

その詳細な分子メカニズムを探るため、Th17 細胞分化に重要な役割を果たす STAT3 のリン酸化や、ROR α あるいは ROR γ といった IL-17 遺伝子の転写に関わる分子の発現に関して検討を加えたが、PI3K 活性との相関が見られなかった。そこで発現そのものではなく、関連分子の細胞内局在について検討を加えたところ、PI3K 活性を阻害することにより IL-17 遺伝子発現に重要な ROR γ の核移行が抑制されることを見出した。この核移行の分子メカニズムに迫るため、ROR γ の分子修飾について検討したところ、核移行した ROR γ はよりリン酸化を受けること、また PI3K 活性を抑制するとこのリン酸化が阻害されることを見出した。現在は、PI3K-Akt-mTORC1 経路によってこの ROR γ のリン酸化がどのように制御を受けるかについて、解析を進めている。

(2) 酸素分圧変化による Th17 細胞分化制御機構の解明

前年度までに、ナイーブ CD4⁺T 細胞を Th17 細胞に分化させる際に、最初の 36 時間を 5%酸素濃度で培養し、続けて通常酸素濃度下(20.9%)で 24 時間培養することにより(再酸素化)、通常酸素下で 60 時間培養した場合に比べて、Th17 細胞分化が促進されることを見出していた。そこで本年度はこの再酸素化による Th17 分化促進メカニズムを明らかにするため、詳細な検討を行った。

まず低酸素応答に重要な役割を果たすと考えられている HIF-1 α を T 細胞特異的に欠損するマウス(Lck-Cre x HIF-1 α flox/flox)を作製し、このマウスの脾臓から単離したナイーブ CD4⁺T 細胞を 5%あるいは通常酸素濃度下で 36 時間培養の後、さらに通常酸素濃度で 24 時間培養して、Th17 細胞分化、および再酸素化による Th17 分化促進における HIF-1 α の役割を検討した。すると、HIF-1 α を欠損すると Th17 細胞分化は抑制され、さらに再酸素化による分化促進も抑制されたことから、HIF-1 α は Th17 分化のみならず、再酸素化による Th17 分化促進にも関与することが示唆された。また、Th17 細胞分化に必須の転写因子である ROR α および ROR γ の発現における再酸素化の影響について検討した。すると再酸素化によっていずれの転写因子とも遺伝子発現上昇が見られたが、ROR α 変異マウス(*Staggerer* マウス)由来ナイーブ CD4⁺T 細胞を用いた場合には、再酸素化による分化促進が見られたことから、少なくとも ROR α は再酸素化による Th17 分化促進には無関係であることが示された。

(1)の研究から Th17 分化が PI3K-Akt-mTORC1 経路によって制御されることを示したが、再酸素化による Th17 細胞分化もこの経路によって制御されるかについて検討した。しかし、PI3K の特異的阻害剤を用いた場合、あるいは PI3K の制御性サブユニットである p85 α 分子を欠損する細胞を用いた場合のいずれにおいても、再酸素化による Th17 分化促進が見られ、PI3K 活性阻害による影響を受けなかった。ところが、mTORC1 の阻害剤である rapamycin を、Th17 分化開始時のみならず再酸素化時に処理した場合においても、再酸素化による分化促進が見られなかった。以上のことから、PI3K 非依存的な mTORC1 の活性化が、再酸素化による Th17 細胞分化促進に重要であることが示唆された。実際に、mTORC1 のターゲット分子である p70^{S6K} のリン酸化を再酸素化時から経時的に調べると、通常酸素下での培養に比べ、再酸素化によってリン酸化の度合

いが上昇していることが示された。また、PI3K 以外に mTORC1 を活性化する分子として知られている AMPK の関与を調べるため、AMPK アクチベーターである AICAR を用いて検討したが、再酸素化による Th17 細胞分化が促進されたことから、AMPK シグナルにも依存しないことが示された。現在、mTORC1 を活性化する分子メカニズムに関して、さらに解析を進めている。

(3) PI3K 経路への干渉による制御性樹状細胞の誘導の試み

クラス IA 酵素の制御サブユニットである p85 α のノックアウトマウスやクラス IB 酵素の触媒サブユニットである p110 γ のノックアウトマウス、さらにそのダブルノックアウトマウスを用いた解析を行った。これまでに、クラス IA 酵素やその下流の mTOR や GSK3 へ干渉することで抗炎症性サイトカイン優位な状況を誘導できることを示したが、p110 γ 単独のノックアウトマウス由来の樹状細胞ではそのような機能の変化は観察されなかった。ところが興味深いことに、p85 α と p110 γ とのダブルノックアウトマウス由来の樹状細胞では、p85 α 単独のノックアウトマウス由来の樹状細胞に比較して、その表現系が増強されることから、クラス IB 酵素との相互作用の存在が示唆された。リーシュマニア感染を用いた *in vivo* の系においても、GSK3 の阻害剤を投与することで、Th1 反応を抑制し、炎症を軽減させることに成功している。アレイを用いた解析は、野生型と p85 α のノックアウトマウスにおける差が小さいことから、それ以上の検討は中止した。

一連の研究の過程で、TLR を介した樹状細胞の成熟刺激によって、Fas を介した樹状細胞の細胞死が強く増強される現象が見いだされた。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

吉村サブグループ

1. Takimoto T, Wakabayashi Y, Sekiya T, Inoue N, Morita R, Ichiyama K, Takahashi R, Asakawa M, Muto G, Mori T, Hasegawa E, Shizuya S, Hara T, Nomura M, Yoshimura A.

Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF-beta-mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development. *J Immunol.* 2010 Jul 15;185(2):842-55. doi: 10.4049/jimmunol.0904100

2. Lu LF, Boldin MP, Chaudhry A, Lin LL, Taganov KD, Hanada T, Yoshimura A, Baltimore D, Rudensky AY. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell.* 2010 Sep 17;142(6):914-29. doi:10.1016/j.cell.2010.08.012

3. Tanaka KA, Suzuki KG, Shirai YM, Shibutani ST, Miyahara MS, Tsuboi H, Yahara M, Yoshimura A, Mayor S, Fujiwara TK, Kusumi A. Membrane molecules mobile even after chemical fixation. *Nature Methods.* 2010 Nov;7(11):865-6. Epub 2010 Oct 3. doi:10.1038/nmeth.f.314

4. Konoeda F, Shichita T, Yoshida H, Sugiyama Y, Muto G, Hasegawa E, Morita R, Suzuki N, Yoshimura A. Therapeutic effect of IL-12/23 and their signaling pathway blockade on brain ischemia model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Nov 19;402(3):500-6. doi:10.1016/j.bbrc.2010.10.058

5. Ishida H, Matsuzaki-Moriya C, Imai T, Yanagisawa K, Nojima Y, Suzue K, Hirai M, Iwakura Y, Yoshimura A, Hamano S, Shimokawa C, Hisaeda H. Development of experimental cerebral malaria is independent of IL-23 and IL-17. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Nov 26;402(4):790-5. doi:10.1016/j.bbrc.2010.10.114
6. Yan C, Cao J, Wu M, Zhang W, Jiang T, Yoshimura A, Gao H. Suppressors of cytokine signaling 3 inhibits LPS-induced IL-6 expression in osteoblasts by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein {beta} activity. *J Biol Chem*. 2010 Nov 26;285(48):37227-39. doi: 10.1074/jbc.M110.132084
7. Ikeda O, Sekine Y, Mizushima A, Nakasuji M, Miyasaka Y, Yamamoto C, Muromoto R, Nanbo A, Oritani K, Yoshimura A, Matsuda T. Interactions of STAP-2 with Brk and STAT3 participate in cell growth of human breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2010 Dec 3;285(49):38093-103. doi: 10.1074/jbc.M110.162388
8. Matsunaga Y, Inoue H, Fukuyama S, Yoshida H, Moriwaki A, Matsumoto T, Matsumoto K, Asai Y, Kubo M, Yoshimura A, Nakanishi Y. Effects of a Janus kinase inhibitor, pyridone 6, on airway responses in a murine model of asthma. *Biochem Biophys Res Commun* 2011 Jan 7;404(1):261-7 doi:10.1016/j.bbrc.2010.11.104
9. Denayer E, Chmara M, Brems H, Kievit AM, van Bever Y, Van den Ouweland AM, Van Minkelen R, de Goede-Bolder A, Oostenbrink R, Lakeman P, Beert E, Ishizaki T, Mori T, Keymolen K, Van den Ende J, Mangold E, Peltonen S, Brice G, Rankin J, Van Spaendonck-Zwarts KY, Yoshimura A, Legius E. Legius syndrome in fourteen families. *Hum Mutat*. 2011 Jan;32(1):E1985-98.DOI: 10.1002/humu.21404
10. Miyamoto R, Jijiwa M, Asai M, Kawai K, Ishida-Takagishi M, Mii S, Asai N, Enomoto A, Murakumo Y, Yoshimura A, Takahashi M. Loss of Sprouty2 partially rescues renal hypoplasia and stomach hypoganglionosis but not intestinal aganglionosis in Ret Y1062F mutant mice. *Dev Biol*. 2011 Jan 15;349(2):160-8. doi:10.1016/j.ydbio.2010.11.002
11. Matsumura K, Taketomi T, Yoshizaki K, Arai S, Sanui T, Yoshiga D, Yoshimura A, Nakamura S. Sprouty2 controls proliferation of palate mesenchymal cells via fibroblast growth factor signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Jan 28;404(4):1076-82. doi:10.1016/j.bbrc.2010.12.116
12. Chinen T, Komai K, Muto G, Morita R, Inoue N, Yoshida H, Sekiya T, Yoshida R, Nakamura K, Takayanagi R, Yoshimura A. Prostaglandin E2 and SOCS1 have a role in intestinal immune tolerance. *Nature Commun*. 2011 Feb;2:190. doi:10.1038/ncomms1181
13. Nakaya M, Hamano S, Kawasumi M, Yoshida H, Yoshimura A, Kobayashi T. Aberrant IL-4 production by SOCS3-over-expressing T cells during infection with Leishmania major exacerbates disease manifestations. *Int Immunol*. 2011 Mar;23(3):195-202. doi: 10.1093/intimm/dxq472
14. Watanabe A, Tatematsu M, Saeki K, Shibata S, Shime H, Yoshimura A, Obuse C, Seya T, Matsumoto M. Raftlin Is Involved in the Nucleocapture Complex to Induce Poly(I:C)-mediated TLR3 Activation. *J Biol Chem*. 2011 Mar 25;286(12):10702-11. doi: 10.1074/jbc.M110.185793

15. Sekiya T, Kashiwagi I, Inoue N, Morita R, Hori S, Waldmann H, Rudensky AY, Ichinose H, Metzger D, Chambon P, Yoshimura A. The nuclear orphan receptor Nr4a2 induces Foxp3 and regulates differentiation of CD4(+) T cells. ***Nature Commun.*** doi:10.1038/ncomms1272 *in press (accepted 09 March 2011).*

永井サブグループ

1. Chiba, S., Nagai, T., Hayashi, T., Baba, Y., Nagai, S. and Koyasu, S. Listerial invasion protein internalin B promotes the entry into ileal Peyer's patches *in vivo*. ***Microbiol. Immunol.*** 2011 Feb;55(2):123-9. doi:10.1111/j.1348-0421.2010.00292.x.

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)