

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770115

研究課題名(和文) PIK3C3の生理的意義の解明

研究課題名(英文) Physiological function of PIK3C3

研究代表者

江口 賢史 (EGUCHI, SATOSHI)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70457117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は PIK3C3 の生理機能についてT細胞特異的PIK3C3欠損マウス(K0マウス)を解析することにより明らかにすることである。K0マウスは自己免疫疾患を発症し、多臓器にわたる炎症性細胞浸潤を認め、最終的には重篤な気管支肺炎により死亡することが明らかになった。また、これらの原因としてはPIK3C3欠損ナイーブT細胞のTh17細胞への分化亢進によるIL-17濃度の顕著な上昇が起因となっていることを明らかにした。以上の結果から未だ不明点が多いPIK3C3の生理機能および多様な自己免疫疾患発症機序の一端を解明する知見を得られた。

研究成果の概要(英文)：To investigate the physiological function of PIK3C3, we generated T cell specific deletion of PIK3C3 mice. These mice caused autoimmune disease and inflammation in several organs, and died for severe bronchopneumonia. We showed increase of IL-17A production by promotion of Th17 differentiation in PIK3C3 deficient naive T cell was the cause of disease. These results suggested that PIK3C3 suppressed Th17 differentiation and autoimmune disease.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：イノシトールリン脂質

1. 研究開始当初の背景

・イノシトールリン脂質 (PIs) 代謝酵素について: PIs は、ジアシルグリセロールと親水性のイノシトール環から構成されている。このイノシトール環の 3,4,5 位の水酸基は様々なリン酸化酵素や、脱リン酸化酵素の働きによって、可逆的なリン酸化の修飾をうけて、8 種類の PIs が細胞膜に生成される。PIs の相互変換には 18 の反応が知られているが、それらの反応を触媒する kinase は 19 種類、phosphatase は 29 種類にもおよぶ。同じ反応を触媒するアイソザイムが多数存在するにも関わらず、個々のアイソザイムの遺伝子異常によって様々な異なる疾患が引き起こされるというこれまでの研究結果から、各触媒酵素が生体内でそれぞれ特有の生理的役割を担う事が考えられている。

・PI3P 産生酵素 PIK3C3: ホスファチジルイノシトール 3 リン酸 (PI3P) は、クラス III PI3K (PIK3C3) により生成される。ホスファチジルイノシトールのみを基質とするこの酵素は、酵母からヒトまで幅広い生物種に存在する。酵母 PIK3C3 である Vps34p は、細胞内小胞輸送を司る分子として古くに同定され、オートファジーおよび液胞への蛋白質輸送を制御することがすでに解明されている。しかし、PI3P を含むイノシトールリン脂質の代謝については、酵母と比べて哺乳類細胞では一層複雑で、PI3P 結合タンパク質も一層数を増していることが知られている。このような知見から、mPIK3C3 は、数百種類の分化細胞からなる哺乳動物個体においては酵母と比してより多くの機能を発揮し、多彩な生命現象に関与すると推察される。哺乳類において PIK3C3 が関与する細胞応答についての知見は、培養細胞株での実験で示されるのみであり、これまでに明らかとなっている細胞内機能制御はオートファジー、小胞輸送である。一方、個体を構成する様々な細胞における知見は皆無であり、哺乳類個体における PIK3C3 の生理的・病態生理的役割は、明らかにされていない。 PIK3C3 生理機能の解明の重要性は PIK3C3 の機能制御の一端であるオートファジーの生理的機能を鑑みれば、明らかである。例えば、始めは飢餓時における栄養補給のシステムの一部だと考えられていたオートファジーはオートファジー不全マウスの解析から、抗原提示不全、心臓肥大、アルツハイマー等、多岐に渡る様々な疾患に関与することが明らかになっている。生理機能が不明な遺伝子/タンパク質の研究に最も有用な方法の一つは、遺伝子欠損マウスの樹立と表現型解析である。そこでまず、申請者は mPIK3C3 欠損マウスの表現型解析によって mPIK3C3 の生理機能についての知見を得る戦略をとった。mPIK3C3 遺伝子の全身性ホモ欠損マウスは早期胎生致死であり (未発表データ)、mPIK3C3 はマウスの個体発生に必須の因子であることをこれまでに見出した。一方、この結果から、成体レベルでの生理的意

義の解析を全身性欠損マウスで行うことは、不可能であることが分かった。PIK3C3 の発現は T 細胞と筋肉細胞で特に高い事が報告されている。そこで、胎発生に影響を与えることのない免疫細胞である T 細胞であれば 胎生致死を回避出来ること、また、すでに報告されている T 細胞特異的オートファジー不全マウスとの比較によりオートファジー以外の新たな生理機能を見出すことができることから T 細胞特異的 mPIK3C3 欠損マウスを作製し、解析を行うという発想に至った。

2. 研究の目的

最終目標は依然として不明点が多い mPIK3C3 の生理機能および機能制御の解明にある。特に「増殖」と「T 細胞分化」での PIK3C3 の機能を実証する。申請者はすでに T 細胞特異的 mPIK3C3 欠損マウスを作製している。これまでの予備的知見から申請者は 2 つの仮説を立てている。まず、PIK3C3 は増殖に必須の分子ではないかという仮説である。 PIK3C3 欠損マウス線維芽細胞では細胞増殖がほぼ完全に抑制されることに加え、T 細胞特異的欠損マウスでは末梢 T 細胞が、劇的に減少していた。加えて、mPIK3C3 欠損マウス線維芽細胞では様々なアポトーシス誘導剤に暴露してもコントロールと差が認められなかったことからアポトーシスを抑制している可能性は低いと考えられる。この点について明解な答えを、mPIK3C3 欠損マウス線維芽細胞を使った普遍的な細胞増殖に対する解析に加え、遺伝子欠損マウスから精製したナイーブ T 細胞を用いて、増殖に関連する分子の発現およびリン酸化を解析することにより PIK3C3 の細胞増殖における役割を明示する。二つ目は、PIK3C3 が Th17 細胞分化を抑制しているのではないかという仮説である。論拠となるのは T 細胞特異的欠損マウスが腸炎を自然発症し、腸炎の引き金となりうる IL-17 の末梢血中での増加が認められる事、加えてリンパ組織に存在する Th17 細胞の割合が増えているという予備的知見である (未発表データ)。この仮説について、精製したナイーブ T 細胞に in vitro で分化誘導をかけ、サイトカイン産生や分化に関与する転写因子などの発現レベルを詳しく解析することで、PIK3C3 の T 細胞分化での役割を明らかにする。これらの解析に際して、Atg5 欠損マウス由来の線維芽細胞や T 細胞と比較対照することにより、PIK3C3 がオートファジーを介して増殖・分化を制御しているのか、あるいは PIK3C3 の未知の機能によるものであるのかを理解する。本研究で用いる mPIK3C3 欠損線維芽細胞、T 細胞特異的 mPIK3C3 および T 細胞特異的 Atg5 欠損マウスはすでに樹立しており、研究期間内に確実に PIK3C3 の生理的役割の一端を明らかにすることができる。

3. 研究の方法

本研究では主に、胎児線維芽細胞 (MEF) と T 細胞特異的遺伝子欠損マウスを利用した解析を進める。実験で使用する mPIK3C3^{flox/flox} (コントロール) マウス、Lck Cre-mPIK3C3^{flox/flox} (T 細胞特異的 mPIK3C3 欠損) マウス、Lck Cre-Atg5^{flox/flox} の作製は完了している。また、mPIK3C3^{flox/flox} MEF、Cre 発現アデノウイルス感染により mPIK3C3 を欠損させた MEF (以下 mPIK3C3^{-/-} MEF) の樹立も完了している。MEF を用いた根源的な細胞応答の解析とマウス個体を用いた生体高次機能の解析を併せて進め、mPIK3C3 の生理機能を解明する。

4. 研究成果

これまでに PIK3C3 欠損 MEF を用いた実験により細胞増殖が顕著に抑制されることを見出していた。PIK3C3 欠損 T 細胞においても同様に増殖が抑制されるかどうか [3H]thymidine の取り込みを指標にした増殖アッセイを行った。その結果、MEF と同様に顕著に増殖が抑制されており、PIK3C3 が普遍的な細胞増殖に重要な役割を果たしていることが明らかになった (図 1)。どのような機序により T 細胞増殖抑制が引き起こされるのかについて増殖・活性化表面マーカーをフローサイトメーターで解析したが、コントロールと比べて特筆すべき違いは認められなかった。一方、細胞内シグナル分子のリン酸化については Akt のリン酸化の低下が認められた。これらの結果から、PIK3C3 は Akt シグナル伝達系に参与し、増殖を制御しているものと考えられる。

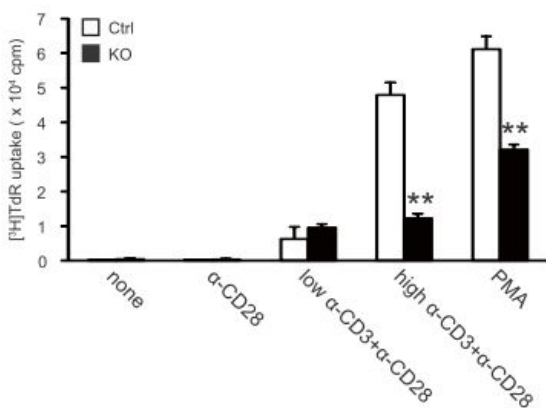


図 1: T cell proliferation assay

次に T 細胞特異的 PIK3C3 欠損マウスの解析では、腸炎が自然発症していることを予備的知見で得ていた。予備的知見に加え、肺、腎臓、肝臓などにおいても炎症性細胞浸潤を認め、多臓器にわたる炎症が起きていることが明らかとなった。また、自己抗体の増加を免疫染色により明らかにした。つまり、T 細胞特異的 PIK3C3 欠損マウスは自己免疫疾患を発症し、全身性炎症性細胞浸潤が惹起されていた。この要因として IL-17 の増加が予備的知見から示唆されていたが、in vitro の分化アッセイを行った結果、PIK3C3 欠損ナイー

ブ細胞は Th17 細胞への分化が亢進することを認めた。これらの結果から、Th17 細胞への分化亢進が IL-17A 産生を惹起していたと考えられる。また、IL-17A との 2 重欠損マウスを作製し、生存率を比較すると顕著に生存率の改善を認めた (図 2)。加えて、組織学的解析により肺に対する炎症が特に抑制されている事を認めた。以上の結果から T 細胞特異的 PIK3C3 欠損マウスは IL-17A 産生亢進による自己免疫疾患および重篤な肺炎により死に至ることが明らかになった。

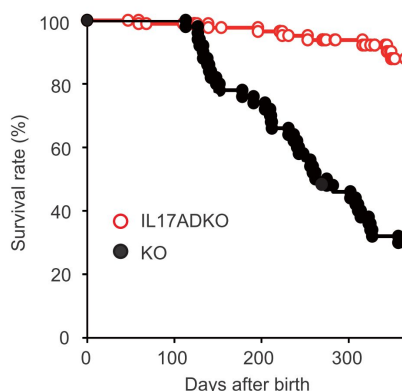


図 2: 生存曲線

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 5 件)

Nakashima, A., Tanimura-Ito, K., Oshiro, N., Eguchi, S., Miyamoto, K., Momonami, A., Kamada, S., Kikkawa, U. and Yonezawa, K.

A positive role of mammalian Tip41-like protein, TIPRL, in the amino-acid dependent mTORC1-signaling pathway through interaction with PP2A, FEBS letter 587, 2924-2929, 2013 査読あり

DOI: 10.1016/j.febslet.2013.07.027.

Nakashima, A., Kawanishi, I., Eguchi, S., Yu-E, H., Eguchi, S., Oshiro, N., Yoshino, K., Kikkawa, U. and Yonezawa, K.

Association of CAD, a multifunctional protein involved in pyrimidine synthesis, with mLST8, a component of the mTOR complexes J. Biomed. Sci. 24, 20-24, 2013 査読あり

DOI: 10.1186/1423-0127-20-24.

Morishita, H., Eguchi, S., Kimura, H., Sasaki, J., Sakamaki, Y., Robinson, M. L., Sasaki, T. and Mizushima, N.

Deletion of Autophagy-related 5 (Atg5) and Pik3c3 Genes in the Lens Causes Cataract Independent of Programmed Organelle Degradation J. Biol. Chem. 288, 11436-11447, 2013 査読あり

DOI: 10.1074/jbc.M112.437103.

Chida, S., Ito, R., Kofuji, S., Eguchi, S., Takasuga, S., Sasaki, J. and Sasaki, T.
SHIP1 deletion enhances ROS production and decrease survival of the S. aureus infected mice
Akita Journal of medicine 39, 95-101, 2013 査読あり

Takasuga, S., Horie, Y., Sasaki, J., Sun-Wada, G. H., Kawamura, N., Iizuka, R., Mizuno, K., Eguchi, S., Kofuji, S., Kimura, H., Yamazaki, M., Horie, C., Odanaga, E., Sato, Y., Chida, S., Kontani, K., Harada, A., Katada, T., Suzuki, A., Wada, Y., Ohnishi, H. and Sasaki, T.
Critical roles of type III phosphatidylinositol phosphate kinase in murine embryonic visceral endoderm and adult intestine. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 1726-1731, 2013 査読あり
DOI: 10.1073/pnas.1213212110.

〔学会発表〕(計 1件)

江口賢史、木村洋貴、浅沼研、堀江泰夫、佐々木純子、佐々木雄彦
脂質キナーゼ PIK3C3 欠損による自己免疫疾患
第11回北東北血液研究会 2013年4月27日、秋田市

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

江口賢史 (EGUCHI SATOSHI)
秋田大学・医学系研究科・助教
研究者番号：70457117

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：