

平成 23 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2006～2009

課題番号：18109005

研究課題名(和文) サイトカインのシグナル制御と免疫制御の分子機構

研究課題名(英文) Molecular Mechanism of Regulation of the Cytokine Signal and Immunity

研究代表者

吉村 昭彦 (YOSHIMURA AKIHIKO)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：90182815

研究成果の概要(和文):

サイトカインはマクロファージや樹状細胞などの自然免疫系の細胞やT細胞などの獲得免疫系の細胞を制御する。我々はサイトカインシグナルを制御する SOCS ファミリーと Spred/Sprouty ファミリーを中心に主に遺伝子改変マウスを用いて個体レベルでの解析を行って来た。その結果 SOCS 1 や SOCS3 は転写因子 STAT を制御することで、ヘルパーT細胞(Th17 や Treg)の分化を調節することを見いだした。また Spred1 が神経芽細胞腫の原因遺伝子であることなどを明らかにした。さらに新規のシグナル制御機構として cAMP による TLR シグナルの抑制に c-fos が関与することを見いだした。また Smad2/3 が TGF β による免疫抑制に必須であることも見いだした。

研究成果の概要(英文):

Cytokines play essential roles in regulation of innate and adaptive immunity. We have investigated the function of SOCS family and Spred/Sprouty family proteins which regulate cytokine signaling, by using genetically engineered mice. We found that SOCS1 and SOCS3 regulate helper T cell differentiation including Th17 and Tregs by modulating STAT transcription factors. We also found that human *SPRED1* is responsible for neurofibromatosis type I like disease. Furthermore we discovered a novel mechanism of cAMP mediated TLR signaling suppression through c-fos. We also found that Smad2/3 is essential for immunosuppression by TGF β .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	27,200,000	8,160,000	35,360,000
2007年度	25,500,000	7,650,000	33,150,000
2008年度	21,300,000	6,390,000	27,690,000
2009年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2010年度	0	0	0
総計	82,500,000	24,750,000	107,250,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：サイトカイン シグナル伝達 チロシンキナーゼ 転写因子 ヘルパーT細胞
樹状細胞 Ras c-fos

1. 研究開始当初の背景

申請者らは世界にさきがけてサイトカインによって誘導される遺伝子CISを発見し、さらにJAK2のキナーゼドメインと直接結合しそのキナーゼ活性を抑制しうる分子SOCS1/JAB (JAK binding protein)をクローニングした (*Nature*, 1997)。またこれらが新しい遺伝子ファミリー (CIS/SOCSファミリー)を形成することを見いだした。2001年にはサイトカイン、増殖因子によるERK活性化を選択的に抑制する分子Spredを発見した (*Nature*, 2001)。

生化学的な解析からSOCS1, SOCS3によるJAKキナーゼ活性抑制の分子機構の解明はほぼ完了している。しかしSOCS1とSOCS3の機能的な重複性や生理機能に関しては不明な点が多い。そこでCre-loxPシステムを利用してコンディショナルKOマウスを作製し、特にT細胞、樹状細胞、造血系を中心に解析を行ってきた。その結果SOCS1はT細胞や樹状細胞のSTAT1活性化を抑制しTh1分化を抑制することを明らかにした。

一方T細胞や樹状細胞でのSOCS3欠損はむしろ免疫抑制的に働く。SOCS3欠損細胞は強力なSTAT3活性化が認められる。IL-6は様々な炎症で発現が上昇しSTAT3を介して炎症の拡大に関与する。しかし一方でIL-10によって活性化されるSTAT3はケモカインの産生抑制やTLRシグナルを抑制し抗炎症に働く。我々はSOCS3がIL-6とIL-10の作用の選別のメカニズムのひとつであることを報告した (*Nature Immunol.* 2003)。さらに最近我々はSOCS3欠損T細胞はTGF- β の発現が上昇し制御性T細胞として働くこと、SOCS3欠損樹状細胞ではMHC発現低下によってT細胞のアナジーを誘導するなど特徴的な性質があることを見いだしている。すなわちSOCS3は抗原提示細胞およびT細胞において欠損することで免疫寛容を誘導する。これはSOCS1の場合と全く正反対である。

