

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590499

研究課題名（和文） PI3K-p38MAPK 経路による樹状細胞機能の制御機構

研究課題名（英文） Regulation of dendritic cell activation through the PI3K-p38 MAPK signaling pathway

研究代表者

松田 達志 (MATSUDA SATOSHI)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00286444

研究成果の概要：PI3K 経路が、マウス樹状細胞において、mTOR 経路・GSK3 経路・p38 MAPK 経路の少なくとも3つの経路を介して、IL-12 産生をはじめとする免疫調整能の制御を行っていることを明らかにした。これまで他の細胞で得られてきた結果と異なり、PI3K は p38 MAPK の活性化を負に制御していることから、樹状細胞においては全く新規の MAPK 制御機構が機能するものと推測される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：樹状細胞、免疫応答、MAPK、サイトカイン、PI3K、Th1/Th2 バランス

1. 研究開始当初の背景

免疫系は、微生物をはじめとした種々の異物の侵入・増殖の危機から個体を守るために、様々な免疫担当細胞からなる協調的なネットワークを形成している。中でも自然免疫系と獲得免疫系の橋渡的存在である樹状細胞は、免疫系の司令塔である T 細胞に抗原を提示すると同時に種々のサイト

カインを生産することで、免疫系が Th1 反応（細胞性免疫反応）を示すか、Th2 反応（液性免疫反応）を示すかを規定する役割を担っている。Th1 反応が細胞内寄生菌やウイルス感染細胞の除去・がん細胞の排除などに重要な役割を果たす一方、Th2 反応は寄生虫の排除などに関与する。これら Th1/Th2 反応のバランスが崩れると、自

己免疫疾患や各種のアレルギー症状など重篤な疾患の発症へと繋がる事が知られている。例えば、1型糖尿病や乾癬などの自己免疫疾患はTh1反応の昂進によって、喘息や花粉症・アトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患はTh2反応の昂進によって、それぞれ引き起こされる。Th1/Th2バランスに影響を与えるサイトカインの一つとして、樹状細胞の生産するIL-12が挙げられる。すなわち、IL-12を投与した個体においては免疫系がTh1反応に傾き、逆にIL-12に対する中和抗体を投与した個体ではTh2反応が有意に引き起こされる事が知られている。

申請者は、慶應義塾大学医学部の小安教授ならびに東京大学大学院医学系研究科の門脇教授のグループと共同で、PI3K欠損マウスの解析を行ってきた。申請者は、樹状細胞の解析の過程で、PI3K経路が樹状細胞によるIL-12生産を負に調節している事を見出した。しかし、その分子機構に関しては不明な点が多く残されている。従来の解析から、外界からの刺激に伴うp38 MAPK経路の活性化がIL-12の遺伝子発現において中心的な役割を果たすことが示唆されている。実際、p38 MAPK経路の活性化を特異的阻害剤で抑制するとIL-12の生産量が低下した事から、p38 MAPK経路の活性に依存してIL-12の遺伝子発現が調節されている事が強く示唆された。しかし、一般にPI3K経路はRhoファミリー分子を介してp38 MAPKを含むMAPK経路を正に制御していると考えられており、従来のモデルからは樹状細胞における挙動を説明する事はできない。そこで、PI3K経路によるマウス樹状細胞のIL-12産生制御機構にp38 MAPK経路が関与するか否か、また関与するのであればどのような制御機構に基づいているのか、の二点の解明を目指す本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、PI3K経路によるマウス樹状細胞のIL-12産生制御機構にp38 MAPK経路が関与するか否か、また関与するのであればどのような制御機構に基づいているのか、の二点の解明を目指す。前者に関しては、PI3K欠損マウスや各種PI3K阻害剤を用いることで、樹状細胞におけるPI3K活性の低下がp38 MAPKの活性化にどのような影響をもたらすか検討を行う。一方、後者のアプローチに関しては、PI3K経路の下流で機能

