

機関番号：34417

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790481

研究課題名 (和文) 樹状細胞における mTOR を介した IL-10 発現制御機構の解明

研究課題名 (英文) Analysis of the molecular mechanism of the mTOR-mediated IL-10 expression in dendritic cells

研究代表者

大谷 真志 (OHTANI MASASHI)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：20383713

研究成果の概要 (和文)：

マウス樹状細胞において、mTOR の下流に位置する eIF4E を過剰発現させると LPS 刺激に伴う IL-10 産生が増大し、eIF4E の阻害剤処理により IL-10 産生が減少した。一方、mTOR 阻害剤は、転写因子 Sp1 や c-Fos の発現、および IFN-β のオートクリン経路を介した IL-10 発現調節には影響を及ぼさなかった。すなわち、mTOR は eIF4E を介して LPS 刺激誘導性 IL-10 発現を正に制御しているが、IL-10 の正の調節因子として知られている Sp1 や c-Fos、IFN-β を介していないことが示された。

研究成果の概要 (英文)：

The overexpression of eIF4E, a downstream molecule of mTOR, enhanced IL-10 production in mouse dendritic cells, whereas the inhibition of eIF4E by inhibitor suppressed IL-10 production. The mTOR inhibitor did not influence the expression of Sp1 and c-Fos and the IFN-β-mediated IL-10 regulation through an autocrine action. These results suggest that mTOR positively regulates LPS-induced IL-10 expression through eIF4E, although not Sp1 and c-Fos, IFN-β, which are positive regulator of IL-10.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：mTOR、IL-10、サイトカイン、樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

我々は 2008 年に、従来型樹状細胞 (conventional dendritic cells: cDC) において mammalian target of rapamycin (mTOR) が LPS

などの病原体分子刺激に伴う IL-10 の発現を正に制御していることを明らかにした。その後、海外のグループにより、マクロファージを用いた同様の研究結果が報告されるとともに、DC の一群である形質細胞様樹状細胞

(plasmacytoid DC: pDC) において mTOR シグナルが IFN- α 産生を正に制御していることが報告された。このように、免疫細胞における mTOR を介したサイトカイン産生制御について世界的に注目が集まっていた。

IL-10 は抑制性サイトカインであり、炎症反応の抑制・終息、免疫寛容の誘導に関与しており、その産生異常は炎症性疾患や自己免疫疾患を引き起こす。そのため、IL-10 の産生制御機構を明らかにすることは、これらの疾患の発症機序の解明や治療法開発に重要である。IL-10 は様々な細胞から産生されるが、cDC の産生する IL-10 は、Th1・Th2 バランスの制御や免疫寛容の誘導に特に重要であると考えられている。我々は、興味深いことに、mTOR による IL-10 発現制御は、T 細胞や B 細胞といったリンパ球系細胞においては認められないことを見出した。つまり、mTOR を介した IL-10 発現の制御は cDC 特異的であると考えられ、その制御が cDC 特異的に発現している分子を介して担われている可能性が強く示唆された。その分子を明らかにできれば、DC 依存的な IL-10 産生の人為的制御の確立に繋がり、Th1・Th2 バランスの異常や免疫寛容の破綻を伴うアレルギー性疾患や自己免疫疾患の新規治療法開発へと波及するものと考えられ、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、マウスの cDC における mTOR を介した IL-10 発現制御の分子機構の解明を目的とした。mTOR はセリン/スレオニンキナーゼで、翻訳調節分子のリン酸化を介してタンパク質の合成を制御している。そこで、(1)mTOR による IL-10 発現制御が mTOR の翻訳調節機能を介して行われているか否かを明らかにするとともに、(2)mTOR の下流で IL-10 の発現制御に関わる分子の同定を試みた。

3. 研究の方法

(1) IL-10 発現制御が mTOR による翻訳調節を介しているか否かの検討

mTOR は下流に位置する翻訳調節分子であ

る p70S6K や 4EBP1 のリン酸化を介して翻訳を正に制御している。4EBP1 のリン酸化は、自信に結合した eIF4E の解離を引き起こし、eIF4E を介した cap 依存的 mRNA の翻訳が促進される。そこで、p70S6K1 や eIF4E の機能を促進もしくは抑制させた時の IL-10 発現について解析した。レンチウイルスベクターによる遺伝子導入により p70S6K1 や eIF4E を骨髓由来樹状細胞 (BMDC) に過剰発現させて、これら分子の機能を促進させた際の LPS 誘導性 IL-10 の発現を ELISA により評価した。一方、siRNA 法により p70S6K1 をノックダウンさせた BMDC、もしくは阻害剤を用いて eIF4E 複合体の機能を阻害させた BMDC における LPS 誘導性 IL-10 の発現を ELISA および real-time PCR により評価した。

