

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790479

研究課題名(和文) Th17細胞分化におけるPI3K-Akt-mTORC1経路による制御機構の解明

研究課題名(英文) The role of PI3K-Akt-mTORC1 signaling pathway on Th17 differentiation

研究代表者

永井 重徳 (Nagai, Shigenori)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：50348801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：ヘルパーT (Th) 細胞の一種であるTh17細胞は、関節リウマチや炎症性腸疾患などの自己免疫疾患の発症にかかわることが知られている。そのため、この細胞の分化機構を解明することによって、これら疾患の予防あるいは治療法の開発に結びつくことが期待できる。本研究において、脂質リン酸化酵素の一種であるホスホイノシタイド 3-キナーゼ (PI3K) が、その下流に存在するAkt-mTORC1経路を介してTh17分化を正に制御することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Th17 cell is a kind of helper T (Th) cells which causes autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis or inflammatory bowel disease. Therefore, to clarify the molecular mechanisms of Th17 differentiation is thought to lead the effective prevention or the development of the effective therapy. In this research, we demonstrated that phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-Akt-mTORC1 signaling pathway positively regulates Th17 differentiation.

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：Th17 PI3K mTORC1

## 1. 研究開始当初の背景

ヘルパーT (Th) 細胞は、獲得免疫系が働くために最も重要な細胞の1つであり、1980年代においては、Th1 および Th2 という2つの異なる Th サブセットのバランスが崩れることによって様々な疾患が起こりうると考えられていた。しかし1990年代以降、このバランスだけでは説明しきれない事象が多く挙げられるようになり、未知の Th サブセットの存在が示唆され、新たに制御性 T (Treg) 細胞と Th17 細胞が発見されるに至った。この Th17 細胞は IL-17A や IL-17F を産生し、粘膜組織において細胞外寄生菌に対する生体防御に働く細胞である。しかしその一方で、慢性関節リウマチや炎症性腸疾患などを引き起こす細胞であるとも考えられており、Th17 細胞の分化を制御することは、細菌感染症のみならず自己免疫疾患の予防や治療法を開発するにあたり、大変重要であると考えられる。

ホスホイノシタイド 3-キナーゼ (PI3K) は脂質リン酸化酵素の一種であり、様々な細胞活動にかかわり、免疫細胞においても、B 細胞、樹状細胞、肥満細胞の分化・機能に重要な役割を果たすことが報告されていた。また、新たなサブセットである Treg 細胞においては、その分化を負に制御することが明らかにされていたものの、Th17 分化に関する報告は当時されていなかった。ところで申請者らはこれまでに、胃粘膜に感染する細胞外寄生菌である *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染で引き起こされる胃炎において、胃粘膜固有層に Th1 および Th17 細胞が浸潤することを見出したが、PI3K 欠損 (PI3K KO) マウスに *H. pylori* を感染させた時に、浸潤する Th17 細胞の割合が減少することを見出し、PI3K の活性が Th17 分化を制御する可能性があると考え、本研究を行うに至った。

## 2. 研究の目的

PI3K がその下流に存在する Akt-mTORC1 経路を介して、Th17 分化をどのような分子機構によって制御するかを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1) *in vitro* での Th17 分化誘導における PI3K 活性の影響について  
まず PI3K 活性が Th17 分化に及ぼす影響を調べるため、ナイーブ Th 細胞をマウスより単離し、TCR 刺激存在下で IL-6 および TGF $\beta$  と共に数日間培養し、Th17 分化の効率を細胞内サイトカイン染色法および ELISA 法にて検討した。この際に PI3K 阻害剤の有無で分化効率を比較した。また、PI3K KO マウス由来あるいはコントロールマウス由来のナイーブ Th 細胞を単離し、同様に比較した。
- (2) *in vitro* での Th17 分化誘導における mTORC1 の重要性について

PI3K による Th17 分化制御が、その下流の Akt-mTORC1 経路へのシグナル伝達によるものかを調べるため、Th17 分化誘導させる際に、mTORC1 阻害剤である rapamycin を加え、同様に分化効率を比較して(1)の結果と同じ傾向であるかを検討した。

- (3) *in vitro* での Th17 分化誘導における Akt の関与について  
PI3K 活性と mTORC1 が Th17 分化に影響を及ぼしている場合、その間に存在する Akt が関与していると考えられる。そこで、tamoxifen を加えることによって Akt 活性を一過的に上昇させることのできるトランスジェニック (Akt-mer TG) マウスから、ナイーブ Th 細胞を単離して Th17 細胞に分化させることにより、PI3K や mTORC1 の活性を阻害した場合と逆の結果が得られるかどうかについて検討した。
- (4) *in vivo* での Th17 分化誘導における PI3K-mTORC1 経路の重要性について  
ナイーブ Th 細胞を Rag2 KO (B および T 細胞を欠いている) マウスに移入することにより腸炎を引き起こすマウスモデルを用い、この際に腸間膜リンパ節に存在する Th17 細胞の割合が、rapamycin を投与することによって、*in vitro* の場合と同様の結果になるかについて検討した。
- (5) PI3K 活性阻害による Th17 細胞関連分子発現の変化について  
PI3K 活性阻害によって Th17 分化効率が変わった場合、Th17 関連分子の遺伝子発現に何らかの変化があったと考えられる。そこで、PI3K 活性を阻害した Th17 細胞およびコントロール Th17 細胞から RNA を抽出し、Th17 関連分子の遺伝子発現を RT-PCR 法にて検討した。これらのうち、Th17 分化効率と相関のあるものについて、Th17 からタンパクを抽出して、その分子に対する特異的抗体を用いてウェスタンブロット法にて、タンパクレベルでの発現変化を検証した。
- (6) タンパク強制発現系を用いた PI3K-Akt-mTORC1 シグナル経路の分子機構解析  
実際に Th17 細胞において、PI3K-Akt-mTORC1 経路によって制御されている分子が(5)で明らかになったならば、レンチウイルスを用いたタンパク強制発現系を用いて、標的分子の過剰発現による Th17 分化効率の変化が見られるかどうかを検討した。
- (7) ROR $\gamma$ t の細胞内局在について  
Th17 細胞のマスター転写因子である ROR $\gamma$ t は、IL-17A 遺伝子の転写調節領域に結合して IL-17A の遺伝子発現を促すが、そのためには ROR $\gamma$ t が核内に局在する必要がある。そこで、蛍光抗体による細胞染色を行い、PI3K 活性阻害による局在の事変化を調べた。
- (8) ROR $\gamma$ t の核内移行と PI3K の関係性について

て

PI3K 活性と ROR $\gamma$ t の核移行に相関が見られた場合、ROR $\gamma$ t は核移行シグナルを持たないため、他の分子と会合して核内に移行する可能性が考えられる。そこで、その候補分子を検索し、培養細胞に co-transfection して細胞内での結合性について、免疫沈降法にて検証した。

#### 4. 研究成果

- (1) Th17 細胞を分化させる際に PI3K 活性を阻害することによって、Th17 分化の割合が減少することを見出した。
- (2) Th17 細胞を分化させる際に mTORC1 活性を阻害することによって、(1)の場合と同様に Th17 分化の割合が減少した。
- (3) Th17 細胞を分化させる際に、(1)や(2)とは逆に一過的に Akt の活性を増強することによって、Th17 分化の割合を増強させることが出来た。以上(1)-(3)のことから、PI3K-Akt-mTORC1 経路が Th17 分化を正に制御していることを見出した。
- (4) 腸炎を起こしたマウスの腸間膜リンパ節に存在する Th17 細胞の割合を調べたところ、rapamycin 投与によって mTORC1 活性を阻害した群において、有意に減少していたことから、*in vivo* においても PI3K-mTORC1 経路によって Th17 分化が正に制御されていることが明らかになった。
- (5) Th17 分化時に PI3K あるいは mTORC1 の阻害剤を加えた場合、加えていないコントロール細胞と比較すると、予想に反して ROR $\gamma$ t や ROR $\alpha$  など Th17 分化に重要な転写因子の遺伝子発現が減少することはなかった。しかし、ROR $\gamma$ t の機能抑制因子である Gfi1 遺伝子発現が上昇することを見出し、これが一因であることが示唆された。そこで Gfi1 タンパクの発現について調べたところ、やはり Th17 分化によって減少した Gfi1 の量が、阻害剤を加えた場合に増加する(元の発現レベルに戻る)ことが明らかとなった。そこでさらにこの Gfi1 の発現制御について調べたが、PI3K-Akt-mTORC1 経路によって制御され、かつ Gfi1 発現を抑える分子として Egr2 を見出した。
- (6) そこで Egr2 をレンチウイルスのシステムを用いて Th17 細胞に強制発現させたところ、予想通り Th17 分化の割合を促進させることが出来た。また、Egr2 の上流かつ mTORC1 の下流に存在する p70<sup>S6K1</sup> (S6K1) も強制発現させたところ、同様に促進させることが出来た。以上の結果から、PI3K-Akt-mTORC1 経路は、S6K1 を介してその下流に存在する Egr2 や Gfi1 の発現を制御し、ROR $\gamma$ t による IL-17 遺伝子発現を制御することを見出した。
- (7) Th17 分化開始 24 時間後に ROR $\gamma$ t 分子の局在を調べたところ、コントロール Th17 細胞ではほとんどが核内に存在するにも

かかわらず、阻害剤処理した細胞では細胞質に留まっていたことから、PI3K-Akt-mTORC1 経路によって ROR $\gamma$ t の核移行が促進される可能性が示唆された。

- (8) ROR $\gamma$ t の核移行を促進する分子の候補として、核移行シグナルを分子内に持ち、PI3K-Akt-mTORC1 経路によって制御される分子として、p70S6K2 (S6K2) を候補とした。実際に細胞内で ROR $\gamma$ t と S6K2 が結合するかについて免疫沈降法で調べたところ、結合することが確認された。また、実際の Th17 細胞において、分化に伴って S6K2 分子の発現は増加するが、この増加は阻害剤の添加によって抑えられることを示した。以上のことから、PI3K-Akt-mTORC1 経路は S6K2 を介して ROR $\gamma$ t の核内移行を促進することによって、Th17 分化を制御することを見出した。

#### 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 8 件) 全て査読有り

Baghdadi M, Yoneda A, Yamashina T, Nagao H, Komohara Y, Nagai S, Akiba H, Foretz M, Yoshiyama H, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Takeya M, Viollet B, Yagita H, Jinushi M. TIM-4 glycoprotein-mediated degradation of dying tumor cells by autophagy leads to reduced antigen presentation and increased immune tolerance. *Immunity*. 2013 Dec 12;39(6):1070-81. doi: 10.1016/j.immuni.2013.09.014.

Murakami R, Denda-Nagai K, Hashimoto S, Nagai S, Hattori M, Irimura T. A unique dermal dendritic cell subset that skews the immune response toward Th2. *PLoS One*. 2013 Sep 9;8(9):e73270. doi: 10.1371/journal.pone.0073270.

Yoshida H, Kotani H, Kondo T, Tani I, Wei X, Tsuruta S, Kimura A, Asakawa M, Ito M, Nagai S, Yoshimura A. CDK inhibitors suppress Th17 and promote iTreg differentiation, and ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Jun 7;435(3):378-84. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.04.096.

Nagai S, Kurebayashi Y, Koyasu S. Role of PI3K/Akt and mTOR complexes in Th17 cell differentiation. *Ann N Y Acad Sci*. 2013 Mar;1280:30-4. doi: 10.1111/nyas.12059.

Kurebayashi Y, Nagai S, Ikejiri A, Koyasu S. Recent advances in understanding the molecular mechanisms of the development and function of Th17

cells. *Genes Cells*. 2013 Apr;18(4):247-65. doi: 10.1111/gtc.12039.

Sugiura D, Denda-Nagai K, Takashima M, Murakami R, Nagai S, Takeda K, Irimura T. Local effects of regulatory T cells in MUC1 transgenic mice potentiate growth of MUC1 expressing tumor cells in vivo. *PLoS One*. 2012;7(9):e44770. doi: 10.1371/journal.pone.0044770.

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 Gfi1 expression and nuclear translocation of ROR. *Cell Rep*. 2012 Apr 19;1(4):360-73. doi: 10.1016/j.celrep.2012.02.007.

Yoshizawa A, Nagai S, Baba Y, Yamada T, Matsui M, Tanaka H, Miyoshi S, Amagai M, Yoshikawa T, Fukuda K, Ogawa S, Koyasu S. Autoimmunity against M<sub>2</sub> muscarinic acetylcholine receptor induces myocarditis and leads to a dilated cardiomyopathy-like phenotype. *Eur J Immunol*. 2012 May;42(5):1152-63. doi: 10.1002/eji.201142104.

[学会発表](計18件)

Ishihama H, Ishii K, Nagai S, Kakinuma H, Sasaki A, Yoshioka K, Kuramoto T, Shiono Y, Aizawa M, Okada Y, Koyasu S, Toyama Y, Matsumoto M. Development of a novel antimicrobial-coated biomedical polymer. The International Society for the Study of Lumbar Spine (ISSLS) 2013. May 13-17, 2013, Scottsdale, Arizona, USA.

Yosihoka K, Ishii K, Nagai S, Kakinuma H, Kuramoto T, Sasaki A, Aizawa M, Okada Y, Koyasu S, Toyama Y, Matsumoto M. A comparison of biofilm formation in various metal materials. The International Society for the Study of Lumbar Spine (ISSLS) 2013. May 13-17, 2013, Scottsdale, Arizona, USA.

Shiono Y, Ishii K, Nagai S, Kuramoto T, Yoshioka K, Ishihama H, Funao H, Kakinuma H, Sasaki A, Aizawa M, Okada Y, Koyasu S, Toyama Y, Matsumoto M. *Propionibacterium acnes* causes delayed surgical site infection only in the presence of implant. The International Society for the Study of Lumbar Spine (ISSLS) 2013. May 13-17, 2013, Scottsdale, Arizona, USA.

Nakamura M, Zhuang Z, Umeda R, Nagai S, Aizawa M. Cellular response of immunocyte to boron-containing apatite

ceramics. The 2<sup>nd</sup> International Symposium on Inorganic and Environmental Materials (ISIEM) 2013. Oct 27-31, 2013, Rennes, France.

Shigenori Nagai, Akihiro Yoshizawa, Yukiko Baba, Taketo Yamada, Tomoyasu Nishimura, Shigeo Koyasu : The pathogenesis of pulmonary alveolar proteinosis in PI3K deficient mice. 第42回日本免疫学会総会・学術集会, 2013.12.11-13, 幕張.

Takeya Adachi, Kazuyo Moro, Shigenori Nagai, Masayuki Amagai, Keisuke Nagao : Resident memory T cells in epidermis require hair follicle-derived cytokines for survival. 第42回日本免疫学会総会・学術集会, 2013.12.11-13, 幕張.

Akihiro Yoshizawa, Shigenori Nagai, Yukiko Baba, Tomoyasu Nishimura, Taketo Yamada, Shigeo Koyasu : Development of pulmonary alveolar proteinosis in PI3K deficient mice. The Joint International Meeting of The 78<sup>th</sup> Meeting of the Japanese Society of Interferon and Cytokine Research and The 21<sup>st</sup> International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2013. May 20-21, 2013. Tokyo.

吉岡研之、石井賢、永井重徳、柿沼祐亮、佐々木文、相澤守、岡田保典、小安重夫、戸山芳昭、松本守雄：超音波照射はインプラント表面のバイオフィルムを除去しインプラント関連感染症（IAI）の発症を予防する。第25回整形外科超音波学会学術集会，2013.7.6，名古屋。

松田達志，永井重徳，星居孝之，小安重夫，平尾敦，大谷真志：獲得免疫系における mTORC1 シグナルの役割。第35回日本分子生物学会，2012年，福岡。

Shigenori Nagai, Yutaka Kurebayashi, Ai Ikejiri, Masashi Ohtani, Kenji Ichiyama, Yukiko Baba, Taketo Yamada, Shohei Egami, Takayuki Hoshii, Atsushi Hirao, Satoshi Matsuda, Shigeo Koyasu: PI3K-Akt-mTORC1-S6K1/2 Axis Controls Th17 Differentiation. Inositol Phospholipid Signaling in Physiology and Disease, New York Academy of Sciences. 2012, NY, USA.

Baghdadi Muhammad, Shigeki Chiba, Hisaya Akiba, Hideo Yagita, Shigenori Nagai, Masahisa Jinushi : TIM-4 blockade augments therapeutic efficacy of chemotherapy by immune-mediated mechanisms. 第41回日本免疫学会総会・学術集会, 2012, 神戸.

Masahiro Nagata, Michio Shimamura, Eri Ishikawa, Shigenori Nagai, Shigeo Koyasu, Sho Yamasaki : Recognition of

amphiphilic acylglucoside derived from Helicobacter pylori by C-type lectin receptor Mincle. 第41回日本免疫学会総会・学術集会, 2012, 神戸.

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Gfi1の発現およびROR $\gamma$ 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, 京都.

永井重徳, 小安重夫: 樹状細胞移入による新規コラーゲン誘導関節炎モデルの確立. 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2012, 東京.

Midori Iso, Shigenori Nagai, Shigeo Koyasu: Role of TLRs in the induction of collagen-induced arthritis. 第41回日本免疫学会総会・学術集会, 2012, 神戸. 永井重徳, 紅林泰, 池尻藍, 大谷真志, 馬場夕紀子, 星居孝之, 平尾敦, 松田達志, 小安重夫: PI3K-Akt-mTORC1-S6K 経路はTh17分化を制御する. 第35回日本分子生物学会 2012年, 福岡.

Midori Iso, Shigenori Nagai, Shigeo Koyasu: Role of TLRs in the induction of collagen-induced arthritis. The 12<sup>th</sup> International Symposium on Dendritic Cells, 2012, Daegu, Korea.

Atsushi Anzai, Toshihisa Anzai, Shigenori Nagai, Shigeo Koyasu and Keiichi Fukuda: Regulatory role of dendritic cells in postinfarction healing and left ventricular remodeling. 20<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2012, 2012, Tokyo.

〔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 2件)

名称: CARRER  
発明者: Shigeo Koyasu, Shigenori Nagai, Chihiro Sasakawa, Hitomi Mimuro  
権利者: 同上  
種類: PATENT  
番号: US 8,524,250 B2  
取得年月日: Sep. 3, 2013

国内外の別: 国外

名称: キャリア  
発明者: 小安重夫, 永井重徳, 笹川千尋, 三室仁美  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 第5145700号  
取得年月日: 2012年12月7日  
国内外の別: 国内

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.tmd.ac.jp/mim/>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
永井重徳 (NAGAI, Shigenori)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授  
研究者番号: 50348801

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号:

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号: