

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. 研究実施体制

(1)「吉村」「永井」グループ

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

② 研究項目

「吉村」グループ

- ・ SOCS の抑制性 T 細胞における機能の解析
- ・ 新規 Foxp3 誘導因子 NR4a2 の解析
- ・ 化合物を用いた T 細胞リプログラミングの試み

「永井」グループ

- ・ PI3K-Akt-mTORC1 経路による Th17 細胞分化制御機構の解明
- ・ 酸素分圧変化による Th17 細胞分化制御機構の解明
- ・ レドックスや低酸素応答を介した制御性樹状細胞の誘導の試み

### §2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

(A) 吉村グループ

研究項目: SOCS の抑制性 T 細胞における機能の解析

T 細胞のリプログラミングに関連して最近抑制性 T 細胞 (nTreg) の可塑性が問題となっている。nTreg の TCR は自己タンパクに対し高い親和性を有していることから、nTreg が Foxp3 を失ってエフェクターとなり IFN $\gamma$  などのサイトカインを産生した場合 (exFoxp3 と呼ばれる) 自己免疫疾患の原因となったり増悪化に寄与すると予想される。もしこのような機構が存在するならば、逆にサイトカインシグナルを制御し nTreg の安定性を増すことも可能と考えられる。nTreg では SOCS1 の発現が高く、SOCS1 が nTreg の可塑性抑制に関与する可能性がある。そこで nTreg における SOCS1 の機能解明を行った。T 細胞特異的 SOCS1 欠損マウスは、皮膚炎、自己抗体産生の上昇などの SLE 様病態の出現する。胸腺中の nTreg 数は上昇していた (*Immunity*. 2009 に報告)。

抗 IL-2 抗体を投与すると Foxp3 陽性 nTreg は正常マウスと同等まで低下することから、その機序には SOCS1 欠損 nTreg の IL-2 シグナルの亢進が考えられた。一方 Foxp3Cre マウスを用いて Treg 特異的に SOCS1 を欠損させた場合も、頻度や程度が低いものの、T 細胞全体で SOCS1 を欠損させた場合と同様に皮膚炎や臓器での炎症が認められた(*Cell*. 2010 に報告)。よって SOCS1 が nTreg で欠損することが Treg の機能を消失させている可能性が示唆された。そこで GFP で標識された SOCS1 欠損 nTreg を単離し、Rag2 欠損マウスへ移入することで Foxp3 の安定性や腸炎の抑制能(あるいは誘導能)について検討を行った。その結果 SOCS1 欠損 nTreg は Rag2 欠損マウス体内では腸炎抑制能を消失しており、むしろ IFN $\gamma$  や IL-17 を産生して腸炎を誘発することが明らかとなった。このとき Foxp3 の消失の促進が認められた。また in-vitro でも同様の現象がみられた。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。一方 IFN $\gamma$  /SOCS1 両欠損マウス由来の nTreg は Foxp3 は安定であるが IL-17 産生は更新していた。これらの結果より SOCS1 は STAT1 を制御することで Foxp3 の安定性と IFN $\gamma$  産生抑制に関与すること、STAT3 の抑制を介して IL-17 産生を制限していることが明らかとなった(A-8)。これらの結果を基に我々は JAK 阻害剤のスクリーニングの結果、Th17 を抑制し iTreg を増加させる新規の JAK 阻害剤を得ており、このような SOCS を模倣する化合物をスクリーニングすることで nTreg を安定化させる薬剤を開発することが可能であると考ええる。

#### 研究項目：新規 Foxp3 誘導因子 NR4a2 の解析

TGF $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  による Foxp3 の誘導や IFN $\gamma$  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 $\beta$  受容体を発現させても同様の現象はみられなかった。したがって活性化された T 細胞では Smad だけでは Foxp3 を誘導することは難しいと考えられる。一方で Smad2/3 両欠損マウスでも nTreg の発生は正常に起こっていた。このことから胸腺においては TGF $\beta$  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。活性化型 T 細胞を抑制型に転換するという T 細胞のリプログラミングのために、Smad 非依存的に Foxp3 を誘導する遺伝子を単離することをめざした。そのために遺伝子発現データベース検索を中心に Treg 誘導に機能する候補因子を選択した。それら候補約 150 遺伝子を完全長 cDNA ライブラリーよりピックアップし、293 細胞を用いた 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。レトロウイルスを用いた T 細胞への強制発現およびコンディショナルノックアウト(cKO)マウスの解析から NR4a2 の機能解析を行った。その結果、NR4a2 は TGF $\beta$  非存在下でもナイーブ T 細胞に Foxp3 を誘導できることがわかった。さらにコンディショナル KO マウスの解析から NR4a2 単独では胸腺の Foxp3 の発現には必須ではないものの、末梢での Foxp3 の安定化に必要であることがわかった(A-2)。また Th1 の抑制にも機能すること