以上のようなSOCS欠損マウスの解析からサイトカインシグナルの制御が中枢トレランスと末梢トレランスの両者に重要な役割を果たすことが予想される。

Spredに関して、我々はすでにKOマウスを作製している。現在Spred-1/Spred-2のダブルノックアウトマウスの解析を進行中で、Spredは胎児期でのリンパ管形成に必須の役割を果たすことを見出している。しかし胎児期に死亡するために成体での機能解析は進んでいない。このためにSpred-1コンディショナルノックアウトマウスを作製し、Spred-1/2の重複した機能を明らかにする必

要がある。

またSOCSやSpred以外の未知のサイトカイン制御因子は数多く存在すると考えられる。特にcAMP, IL-10やTGF- β による免疫抑制作用は分子レベルでの理解は十分なされていない。TGF- β 1のKOマウスの解析からTGF- β が炎症性腸疾患の抑制や自己免疫疾患の抑制に必須であることは明白であるにもかかわらず、TGF- β がどのような分子機構で免疫抑制に寄与するかは解明されていなかった。しかし、ここ数年抑制性T細胞の分野で大きなブレイクスルーがなされた。すなわちT細胞受容体刺激時にTGF- β が存在することで、抑制性T細胞のマスター遺伝子である*Foxp3*が誘導されることが示された。本研究ではcAMPとTGF- β を介した免疫抑制の分子機構の解明を行う。今後も新たな制御因子の発見とその生理機能の解明に取り組む。

2. 研究の目的

サイトカインは免疫応答のみならず造血、炎症、癌など広範な疾患とも関連が深い。サイトカインはネットワークをつくり特にマクロファージや樹状細胞などの自然免疫系の細胞やT細胞などの獲得免疫系の細胞を制御する。これらの作用を細胞内のシグナル伝達の観点から理解し、新たな免疫調節の方法論を開発することが求められている。さらにTh17やiTregなどの新たな細胞集団も発見されこれらの発生、分化、機能制御を理解する上でも、サイトカインのシグナル制御についての理解が求められている。

申請者らは世界にさきがけてサイトカインによって誘導されそのシグナルを負に制御する分子群CIS/SOCSファミリーとSpred/Sproutyファミリーを発見した。本研究ではこれらの分子を各種臓器において特異的に欠失したマウス(cKOマウス)を作製し解析を行い、サイトカインシグナルの制御による免疫ホメオスタシス維持の分子機構とその破綻による免疫関連疾患の発症機構を解明することを目的とする。また未解明の免疫制御機構、例えばcAMPやTGF- β による免疫抑制の分子機構を解明し、炎症性疾患や自己免疫疾患との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)SOCS1およびSOCS3コンディショナルノックアウト(cKO)マウスの作製と解析
SOCS cKOマウスは常法に従いSOCS1遺伝子のcoding領域の両側にfloxed配列を挿入したベクターを構築し、ES細胞に相同組み替えに

よって本来の SOCS 遺伝子と入れ替える。薬剤耐性マーカーである neo 遺伝子を除いた後にプラスミドにインジェクションを行いキメラマウスを得る。さらにこのキメラマウスから野生型マウスとの交配によって germ-line に SOCS-flox 遺伝子が導入されたヘテロマウスを得る。Cre-トランスジェニック(Tg)マウスもしくはノックインマウスとの交配により cKO マウスを得る。T 細胞特異的 cKO には Ick-Cre、肝臓特異的 cKO には Alb-Cre、マクロファージ特異的 cKO には LysM-Cre、樹状細胞特異的 cKO には CD11c-Cre、Treg 特異的 Cre には Foxp3-Cre などを用いて各種臓器特異的、細胞特異的 SOCS 欠損マウスを得る。