する何れのシグナル伝達分子が、p38 MAPK経路の活性制御に関与するかを明らかにする。

IL-12の生産は自然免疫系・獲得免疫系の両者の活性化に重要な役割を担うことから、IL-12の生産調節に関与する分子群の同定は、これら免疫系の活性調節の鍵分子の発見に繋がる事が期待される。特にPI3K経路によるp38 MAPKの負の調節経路という、これまでに例を見ないシグナル伝達の存在が樹状細胞において明らかとなるならば、その経路に関与する分子は樹状細胞で特異的に機能している可能性が強く示唆される。このような分子を標的とした分子治療法を開発する事ができれば、Th1/Th2バランスの是正を分子基盤とする、新しいタイプのアレルギー治療、自己免疫疾患治療にも繋がるものと期待される。

3. 研究の方法

本研究では、(i) PI3K経路によるマウス樹状細胞のIL-12産生制御機構にp38 MAPK経路が関与するか否か、ならびに(ii) 関与するのであればどのような制御機構に基づいているのか、の二点の解明を目指す。なお本研究では、骨髄細胞からGM-CSFにより分化誘導した樹状細胞(以下、骨髄由来樹状細胞BMDC)を対象に、生化学的・分子生物化学的なアプローチを併用することで、上記の研究目的に迫る。

(i)に関しては、LPS刺激により誘導されるp38 MAPKの活性化のレベル・キネティクスについて、野生型マウス由来BMDCならびにclass IA PI3Kの制御サブユニットであるp85aを欠失したマウス(以下、PI3K-K0マウス)由来BMDC間で比較を行い、差異が認められるか否かを評価する。また、PI3K-K0マウス由来のBMDCが分化過程に異常を有する可能性も考慮し、野生型マウス由来BMDCを、PI3K特異的な阻害剤であるwortmanninで処理した場合のp38 MAPKの活性化パターンについても解析を行う。この場合は、並行してPI3Kの下流因子であるAktの活性化の消失の有無を評価することで、PI3K経路の活性化が阻害されていることを確認する。以上の方法により、PI3K経路の活性阻害がp38 MAPK経路の活性化に影響を及ぼすか否かを明らかにする。

(i)の解析によりPI3K経路の下流にp38 MAPK経路が位置していることが明らかとなった場合には、さらに(ii)PI3K下流の何れの分子がp38 MAPK経路の活性化に関与

しているかを解明する。すなわち、PI3K 経路の下流で活性制御を受ける Akt・mTOR・GSK3 等のシグナル伝達分子が、p38 MAPK 経路の活性制御に関わっているか否かを、各種の阻害剤ならびに遺伝子改変体の強制発現系を用いて評価する。

4. 研究成果

PI3K-KO マウス由来樹状細胞ならびに PI3K 経路特異的な阻害剤を用いた解析から、LPS 刺激により誘導される p38 MAPK の活性化は、PI3K 活性抑制化に増強されることが明らかとなった。その際、活性化のキネティクスには影響が認められなかったことから、PI3K 経路は p38 MAPK 経路の活性化レベルを負に制御していることが強く示唆された。実際、PI3K 経路の抑制因子である PTEN を欠損した BMDC (注：PI3K 経路の活性が異常に亢進することが知られている) においては、p38 MAPK 経路の活性化が有意に低下していた。以上の事実は、線維芽細胞などを用いた解析から導かれている、「PI3K 経路の下流で低分子量 G タンパク質を介して p38 MAPK 経路が正に制御されている」というモデルが、少なくとも樹状細胞には当てはまらないことを意味している。そこで、PI3K 経路による p38 MAPK 経路の負の調節機構を明らかにすべく、さらなる解析を続けた。

PI3K 経路の活性化は、セリン/スレオニンキナーゼである Akt の活性化を介して、mTOR の活性化や GSK3 の不活性化等、さまざまなシグナル伝達分子の活性制御を引き起こす。そこで、mTOR 特異的阻害剤である ラパマイシンや GSK3 の特異的阻害剤である SB216763 で処理した BMDC を対象に、LPS 刺激に伴う p38 MAPK 経路の活性化の評価を行った。しかし、これらの阻害剤は p38 MAPK の活性化には何ら影響を与えなかった。そこで、Akt 阻害剤を用いた解析を計画したが、これら阻害剤は wortmannin 処理では見られない樹状細胞の細胞死を誘導したため、PI3K-Akt 経路以外に影響を与えている可能性が高いものと判断し、使用を断念した。代わって Akt の優性不能型変異体である Akt-3A (東京大学・後藤先生より供与) の過剰発現による Akt 経路の阻害を試みたが、p38 MAPK 経路の活性化に影響は認められなかった。実際、恒常活性型 Akt の発現により Akt 経路の活性を亢進させた場合には、PTEN 欠損樹状細胞で見られた p38 MAPK 経路の活性抑制は認められなかった。