がわかった。さらに現在 NR4a1 および NR4a3 の欠損マウスを作成し double および triple ノックアウトの作成を行っている。今後は Nr4a ファミリーがどのようにして Treg 誘導に関わるのか分子機構を明らかにするとともに、NR4a2 の活性を増強したり、さらに遺伝子を追加してすでに分化成熟した T 細胞にも抑制能を付与できるような真のリプログラミングを完成させたい。

## (B) 永井グループ

### 研究項目:PI3K-Akt-mTORC1 経路による Th17 細胞分化制御機構の解明

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 の関与について解析し、PI3K-Akt-mTOR 経路によって Th17 分化をどのように制御できるかを検討した。その結果、PI3K-Akt-mTORC1-p70<sup>S6K1</sup> 経路が Egr2 の発現を正に制御し、Egr2 が Gfi-1 の発現を負に制御することを明らかにした。Gfi-1 は IL-17A 発現を抑制することから、結果として PI3K-Akt-mTORC1-p70<sup>S6K1</sup> 経路が Th17 分化を正に制御していることが明らかになった。さらに、Th17 細胞の鍵となる転写因子 ROR $\gamma$ t は核移行シグナルを持たないが、核移行シグナルを持つ p70<sup>S6K2</sup> と結合すること核移行することを明らかにした。以上の研究から、PI3K-Akt-mTORC1 シグナルによって S6K1 および S6K2 を介する(少なくとも)2通りの経路で、Th17 分化を正に制御することが明らかとなった(B-1)。

### 研究項目:酸素分圧変化による Th17 細胞分化制御機構の解明

生体内における酸素分圧は、通常大気における濃度 (21%) に比べて低く、その濃度はリンパ節などの二次リンパ組織では 3~7%と低く、また炎症部位においては 1%以下になるなど、様々な濃度をとる。特に T 細胞はリンパ節において樹状細胞などにより抗原提示を受け、血流に乗って全身を巡り、炎症部位に到達してその機能を発揮するが、その間に劇的な酸素分圧の変化に曝される。従って、酸素分圧の変化によってヘルパーT 細胞の分化を制御できる可能性を検討した。

5% O<sub>2</sub> 存在下で感作して 36 時間後に 21% O<sub>2</sub> でさらに 24 時間培養する(再酸素化)ことにより Th17 分化が促進されること、再酸素化による PI3K 非依存的な mTORC1 の活性化が Th17 分化を促進することを示した。Th17 分化における HIF-1 $\alpha$  発現は mTORC1 によって制御され、HIF-1 $\alpha$  の発現増強は Th17 分化を促進し、HIF-1 $\alpha$  の欠損は Th17 分化を抑制した。これらの結果から、再酸素化により HIF-1 $\alpha$  と mTORC1 が正のフィードバック機構が形成され、Th17 分化を促進すると結論した(B-4)。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ●論文詳細情報

吉村グループ (A)

(A-1) Lesina M, Kurkowski MU, Ludes K, Rose-John S, Treiber M, Klöppel G, Yoshimura A, Reindl W, Sipos B, Akira S, Schmid RM, Algül H. Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer.