(2) Spred コンデショナル KO マウスの作製
SOCS1-flox マウスの作製と同様の手法で Spred-1-flox マウスを得る。flox マウスを効率よく得るために neo 遺伝子の両側に FRT 配列を挿入し F1p レコンビナーゼによって neo 遺伝子を欠失させる。

(3) 新規免疫抑制物質の探索と機能解明

我々は樹状細胞を生きた繊維芽細胞と co-culture すると LPS による樹状細胞の成熟が強く抑制され、T 細胞の活性化も抑制されることを見いだした。トランスウエルを用いた実験からこの現象には細胞膜成分(接触)と液性因子が関与することがわかった。そこでまず液性因子の精製を行うこととした。繊維芽細胞の培養上清を分子ふるいにかけて高分子と低分子分画に分ける。LPS による TNF や IL-12 産生の抑制を指標に HPLC による精製を行う。最後に質量分析により活性分画の分子を同定する。エーターやペプチドによって抑制される。IL-10 は STAT3 を介して炎症性サイトカインの産生を抑制することが明らかになっている。一方、その他のメディエーターは細胞内 cAMP 濃度の上昇を介して抑制する。PGE2 などによって処理された樹状細胞は IL-10 産生抑制性 T 細胞(Tr1)を誘導することが知られており、cAMP は免疫制御の上で極めて重要と考えられる。しかし cAMP のサイトカイン産生抑制の分子基盤はほとんど理解されていない。本研究では cAMP によって誘導される遺伝子に注目して、cAMP の抑制作用の本体の同定を行った。

(4) TGF による免疫抑制機構の解明

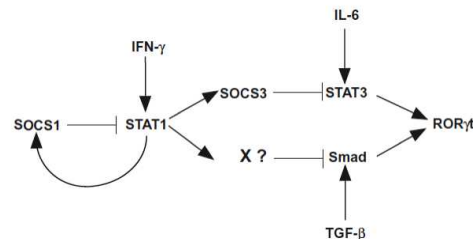
TGF-による免疫抑制機構の解明を旨として以下の実験を行う。TGF によって誘導される Foxp3 と ROR γ t のプロモーター解析を行い誘導の分子機構を解明する。TGF-Smad による免疫抑制機構の本質を理解するために Smad2/3cKO マウスを作製し解析を行う。

4. 研究成果

(1) SOCS の免疫制御における機能解明

近年 Th1/2 に加えて誘導性 Treg(iTreg)や Th17 など Th 細胞の新たなサブセットについての報告・知見が集積してきており、免疫の恒常

性維持もしくは破綻はこれらの様々な Th 細胞群のバランスにより生じるのではないかと考えられるようになってきている。T 細胞特異的に SOCS1 や SOCS3 を欠損した cKO マウスを作製し、様々な生化学的解析から SOCS1 は IFN γ のシグナルを抑制することで Th17 促進に、SOCS3 は IL-6 や IL-23 を抑制することで Th17 抑制に作用することを明らかにした (Pro.NAS, USA2007, J.Immunol. 2008)。さらに SOCS1 欠損においては STAT1 が未知の機構を介して Smad を抑制している実態が明らかとなった。このスキームを下図に示す。



抑制性のヘルパーT 細胞としては胸腺由来の nTreg の他、最近 TGF によって誘導される iTreg が注目されている。SOCS3 欠損 T 細胞では TGF や IL-10 の産生が高く SOCS3 は T 細胞において抑制性 T 細胞の分化を制御する可能性が示された。一方 SOCS1 欠損 T 細胞では nTreg が胸腺で 2 倍以上に増加し機能的にも異常である (Immunity 2009, Cell, 2010)。

SOCS3 欠損樹状細胞の解析を通じて TGF が Foxp3 陽性 Treg の expansion に極めて重要であることを発見し報告した (J.Immunol. 2007)。すなわち SOCS3 欠損樹状細胞は抑制性 T 細胞を産み出す、寛容誘導型の樹状細胞であると言える。SOCS3 が STAT3 を介して TGF の産生を制御することが示唆された。これらの結果から、TGF が Foxp3 陽性 Treg の誘導に必須であること、および SOCS3 は樹状細胞が免疫応答を引き起こすか免疫寛容を引き起こすかの決定に重要であることが示された。

(2) 新規免疫抑制物質の探索と機能解明

PGE2-cAMP 経路の自然免疫抑制効果の発見
我々は樹状細胞を生きた繊維芽細胞と co-culture すると LPS による樹状細胞の成熟が強く抑制され、T 細胞の活性化も抑制されることを見いだした。精製の結果、繊維芽細胞から産生される、TNF や IL-12 産生の抑制因子はプロスタグランジン E2 (PGE2) であった (Int. Immunol. 2008)。

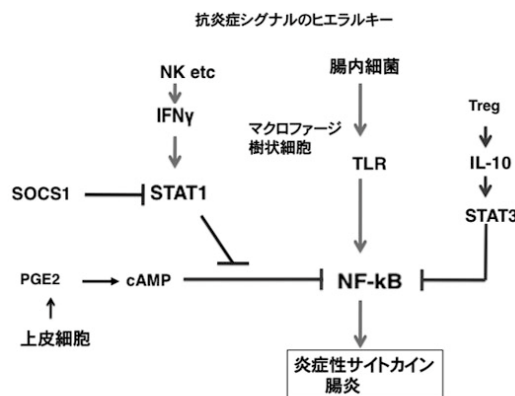
PGE2 は細胞内 cAMP 濃度の上昇を介して樹状細胞からの TNF や IL12 産生を抑制する。本研究では cAMP によって誘導される遺伝子に注目して、cAMP の抑制作用の本体の同定を行った。まずタンパク合成阻害剤シクロヘキシミドの効果から cAMP が抑制効果を発揮するためには新規タンパク合成が必要と考えられた。そこでマイクロアレイ解析を行った結果、我々は

c-fos を cAMP による抑制効果を担う因子の候補として同定した。*c-fos* 遺伝子をマクロファージ系の細胞 (Raw 細胞) に強制発現することで LPS による TNF の誘導を強力に抑制することができた。逆に siRNA により *c-fos* 発現を抑制すると cAMP の抑制効果が失われた。さらに我々は LPS または cAMP 単独刺激と比較して LPS+cAMP 共刺激によって、*c-Fos* タンパク質レベルが極めて増加することを見いだした。

次に我々は *c-Fos* の炎症性サイトカイン産生抑制機構を解析した。*c-Fos* は NF- κ B p65 サブユニットと物理的に相互作用することによって、p65 ホモダイマーの TNF α プロモーターや IL-12 プロモーターへのリクルートを阻害していた。また cAMP によって *c-fos* の mRNA が発現誘導され、TLR の下流で活性化された IKK が *c-Fos* を直接リン酸化することによって、*c-Fos* の安定化と蓄積を引き起こすことがわかった。*c-Fos* の複数箇所が IKK によってリン酸化を受けるが、*c-Fos* の 308 番目のセリン残基が IKK β によるリン酸化と安定化に必要な残基の一つであることを明らかにした。これらの結果から、我々は *c-Fos* が IKK の新規基質であること、および cAMP による免疫抑制効果を担う因子であると結論づけた。以上の本研究成果は 2010 年 *Immunity* 誌に掲載された。

PGE2 を介した新規の免疫抑制システムとその生理的な意義の発見

次に Rag 欠損マウスに COX 阻害剤を投与することで PGE2 システムが個体の消化器官における炎症抑制に必須であること、および STAT1 の過剰な活性化によって破綻することを見いだした (*Nature Commun.* 2011)。またこの系は IL-10/Treg とは独立した存在であることや、STAT1 によって破綻することも見いだした (下図)。



Chinen et al. *Nature Commun.* 2011 Feb;2: art. No.190.

