

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08893

研究課題名(和文) アミノ酸-mTORC1によるGM-CSF発現制御機構の解明と乾癬治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of GM-CSF expression regulation mechanism by amino acid-mTORC1 and its application to psoriasis therapy

研究代表者

大谷 真志 (OHTANI, Masashi)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号：20383713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：mTORC1は細胞周囲の栄養状態やエネルギー状態を感知するシグナル伝達分子で、免疫細胞の分化やサイトカインの発現に関わる。本研究では、アミノ酸-mTORC1シグナルが、マウス表皮角化細胞におけるGM-CSF発現制御に関与していることを明らかにした。また、乾癬と同様にGM-CSFが炎症増悪因子と知られる刺激性接触皮膚炎モデルを用いた解析から、アミノ酸処理が皮膚炎に対して治療効果をもつ可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

mTORC1は様々な免疫細胞のサイトカイン発現制御に関与していることが知られているものの、非免疫細胞においては未解明な点が多い。本研究では、mTORC1および、その活性化物質であるアミノ酸が表皮角化細胞のGM-CSF発現制御に関与することを明らかにし、アミノ酸処理による皮膚炎治療への足掛かりを示した。そのため、アミノ酸-mTORC1シグナルは、皮膚免疫応答の人為的制御点の一つとして皮膚疾患の治療に応用できると期待される。

研究成果の概要(英文)：mTORC1 is a signal transduction molecule that senses nutritional and energy states around cells, and is involved in immune cell differentiation and cytokine expression. Here we show that the amino acid-mTORC1 signal is involved in the regulation of GM-CSF expression in mouse epidermal keratinocytes. In addition, we have revealed that the amino acid treatment may have a therapeutic effect on dermatitis, based on an analysis using an irritant contact dermatitis model in which GM-CSF is known to be an exacerbation factor for inflammation as well as psoriasis.

研究分野：免疫学

キーワード：mTORC1 表皮角化細胞 GM-CSF

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

セリン・スレオニンキナーゼとして知られる mTOR complex 1 (mTORC1) は、もともとアミノ酸や成長因子などにより活性化し、細胞の増殖や代謝を促進する分子として考えられてきたが、近年、我々を含め国内外の研究グループから免疫機能の調節に関する報告が相次ぎ、様々な疾患の治療標的分子の一つとして注目されている (Weichhart T., *Nat. Rev. Immunol.* 2015)。我々はこれまで、mTORC1 が樹状細胞の IL-12 産生を抑制して Th1 反応を抑えることや、IL-10 産生を促進することで腸炎発症を抑えることを明らかにしてきた。また、予備的解析から、マウス表皮角化細胞株 Pam212 において mTORC1 が炎症誘発物質刺激に伴う顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) の遺伝子発現およびタンパク質発現を抑制することを見出した。

表皮角化細胞が産生する GM-CSF は乾癬やアトピー性皮膚炎といった炎症性皮膚疾患の病因の一つと考えられている。乾癬は慢性の炎症性角化症で、表皮角化細胞の異常増殖や好中球や TH17 細胞の組織浸潤、GM-CSF や TNF- $\alpha$ 、IL-23 といった炎症性サイトカインの過剰産生がみられる。GM-CSF は好中球やマクロファージの遊走と活性化を促すことで炎症を増悪化させることから、乾癬の治療標的の候補に挙げられている。現在、乾癬の治療法は角化細胞の増殖を抑えるビタミン D3 外用薬と炎症を抑えるステロイド外用薬を用いるのが一般的で、病状によっては光線療法や生物学的製剤が使われている。しかし、いずれも副作用や費用の点で問題があり、新規治療法の開発が望まれている。

mTORC1 は様々な刺激によって活性化されるが、特にアミノ酸のロイシン (Leu) やアルギニン (Arg)、グルタミン (Gln) は強い活性化を引き起こす。In vitro の予備的解析から、培地中の Leu、Arg の量を増やすと Pam212 における GM-CSF 発現が抑制されることがわかっている。そのため、アミノ酸を皮膚に作用させることで mTORC1 活性化させて GM-CSF 産生を抑制できれば、乾癬などの皮膚疾患の新たな治療法につながることを期待され、本研究を行うに至った。

### 2. 研究の目的

マウス表皮角化細胞における (1) アミノ酸-mTORC1 を介した GM-CSF 遺伝子発現制御機構を明らかにするとともに、(2) マウス皮膚へのアミノ酸塗布が GM-CSF 産生を抑制し、乾癬に対する治療効果を示す可能性について検証を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) マウス表皮角化細胞におけるアミノ酸-mTORC1 シグナルを介した GM-CSF 遺伝子発現制御機構の解明