以上の結果は、樹状細胞において、Akt を介した主要なシグナル伝達経路非依存的な p38 MAPK 活性制御機構が存在することを強く示唆している。教科書的な、低分子量 G タンパク質を介した正の制御系とは異なる制御系であることを鑑みると、樹状細胞における p38 MAPK の制御機構は全く新規の分子を介しているものと推測される。当該シグナル伝達分子が同定されたあかつきには、樹状細胞における p38 MAPK 経路の活性制御機構を標的とした、副作用の低い新規免疫制御薬の開発に繋がるものと期待される。

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 6 件)

- ① Matsuda, S., Mikami, Y., Ohtani, M., Fujiwara, M., Hirata, Y., Minowa, A., Terauchi, Y., Kadowaki, T., and Koyasu S. Critical role of class IA PI3K for c-Rel expression in B lymphocytes. (2009) *Blood* **113** (5), 1037-1044、査読有り
- ② 大谷真志, 小安重夫, 松田達志 樹状細胞のシグナル伝達 肝胆膵 58 (2)、185-192、2009、査読無し
- ③ Ohtani, M., Nagai, S., Kondo, S., Mizuno, S., Nakamura, K., Tanabe, M., Takeuchi, T., Matsuda, S., and Koyasu, S. mTOR and GSK3 differentially regulate LPS-induced IL-12 production in dendritic cells. (2008) *Blood* **112** (3), 635-643、査読有り
- ④ Fujii, Y., Matsuda, S., Takayama, G., and Koyasu, S. ERK5 is involved in TCR-induced apoptosis through the modification of Nur77. (2008) *Genes Cells* **13** (5), 411-419、査読有り
- ⑤ 松田達志, 小安重夫 TLR 刺激樹状細胞からの IL-12 生産におけるシグナル伝達 臨床免疫・アレルギー科 48 (3)、307-313、2007、査読無し
- ⑥ 松田達志, 小安重夫 フローサイトメトリの原理、技術革新 臨床検査 51 (9)、907-914、2007、査読無し

[学会発表] (計5件)

- ① Ohtani, M., Nagai, S., Kondo, S., Mizuno, S., Nakamura, K., Tanabe, M., Takeuchi, T., Matsuda, S., and Koyasu, S. mTOR and GSK3 differentially regulate LPS-induced IL-12 production in dendritic cells. 第10回国際樹状細胞シンポジウム (2008年10月1日~5日、神戸)
- ② 高山源介、松田達志、小安重夫 T細胞におけるIL-2発現に関わるPI3K γ の役割 第18回 Kyoto T cell Conference (2008年6月13日-14日、京都)
- ③ 松田達志 Class IA PI3K経路はB細胞におけるc-Relの発現制御に関与している 基生研研究会「リン酸化シグナルの統合的解明を目指して」(2008年4月18日-19日、岡崎)
- ④ Yokoyama, T., Takae, Y., Amagai, M., Matsuda, S., and Koyasu, S. Suppressive effects of CD4+CD25+ regulatory T cells in Pemphigus Vulgaris model mice. 第37回日本免疫学会総会・学術集会 (ワークショップ) (2007年11月20日-22日、品川)
- ⑤ Minowa, A., Matsuda, S., Hiromatsu, K., and Koyasu, S. The role of p85 α PI3K regulatory subunit in maintenance of mast cell progenitor in mouse small intestine. 第37回日本免疫学会総会・学術集会 (2007年11月20日-22日、品川)

[その他]

ホームページ

<http://www3.kmu.ac.jp/bioinfo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 達志 (MATSUDA SATOSHI)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00286444

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し