(3) TGF- β /Smad による免疫抑制作用の解析

これまで長らくヘルパー T 細胞のドグマとされてきた Th1/Th2 の概念にここ数年大きな変化がもたらされている。新しいエフェクター T 細胞である Th17 と誘導性の抑制性 T 細胞、iTreg の

発見である。Th17 は IL-17 を高産生するヘルパー T 細胞で、自己免疫性脳脊髄炎モデル (EAE) の発症に必要な T 細胞として発見された。Th17 の初期分化には TGF- β と IL-6 が必要でこれが Th17 のマスター遺伝子である転写因子 ROR γ t を誘導する。さらに IL-23 の作用で成熟した炎症性の高い Th17 に成熟すると考えられている。我々は TGF- β の免疫抑制機構について転写因子のレベルでの解析を行っている。TGF- β は Smad2 と Smad3 を活性化する。T 細胞特異的 Smad2 欠損マウスは EAE が軽症化するが、これは Th17 の抑制と関連していた。しかし Smad2、Smad3 欠損マウスの解析から Th17 のマスター遺伝子である ROR γ t の誘導には Smad2/3 は必要ないことが明らかとなった。Smad2 欠損 T 細胞では Th1 や Th2 サイトカインの産生が高くなるために間接的に Th17 分化が抑制されることを見いだした (*J. Immunol.* 2010)。

(4) Spred1 が家族性神経細胞腫の原因遺伝子であることの発見

ベルギー、フランス、アメリカとの国際共同研究において、カフェオレ斑を持つが、*NF1* 遺伝子に変異を認めない家族性優性遺伝の神経線維腫症 1 型様患者での解析を行った。その結果ヒト *SPRED1* に多数の変異を発見し報告した。*SPRED1* は neuro-cardio-facial-cutaneous (NCFC) 症候群の原因遺伝子の一つであり、Ras 経路を抑制する新しい癌抑制遺伝子の候補であることが示唆された (*Nature Genetics* 2007、*JAMA* 2009)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 40 件) 以下は代表的な論文

(1) Chinen T, Komai K, Muto G, Morita R, Inoue N, Yoshida H, Sekiya T, Yoshida R, Nakamura K, Takayanagi R, Yoshimura A. *Nature Commun.* 2011 Feb;2:190.

(2) 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.

(3) 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.

(4) Shichita T, Sugiyama Y, Ooboshi H, Sugimori H, Nakagawa R, Takada I, Iwaki T, Okada Y, Iida M, Cua DJ, Iwakura Y, Yoshimura A. Pivotal

role of cerebral interleukin-17-producing gammadeltaT cells in the delayed phase of ischemic brain injury. **Nature Med.** 2009 Aug;15(8):946-50.

(5) Nakaya M, Hashimoto M, Nakagawa R, Wakabayashi Y, Ishizaki T, Takada I, Komai K, Yoshida H, Yoshimura A. SOCS3 in T and NKT cells negatively regulates cytokine production and ameliorates ConA-induced hepatitis. **J Immunol.** 2009 Dec 1;183(11):7047-53.

(6) Messiaen L, Yao S, (他 30 名) Taniguchi K, Ayada T, Okamoto F, Yoshimura A, Parret A, Korf B, Legius E. Clinical and mutational spectrum of Legius syndrome **JAMA** 2009 Nov 18;302(19):2111-8.

(7) Taleb S, Romain M, Ramkhelawon B, Uyttenhove C, Pasterkamp G, Herbin O, Esposito B, Perez N, Yasukawa H, Van Snick J, Yoshimura A, Tedgui A, Mallat Z. Loss of SOCS3 expression in T cells reveals a regulatory role for interleukin-17 in atherosclerosis. **J Exp Med.** 2009 Sep 28;206(10):2067-77.