*Cancer Cell*. 2011 Apr 12;19(4):456-69. DOI 10.1016/j.ccr.2011.03.009

(A-2) 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*. 2011 Apr;2:269. doi:10.1038/ncomms1272

(A-3) Ichiyama K, Sekiya T, Inoue N, Tamiya T, Kashiwagi I, Kimura A, Morita R, Muto G, Shichita T, Takahashi R, Yoshimura A. Transcription Factor Smad-Independent T Helper 17 Cell Induction by Transforming-Growth Factor- $\beta$  Is Mediated by Suppression of Eomesodermin. *Immunity*. 2011 May 27;34(5):741-54. DOI 10.1016/j.immuni.2011.02.021

(A-4) Ishizaki T, Tamiya T, Taniguchi K, Morita R, Kato R, Okamoto F, Saeki K, Nomura M, Nojima Y, Yoshimura A. miR126 positively regulates mast cell proliferation and cytokine production through suppressing Spred1. *Genes Cells*. 2011 Jul;16(7):803-814. doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01529.x

(A-5) Carow B, Qun Ye X, Gavier-Widén D, Bhujra S, Oehlmann W, Singh M, Sköld M, Ignatowicz L, Yoshimura A, Wigzell H, Rottenberg ME. Silencing Suppressor of Cytokine Signaling-1 (SOCS1) in Macrophages Improves Mycobacterium tuberculosis Control in an Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )-dependent Manner. *J Biol Chem*. 2011 Jul 29;286(30):26873-87. doi: 10.1074/jbc.M111.238287

(A-6) Takahashi R, Nishimoto S, Muto G, Sekiya T, Tamiya T, Kimura A, Morita R, Asakawa M, Chinen T, Yoshimura A. SOCS1 is essential for regulatory T cell functions by preventing loss of Foxp3 expression as well as IFN- $\gamma$  and IL-17A production. *J Exp Med*. 2011 Sep 26;208(10):2055-67. doi: 10.1084/jem.20110428

(A-7) Hiwatashi K, Tamiya T, Hasegawa E, Fukaya T, Hashimoto M, Kakoi K, Kashiwagi I, Kimura A, Inoue N, Morita R, Yasukawa H, Yoshimura A. Suppression of SOCS3 in macrophages prevents cancer metastasis by modifying macrophage phase and MCP2/CCL8 induction. *Cancer Lett.* 2011 Sep 28;308(2):172-80. doi: 10.1016/j.canlet.2011.04.024,

(A-8) Takahashi H, Kouno M, Nagao K, Wada N, Hata T, Nishimoto S, Iwakura Y, Yoshimura A, Yamada T, Kuwana M, Fujii H, Koyasu S, Amagai M. Desmoglein 3-specific CD4+ T cells induce pemphigus vulgaris and interface dermatitis in mice. *J Clin Invest.* 2011 Sep 1;121(9):3677-88. doi: 10.1172/JCI57379.

(A-9) Sujino T, Kanai T, Ono Y, Mikami Y, Hayashi A, Doi T, Matsuoka K, Hisamatsu T, Takaishi H, Ogata H, Yoshimura A, Littman DR, Hibi T. Regulatory T Cells Suppress Development of Colitis, Blocking Differentiation of T-Helper 17 Into Alternative T-Helper 1 Cells. *Gastroenterology.* 2011 Sep;141(3):1014-23. doi:10.1053/j.gastro.2011.05.052

(A-10) Joshi S, Pantalena LC, Liu XK, Gaffen SL, Liu H, Rohowsky-Kochan C, Ichiyama K, Yoshimura A, Steinman L, Christakos S, Youssef S. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A. *Mol Cell Biol.* 2011 Sep;31(17):3653-69. doi: 10.1128/MCB.05020-11

(A-11) Wakabayashi Y, Tamiya T, Takada I, Fukaya T, Sugiyama Y, Inoue N, Kimura A, Morita R, Kashiwagi I, Takimoto T, Nomura M, Yoshimura A. Histone 3 lysine 9 (H3K9) methyltransferase recruitment to the interleukin-2 (IL-2) promoter is a mechanism of suppression of IL-2 transcription by the transforming growth factor- $\beta$ -Smad pathway. *J Biol Chem.* 2011 Oct 14;286(41):35456-65. doi: 10.1074/jbc.M111.236794

(A-12) Nakagawa R, Yoshida H, Asakawa M, Tamiya T, Inoue N, Morita R, Inoue H, Nakao A, Yoshimura A. Pyridone 6, a pan-JAK inhibitor, ameliorates allergic skin inflammation of NC/Nga mice via suppression of Th2 and enhancement of Th17. *J Immunol.* 2011 Nov 1;187(9):4611-20. doi:10.4049/jimmunol.1100649

(A-13) Mori T, Miyamoto T, Yoshida H, Asakawa M, Kawasumi M, Kobayashi T, Morioka H, Chiba K, Toyama Y, Yoshimura A. IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ -initiated IL-6-STAT3 pathway is

critical in mediating inflammatory cytokines and RANKL expression in inflammatory arthritis. *Int Immunol*. 2011 Nov;23(11):701-12. doi: 10.1093/intimm/dxr077

(A-14) Sekine Y, Ikeda O, Mizushima A, Ueno Y, Muromoto R, Yoshimura A, Kanakura Y, Oritani K, Matsuda T. STAP-2 interacts with and modulates BCR-ABL-mediated tumorigenesis.

*Oncogene*. 2012 Jan 9. doi: 10.1038/onc.2011.604.

(A-15) Yoshida H, Kimura A, Fukaya T, Sekiya T, Morita R, Shichita T, Inoue H, Yoshimura A.

Low dose CP-690,550 (tofacitinib), a pan-JAK inhibitor, accelerates the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis by potentiating Th17 differentiation.

*Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Feb 10;418(2):234-40

doi:10.1016/j.bbrc.2011.12.156

(A-16) Takaesu G, Kobayashi T, Yoshimura A. TGF $\beta$ -Activated Kinase 1

(TAK1)-Binding Proteins (TAB) 2 and 3 Negatively Regulate Autophagy. *J Biochem*.

2012 Feb;151(2):157-66. doi: 10.1093/jb/mvr123

(A-17) Sugiyama Y, Kakoi K, Kimura A, Takada I, Kashiwagi I, Wakabayashi Y, Morita R, Nomura M, Yoshimura A. Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the

suppression of iNOS synthesis in macrophages by regulating IRF3 and STAT1 pathways.

*Int Immunol*. 2012 Apr;24(4):253-65. doi: 10.1093/intimm/dxr126

(A-18) Shichita T, Hasegawa E, Kimura A, Morita R, Sakaguchi R, Takada I, Sekiya T, Ooboshi H, Kitazono T, Yanagawa T, Ishii T, Takahashi H, Mori S, Nishibori M,

Kuroda K, Akira S, Miyake K, and Yoshimura A Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain *Nature Medicine* in press

永井グループ (B)

(B-1) Kurebayashi, Y., Nagai, S., Ikejiri, A., Ohtani, M., Ichiyama, K., Baba, Y., Yamada, T., Egami, S., Hoshii, T., Hirao, A., Matsuda, S. and Koyasu, S.

PI3K-Akt-mTORC1-S6K1/2 axis controls Th17 differentiation by regulating Gfi-1 expression and nuclear translocation of ROR $\gamma$ .

*Cell Reports* doi: 10.1016/j.celrep.2012.02.007 (2012).

(B-2) Yoshizawa, A., Nagai, S., Baba, Y., Yamada, T., Matsui, M., Tanaka, H., Miyoshi, S.,

Amagai, M., Yoshikawa, T., Fukuda, K., Ogawa, S. and Koyasu, S. (2012) Autoimmunity against M2 muscarinic acetylcholine receptor induces myocarditis and leads to a dilated cardiomyopathy-like phenotype.

*Eur. J. Immunol.* doi: 10.1002/eji.201142104 (2012).

(B-3) Anzai, A., Anzai, T., Nagai, S., Maekawa, Y., Naito, K., Kaneko, H., Takahashi, T., Sano, M., Yoshikawa, T., Koyasu, S., Ogawa, S. and Fukuda, K.

Regulatory Role of Dendritic Cells in Post-Infarction Healing and Left Ventricular Remodeling.

*Circulation* 125: 1234-1245 (2012).

(B-4) Ikejiri, A., Nagai, S., Goda, N., Kurebayashi, Y., Osada-Oka, M., Takubo, K., Suda, T. and Koyasu, S.

Dynamic regulation of Th17 differentiation by oxygen concentrations.

*Int. Immunol.*, 24: 137-146 (2012).

(B-5) Funao, H., Ishii, K., Nagai, S., Sasaki, A., Hoshikawa, T., Aizawa, M., Okada, Y., Chiba, K., Koyasu, S., Toyama, Y. and Matsumoto, M.

Establishment of a Real-time, Quantitative and Reproducible Mouse Model of Staphylococcal Osteomyelitis using Bioluminescence Imaging.

*Infect. Immun.* 80: 733-741 (2012).