

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 30 日現在

機関番号：34417
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790546
 研究課題名（和文） 抗原提示細胞の mTORC1 を介した IL-10 発現制御機構の解明と腸炎における役割
 研究課題名（英文） Analysis of the mechanisms of mTORC1-mediated IL-10 regulation in antigen presenting cells and the role of mTORC1 in colitis
 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）：

mTOR 複合体 1 (mTORC1) は細胞の成長や増殖に関わる分子として知られているが、我々は以前、mTORC1 が樹状細胞 (DC) の IL-10 産生を正に制御していることを明らかにした。IL-10 は腸炎の発症に深く関わる分子として知られているので、本研究では DC 特異的 mTORC1 機能欠損 (mTORC1^{DC-/-}) マウスを用いて DC の mTORC1 の腸炎発症に及ぼす影響について解析した。対照マウスに比べて mTORC1^{DC-/-} マウスでは腸に存在する DC の IL-10 産生能が低下しており、実験的腸炎の増悪がみられた。このことから、mTORC1 は IL-10 発現を介して自然免疫反応を制御することで腸炎の発症に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

mTOR complex 1 (mTORC1) affects broad aspects of cellular functions such as growth and proliferation. We have previously demonstrated that mTORC1 positively regulates IL-10 production in dendritic cells (DC). Because it has been known that IL-10 is critical for onset of colitis, we assessed the role of mTORC1 in DC in colitis using DC-specific mTORC1 function-deleted (mTORC1^{DC-/-}) mice. In mTORC1^{DC-/-} mice, IL-10 expression in intestinal DC was decreased compared with control mice. In addition, mTORC1^{DC-/-} mice developed more severe experimental colitis. These results indicate that mTORC1 in DC influences the onset of colitis through IL-10-mediated regulation of innate immune response *in vivo*.

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：mTORC1、樹状細胞、IL-10、腸炎

1. 研究開始当初の背景

腸に存在する樹状細胞やマクロファージといった抗原提示細胞は、IL-10 を産生することで、腸内細菌に対する過剰

な免疫応答を制御している。クローン病や潰瘍性大腸炎の患者では IL-10 遺伝子に変異が見られることや、IL-10 遺伝子欠損マウスが腸炎を自然発症すること

からも、炎症性腸疾患の発症には IL-10 の産生異常が深く関与することが分かっている。そのため、抗原提示細胞における IL-10 発現の分子機構を明らかにすることで人為的な IL-10 産生制御が可能になれば、炎症性腸疾患の治療法開発に結びつくことと期待されている。

我々はこれまでに、細胞の増殖・成長を促す分子として知られてきた mammalian target of rapamycin complex : mTORC1 が樹状細胞の LPS 刺激に伴う IL-10 産生制御に関与していることを見出しており (大谷ら、*Blood* 112:635-643, 2008)、mTORC1 が炎症性腸疾患の治療標的になり得るか検討することにした。

2. 研究の目的

抗原提示細胞 (特に樹状細胞) における mTORC1 を介した IL-10 発現制御について、その分子機構と腸炎発症に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) mTORC1-eIF4E シグナルによる IL-10 発現制御メディエーターの検索

IL-10 発現もしくは mTORC1 シグナルに関与することが知られている転写因子のうち、mTORC1-eIF4E シグナルによって制御されているものを見つけ出すため、eIF4E 阻害剤存在下・非存在下で LPS 刺激したマクロファージ細胞株 Raw264.7 の核抽出液を用いた EMSA 法により検討した。

(2) mTORC1^{DC-/-}マウスを用いた、生体内樹状細胞の IL-10 産生能の評価

金沢大学医学部・平尾敦先生が樹立した mTORC1 の機能を細胞特異的に欠損可能なコンディショナルノックアウトマウス (*Raptor*^{f1/f1}) と CD11c-Cre マウスと交配して、樹状細胞特異的 mTORC1 機能欠損マウス (mTORC1^{DC-/-}マウス) を作成した。定常状態の mTORC1^{DC-/-}マウスにおける様々な組織に存在する樹状細胞の数や活性化状態を、フローサイトメトリー法にて解析した。また、mTORC1^{DC-/-}マウスと対照マウスにおける腸管 CD11b⁺樹状細胞の恒常的な IL-10 発現量

をフローサイトメトリー法と real-time PCR 法により測定し、比較した。

(3) mTORC1^{DC-/-}マウスを用いた、非感染性腸炎モデル実験の解析

(2)の実験により、mTORC1^{DC-/-}マウスでは腸管 CD11b⁺樹状細胞の IL-10 産生能が低下しており、腸管において IL-10 を介した T 細胞サブセット (Th1, Th17, Treg) のバランスや、自然免疫応答に影響があると考えられた。そこで、mTORC1^{DC-/-}マウスおよび対照マウスについて、①フローサイトメトリー法により腸管粘膜固有層における T 細胞サブセットの解析を行い、②デキストラン硫酸塩を用いた実験的腸炎を引き起こしてその病態を、体重変化・腸管の萎縮・組織像を解析することで評価した。

4. 研究成果

(1) mTORC1-eIF4E シグナルによる IL-10 発現制御メディエーターの検索

マウス骨髄由来樹状細胞を用いた解析から、eIF4E 阻害剤で前処理する時間の長さに依存して LPS 刺激に伴う IL-10 遺伝子発現の抑制効果が強く見られたことから、eIF4E は刺激の有無にかかわらず恒常的に発現しているタンパク質を標的にして IL-10 発現を制御していると考えられた。そこで、IL-10 発現へ関与が知られているいくつかの転写因子と、mTORC1 シグナルによって制御を受けることが知られている転写因子 YY1 について、これら転写因子の活性が eIF4E シグナルによって制御されているか否か EMSA 法を用いて検討した。その結果、eIF4E 阻害剤により Stat3 のシグナル強度が減少していたことから (図 1、矢印)、eIF4E は Stat3 を介して IL-10 発現制御を行っている可能性が示唆された。一方、IL-10 発現の正の調節因子である CREB と C/EBP のシグナル強度は eIF4E 阻害剤によって増大しており、これら分子は eIF4E を介した IL-10 発現制御に関与していないと考えられた。

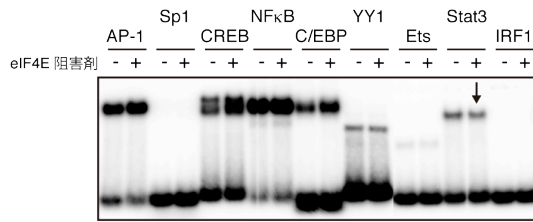


図1：LPS 刺激した Raw264.7 の核抽出液を用いた EMSA (2) mTORC1^{DC-/-}マウスを用いた、生体内樹状細胞の IL-10 産生能の評価

対照マウスと比べ mTORC1^{DC-/-}マウスでは、骨髄の形質細胞様樹状細胞、脾臓の CD8⁺樹状細胞、および腸管粘膜固有層の CD11b⁺樹状細胞の数が増加していた。mTORC1^{DC-/-}マウス由来樹状細胞では Akt のリン酸化が亢進していたことから、mTORC1^{DC-/-}マウスでみられた細胞数の増加は Akt シグナルを介した細胞生存能の亢進による可能性が示唆された。mTORC1^{DC-/-}マウスでは腸管 CD11b⁺樹状細胞の恒常的な IL-10 産生能が減少しており、*in vivo*でも mTORC1 が IL-10 産生を正に制御していることが明らかとなった (図2)。また、mTORC1^{DC-/-}マウス由来腸管 CD11b⁺樹状細胞では共刺激分子 CD86 の発現が増大しており、活性化状態にあることがわかった。

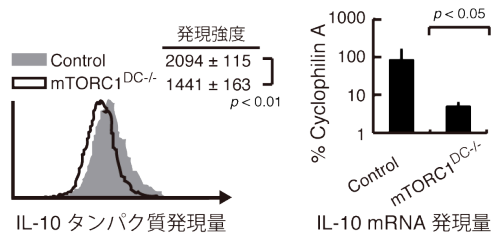


図2：腸管 CD11b⁺ 樹状細胞における IL-10 の発現 (3) mTORC1^{DC-/-}マウスを用いた、非感染性腸炎モデル実験の解析

①腸管粘膜固有層における T 細胞サブセットの解析

腸管において、樹状細胞が産生する IL-10 は Treg の細胞数維持や Th17 の分化抑制に関与することが分かっている。しかし、mTORC1^{DC-/-}マウスでは腸管樹状細胞の IL-10 産生が低下しているにも関わらず、対照マウスと mTORC1^{DC-/-}マウスの腸管に存在する Th1, Th17, Treg 細胞の割合に違いは見られなかった (図3)。すなわち、樹状細胞における mTORC1 を介した IL-10 産生制御は腸管の T 細胞サ

ブセット形成に関与しないことが明らかとなった。

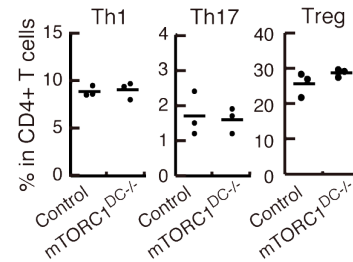


図3：腸管に存在する T 細胞サブセットの割合 ②デキストラン硫酸塩を用いた実験的腸炎の解析

対照マウスと mTORC1^{DC-/-}マウスに実験的腸炎を起こさせたところ、mTORC1^{DC-/-}マウスでは体重減少や大腸組織のびらんの程度がよりひどく、腸炎が増悪していた (図4)。①の結果から、腸管に存在する T 細胞サブセットは対照マウスと mTORC1^{DC-/-}マウスで差が見られないこと、一般的にはデキストラン硫酸塩を用いた腸炎は T 細胞非依存的な現象だと考えられていることから、mTORC1^{DC-/-}マウスでは IL-10 発現の減少に伴った自然免疫反応の亢進が腸炎の悪化をもたらしたと思われる。

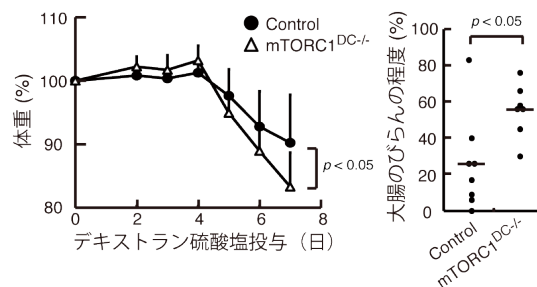


図4：デキストラン硫酸塩誘導性腸炎モデル実験

以上のことから、樹状細胞における mTORC1 は IL-10 産生を正に制御することで腸管の自然免疫反応の抑制に貢献していることが明らかとなった。この成果は、*J. Immunol.* 188:4736-4740, 2012 に発表された。

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4件)

1: 大谷真志、松田達志 樹状細胞からのIL-10 産生誘導の機序 臨床免疫・アレルギー科 59:325-330, 2013 査読無

2: Takayama, G., Ohtani, M., Minowa, A., Matsuda, S., Koyasu S. Class I PI3K-mediated Akt and ERK signals play a critical role in Fc ϵ RI-induced degranulation in mast cells. *Int. Immunol.* 25:215-220. 2012 (DOI: 10.1093/intimm/dxs105) 査読有

3: Kurebayashi, Y., Nagai, S., Ikejiri, A., Ohtani, M., Ichiyama, K., Baba, Y., Yamada, T., Egami, S., Hoshii, T., Hirao, A., Matsuda, S., Koyasu, S. PI3K-Akt-mTORC1-S6K1/2 axis controls Th17 differentiation by regulating Gfi-1 expression and nuclear translocation of ROR γ . *Cell Reports* 1:360-373, 2012 (DOI: 10.1016/j.celrep.2012.02.007) 査読有

4: Ohtani, M., Hoshii, T., Fujii, H., Koyasu, S., Hirao, A., Matsuda, S. mTORC1 in intestinal CD11c⁺CD11b⁺ dendritic cells regulates intestinal homeostasis by promoting IL-10 production. *J. Immunol.* 188:4736-4740. 2012 (DOI: 10.4049/jimmunol.1200069) 査読有

[学会発表] (計12件)

1: Ohtani, M., Fujii, H., Sakai, K., Hoshii, T., Watanabe, T., Koyasu, S., Hirao, A., and Matsuda, S. mTOR complex 1 is critical for B cell development. 第35回 日本分子生物学会年会 (2012年12月11~14日、福岡)

2: Matsuda, S., Nagai, S., Hoshii, T., Koyasu, S., Hirao, A., and Ohtani, M. Role of the mTORC1 signaling pathway in acquired immunity. 第35回 日本分子生物学会年会 (ワークショップ) (2012年12月11~14日、福岡)

3: Nagai, S., Kurebayashi, Y., Ikejiri, A., Ohtani, M., Baba, Y., Hoshii, T., Hirao, A., Matsuda, S., and Koyasu, S.

PI3K-Akt-mTORC1-S6K axis controls Th17 differentiation. 第35回 日本分子生物学会年会 (2012年12月11~14日、福岡)

4: Matsuda, S. and Ohtani, M. Role of the mTORC1 signaling pathway in T cell function. 第41回 日本免疫学会総会・学術集会 (ワークショップ) (2012年12月5~7日、神戸)

5: Ohtani M., Hoshii T., Fujii H., Koyasu S., Hirao A., and Matsuda S. mTORC1 in intestinal CD11c⁺CD11b⁺ dendritic cells regulates intestinal homeostasis by IL-10. 34th Naito conference on Infection, immunity and their control for health. (October 16-19, 2012, Sapporo, Japan)

6: 永井重徳、紅林泰、大谷真志、松田達志、小安重夫
PI3K-Akt-mTORC1-S6K1/2経路はGfiの発現およびROR γ の核移行を調節することによりTh17分化を制御する
第22回 Kyoto T Cell Conference (2012年7月6~7日、京都)

7: 大谷真志、星居孝之、平尾敦、藤猪英樹、小安重夫、松田達志 樹状細胞におけるmTORC1はIL-10産生を介して腸管免疫に関与する
第22回 Kyoto T Cell Conference (2012年7月6~7日、京都)
口頭発表

8: Ohtani M., Hoshii T., Fujii H., Koyasu S., Hirao A., and Matsuda S. mTORC1 in dendritic cells regulates intestinal homeostasis by IL-10. 20th International symposium on molecular cell biology of macrophages 2012 (June 15-16, 2012, Tokyo, Japan)

9: Ohtani, M. and Matsuda, S. Role of mTORC1 in immune function of dendritic cells. 第40回 日本免疫学会総会・学術集会 (2011年11月27~29日、千葉)

10: Matsuda, S. and Ohtani, M.

Role of the mTORC1 signaling pathway in T cell development.

第40回 日本免疫学会総会・学術集会（ワークショップ）（2011年11月27～29日、千葉）

11: Fujii, H., Matsuda, S., Ohtani, M., and Koyasu, S.

Role of class IA PI3K in regulatory T cell function.

第40回 日本免疫学会総会・学術集会（ワークショップ）（2011年11月27～29日、千葉）

12: 松田達志、大谷真志、星居孝之、平尾敦
T細胞分化過程におけるmTORC1シグナルの役割

第21回 Kyoto T Cell Conference（2011年6月3～4日、京都）

〔その他〕

関西医科大学附属生命医学研究所・生体情報部門ホームページ

<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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：