(8) Taniguchi K, Sasaki K, Watari K, Yasukawa H, Imaizumi T, Ayada T, Okamoto F, Ishizaki T, Kato R, Kohno R, Kimura H, Sato Y, Ono M, Yonemitsu Y, Yoshimura A. Suppression of Sproutys has a therapeutic effect for a mouse model of ischemia by enhancing angiogenesis. **PLoS ONE.** 2009;4(5):e5467. doi:

(9) Koga K, Takaesu G, Yoshida R, Nakaya M, Kobayashi T, Kinjyo I, Yoshimura A. Cyclic adenosine monophosphate suppresses the transcription of proinflammatory cytokines via the c-Fos protein phosphorylated by IKKbeta **Immunity** 2009 30(3): 372-383

(10) Lu LF, Thai TH, Calado DP, Chaudhry A, Kubo M, Tanaka K, Loeb GB, Lee H, Yoshimura A, Rajewsky K, Rudensky AY. Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. **Immunity.** 2009 30(1):80-91.

(11) Takaki H, Ichiyama K, Koga K, Chinen T, Takaesu G, Sugiyama Y, Kato S, Yoshimura A, Kobayashi T. STAT6 inhibits TGF-beta 1-mediated Foxp3 induction through direct binding to the Foxp3 promoter, which is reverted by retinoic acid receptor. **J Biol Chem.** 2008 283(22):14955-62

(12) Tanaka K, Ichiyama K, Hashimoto M, Yoshida H, Takimoto T, Takaesu G, Torisu T, Hanada T, Yasukawa H, Fukuyama S, Inoue H, Nakanishi Y, Kobayashi T, Yoshimura A. Loss of Suppressor of Cytokine Signaling 1 in Helper T Cells Leads to Defective Th17 Differentiation by Enhancing Antagonistic Effects of IFN- γ on STAT3 and Smads. **J Immunol.** 2008 15;180(6):3746-56.

(13) Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. **Nat Rev Immunol.** 2007 Jun;7(6):454-65.

(14) Brems H, Chmara M, Sahbatou M, Denayer E, Taniguchi K, Kato R, Somers R, Messiaen L,

De Schepper S, Fryns JP, Cools J, Marynen P, Thomas G, Yoshimura A, Legius E. Germline loss-of-function mutations in SPRED1 cause a neurofibromatosis 1-like phenotype. **Nature Genet.** 2007 39(9):1120-6.

〔学会発表〕(計 15 件)

国際学会招待講演のみ記載

(1) Akihiko Yoshimura SOCS is a molecular link between inflammation and cancer development. International symposium of infection-associated cancers

Conference Hall of Hokkaido University in Sapporo, Hokkaido, Japan, March 3 to 4, 2010.

(2) Akihiko Yoshimura Role of SOCS1 in innate and adaptive immune tolerance World Immune Regulation Meeting IV 2010 3/29-4/1 Davos Switzerland

(3) Akihiko Yoshimura Molecular basis for immune suppression by TGFb/Smad2/3 5th Leukocyte Signal Transduction Workshop, sponsored by Aegean Conferences Aldeamar Knossos Royal Village in Hersonissos, Crete, Greece, June 13 -18, 2009.

(4) Akihiko Yoshimura SOCS1 and SOCS3 are Critical Regulators of Cytokine Signaling; Implication for Helper T Cell Differentiation and Tumor Development. KEYSTONE SYMPOSIA on Molecular and Cellular Biology Keystone USA 2007/1/5-10

(5) Akihiko Yoshimura SOCS1 is a link between inflammation and inflammation-mediated carcinogenesis. 5th International Aachen Symposium on Cytokine Signalling, Aachen Germany 2007/3/29-31

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 昭彦 (YOSHIMURA AKIHIKO)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：90182815

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし