

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590439

研究課題名（和文） 樹状細胞 mTOR 経路を標的とした免疫制御の分子基盤

研究課題名（英文） Immune regulation through dendritic cell-specific mTOR pathway

研究代表者

松田 達志 (MATSUDA SATOSHI)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00286444

研究成果の概要（和文）：IL-10 は、自己免疫反応の抑制など免疫応答の閾値を制御する重要なサイトカインであるが、その産生機構には不明な点が多い。本研究では、細胞増殖の制御因子と考えられてきた mTORC1 経路が、樹状細胞において IL-10 の発現を正に制御していることを明らかにした。さらに、樹状細胞特異的に mTORC1 シグナルを欠失させると、特に腸管における炎症反応が増悪化することを見出した。

研究成果の概要（英文）：Although several reports have suggested the involvement of mTORC1 in development and function of dendritic cells (DCs), its physiological roles remain obscure. By using mTORC1 signal-deficient mice lacking Raptor, an essential component of mTORC1 signal, specifically in DC lineage (referred to here as *Raptor*<sup>DC-/-</sup>), we found that impaired mTORC1 signal resulted in the suppression of IL-10 production in intestinal CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> DCs. We also found that *Raptor*<sup>DC-/-</sup> mice were highly susceptible to dextran sodium sulfate-induced colitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：mTOR、樹状細胞、IL-10、Raptor、免疫制御、サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

免疫系は、微生物をはじめとした種々の異物の侵入・増殖の危機から個体を守るために、様々な免疫担当細胞からなる協調的なネットワークを形成している。中でも自然免疫系と獲得免疫系の橋渡しの存在である樹状細胞は、免疫系の司令塔である T 細胞に抗原を

提示すると同時に IL-12 や IL-6 に代表される炎症性サイトカインを産生することで、細胞内寄生菌やウイルス感染細胞の除去・がん細胞の排除などに重要な役割を果たす Th1 反応、寄生虫の排除などに関与する Th2 反応、もしくは自己免疫応答をもたらす Th17 反応の何れを誘導するかを規定している。これら

質的な免疫応答制御に加え、樹状細胞の産生する IL-10 をはじめとした抑制性サイトカインが、免疫応答の終息や免疫応答の閾値の決定といった免疫応答の時間的・量的制御に関与することが、近年の解析から明らかにされつつある。実際、ごく最近、理化学研究所 RCAI の佐藤チームリーダーの研究グループは、IL-10・TGF- $\beta$ を高産生する制御性樹状細胞と呼ばれる一群の樹状細胞が、制御性 T 細胞の誘導を介して免疫応答の負の調節を行っていることを明らかにしている。しかし、炎症性サイトカインの産生制御機構の理解に比べ、IL-10 産生のシグナル伝達機構には未だ不明な点が多いのが現状である。

研究代表者は、クラス IA PI3K の制御サブユニットである p85 $\alpha$ を欠損したマウス(以下、PI3K 欠損マウス)を用い、クラス IA PI3K 経路が広く免疫系の制御に関与していることが明らかにしてきた。その過程で得られた“PI3K 経路が樹状細胞の活性化を負に調節している”という知見に着目し、本研究の連携研究者である大谷助教と共にその分子機構の解明に取り組んだ結果、PI3K 経路の下流因子の一つである mTOR が抑制性サイトカインである IL-10 の発現誘導を介して樹状細胞の活性化を負に調節していることを見出した(平成 19-20 年度 基盤研究(C))。すなわち、樹状細胞を mTOR に対する特異的阻害剤であるラパマイシンで処理することで、IL-10 の遺伝子発現が抑制され、結果として樹状細胞の活性化が亢進することを明らかにした。興味深いことに、この mTOR 経路を介した IL-10 発現調節機構は樹状細胞・マクロファージに特異的な現象であり、B 細胞や制御性 T 細胞の一種である Tr 細胞をラパマイシンで処理しても IL-10 遺伝子の発現抑制は認められなかった。したがって、mTOR 経路は樹状細胞・マクロファージ系譜特異的な分子機構で IL-10 の遺伝子発現を制御していることが強く示唆された。本研究では研究代表者らの見出したこれら知見を発展させ、mTOR 経路による IL-10 の遺伝子発現調節機構を分子レベルで解明するとともに、樹状細胞 mTOR

経路の活性を人為的に制御することで個体レベルでの免疫応答にどのような影響をもたらされるかを明らかにすることを目標に、解析に取り組んだ。

## 2. 研究の目的

具体的には、(1) mTORC1 の下流で IL-10 遺伝子発現を調節するエフェクター分子の同定と、(2) mTORC1 依存的な IL-10 遺伝子発現のシスエレメントの同定の二つのアプローチを併用することで、mTORC1 経路による IL-10 遺伝子発現制御機構の解明を目指すとともに、(3) 樹状細胞特異的に mTORC1 経路の活性阻害を行うことで、個体レベルの免疫応答にどのような影響をもたらされるかの検証を行った。

## 3. 研究の方法

- (1) ラパマイシン感受性の mTOR シグナル(以下、mTORC1 シグナル)は、4EBP1 と p70S6K の二つのエフェクター分子の活性制御を介して発揮されるものと考えられている。そこで、各経路に対する特異的阻害剤や優性不能型変異体の過剰発現系を用いることで、4EBP1・p70S6K の何れのエフェクター分子が IL-10 の発現制御に関わっているかを明らかにする。
- (2) 一方、予備的な検討の結果、ラパマイシン処理の前後で IL-10 のプロモータ領域に結合することの知られる転写因子群(SP1、NF- $\kappa$ B、STAT3、c-Fos、C/EBP など)の発現レベルに変化は認められず、ラパマイシン処理による IL-10 遺伝子発現の抑制は、これら既知のトランス因子と会合する分子の発現(活性)調節を介しているか、もしくはこれまでに報告の無いシスエレメントを介している可能性が強く示唆された。そこで、IL-10 遺伝子プロモータ領域(米国 UCLA の Smale ST 博士より供与)に各種欠失変異を導入

した変異レポーター遺伝子を作製し、樹状細胞に遺伝子導入した上でラパマイシン存在下・非存在下に刺激することで、mTOR 依存的なシスエレメントの同定を試みる。

- (3) 樹状細胞特異的に mTORC1 シグナルを欠失させるために、mTORC1 経路のシグナル伝達に必須な Raptor 分子を組織特異的に欠失可能なマウス (Raptor コンディショナルノックアウトマウス; 金沢大学の平尾教授より供与) と、樹状細胞特異的に Cre を発現する CD11c-Cre マウスを交配し、*Raptor*<sup>DC-/-</sup> マウスを作出し、個体レベルの解析を行う。

#### 4. 研究成果

- (1) 野生型マウスの骨髄から分化させた樹状細胞 (BMDC) に、p70S6K の恒常活性型変異体ならびに優性不能型変異体をレンチウイルスベクターによって遺伝子導入した上で、IL-10 産生能をコントロール BMDC と比較したところ、何ら差異は認められなかった。一方で、4EBP による eIF4E の阻害を模倣する化合物を野生型 BMDC に添加したところ、LPS 刺激に伴う IL-10 産生能の著しい低下が観察された。逆に、eIF4E の過剰発現により IL-10 産生の亢進が認められたことから、mTORC1 シグナルは 4EBP による eIF4E の阻害効果をキャンセルすることで IL-10 産生を正に調節していることが強く示唆された。
- (2) Smale ST 博士より供与された、マウス IL-10 遺伝子の転写開始領域上流 1 kb のプロモータ領域下流にルシフェラーゼを繋いだレポーター遺伝子を用い、mTORC1 シグナル依存的な転写因子の結合が認められるか否か、網羅的 EMSA な

らびに既知のシスエレメントの欠失によるレポーター活性の変化の有無により、検証を行った。しかし、予想に反して、mTORC1 シグナルの阻害により結合に変化の見られる分子は観察されず、mTORC1 シグナルはプロモーター領域以外のシスエレメントを標的に遺伝子発現を行っている可能性が示唆された。そこで、データベース上、IL-10 遺伝子の配列解析を行ったところ、exon1 と exon2 の間、ならびに exon3 と exon4 の間に、それぞれ種を超えて保存された領域が存在することが明らかとなった。実際、exon3 と exon4 の間の領域を対象に網羅的 EMSA 解析を行ったところ、mTORC1 シグナルを阻害した際にシグナルが消失する領域を 2 カ所見出すことができた。しかし、mTORC1 シグナルを阻害しても、当該領域に結合すると予想される転写因子の発現レベルに差は認められず、mTORC シグナルは転写因子複合体を構成する未知の因子の発現に間接的に関与している可能性が考えられた。

- (3) *Raptor*<sup>DC-/-</sup> マウスを作出して、全身の樹状細胞の数や分布を調べたところ、mTORC1 シグナルが細胞増殖や生存に関わるとの教科書的な記述に反して、調べた範囲の樹状細胞ポピュレーションにおいて、細胞数の低下は一切観察されず、むしろ脾臓における CD8 陽性樹状細胞や、腸管における CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>樹状細胞数の増加が認められた。CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>樹状細胞を詳細に調べたところ、抑制性サイトカインとして知られる IL-10 の産生能が低下し、全体的に活性状態が亢進していることが明らかとなった。CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>樹状細胞は、腸管における炎症反応制御に重要な役割を担うことが知られてい

ることからドデシル硫酸ナトリウムによる実験的大腸炎を誘発させたところ、コントロールマウス (*Raptor*-f1/f1) に比べ *Raptor*<sup>DC-/-</sup> マウスにおいて有意に炎症反応の増悪が認められた。すなわち、mTORC1 シグナルが、樹状細胞による IL-10 産生を介して、腸管における免疫的恒常性維持に寄与していることが強く示唆された (図 1)。

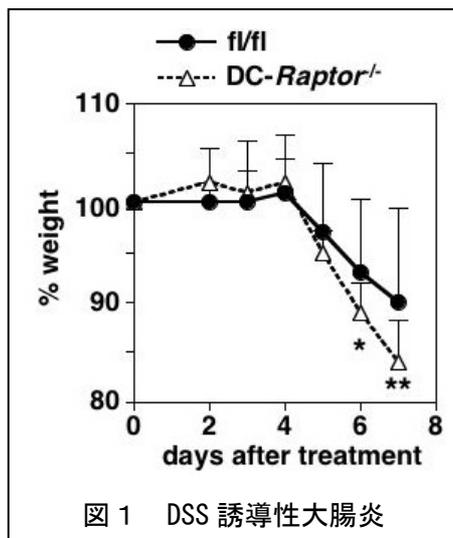


図 1 DSS 誘導性大腸炎

##### 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)

- ① Takayama, G., Ohtani, M., Minowa, A., Matsuda, S., and Koyasu, S. Class I PI3K-mediated Akt and ERK signals play a critical role in FcεRI-induced degranulation in mast cells. *Int. Immunol.*、査読有、vol.25、2013、pp.215-220.  
DOI: 10.1093/intimm/dxs105
- ② Powers, S. E., Mandal, M., Matsuda, S., Miletic, A. V., Cato, M. C., Tanaka, A., Rickert, R. C., Koyasu, S., and Clark, M. R. Subnuclear cyclin D3 compartments and the coordinated regulation of proliferation and immunoglobulin variable gene repression. *J. Exp. Med.*、査読有、vol.209、2012、pp.2199-2213.  
DOI: 10.1084/jem.20120800
- ③ Ohtani, M., Hoshii, T., Fujii, H.,

Koyasu, S., Hirao, A. and Matsuda, S. mTORC1 in intestinal CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> dendritic cells regulates intestinal homeostasis by promoting IL-10 production. *J. Immunol.*、査読有、vol.188、2012、pp.4736-4740.

DOI: 10.4049/jimmunol.1200069

- ④ Kurebayashi, Y., Nagai, S., Ikejiri, A., Ohtani, M., Ichiyama, K., Baba, Y., Yamada, T., Egami, S., Hoshii, T., Hirao, A., Matsuda, S., and Koyasu, S. PI3K-Akt-mTORC1-S6K1/2 axis controls Th17 differentiation by regulating Gfi-1 expression and nuclear translocation of RORγ. *Cell Rep.*、査読有、vol.1、2012、pp.360-373  
DOI: 10.1016/j.celrep.2012.02.007
- ⑤ Yokoyama, T., Matsuda, S., Takae, Y., Wada, N., Nishikawa, T., Amagai, M., and Koyasu, S. Antigen-independent development of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells suppressing autoantibody production in experimental pemphigus vulgaris. *Int. Immunol.*、査読有、vol.23、2011、pp.365-373.  
DOI: 10.1093/intimm/dxr020

[学会発表] (計 6 件)

- ① 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、2012 年 12 月 13 日、福岡
- ② 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 14 日、福岡
- ③ 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、2012 年 12 月 5 日、神戸
- ④ Matsuda, S. and Ohtani, M. Role of the mTORC1 signaling pathway in T cell development. 第 40 回日本免疫学会学術集会、2011 年 11 月 29 日、幕張
- ⑤ Ohtani, M. and Matsuda, S. Role of mTORC1 in immune function of dendritic cells. 第 40 回日本免疫学会学術集会、2011 年 11 月 29 日、幕張
- ⑥ Nagai, S., Kurebayashi, Y., Baba, Y.,

Matsuda, S., and Koyasu, S.  
PI3K-Akt-mTORC1 axis controls Th17  
differentiation by regulation of Gfi-1  
and ROR $\gamma$ t. 第40回日本免疫学会学術集  
会、2011年11月28日、幕張

[その他]

ホームページ等

<http://www3.kmu.ac.jp/bioinfo/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松田 達志 (MATSUDA SATOSHI)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00286444

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

大谷 真志 (OHTANI MASASHI)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：20383713