マウス表皮角化細胞株 Pam212 を用いた解析から、炎症誘発物質刺激によって誘導される GM-CSF プロモーター活性が mTORC1 阻害剤により増大し、そのプロモーター活性制御に転写因子 Tfc2p2 が関与している可能性が示唆された。そこで、mTORC1 が Tfc2p2 を介して GM-CSF 発現を抑制しているのか否かを調べるため、Tfc2p2 を強制発現させた後、レポーターアッセイにより GM-CSF プロモーター活性を評価するとともに、ELISA によりタンパク質産生量を解析した。また、Tfc2p2 以外の転写因子の関与をレポーターアッセイにより調べた。

Pam212 にアミノ酸 (Leu、Gln) を過剰添加すると GM-CSF 発現が低下した。そのため、逆にアミノ酸を枯渇させた場合に GM-CSF 発現が増加する可能性について調べた。培地から三種類のアミノ酸 (Leu、Arg、Gln) を単独もしくは同時に枯渇させ、GM-CSF 遺伝子発現およびタンパク質産生の量を real-time PCR および ELISA にて解析した。

Pam212 でみられたアミノ酸-mTORC1 シグナルによる GM-CSF 発現制御について、より生理的条件下に近い初代培養表皮角化細胞を用いて確認した。

初代培養表皮角化細胞にアミノ酸 (Leu、Arg、Gln) を過剰添加し、炎症誘発物質刺激によって誘導される GM-CSF 遺伝子発現を real-time PCR で調べた。また、アミノ酸過剰添加が mTORC1 活性化に与える影響を Western blotting により解析し、mTORC1 阻害剤を用いて GM-CSF 発現への影響を解析した。

(2) アミノ酸塗布による乾癬治療への応用検討

乾癬と同様に GM-CSF が炎症増悪因子と知られる皮膚炎で、解析が容易な刺激性接触皮膚炎モデルを用い、皮膚炎に伴う GM-CSF 発現におけるアミノ酸処理の影響を解析した。三種類のアミノ酸 (Leu、Arg、Gln) を混合した水溶液をマウスの耳に塗布した後、クロトンオイルを塗布して刺激性接触皮膚炎を誘導し、皮膚の肥厚を測定した。また、皮膚中の GM-CSF mRNA 発現量を

real-time PCR で測定した。

皮膚への mTORC1 阻害剤処理が、アミノ酸処理がもたらす作用と反対に働くかを と同様の方法で検証した。

#### 4. 研究成果

##### (1) マウス表皮角化細胞におけるアミノ酸-mTORC1 シグナルを介した GM-CSF 遺伝子発現制御機構の解明

Tfcp2 発現ベクターを導入した Pam212 では、コントロールベクターを導入した細胞と比べて GM-CSF プロモーター活性が低下した。また、レンチウイルスベクターで Tfcp2 遺伝子を導入後、Tfcp2 強陽性細胞をソーティングし、炎症誘発物質刺激に伴う GM-CSF の発現を調べたところ、コントロールと比べて GM-CSF の mRNA およびタンパク質の発現低下が観察されたことから、Tfcp2 が GM-CSF 発現を負に制御することが示唆された。今後、mTORC1 と Tfcp2 の相互作用を調べる必要がある。一方、マクロファージや樹状細胞において、mTORC1 が転写活性に影響を与えることが知られている NF- $\kappa$ B と AP-1 について、Pam212 細胞を用いてレポーターアッセイにより調べた。その結果、炎症誘発物質刺激に伴う NF- $\kappa$ B と AP-1 の転写活性は、mTORC1 阻害剤によって増加がみられたことから、mTORC1 は Tfcp2 のみならず、NF- $\kappa$ B や AP-1 の転写活性を抑制することで、GM-CSF 発現を負に制御している可能性が明らかとなった。

培地中のアミノ酸 (Leu, Arg, Gln) を枯渇させた培地下で、Pam212 細胞を炎症誘発物質刺激して GM-CSF の mRNA 発現を調べたところ、枯渇しない場合と比べて著しく発現が増加した。その程度は、三種類すべて枯渇で最も高く、Arg 単独もしくは Gln 単独枯渇でも同程度だったが、Leu 単独枯渇では他と比べて弱かった。また、GM-CSF のタンパク質発現においても同様の傾向がみられた。mTORC1 阻害剤で処理した場合は、2 倍程度の発現増加であることから、アミノ酸シグナルは mTORC1 依存・非依存的に GM-CSF 発現を負に制御していることが示唆された。

初代培養表皮角化細胞にアミノ酸 (Leu, Arg, Gln) を過剰添加した後、炎症誘発物質刺激して GM-CSF の発現を解析した。その結果、Pam212 の結果とは対照的に、Leu 単独、Arg 単独、三種類同時に添加した場合、GM-CSF の mRNA およびタンパク質発現は増加した。Arg 単独添加による顕著な変化は認められなかった。mTORC1 の下流分子である p70S6K のリン酸化状態は、Leu もしくは Gln 添加によって亢進したが、Arg 添加では変化がなかった。また、mTORC1 阻害剤を用いた解析から、アミノ酸過剰添加による GM-CSF 発現の正の調節は、mTORC1 依存的・非依存的経路な経路を介していることが示唆された。

##### (2) アミノ酸塗布による乾癬治療への応用検討

マウスの耳にアミノ酸 (Leu, Arg, Gln) 混合溶液を 10  $\mu$ l ずつ 3 回塗布した群と、リン酸緩衝液を塗布した群に、クロトンオイルを塗布して刺激性接触皮膚炎を誘導した。その結果、炎症に伴う耳の肥厚がアミノ酸処理で軽減しており、耳組織における GM-CSF mRNA 発現が抑制傾向にあったことから、アミノ酸処理が GM-CSF 発現低下を介して皮膚炎の抑制に働く可能性が示唆された。

マウスの耳に mTORC1 阻害剤を塗布して、クロトンオイルによる刺激性接触皮膚炎への影響を調べたが、阻害剤の有無による変化は観察されなかった。mTORC1 阻害剤が皮膚細胞の mTORC1 活性を抑制できているかを Western blotting および免疫組織染色で解析したが、mTORC1 阻害剤の濃度を濃くしても、mTORC1 活性の抑制は認められなかった。そのため、アミノ酸処理による GM-CSF 発現低下および皮膚炎抑制効果が mTORC1 を介しているかは明らかにできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Watanabe, N., Teradu, S., Ohtani, M., Uemura, H.	4. 巻 18
2. 論文標題 Oral administration of whole dihomo- $\gamma$ -linolenic acid-producing yeast suppresses allergic contact dermatitis in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem.	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2019.1667220	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡邊哲生、渡邊直子、大谷真志
2. 発表標題 ババイン誘導性アトピー性皮膚炎の初期段階におけるカテキンの影響
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深谷佳苗、渡邊直子、大谷真志
2. 発表標題 マウスケラチノサイトのサイトカイン発現におけるアミノ酸処理の影響
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazama, A., Ohtani, M., Moro, K., Watanabe, N.
2. 発表標題 Role of cystine/glutamate transporter (system xc-) in murine sepsis.
3. 学会等名 第47回 日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 風間絢香、大谷真志、茂呂和世、佐藤英世、渡辺直子
2. 発表標題 マウス敗血症モデルにおけるシスチントランスポーターの影響
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊哲生、渡辺直子、大谷真志
2. 発表標題 パバイン誘導性アトピー性皮膚炎におけるカテキンの影響
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林一哉、大谷真志、佐藤英世、渡辺直子
2. 発表標題 マウス慢性皮膚炎におけるシスチントランスポーターの役割
3. 学会等名 日本動物学会関東支部 第70回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大谷真志、篠崎大輔、豊島理紗、高橋桃花、渡辺直子
2. 発表標題 アレルギー性接触皮膚炎に対するクエルセチンの抑制効果
3. 学会等名 第40回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

## 〔図書〕 計1件

1. 著者名 小林芳郎、笠原忠 編；大谷真志、小林芳郎、笠原忠、筑地信、永田喜三郎、渡辺直子 著	4. 発行年 2018年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 242
3. 書名 スタンダード免疫学 第5版	

## 〔産業財産権〕

## 〔その他〕

東邦大学 理学部生物分子科学科 大谷研究室  
<http://www.lab.toho-u.ac.jp/sci/biomol/ohitani/index.html>

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	松井 毅  (MATSUI Takeshi)  (10452442)		
研究協力者	渡邊 直子  (WATANABE Naoko)		
研究協力者	真鍋 昭雄  (MANABE Akio)		

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	深谷 佳苗  (FUKAYA Kanae)		
研究協力者	林田 瑛倫  (HAYASHIDA Akinori)		