

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460602

研究課題名(和文) 獲得免疫反応における樹状細胞のmTORC1の役割

研究課題名(英文) The role of mTORC1 in dendritic cells in adaptive immune response

研究代表者

大谷 真志(OHTANI, Masashi)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号：20383713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：代表者は以前、樹状細胞(DC)において細胞内シグナル伝達分子mTORC1がIL-12産生とヘルパーT細胞分化を制御していることを明らかにした。本研究ではDC特異的mTORC1機能欠損(KO)マウスを用いて、ヘルパーT細胞を介した液性免疫におけるmTORC1の役割を調べた。抗原で免疫したKOマウスでは、対照マウスと比べて抗原特異的IgG1産生の低下と脾臓Th2型ヘルパーT細胞の割合の減少がみられたことから、樹状細胞におけるmTORC1は、ヘルパーT細胞分化を制御することで抗原特異的抗体産生に影響を与えていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We have previously demonstrated that, in dendritic cells (DC), mTORC1 regulates the production of IL-12 as well as the T helper (Th) cell differentiation. In this study, we investigated the roles of mTORC1 in DC in T cell mediated-humoral immunity using DC-specific mTORC1 function-deleted (KO) mice. In KO mice, bovine serum albumin (BSA)-alum induced the production of antigen-specific IgG1 was decreased when compared with control mice. We also found the reduction of the proportion of Th2 cells in the spleen of immunized KO mice, suggesting that the mTORC1 in DC influences the antigen-specific antibody production through the regulation of Th cell differentiation.

研究分野：免疫学

キーワード：mTOR サイトカイン 樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

mTOR complex 1 (mTORC1) は細胞周囲のエネルギー状態や酸素濃度、栄養状態、ストレスなどを感知し、細胞の成長や増殖、代謝を制御する環境センサー分子と知られていたが、近年の研究から、免疫応答にも関与していることが明らかとなってきた。このことは様々な環境変化によって免疫応答が変化することと、それを制御する mTORC1 の重要性を示している。様々な免疫細胞・免疫応答における mTORC1 の役割を明らかにできれば、低酸素状態である腫瘍組織や、栄養不足やストレス下における免疫応答の人為的制御法に結びつくと考えられる。

当初、T 細胞の分化や機能に着目した研究が多い中、我々はミエロイド系細胞の樹状細胞における研究を行なった。その結果、樹状細胞において mTORC1 が IL-10 と IL-12 というサイトカインの産生を制御していることを明らかにし (*Blood* 112:635-643, 2008)、樹状細胞特異的 mTORC1 機能欠損 (mTORC1^{DC-/-}) マウスを用いた解析から、mTORC1 を介した IL-10 産生が自然免疫応答の抑制に貢献していることを報告してきた (*J. Immunol.* 188:4736-4740, 2012)。樹状細胞は自然免疫応答を活性化させるだけでなく、T 細胞に抗原を提示することでヘルパー T (Th) 細胞を中心とした獲得免疫応答の誘導を行なう。In vitro の解析から、樹状細胞の mTORC1 が IL-12 産生制御を介して Th1 細胞の活性化に貢献していることから、in vivo における獲得免疫応答の制御にも mTORC1 が関与している可能性があると考え、本研究を行うに至った (図 1)。

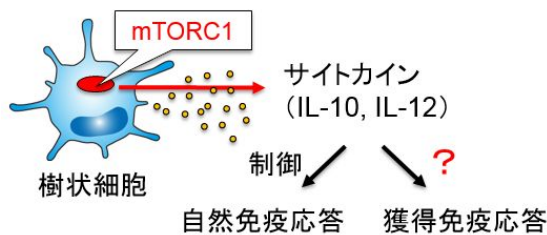


図 1 : mTORC1 は獲得免疫応答を制御しうるのか？

2. 研究の目的

樹状細胞の mTORC1 が獲得免疫応答で果たす役割について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 定常状態の T 細胞分化における樹状細胞の mTORC1 の影響について

まず樹状細胞における mTORC1 の活性が定常状態の T 細胞分化に及ぼす影響を調べるため、樹状細胞特異的 mTORC1 機能欠損 (mTORC1^{DC-/-}) マウスおよびコント

ロールマウスの胸腺と脾臓から細胞を単離し、フローサイトメトリー法にて解析、比較した。

(2) Th17 細胞を主体とした獲得免疫応答における樹状細胞の mTORC1 の役割について

IL-10 は Th17 細胞の活性を抑制することが知られていることから、mTORC1^{DC-/-} マウスでは樹状細胞の IL-10 産生の減少に伴って Th17 反応が増強する可能性が考えられた。そこで、病態形成の主体が Th17 細胞であるマウス実験的自己免疫脳脊髄炎モデルを用いて仮説を検証するため、mTORC1^{DC-/-} マウスおよびコントロールマウスに髄鞘構成糖タンパク質 (MOG) を投与し、20 日間経時的に症状スコアをつけて比較した。

(3) Th2 細胞を主体とした獲得免疫応答における樹状細胞の mTORC1 の役割について

Th1 細胞と Th2 細胞は互い抑制しあってバランスを保っている。mTORC1^{DC-/-} マウスでは樹状細胞の IL-12 産生の増大に伴って Th1 反応が増強することから、Th2 反応が低下している可能性が考えられた。Th2 細胞は B 細胞の分化・増殖と IgG1 産生を促すことから、mTORC1^{DC-/-} マウスおよび対照マウスに抗原 (ウシ血清アルブミン; BSA) を Alum アジュバントと共に免疫し、その後追加で 2 度同じ抗原で免疫した後に血清を採取し、誘導された抗原特異的 IgG 抗体力価を ELISA 法により評価・比較した。また、その際の脾臓における Th1/Th2 細胞のバランスを調べるため、フローサイトメトリー法により IFN- γ 産生 Th1 細胞と IL-4 産生 Th2 細胞の割合を解析した。

4. 研究成果

(1) mTORC1^{DC-/-} マウスの定常状態の胸腺と脾臓の CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞の割合及び細胞数はコントロールマウスと比べて有意な差はみられなかった。mTORC1^{DC-/-} マウスの脾臓では、樹状細胞のうち T 細胞の活性化に関わる古典的樹状細胞の細胞数や活性化マーカーはコントロールマウスと違いがないことから、樹状細胞の mTORC1 は定常状態の T 細胞分化に影響を及ぼさないと考えられた。

(2) 実験的自己免疫脳脊髄炎を発症すると情動不安定や運動失調、痺れんといった症状が現れるが、mTORC1^{DC-/-} マウスおよびコントロールマウスでその症状の程度に違いは見られなかったことから、樹状細胞の mTORC1 は Th17 細胞を介した免疫応答に影響を与えない可能性が示唆された。今後、脳における Th17 細胞数や活性化状

態を解析する必要がある。

(3) 定常状態における mTORC1^{DC-/-}マウスの血清中の IgM、IgG、IgA の産生量はコントロールマウスと比べて有意な差はみられなかった。しかし、BSA 抗原で 2 度免疫した後の血清中の抗原特異的 IgG 抗体力価はコントロールマウスと比べて mTORC1^{DC-/-}マウスで顕著に低下していた (図 2)。誘導された抗原特異的 IgG の大部分は IgG1 サブクラスで、IgG3 サブクラスもわずかに検出されたものの、IgG1 の抗体力価のみが mTORC1^{DC-/-}マウスで低下していた。一方、両マウスにおける免疫後の総 IgG 産生量は免疫前と比べて増加していたことから、アジュバントによる樹状細胞の活性化と抗原非特異的抗体産生の増強効果に樹状細胞の mTORC1 が関与しないことが示唆された。また、脾臓における Th1/Th2 細胞の割合を解析したところ、Th2 細胞の割合はコントロールマウスと比べて mTORC1^{DC-/-}マウスでわずかに減少していた。以上の結果から、樹状細胞の mTORC1 は抗原特異的な Th2 細胞の分化を促すことで、抗原特異的 IgG1 産生の誘導に貢献しているものと考えられた。

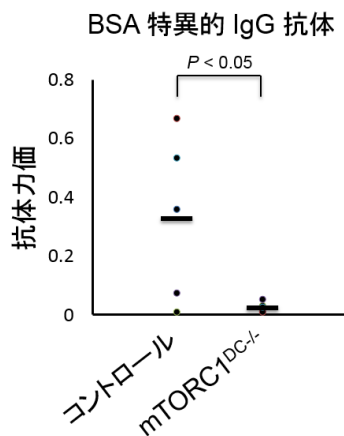


図 2 : mTORC1^{DC-/-}マウスでは抗原特異的 IgG 抗体力価が低下していた

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 1 件)

1. Hoshii, T., Kasada, A., Hatakeyama, T., Ohtani, M., Tadokoro, Y., Naka, K., Ikenoue, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., Fehling, H.J., Araki, K., Yamamura, K.I., Matsuda, S., Hirao, A. Loss of mTOR complex 1 induces developmental blockage in early T-lymphopoiesis and eradicates T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 111:3805-3810, 2014 (DOI: 10.1073/pnas.1320265111) (査読有)

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 真鍋昭雄、渡辺直子、大谷真志 マウス表皮ケラチノサイトの croton oil 刺激誘導性サイトカイン発現における mTORC1 の関与 第38回 日本分子生物学会年会 (2015年12月1日、神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市)
2. Ohtani, M., Uemura, H., and Watanabe, M. Oral administration of whole dihomo- γ -linolenic acid-producing *Saccharomyces cerevisiae* suppresses irritant contact dermatitis in mice. 19th International conference of FFC - 7th International symposium of ASFFBC (Nov. 17, 2015, Kobe Univ., Kobe City, Hyogo, Japan)
3. Ohtani, M., Fujii, H., Ohara, O., Koyasu, S., Kubo, M., and Matsuda, S. B-lineage specific loss of mTORC1 signal causes selective production of IgA against commensal bacteria. 第43回 日本免疫学会総会・学術集会 (2014年12月10日、京都国際会議場、京都府京都市)
4. 寺津聡一郎、大谷真志、矢澤弥、植村浩、渡辺直子 ジホモ- γ -リノレン酸産生酵母菌の経口投与による皮膚炎症応答の抑制効果 第37回 日本分子生物学会年会 (2014年11月27日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市)
5. Ohtani, M., Fujii, H., Koyasu, S., Kubo, M., and Matsuda, S. mTOR complex 1 is critical for B cell development but not IgA production. 第42回 日本免疫学会総会・学術集会 (2013年12月12日、幕張メッセ、千葉県千葉市)
6. Matsuda, S., and Ohtani, M. Role of the mTORC1 signaling pathway in thymocyte development. 第42回 日本免疫学会総会・学術集会 (2013年12月12日、幕張メッセ、千葉県千葉市)
7. Ohtani, M., Watanabe, T., Hoshii, T., Koyasu, S., Ohara, O., Hirao, A., Kubo, M., and Matsuda, S. mTOR complex 1 regulates B cell development through IgHm expression. 第36回 日本分子生物学会年会 (2013年12月5日、神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市)
8. Ohtani, M., Fujii, H., Sakai, K., Hoshii, T., Watanabe, T., Koyasu, S., Hirao, A., and Matsuda, S. mTOR complex 1 regulates B cell development. 第 78 回日本インターフェロン・サイトカイン学会総会 / 第 21 回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム合同学術集会 (2013年5月20日、都市センターホテル、東京都千代田区)

〔その他〕

東邦大学・理学部・生物分子科学科・大谷研究室ホームページ

http://www.sci.toho-u.ac.jp/biomol/lab/ohtani_lab/index.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大谷 真志 (OHTANI, Masashi)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号：20383713

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

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

渡邊 利雄 (WATANABE, Toshio)

奈良女子大学・大学院人間文化研究科・教

授

研究者番号：60201208