

機関番号 : 32612

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21790468

研究課題名 (和文)

ダイオキシンレセプターによる獲得免疫および自然免疫反応の制御機構の解明

研究課題名 (英文)

Aryl hydrocarbon receptor regulates innate and acquired immune responses

研究代表者

木村 彰宏 (KIMURA AKIHIRO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号 : 20533318

研究成果の概要 (和文) :

本研究では、ダイオキシンレセプターとして知られている Aryl hydrocarbon receptor (Ahr) がマクロファージにおいて LPS による炎症性サイトカイン産生を抑制していることが明らかになった。LPS 刺激によりマクロファージが活性化されると Ahr が誘導される。その後 Ahr は Stat1 と結合しさらに NF- κ B と結合することで、NF- κ B の転写活性を抑制していることが判明した。また樹状細胞において Ahr は IDO を誘導することでキヌレリン産生を促進し、Treg の分化を誘導していることも明らかになった。

研究成果の概要 (英文) :

Ahr is induced in macrophages stimulated by LPS. The production of IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α by LPS was significantly elevated in Ahr-deficient macrophages compared to that in wild-type (WT) cells. Ahr forms a complex with Stat1 and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) in macrophages stimulated by LPS, which leads to inhibition of the promoter activity of IL-6. Ahr thus plays an essential role in the negative regulation of the LPS signaling pathway through interaction with Stat1. In dendritic cells, Ahr induces the expression of IDO, which promotes Treg cell differentiation.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野 : 基礎免疫学

科研費の分科・細目 : 基礎医学・免疫学

キーワード : Ahr、LPS、マクロファージ、関節リウマチ、自然免疫

1. 研究開始当初の背景

ダイオキシン受容体として知られている Aryl hydrocarbon receptor (Ahr) はさまざま

まな外因性・内因性由来の環境因子を認識し、さまざまな生体反応を誘導することで、環境応答因子として生体内で作用していること

が知られている。ダイオキシンなどのリガンドが Ahr と結合すると Ahr が活性化され核内へと移行し Ahr nuclear translocator (Arnt) とヘテロ二量体を形成する。Ahr/Arnt ヘテロ二量体は xenobiotic responsive element (XRE) というエンハンサー配列に結合し薬物代謝酵素などのターゲット遺伝子の転写を活性化させる。Ahr repressor (Ahrr)は Arnt や Ahr に結合することで Ahr のはたらきを阻害することが示されており、Ahrr や Arnt などの Ahr 関連因子の役割についても明らかになってきている。また Ahr は転写因子としてだけでなく E3 ユビキチンリガーゼとして oestrogen receptor- α などの標的タンパクを分解する機能があることも報告されている (Ohtake *et al. Nature*. 446:562-566, 2007)。

近年、この Ahr がさまざまな免疫応答を制御していることが発見されている。本申請者らを含めた3つの研究グループから Ahr が Th17 細胞の分化に関与していることが報告された (Kimura *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 9721-9726, 2008; Veldhoen *et al. Nature*. 453: 106-109, 2008; Quintana *et al. Nature*. 453:65-71, 2008)。本申請者らは Ahr が Th17 細胞分化に対して抑制的に作用する Stat1 の活性を抑制することで Th17 細胞の分化を促進させていることを解明した。

2. 研究の目的

Ahr は T 細胞においては炎症反応を惹起する方向にはたらき、マクロファージでは炎症反応を抑えるはたらきをしていることが示された。申請者ら以外に2つの研究グループから Th17 分化における Ahr の制御に関する論文が同時に報告されたが (*Nature* 453 : 65-71, 2008, *Nature* 453 : 106-109, 2008)、これら2つの論文において一方では Ahr は EAE の発症に促進的にはたらき、もう一方は

抑制的にはたらきという一見矛盾した結果が得られている。しかしながら申請者らの研究では細胞によって Ahr は炎症反応の起こし方に違いが生じていることから、この矛盾は Ahr が異なる細胞で機能していたことから生じた可能性がある。従ってさまざまな免疫反応や自己免疫疾患に関与している Th17 やマクロファージなどの免疫担当細胞集団における Ahr の機能の違いを解明することが重要な研究テーマになってくる。本研究は Ahr を基盤とした免疫反応の新たな制御機構の解明を目標としており、各免疫担当細胞集団レベルでの炎症反応における Ahr の役割の違いに着目した点は非常に独創的である。さらにはさまざまな自己免疫疾患においてどの免疫担当細胞が病因となり Ahr がそれら細胞をどのように制御しているのかを解明することで未だ解明されていない自己免疫疾患発症メカニズムが明らかにされることが期待される。

3. 研究の方法

(1) マクロファージにおける Ahr の作用機構の解明

これまでの研究結果から Th17 分化の状況とは異なり LPS による炎症性サイトカイン産生においては Ahr と Stat1 は共に抑制的にはたらいていることが判明している。LPS による IL-6 などの炎症性サイトカインの産生は NF- κ B を介していることが知られている。Ahr は NF- κ B と結合しその活性を制御することが報告されており (*Chem Biol Interact* 141(1-2): 97-115, 2002)、申請者らは LPS で刺激したマクロファージにおいて Ahr、Stat1、NF- κ B の3者が複合体を形成していることを発見した。そこでマクロファージにおいて Ahr は E3 ユビキチンリガーゼとしてではなく共役因子としてはたらいていること

が考えられた。まず Ahr、Stat1 および NF- κ B の3者が IL-6 のプロモーター領域に結合しているかを Chip assay を用いて確認する。さらにルシフェラーゼアッセイによって Ahr や Stat1 が LPS による IL-6 の産生に抑制的にはたらいっているかを確認する。次に LPS によって誘導されるサイトカインやケモカインの産生において Ahr や Stat1 がどの産生に関与しているのかを正確に把握するために、Ahr ノックアウト (KO)、Stat1 KO およびコントロールの WT マクロファージを LPS 刺激した後培養上清に含まれるサイトカインやケモカインの産生量についてビーズサスペンションアレイシステム (Bio-Plex) を用いて網羅的に解析する。

(2) B 細胞および樹状細胞における Ahr の作用機構の解明

T 細胞やマクロファージ以外にも B 細胞や樹状細胞 (DC) などそれぞれ獲得免疫および自然免疫においてそれぞれ重要な役割を果たしている。これら細胞においても Ahr が作用しているかを明らかにしていく。B 細胞や樹状細胞を TLR リガンドや IL-6 などで刺激し活性化させた後、RT-PCR やウェスタンブロッティング法を用いて Ahr の発現を確認していく。さらに B 細胞や樹状細胞において Ahr の発現を誘導する刺激が同定された場合には Ahr KO B 細胞あるいは樹状細胞をその刺激で刺激し Ahr により制御されている遺伝子群について DNA マイクロアレイを用いて同定していく。B 細胞や樹状細胞における Ahr の作用機構についてもマクロファージの実験計画と同様の手段で解析を進めていく。

4. 研究成果

(1) マクロファージにおける Ahr の作用機構の解明:

Ahr 欠損 (KO) マウスでは LPS に対する感受性が亢進しており、マクロファージにおいて

LPS や CpG-ODN の刺激で誘導された Ahr は IL-6 などの炎症性サイトカインを抑制していた (図 1)。その作用機序についても明らかにされ、Ahr は NF- κ B の DNA binding 活性は抑制していなかったが NF- κ B の転写活性は抑制していた。具体的には Ahr は Stat1 と協調し NF- κ B と複合体を形成することで IL-6 のプロモーター領域上で NF- κ B の転写活性を抑制していた (図 2)。これら内容に関して 2009 年度 *J Exp Med* で報告した。

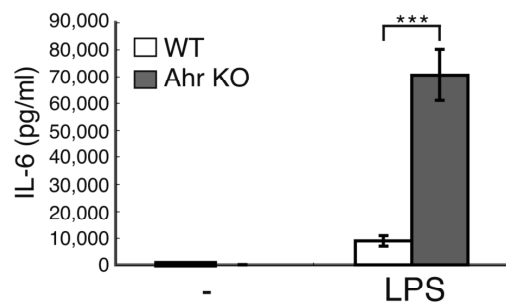


図 1. Ahr 欠損マクロファージにおける LPS 誘導性 IL-6 産生の亢進

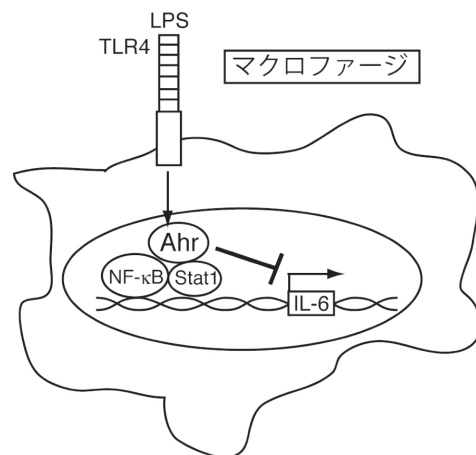


図 2. マクロファージにおける Ahr による LPS シグナル抑制機構

(2) B 細胞および樹状細胞における Ahr の作用機構の解明

DC においても LPS や CpG 刺激により Ahr が誘導されていた。マクロファージとは異なり、Ahr KO DC は WT DC と同様に LPS や CpG により IL-6 などの炎症性サイトカインが誘導されていた。しかしながら Ahr KO DC では LPS

刺激による IDO の産生が抑制されていた。その後の解析で、DC における Ahr は IDO の発現を制御しておりキヌレニン産生を促進することで、Treg の分化を誘導し Th17 細胞分化を抑制することで抗炎症にはたらくことが明らかとなった (図 3)。B 細胞においても Ahr は LPS や CpG 刺激に誘導されることが確認されたが、B 細胞における Ahr の作用機序に関しては現在解析を進めている。

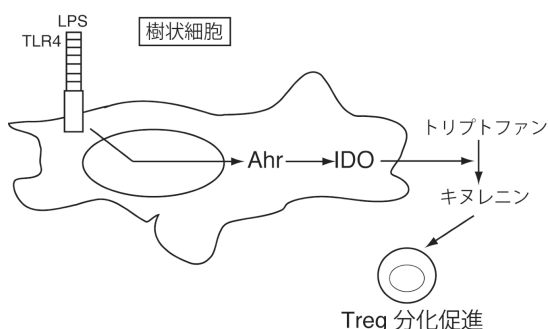


図 3. DC における Ahr による Treg 分化促進

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. Kimura A, Kishimoto T. Th17 cells in inflammation. *Int Immunopharmacol* 11: 319-322, 2011. (査読有り)
2. Hashimoto M, Hiwatashi K, Ichiyama K, Morita R, Sekiya T, Kimura A, Sugiyama Y, Sibata T, Kuroda K, Takahashi R, Yoshimura A. SOCS1 regulates type I/type II NKT cell balance by regulating IFN γ signaling. *Int Immunol* 23: 165-176, 2011. (査読有り)
3. Fujimoto M, Nakano M, Terabe F, Kawahata H, Ohkawara T, Han Y, Ripley B, Serada S, Nishikawa T, Kimura A, Nomura S, Kishimoto T, Naka T. The Influence of Excessive IL-6 Production In Vivo on the Development and Function of Foxp3+ Regulatory T Cells.

J Immunol 186: 32-40, 2011. (査読有り)

4. Kimura A, Kishimoto T. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol* 40: 1830-1835, 2010. (査読有り)

5. Nguyen NT, Kimura A, Nakahama T, Chinen I, Masuda K, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y, Kishimoto T. Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 19961-19966, 2010. (査読有り)

6. Kimura A, Naka T, Nakahama T, Chinen I, Masuda K, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y, Kishimoto T. Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses. *J Exp Med* 206: 2027-2035, 2009. (査読有り)

[学会発表] (計 4 件)

1. Akihiro Kimura and Tadimitsu Kishimoto. Ahr regulates inflammatory responses through T cell, macrophage and B cell function. 14th International Congress of Immunology Kobe, Japan, October 22, 2010.
2. 木村彰宏, 吉村昭彦 ダイオキシン受容体はリステリア感染による免疫応答を制御する 第 9 回感染症沖縄フォーラム, 沖縄国民年金健康センター, 2010 年 2 月 10 日
3. KIMURA Akihiro, NAKA Tetsuji, NAKAHAMA Taisuke, CHINEN Ichino, MASUDA Kazuya, KISHIMOTO Tadimitsu. Aryl hydrocarbon receptor regulates LPS-induced inflammatory responses together with Stat1. 第 39 回日本免疫学会総会, 大阪国際会議場, 2009 年 12 月 3 日

4. Akihiro Kimura, Tetsuji Naka, Taisuke Nakahama, Ichino Chinen, Kazuya Masuda and Tadamitsu Kishimoto. Aryl hydrocarbon receptor regulates LPS -induced inflammatory responses together with Stat1. Cellular and cytokine interactions in health and diseases Lisbon, Portugal, October 20, 2009.

[図書] (計5件)

1. 木村彰宏 : Aryl hydrocarbon receptorによる免疫応答制御機構. 臨床免疫・アレルギー科 (科学評論社) 55: 282-288, 2011.
2. 木村彰宏、岸本忠三 : Aryl hydrocarbon receptor による LPS 応答の制御. 臨床免疫・アレルギー科 (科学評論社) 53: 430-436, 2010.
3. 木村彰宏、岸本忠三 : Th17 細胞の分化と aryl hydrocarbon receptor. 臨床免疫・アレルギー科 (科学評論社) 52: 606-611, 2009.
4. 木村彰宏、仲哲治、岸本忠三 : Th17 細胞とダイオキシンレセプター. 感染・炎症・免疫 (医薬の門社) 39: 60-61, 2009.
5. 木村彰宏、仲哲治、岸本忠三 : Th17 と関節炎. 炎症と免疫 (先端医学社) 17: 21-26, 2009.

[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

<http://new.immunoreg.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村 彰宏 (KIMURA AKIHIRO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号 : 20533318

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし