

機関番号：35302
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20500275
 研究課題名（和文） シグナル伝達系パスウェイの挙動に基づく細胞群シミュレーション法の確立
 研究課題名（英文） Development of simulation method of cell group population based on signal transduction pathway's behaviors
 研究代表者
 山田 訓 (YAMADA SATOSHI)
 岡山理科大学・工学部・教授
 研究者番号：20393506

研究成果の概要（和文）：

ヘルパーT細胞のサブタイプの分化のモデル化を題材に細胞内反応と細胞群の挙動を同時に計算する手法を開発した。サブタイプに分化する前の Th0 内の転写因子相互作用とサイトカインによる分化・増殖の影響をモデル化し、Th17 と iTreg の TCR 刺激強度依存性と TGF- β 濃度依存性を再現することができた。その際に、Foxp3 で誘導され ROR γ t の効果を抑制する未知の抑制因子が必要であることがわかった。樹状細胞と nTreg を加えた系で iTreg の生理的役割を解析した。

研究成果の概要（英文）：

The computer model which simultaneously calculates intra-cellular reactions and population of cell groups was developed by constructing a model of the helper T cell differentiation. The model contained the interactions among transcription factors in Th0 and simple interactions among subtypes through cytokines. This model mimicked TCR-stimulation strength dependency and TGF- β dependency of Th17 and iTreg. To simulate such behaviors, an unknown inhibitory factor, which is induced by Foxp3 and inhibits ROR γ t actions, is required. The physiological role of iTreg was analyzed by the simulation of the system containing dendritic cells and nTreg.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： バイオインフォマティクス

科研費の分科・細目： 情報学・生体生命情報学

キーワード：ヘルパーT細胞、免疫ネットワーク、転写因子、サイトカイン、シミュレーション、iTreg、Th17

1. 研究開始当初の背景

シグナル伝達系パスウェイは細胞外の状況変化を感知し、適切な細胞応答をするための細胞内反応系である。多くのシグナル伝達系パスウェイの存在と反応経路が解明され

たが、制御メカニズムの解明や組織レベル・個体レベルの挙動に対する影響は解析できていない。シグナル伝達系パスウェイの生理学的役割を解明するためには、シグナル伝達系パスウェイの挙動を調べると共に関係す

る細胞の細胞群の挙動を調べることが必要である。シグナル伝達系パスウェイの挙動をシミュレーションしつつ、細胞群の挙動をシミュレーションする手法の確立が必要である。

免疫系は多種類の細胞によって構成され、その微妙なバランスによって反応が制御されている。また、免疫系では多種類のサイトカインを介して細胞の活動が制御されているので、個々の細胞の挙動や免疫系全体の挙動を解析するには、シグナル伝達系パスウェイの挙動の影響を考慮する必要がある。免疫系中でも中心的な役割を持つヘルパーT細胞分化は、シグナル伝達系パスウェイの挙動と細胞群の挙動を同時にシミュレーションするモデルの格好の題材である。

抗原を捕捉した樹状細胞は感染局所から2次リンパ組織に移動し、ここで胸腺から遊離して来た未感作T細胞を活性化する。ヘルパーT細胞は増殖と分化、成熟し、B細胞に抗体産生を促進する指令を出す。さらに活性化されたヘルパーT細胞は炎症部位に移行してマクロファージやCTLを活性化する。ヘルパーT細胞には、いくつかの種類があり、特有のサイトカインによって誘導される。この際に生じる細胞種の割合によって免疫系全体の反応様式が変化する。従って、ヘルパーT細胞の増殖・分化のモデル化が、免疫系全体の反応予測のキーになると考えられる。最近までヘルパーT細胞はTh1, Th2の2種類が主な機能的T細胞と考えられて来たが、最近Th17, iTreg等が発見されてより複雑化している。

我々は、既にシグナル伝達系パスウェイのモデル化(JAK/STAT系とRas/MAPK系)及びTh1/Th2分化のモデル化を行っており、次のステップのモデル化を行う準備ができています。

2. 研究の目的

シグナル伝達系パスウェイが組織レベルや個体レベルでの生理反応に及ぼす影響と制御メカニズムを解明するためのツールとして用いるために、シグナル伝達系パスウェイの挙動と細胞群の挙動を同時に計算するモデル化の手法をヘルパーT細胞分化のモデル化を題材として確立する。

3. 研究の方法

ヘルパーT細胞は未感作T細胞(Th0)が抗原刺激を受けるとその際の状況に応じ、各種ヘルパー細胞に分化する。この過程をモデル化し、抗原刺激の状態によって最終のヘルパーT細胞の割合を予測し、免疫反応を予測できるモデルを構築する。

(1) 第一段階のモデル

第一段階のモデルでは、各種細胞の増殖・

分化に対するサイトカインの効果を下記の簡略化した式でモデル化する。

促進性の場合

$$k = k_{\max} \left(x + (1-x) \frac{[C_i]}{K_i + [C_i]} \right) \quad (1)$$

抑制性の場合

$$k = k_{\max} \left(1 - (1-x) \frac{[C_i]}{K_i + [C_i]} \right) \quad (2)$$

ここで、 k は反応速度、 k_{\max} は最大反応速度、 x は反応の割合、 K_i は定数、 $[C_i]$ はサイトカイン C_i の濃度である。上記の式は、これまでに行ったシグナル伝達系パスウェイのシミュレーション結果を近似した式になっている。

これまでに生物学実験で得られたヘルパーT細胞サブタイプに対するサイトカインの影響を組み込み、図1のようなモデルを構築し、シミュレーションを行う。

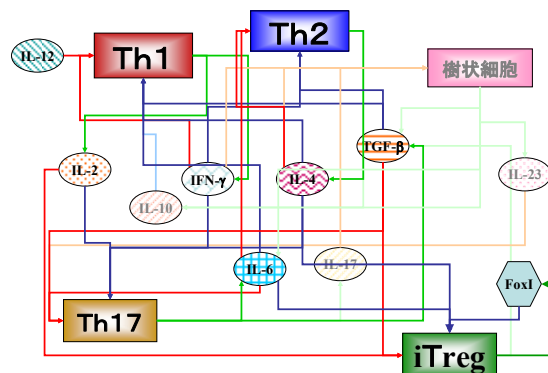


図1 第一段階のモデル

モデルに含まれる各種パラメータは、連携研究者である慶応大吉村が行った生物実験結果に適合するように、設定した。

(2) 第二段階のモデル

第二段階モデルでは、上記のサイトカインによるサブタイプ間の相互作用に加え、Th0細胞内での転写因子間の相互作用をモデル化した。転写因子は、サイトカイン濃度に依存して、増加したり減少したりするようにモデル化した。Th0内の転写因子の変化は(1), (2)式に類似した式で近似した。さらに、生物実験から得られた転写因子間の相互作用(Foxp3による転写因子生成の抑制、Foxp3とROrytの結合など)を組み込んだ(図2)。転写因子の濃度に依存して、Th0から各サブタイプへの分化の速度が変化する。その依存性を、(1), (2)式と類似した式を用いて近似した。転写因子の活性化と分化の転写因子依存性もシグナル伝達系パスウェイのシミュレーションで得られた結果を近似した式になっている。

また、分化したサブタイプから別のサブタイプにさらに分化する現象が知られているので、この再分化もモデル化した。

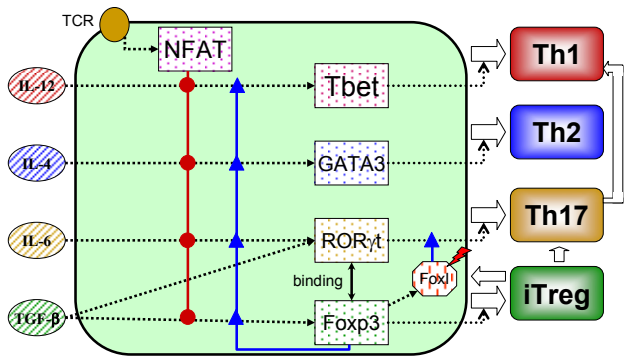


図2 第二段階モデル (Th0 細胞内の転写因子間相互作用のモデル)

サイトカインを介したサブタイプ間の相互作用は第一段階のモデルと同様である (図1)。

第二段階のモデルのパラメータも、連携研究者である慶応大吉村の生物実験結果に適合するように設定した。

4. 研究成果

(1) 第一段階のモデルの結果

サイトカインの各サブタイプに対する効果を生物実験結果に基づき、(1)式、(2)式の簡略化したモデルでモデル化した。その際に、iTregの細胞数の時間経過 (最初増加するが、途中から減少し、ピークを形成する) を再現するためには、Foxp3で誘導され、iTregの増殖を抑制する作用のある未同定の抑制性因子が必要であることがわかった。この未同定の抑制性因子 (FoxInh と名付けた) を組み込むと、図3左図のような時間経過になるが、FoxInhがないと (右図)、iTregが減少しなかった。iTregの時間経過を再現するためには、このような抑制性因子が必要なことがわかった。

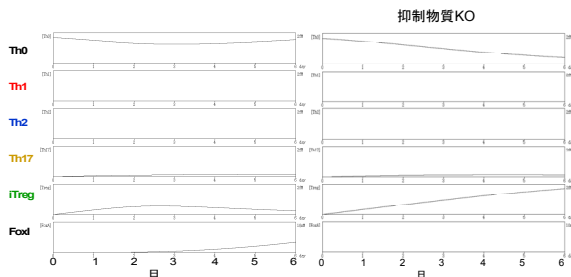


図3 第一段階のモデルから得られた各サブタイプの時間経過。左図: TGF-β 10nM, IL-6 10nM 添加。右図: FoxInh を含まないモデルの時間経過。

このモデルを用いて、各サブタイプを誘導するサイトカインの条件 (Th1: IL-12, Th2: IL-4, Th17: TGF-β+IL-6, iTreg: TGF-β) でシミュレーションしたところ、各サブタイプの割合が、生物実験結果とほぼ一致することがわかった (図4)。

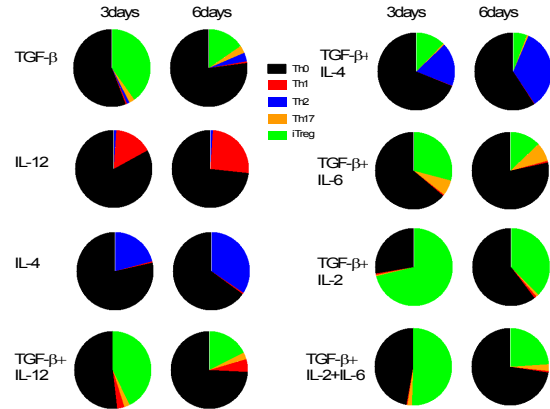


図4 各条件下での誘導された各サブタイプの割合。

(2) 第二段階のモデルの結果

第一段階のモデルで、各サブタイプの大きな割合を再現することができた。しかし、細胞内シグナル伝達系パスウェイの挙動をシミュレーションしていないので、精度の点で問題がある。全てのシグナル伝達系パスウェイをモデル化することも可能であるが、パラメータが非常に多くなってしまい、ヘルパーT細胞分化の制御メカニズムを解析することが困難になる。ヘルパーT細胞分化で重要であると考えられている、Th0細胞内の転写因子の活性化と転写因子間相互作用をモデル化した。このモデルはシグナル伝達系パスウェイの挙動と細胞群の挙動を同時にシミュレーションするモデルの最初のステップである。

生物学実験で得られた結果に適合するようにパラメータを設定した結果、以下の結果が得られた。

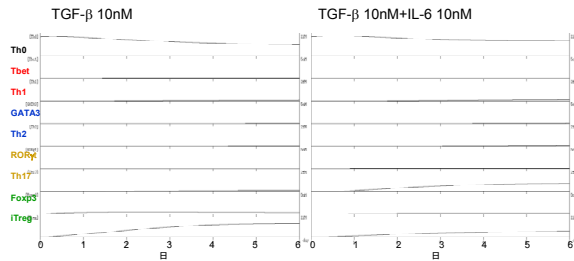


図5 第二段階のモデルから得られた各サブタイプの時間経過。左図: TGF-β 10nM 添加、右図: TGF-β 10nM, IL-6 10nM 添加。

iTreg を誘導する条件 (TGF- β 10nM 添加: 図 5 左図) と Th17 を誘導する条件 (TGF- β 10nM, IL-6 10nM 添加: 図 5 右図) の時間経過を調べると図 5 のように、各サブタイプが誘導された。この結果は、生物実験結果と一致している。

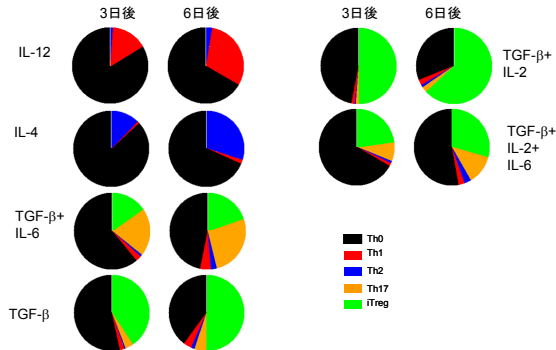
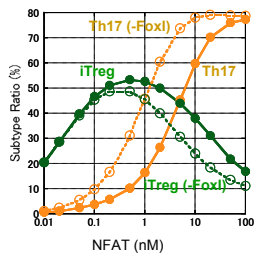


図 6 様々なサイトカインを添加した場合の各サブタイプの割合。

このモデルで各サブタイプを誘導するサイトカインの条件でシミュレーションしたところ、各サブタイプを誘導することができた (図 6)。また、IL-2 により、iTreg が増加し、Th17 が減少するという IL-2 の効果も再現することができた。

TCR 依存性
(NFAT濃度により模擬)



TGF- β 濃度依存性

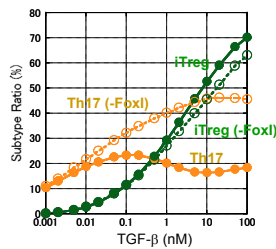


図 7 Th17 と iTreg の TCR 刺激強度依存性 (NFAT 濃度依存性) と TGF- β 濃度依存性。

TCR 刺激を受けると、Th0 細胞内では、転写因子 NFAT が活性化される。そこで、TCR 刺激強度依存性を NFAT 濃度依存性で模擬した。生物実験により、iTreg は TCR 刺激強度依存性においてピークを示し、Th17 は TGF- β 濃度依存性においてピークを示すことが知られている。この両方の依存性について検討したところ、Foxp3 で誘導され RORgt の経路を抑制する未知の抑制性因子 (FoxI と名付けた) がこの依存性、特に Th17 の TGF- β 濃度依存性を再現するのに必要であることがわかった。FoxI を組み込んだモデルでシミュレーションした結果、図 7 のような依存性が得られた。FoxI を組み込まない場合には、Th17 はピークを示さない (図 7 右図)。

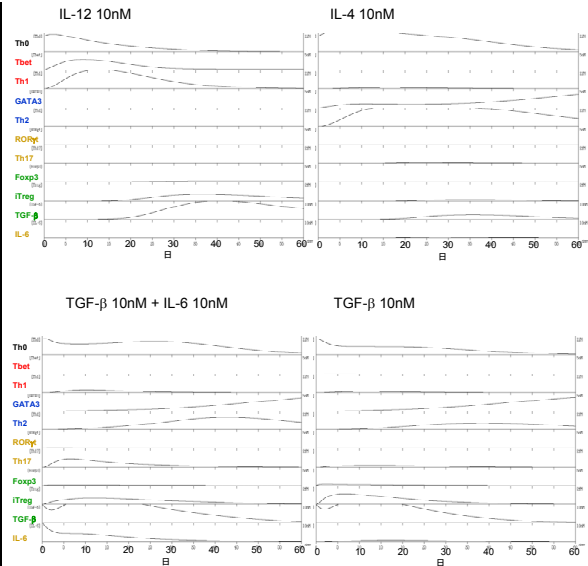


図 8 樹状細胞と nTreg を組み込んだモデルの長時間の時間経過。左上: IL-12 10nM, 右上: IL-4 10nM, 左下: TGF- β 10nM, IL-6 10nM, 右下: TGF- β 10nM。

生体内では、樹状細胞や nTreg も共存しており、これらの細胞が産生するサイトカインもヘルパー T 細胞分化に関与していると考えられる。そこで、これらの細胞も含むモデルを構築し、長時間の時間変化を調べた。すると、各サブタイプを誘導するいずれの条件でも、最初はそのサブタイプが誘導されるが、その後、iTreg が誘導され、その後、最初誘導されたサブタイプが減少するという時間経過が見られた (図 8)。これは、iTreg が刺激によって変化した免疫系を元の状態に戻す生理的な役割を持つことを示したと考えられる。

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 0 件)

[学会発表] (計 7 件)

- ① Satoshi Yamada, Akihiko Yoshimura, "Computer model of helper T cell differentiation", The 2nd Synthetic Immunology Workshop, 2010 年 12 月 18 日, 京都
- ② Satoshi Yamada, Akihiko Yoshimura, "Computer model of helper T cell differentiation with transcription factor's interactions", BMB2010, 2010 年 12 月 10 日, 神戸
- ③ Satoshi Yamada, Akihiko Yoshimura, "Computer model of helper T cell differentiation", 14th International

Congress of Immunology, 2010年8月23日, 神戸

- ④ Satoshi Yamada, Akihiko Yoshimura, "Model analysis of Helper T cell differentiation with transcriptional factor's interactions in Th0", The 20th International Conference on Genome Informatics, 2009年12月14日-16日, 横浜
- ⑤ 山田訓, 吉村昭彦, 「転写因子相互作用を含むヘルパーT細胞分化のモデル化」, 第39回日本免疫学会総会・学術集会, 2009年12月3日, 大阪
- ⑥ 山田訓, 吉村昭彦, 「ヘルパーT細胞分化のモデル化」, 第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会大会合同大会, 2008年12月9日, 神戸
- ⑦ 山田訓, 吉村昭彦, 「ヘルパーT細胞分化のモデル化」, 第38回日本免疫学会総会・学術集会, 2008年12月1日, 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 訓 (YAMADA SATOSHI)
岡山理科大学・工学部・教授
研究者番号: 20393506

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

吉村 昭彦 (YOSHIMURA AKIHIKO)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 90182815