

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2012
課題番号：23790545
研究課題名(和文) ダイオキシン受容体とその関連因子による自然免疫応答および Th 17 分化の制御
研究課題名(英文) AhR regulates innate immune responses and Th17 cell differentiation
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、ダイオキシン受容体として知られている Aryl hydrocarbon receptor (AhR) がリステリア感染による宿主免疫応答において重要な役割を担っていることを解明した。リステリア感染時において AhR はマクロファージの細胞死を抑制するとともに活性酸素(ROS)を産生することで細胞内のリステリアを効率的に排除していることを証明した。

研究成果の概要(英文): AhR plays an important role in the host defense against *Listeria monocytogenes* (LM) infection. While AhR suppresses LM-induced pro-inflammatory cytokine production, AhR inhibits the cell death of macrophages infected with LM. In addition, AhR participates in bacterial clearance through the induction of ROS.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：ダイオキシン受容体、*listeria monocytogenes*、活性酸素、マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

Aryl hydrocarbon receptor (Ahr)はダイオキシンレセプターとして知られており、薬物レセプターの一つである。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(Nature. 446:562-566. 2007)。本申請者らは最近 Ahr が Th17 細胞の分化に関与していることやマクロファージにおいて自然免疫応答を制御していることを明らかにしてきた。Ahr は 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 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 : 9721-9726, 2008)。さらにマクロファージにおいて Ahr は LPS などの自然免疫応答シグナルにより誘導され、LPS による炎症反応を抑制していることを報告した (*J. Exp. Med.* 206: 2027-2035, 2009)。LPS により活性化されたマクロファージでは Ahr は Stat1 と結合し、Ahr-Stat1 複合体がさらに NF- κ B の転写活性を阻害していることを明らかにした。また他の研究グループにより T 細胞において Ahr が c-Maf と結合することでタイプ 1 制御性 T 細胞(Tr1)の分化誘導を促進していることや(*Nat. Immunol.* 11: 854-861, 2010)、Th1/Th2 の分化バランスを制御していることなども報告されている(*J. Immunol.* 175: 7348-7356, 2005)。

以上のように Ahr はさまざまな免疫応答を制御している因子であることが解明されてきた。

2. 研究の目的

前述したように、マクロファージにおいて Ahr が自然免疫応答の制御に関与していることから、Ahr が細菌感染に対する免疫応答にも関与していることが考えられる。リステリア細菌に感染するとヒトにおいても髄膜炎、敗血症、髄膜脳炎などを引き起こすことが知られており、リステリア細菌に対する自然免疫応答の解明は重要である。リステリアを感染させたマクロファージにおいて細胞内でのリステリアの増殖やリステリア感染による炎症性サイトカインの産生に対して Ahr がどのように関与しているかを解明していくことにより、Ahr とリステリア感染による自然免疫応答との関連について明らかにしていく。

3. 研究の方法

これまでの研究結果からリステリアを感染させたマクロファージにおいて Ahr 欠損細胞では細胞質内でのリステリア菌数がコントロールに比べて有意に高くなっていることが明らかになっている。このことから Ahr 欠損マクロファージではリステリアに対する細胞質内殺菌機構が破綻あるいは弱体化していることが考えられる。そこでまずリステリア感染マクロファージにおける炎症性サイトカイン応答について検討する。Ahr 欠損マクロファージおよびコントロール細胞にリステリアを感染させた後、培養液上清のサイトカイン量を ELISA 法を用いて比較する。リステリア感染による炎症性サイトカイン応答は TLR を介していることが知られている。従って、リステリア感染後の Ahr 欠損マクロファージおよびコントロール細胞における TLR シグナル伝達に関わる因子の活性化について検証する。特に TLR 誘導性炎症性サイトカインの産生に大きく寄与している転写因子 NF- κ B の活性についてゲルシフトアッセイやウェスタンブロットティング法を用いて解析を進める。さらに *in vivo* におけるリステリア感染に対する Ahr の役割についても解析を進める。まず Ahr 欠損マウスおよびコントロールマウスにリステリアを感染させた後、生存率および血清中の炎症性サイトカイン量について比較する。またリステリアを感染させた Ahr 欠損マウスおよびコントロールマウスの脾臓におけるリステリア菌数の違いを比較するとともに、各マウスの脾臓における IFN- γ や TNF- α などのサイトカインの産生量に関しても ELISA 法を用いて比較する。この実験計画を遂行することでリステリア感染による自然免疫応答における Ahr の作用機構を解明していく。

4. 研究成果

本研究期間において、ダイオキシン受容体として知られているaryl hydrocarbon receptor (AhR)がリステリア感染に対して抵抗性を示す重要な因子の一つであることを解明した。リステリア感染によりマクロファージにおいてAhRが誘導され、AhR欠損マウスではコントロールマウスに比べ細菌感染に対する感受性が上がっていた。一方で、AhR欠損マクロファージではリステリア感染による炎症性サイトカインの産生がコントロール細胞に比べ有意に上昇していた。従って、AhRによる細菌感染に対する抵抗性の促進は炎症性サイトカインによるものでないことが示された。さらに解析を進めたところAhRはリステリア感染により誘導されるマクロファージの細胞死を抑制していることが明らかになった。AhRはapoptosis inhibitor of macrophage (AIM)という因子を誘導することでマクロファージの細胞死を抑制していた。AIMのプロモーター領域にAhR結合配列があることを確認し、リステリア感染後AhRがその領域にリクルートされることでAIMを誘導していることを解明した。AhRは細胞内に侵入したリステリアを処理するのにも重要な役割を担っていることが判明した。リステリアなどの細菌処理において重要な役割を担っているのが活性酸素(ROS)であり、AhRはこのROSの産生を促進することで細菌処理を行っていた。これまでにAhRはさまざまな免疫応答を制御していることが示されてきたが、本研究において環境応答因子の一つであるAhRが細菌感染においても重要な役割を担っていることが証明された(図1)。

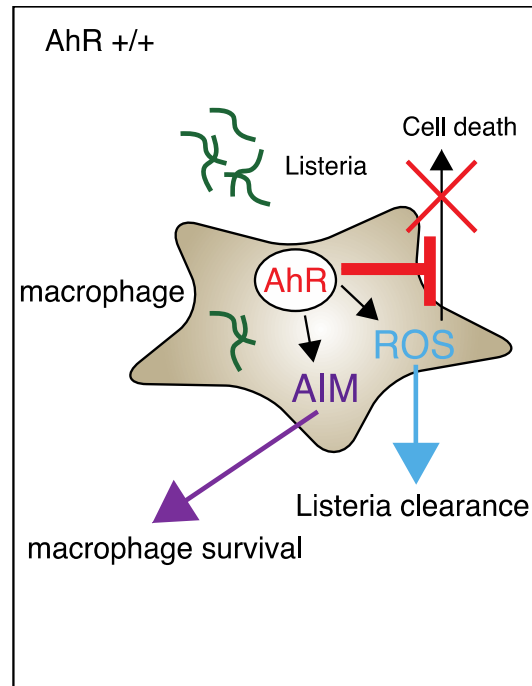


図1 リステリア感染時におけるAhRの作用機序

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10件)

1. Sekiya T, Kashiwagi I, Yoshida R, Fukaya T, Morita R, Kimura A, Ichinose H, Metzger D, Chambon P, Yoshimura A. Nr4a receptors are essential for thymic regulatory T cell development and immune homeostasis. *Nat Immunol* 14: 230-7, 2013. doi: 10.1038/ni.2520. (査読有り)
2. Hasegawa E, Sonoda KH, Shichita T, Morita R, Sekiya T, Kimura A, Oshima Y, Takeda A, Yoshimura T, Yoshida S, Ishibashi T, Yoshimura A. IL-23-independent induction of IL-17 from $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells promotes experimental intraocular neovascularization. *J Immunol* 190: 1778-87, 2013. doi: 10.4049/jimmunol.1202495. (査読有り)
3. Yoshida R, Suzuki M, Sakaguchi R,

Hasegawa E, Kimura A, Shichita T, Sekiya T, Shiraishi H, Shimoda K, Yoshimura A. Forced expression of stabilized c-Fos in dendritic cells reduces cytokine production and immune responses in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 423: 247-52, 2012. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.05.097. (査読有り)

4. Shichita T, Hasegawa E, Kimura A, Morita R, Sakaguchi R, Takada I, Sekiya T, Ooboshi H, Kitazono T, Yanagawa T, Ishii T, Takahashi H, Mori S, Nishibori M, Kuroda K, Akira S, Miyake K, Yoshimura A. Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nat Med* 18: 911-917, 2012. doi: 10.1038/nm.2749. (査読有り)

5. Sugiyama Y, Kakoi K, Kimura A, Takada I, Kashiwagi I, Wakabayashi Y, Morita R, Nomura M, Yoshimura A. Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the suppression of iNOS synthesis in macrophages by regulating IRF3 and STAT1 pathways. *Int Immunol* 24: 253-265, 2012. doi: 10.1093/intimm/dxr126. (査読有り)

6. Yoshida H, Kimura A, Fukaya T, Sekiya T, Morita R, Shichita T, Inoue H, Yoshimura A. Low dose CP-690,550 (tofacitinib), a pan-JAK inhibitor, accelerates the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis by potentiating Th17 differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 418: 234-240, 2012. doi: 10.1016/j.bbrc.2011. (査読有り)

7. Takahashi R, Nishimoto S, Muto G, Sekiya T, Tamiya T, Kimura A, Morita R, Asakawa M, Chinen T, Yoshimura A. SOCS1 is essential for regulatory T cell functions by preventing loss of Foxp3 expression as well as IFN- γ and IL-17A production. *J Exp*

Med 208: 2055-2067, 2011. doi: 10.1084/jem.20110428. (査読有り)

8. Masuda K, Kimura A, Hanieh H, Nguyen NT, Nakahama T, Chinen I, Otoyo Y, Murotani T, Yamatodani A, Kishimoto T. Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates LPS-induced IL-6 production through suppression of histamine production in macrophages. *Int Immunol* 23: 637-645, 2011. doi: 10.1093/intimm/dxr072. (査読有り)

9. Nakahama T, Kimura A, Nguyen NT, Chinen I, Hanieh H, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y, Kishimoto T. Aryl hydrocarbon receptor deficiency in T cells suppresses the development of collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 14222-14227, 2011. doi: 10.1073/pnas.1111786108. (査読有り)

10. Ichiyama K, Sekiya T, Inoue N, Tamiya T, Kashiwagi I, Kimura A, Morita R, Muto G, Shichita T, Takahashi R, Yoshimura A. Transcription Factor Smad-Independent T Helper 17 Cell Induction by Transforming-Growth Factor- β Is Mediated by Suppression of Eomesodermin. *Immunity* 34: 741-754, 2011. doi: 10.1016/j.immuni.2011.02.021. (査読有り)

[学会発表] (計4件)

1. 木村彰宏、吉村昭彦 Aryl hydrocarbon receptor is important for macrophage survival and protection against *Listeria monocytogenes* infection. 第41回日本免疫学会総会, 神戸国際会議場, 2012年12月6日

2. Akihiro Kimura, Akihiko Yoshimura. Aryl hydrocarbon receptor regulates innate immune responses to *Listeria monocytogenes*. 9th Joint Meeting of the ICS/ISICR Firenze, Italy, Oct 10, 2011.

3. 木村彰宏、吉村昭彦 Aryl hydrocarbon receptor regulates innate immune responses to *Listeria monocytogenes*. 第40回日本免疫学会総会, 幕張メッセ, 2011年12月3日

4. 木村彰宏、吉村昭彦 ダイオキシン-ダイオキシン受容体によるT細胞分化制御機構の解明 第6回日本ケミカルバイオロジー学会, 東京工業大学大岡山キャンパス, 2011年5月24日

[図書] (計2件)

1. 木村彰宏: Th17細胞の分化とIL-6の役割. 臨床免疫・アレルギー科 (科学評論社) 59: 40-43, 2013.

2. 木村彰宏: Aryl hydrocarbon receptor/IDO産生樹状細胞によるレギュラトリーT細胞の誘導. 臨床免疫・アレルギー科 (科学評論社) 57: 371-376, 2012.

[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

<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