(2) mTOR の下流で IL-10 発現制御に関与する転写因子の探索

①IL-10 遺伝子発現に関与する転写因子と mTOR シグナルとの関連性についての検討：IL-10 遺伝子発現に関与する転写因子のうち、Sp1 と c-Fos、ミエロイド系細胞で強く発現している C/EBP δ の三つ着目して、mTOR シグナルとの関わりを調べた。mTOR の特異的阻害剤であるラパマイシンの存在下・非存在下で LPS 刺激した BMDC におけるそれぞれの発現を Western blot にて評価した。また、C/EBP δ に関してはレンチウイルスベクターによる遺伝子導入により BMDC に過剰発現させ、LPS 刺激に伴う IL-10 発現を ELISA および real-time PCR により評価した。

②IL-10 プロモーターの mTOR 依存的な転写制御領域の探索：ラパマイシン存在下・非存在下で LPS 刺激をした BMDC 由来の核内タンパク質と、マウス IL-10 プロモーター遺伝子 (-98/-936 bp) を 6 つの断片に分けたプローブを用いてゲルシフトアッセイを行い、ラパマイシンに感受性を示す領域を探索した。

(3) オートクリン IFN- β による IL-10 発現制御と mTOR の関連性についての検討

LPS 刺激を受けた cDC から産生される IFN- β はオートクリン経路で IL-10 発現を正に制御している。前述したが、pDC では同じ I 型 IFN である IFN- α の発現が mTOR により制御されていることから、cDC の IFN- β 発現

においても同様である可能性が考えられた。そこで、ラパマイシン存在下・非存在下で LPS 刺激した BMDC における IFN- β 発現を real-time PCR により評価し、mTOR による IL-10 発現制御が IFN- β を仲介して行われているか否かを検討した。

4. 研究成果

(1) IL-10 発現制御が mTOR による翻訳調節を介しているか否かの検討

p70S6K1 を BMDC に過剰発現させても LPS 刺激に伴う IL-10 産生に変化はなかったが、eIF4E を過剰発現させた場合では IL-10 産生が増大する傾向にあった (図 1a)。一方、p70S6K1 を約 70% ノックダウンした BMDC では LPS 刺激に伴う IL-10 発現に変化はみられなかった。これは、アイソフォームの p70S6K2 が健全で p70S6K シグナルが機能していたからか、それとも p70S6K シグナルが IL-10 発現に関与していないからかは不明である。ところが、eIF4E 複合体阻害剤の 4EGI-1 で処理した BMDC では IL-10 産生の著しい減少が観察された (図 1b)。これらは遺伝子発現レベルでも同様の結果だった。また、eIF4E 複合体阻害剤は T 細胞の IL-10 産生には影響を及ぼさなかった。

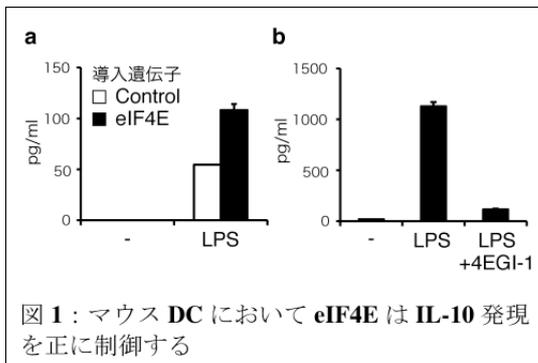


図 1: マウス DC において eIF4E は IL-10 発現を正に制御する

以上のことから、DC における LPS 刺激誘導性 IL-10 発現は mTOR-eIF4E による翻訳調節を介していることが明らかとなった。最近、mTOR が p70S6K のオルタナティブスプライシングバリエーションである p85S6K を介して GSK3 のリン酸化を制御し、結果として IL-10 発現を調節しているという報告がなされた (Wang H. *et al.*, *J. Immunol.* 186:5217-26, 2011)。すなわち、mTOR は p85S6K と eIF4E

