

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 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

- ・ 新規 Foxp3 誘導因子 NR4a2 の解析
- ・ 抑制性樹状細胞の創成
- ・ 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: 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。我々は活性化型 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。また Th1 の抑制にも機能することがわかった。しかし、NR4a2 のみを欠損させたマウスでは免疫応答の亢進がみられるものの、胸腺で Treg は正常に発生分化し、単独欠損マウスは自己免疫疾患を自然発症しなかった。そこで NR4a ファミリーの全て 8

NR4a1, NR4a2, NR4a3) を T 細胞特異的に欠損させた TKO マウスを作成した。予想通り TKO マウスでは胸腺・末梢共に Treg が全く存在しないことが明らかとなった。さらに TKO 細胞ではネガティブセレクションが減弱していた。その結果、TKO マウスは激しい全身性の自己免疫疾患を発症し、生後 3 週間以内に死亡することが明らかとなった。これらの結果から、NR4a ファミリー分子は同様の機能を持ち、互いに補い合いつつ Treg 分化とネガティブセレクションに機能していることが明らかとなった。

次に TCR 刺激が弱いため Foxp3 の発現のない OT-II TCR トランスジェニックマウス由来の T 細胞に、NR4a を人工的に活性化できるように工夫した遺伝子を導入して T 細胞の運命決定を解析しました。その結果 NR4a を強力に活性化させると T 細胞にアポトーシス(ネガティブセレクション)が誘導され、中程度の活性化を起こすと Treg が誘導されることを見いだした。すなわち、NR4a の活性制御により非 Treg 細胞から人為的に Treg を造りうることを示した。

### 研究項目： 抑制性樹状細胞による Treg 増強

当グループではこれまで SOCS3 の欠損樹状細胞および c-fos 強制発現樹状細胞が iTreg や Tr1 を誘導し免疫抑制的に働くことを示した。さらに今回樹状細胞特異的に c-fos を強制発現させたトランスジェニックマウスを作製した(A-10)。このマウスは実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)モデルなどに抵抗性を示し、単離した樹状細胞は T 細胞の活性化能が低下していた。すなわち in-vitro で示された c-fos による免疫抑制機能が個体レベルでも証明された。しかし残念ながらこのトランスジェニックマウスでは Treg の増加は認められなかった。そこで次に樹状細胞特異的な Smad2 欠損マウスを作製して解析を行ったところ、腸管固有粘膜層において Treg の増加が認められ、このマウスは DSS 誘導性腸炎に抵抗性を示した。次に Smad2 欠損樹状細胞における Treg 誘導機構の解明を行った。予想に反して Smad2 欠損樹状細胞は iTreg を多く誘導する性質があった。解析の結果 Smad3 が TGF $\beta$  の産生を促進し Smad2 が抑制することを見いだした。Smad2 欠損樹状細胞は TGF $\beta$  を高産生することで iTreg を誘導する強力な抑制性樹状細胞

胞となることを見いだした。

## (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)。また ROR $\gamma$ t が分化の過程でリン酸化を受けることを見だし、現在そのリン酸化部位についての検討を行っている。

## §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) Sekiya T, Kashiwagi I, Yoshida R, Fukaya T, Morita R, Kimura A, Ichinose H, Metzger D, Chambon P, Yoshimura A.

Nr4a receptors are essential for thymic regulatory T cell development and immune homeostasis.

*Nature Immunol.* 2013 Jan 20. doi: 10.1038/ni.2520.

(A-2) Romain M, Taleb S, Dalloz M, Ponnuswamy P, Esposito B, Pérez N, Wang Y, Yoshimura A, Tedgui A, Mallat Z. Overexpression of SOCS3 in T Lymphocytes Leads to Impaired Interleukin-17 Production and Severe Aortic Aneurysm Formation in Mice - Brief Report.

*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 Mar;33(3):581-4. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300516.

(A-3) Hasegawa E, Sonoda KH, Shichita T, Morita R, Sekiya T, Kimura A, Oshima Y, Takeda A, Yoshimura T, Yoshida S, Ishibashi T, Yoshimura A.

IL-23-Independent Induction of IL-17 from  $\gamma$   $\delta$  T Cells and Innate Lymphoid Cells Promotes Experimental Intraocular Neovascularization.

*J Immunol.* 2013 Feb 15;190(4):1778-87. doi: 10.4049/jimmunol.1202495.

(A-4) Yan X, Shichita T, Katsumata Y, Matsubashi T, Ito H, Ito K, Anzai A, Endo J, Tamura Y, Kimura K, Fujita J, Shinmura K, Shen W, Yoshimura A, Fukuda K, Sano M.

Deleterious Effect of the IL-23/IL-17A Axis and  $\gamma$   $\delta$  T Cells on Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction.

*J Am Heart Assoc.* 2012 Oct;1(5):e004408. doi: 10.1161/JAHA.112.004408.

- (A-5) Takaesu G, Inagaki M, Takubo K, Mishina Y, Hess PR, Dean GA, **Yoshimura A**, Matsumoto K, Suda T, Ninomiya-Tsuji J.  
TAK1 (MAP3K7) Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cells through TNF-Dependent and -Independent Mechanisms.  
*PLoS One*. 2012;7(11):e51073. doi: 10.1371/journal.pone.0051073.
- (A-6) Inagaki-Ohara K, Mayuzumi H, Kato S, Minokoshi Y, Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T, Matsuzaki G, **Yoshimura A**.  
Enhancement of leptin receptor signaling by SOCS3 deficiency induces development of gastric tumors in mice.  
*Oncogene*. 2012 Nov 26. doi: 10.1038/onc.2012.540
- (A-7) 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**  
Peroxisome family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain  
*Nature Medicine* 2012 Jun;18(6):911-7. doi: 10.1038/nm.2749.
- (A-8) Wakabayashi H, Ito T, Fushimi S, Nakashima Y, Itakura J, Qiuying L, Win MM, Cuiming S, Chen C, Sato M, Mino M, Ogino T, Makino H, **Yoshimura A**, Matsukawa A.  
Spred-2 deficiency exacerbates acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice.  
*Clin Immunol*. 2012 Jul 14;144(3):272-282. doi: 10.1016/j.clim.2012.07.002.
- (A-9) Uto-Konomi A, Miyauchi K, Ozaki N, Motomura Y, Suzuki Y, **Yoshimura A**, Suzuki S, Cua D, Kubo M.  
Dysregulation of suppressor of cytokine signaling 3 in keratinocytes causes skin inflammation mediated by interleukin-20 receptor-related cytokines.  
*PLoS One*. 2012;7(7):e40343. doi: 10.1371/journal.pone.0040343.
- (A-10) Yoshida R, Suzuki M, Sakaguchi R, Hasegawa E, Kimura A, Shichita T, Sekiya T, Shiraishi H, Shimoda K, **Yoshimura A**.  
Forced expression of stabilized c-Fos in dendritic cells reduces cytokine production and immune responses in vivo.  
*Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Jun 29;423(2):247-52. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.05.097.
- (A-11) Sekine Y, Yamamoto C, Kakisaka M, Muromoto R, Kon S, Ashitomi D, Fujita N, **Yoshimura A**, Oritani K, Matsuda T.  
Signal-transducing adaptor protein-2 modulates fas-mediated T cell apoptosis by interacting with caspase-8.  
*J Immunol*. 2012 Jun 15;188(12):6194-204. doi: 10.4049/jimmunol.1103467.
- (A-12) Kawano Y, Nakae J, Watanabe N, Fujisaka S, Iskandar K, Sekioka R, Hayashi Y, Tobe K, Kasuga M, Noda T, **Yoshimura A**, Onodera M, Itoh H.  
Loss of pdk1-foxo1 signaling in myeloid cells predisposes to adipose tissue inflammation and insulin resistance.  
*Diabetes*. 2012 Aug;61(8):1935-48. doi: 10.2337/db11-0770.
- (A-13) Yoshida H, Suzuki M, Sakaguchi R, Tani I, Kotani H, Shudo N, **Yoshimura A**.  
Preferential induction of Th17 cells in vitro and in vivo by Fucogalactan from *Ganoderma lucidum* (Reishi).  
*Biochem Biophys Res Commun*. 2012 May 25;422(1):174-80. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.135.

(A-14) 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-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) Saeki K, Kanai T, Nakano M, Nakamura Y, Miyata N, Sujino T, Yamagishi Y, Ebinuma H, Takaishi H, Ono Y, Takeda K, Hozawa S, Yoshimura A, Hibi T. CCL2-Induced Migration and SOCS3-Mediated Activation of Macrophages Are Involved in Cerulein-Induced Pancreatitis in Mice. *Gastroenterology*. 2012 Apr;142(4):1010-1020.e9. doi: 10.1053/j.gastro.2011.12.054.

(A-17) 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-18) Takaesu G, Kobayashi T, Yoshimura A. TGF $\beta$ -Activated Kinase 1 (TAK1)-Binding Proteins (TAB) 2 and 3 Negatively Regulate Autophagy. *J Biochem*. Feb;151(2):157-66. doi: 10.1093/jb/mvr123.

永井グループ

(B-1) Sugiura D, Denda-Nagai K, Takashima M, Murakami R, Nagai S, Takeda K, \*Irimura T. Local Effects of Regulatory T Cells in MUC1 Transgenic Mice Potentiate Growth of MUC1 Expressing Tumor Cells In Vivo. *PLoS One*. 2012;7(9):e44770. (Sep 17 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0044770).

(B-2) Kurebayashi Y, Nagai S, Ikejiri A, Ohtani M, Ichiyama K, Baba Y, Yamada T, Egami S, Hoshii T, Hirao A, Matsuda S, Koyasu S. PI3K-Akt-mTORC1-S6K1/2 axis controls Th17 differentiation by regulating Gfi1 expression and nuclear translocation of ROR  $\gamma$ . *Cell Rep*. 2012 Apr 19;1(4):360-73. doi: 10.1016/j.celrep.2012.02.007.

(B-3) Yoshizawa A, Nagai S, Baba Y, Yamada T, Matsui M, Tanaka H, Miyoshi S, Amagai M, Yoshikawa T, Fukuda K, Ogawa S, Koyasu S. Autoimmunity against M<sub>2</sub> muscarinic acetylcholine receptor induces myocarditis and leads to a dilated cardiomyopathy-like phenotype. *Eur J Immunol*. 2012 May;42(5):1152-63. doi: 10.1002/eji.201142104.

(B-4) Anzai A, Anzai T, Nagai S, Maekawa Y, Naito K, Kaneko H, Sugano Y, Takahashi T, Abe H, Mochizuki S, Sano M, Yoshikawa T, Okada Y, Koyasu S, Ogawa S, Fukuda K. Regulatory role of dendritic cells in postinfarction healing and left ventricular remodeling.

*Circulation*. 2012 Mar 13;125(10):1234-45. doi:  
10.1161/CIRCULATIONAHA.111.052126.

(B-5) Ikejiri A, Nagai S, Goda N, Kurebayashi Y, Osada-Oka M, Takubo K, Suda T,  
Koyasu S.

Dynamic regulation of Th17 differentiation by oxygen concentrations.  
Int Immunol. 2012 Mar;24(3):137-46. doi: 10.1093/intimm/dxr111.

(B-6) Funao H, Ishii K, Nagai S, Sasaki A, Hoshikawa T, Aizawa M, Okada Y, Chiba K,  
Koyasu S, Toyama Y, Matsumoto M.

Establishment of a real-time, quantitative, and reproducible mouse model of  
Staphylococcus osteomyelitis using bioluminescence imaging.

Infect Immun. 2012 Feb;80(2):733-41. doi: 10.1128/IAI.06166-11.

### (3-2) 知財出願

CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)