の二つのシグナルを介して異なる機構で IL-10 の発現制御を行っていると考えられる。

(2) mTOR の下流で IL-10 発現制御に関与する転写因子の探索

① IL-10 遺伝子発現に関与する転写因子と mTOR シグナルとの関連性についての検討

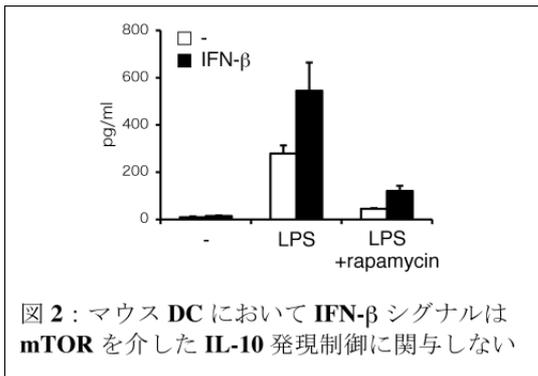
BMDC における Sp1 および c-Fos のタンパク質発現はラパマイシンおよび 4EGI-1 処理による影響を受けなかった。タンパク質発現を Western blot で検出できなかった C/EBP δ については BMDC に過剰発現させても、LPS 刺激に伴う IL-10 発現に変化は見られなかったことから、Sp1 や c-Fos、C/EBP δ は mTOR による IL-10 発現制御機構に関与していないことが示唆された。

② IL-10 プロモーターの mTOR 依存的な転写制御領域の探索

ゲルシフトアッセイの結果から、マウス IL-10 プロモーターのうち、-231/-380 bp と -791/-936 bp の領域がラパマイシン感受性を示した。この二つの領域をさらに幾つかの短い断片に分けて同様な解析を行ったが、ラパマイシン感受性領域を特定できなかった。今後、IL-10 遺伝子のプロモーター以外の領域で、DC・マクロファージ特異的に IL-10 発現に関わる領域についても検討を行う必要がある。

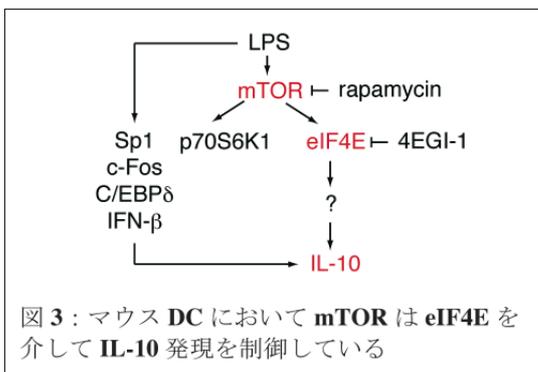
(3) オートクリン IFN- β による IL-10 発現制御と mTOR の関連性についての検討

BMDC における LPS 刺激に伴う IL-10 の発現は刺激後 2 時間目から観察され、その後 6-8 時間後でピークを迎える。一方、IFN- β 発現は刺激後 1 時間目でピークを迎えて 4 時間後には減少しており、IL-10 より早い時間に発現が誘導されていることが明らかとなった。ラパマイシン処理によってピーク時の IFN- β の発現減少が観察されたことから、IFN- β 発現の減少がオートクリン経路を介した IL-10 発現に影響を及ぼしている可能性を考えた。外因性 IFN- β を培養液中に過剰に加えてオートクリン経路による IFN- β シグナルを補完したが、ラパマイシン処理による IL-10 産生および IL-10 遺伝子発現の減少は回復しなかった (図 2、次ページ)。



また、BMDC を IFN-β で刺激した時に誘導される IRF7 や IP-10 遺伝子の発現はラパマイシンの影響を受けなかった。すなわち、mTOR は LPS 刺激に伴う IFN-β の発現誘導に関与しているものの、オートクリン経路の IFN-β シグナルには影響を及ぼしておらず、間接的な IL-10 発現制御に関与していないことが示された。

以上の結果から、マウス DC において mTOR は eIF4E による翻訳調節機能を介して LPS 刺激誘導性 IL-10 発現を制御していることが示された。一方、mTOR は Sp1 や c-Fos、C/EBPδ、IFN-β を介した IL-10 発現制御機構には関与していないと考えられた。今後は eIF4E と IL-10 を結ぶ分子の同定が必要である (図 3)。



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 1 件)

Moro K., Yamada T., Tanabe M., Takeuchi T., Ikawa T., Kawamoto H., Furusawa J.,

Ohtani M., Fujii H. and Koyasu S.

Innate production of TH2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit⁺Sca-1⁺ lymphoid cells.

Nature、査読あり、vol. 463、2010、pp. 540-544

[学会発表] (計 2 件)

① 大谷 真志、Analysis of the molecular mechanism of the mTOR-mediated IL-10 expression in dendritic cells

第 14 回国際免疫学会、2010 年 8 月 22 日～27 日、神戸、神戸国際展示場・神戸ポートピアホテル

② 大谷 真志、Analysis of the molecular mechanism underlying mTOR-mediated IL-10 expression in dendritic cells

第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日～12 日、横浜、パシフィコ横浜

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大谷 真志 (OHTANI MASASHI)
 関西医科大学・医学部・助教
 研究者番号：20383713

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし