

平成 30 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2013～2017

課題番号：25221305

研究課題名(和文)炎症抑制と組織修復を促す細胞シグナルの解明

研究課題名(英文)Identification of Cellular Signaling Mechanism that regulates inflammation and tissue repairing

研究代表者

吉村 昭彦 (YOSHIMURA, Akihiko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：90182815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 132,500,000円

研究成果の概要(和文)：免疫システムは正負のシグナルがバランスを保って進行することで恒常性が維持され、この破綻がアレルギー疾患などの免疫疾患につながる。本研究はこのような免疫応答の恒常性を支えるサイトカインとそのシグナル制御の基本原理の解明し、疾患治療に応用することを目的とする。本研究では免疫を負に制御し炎症応答を収束させる3つの重要な因子を見出した。第一は核内オーファン受容体NR4aで制御性T細胞の発生維持に必要である。第二はSmad転写因子で免疫抑制因子であるTGF $\beta$ の産生制御を行う。第三は修復性マクロファージで死細胞より放出される因子を処理し炎症を収束させる。

研究成果の概要(英文)：The immune system maintains homeostasis by positive and negative signaling, and dysregulation of this system leads to immune diseases such as allergies. This study aims to elucidate the basic principle of cytokines and their regulation which maintain the immune homeostasis, and to apply our findings to treatment of diseases. In this study, we found three important immunological factors that regulates the inflammatory responses. The first is NR4a transcription factors, which are necessary for the development and maintenance of regulatory T cells. The second is Smad transcription factors, which control the production of TGF $\beta$ , an immunosuppressive factor. The third is preparing macrophages which are involved in resolution of inflammation by clearing the factors released from dead cells.

研究分野：基礎医学・免疫学

キーワード：サイトカイン シグナル伝達 炎症 マクロファージ 制御性T細胞 組織障害 修復

### 1. 研究開始当初の背景

免疫システムは正負のシグナルがバランスを保って進行することで恒常性が維持される。このような恒常性の維持機構は主にサイトカインや増殖因子によって制御され、この破綻がアレルギー疾患、炎症性疾患や自己免疫疾患につながる。本研究はこのような免疫応答の恒常性を支えるサイトカインとそのシグナル制御の基本原理の解明し、疾患治療に応用することを目的とする。

### 2. 研究の目的

本研究課題ではシグナルネットワーク制御の観点から免疫シグナル間相互作用を解析することで複雑な免疫応答制御をより単純化して理解し、他の疾患制御系にも通じる新たなパラダイムの確立をめざす。特に以下の3点を明らかにする。(1)抗炎症細胞の代表的な存在である Treg の分化誘導および維持に関する分子機構を転写因子 NR4a および TGF の作用の観点から解明する。(2)消化管や脳における免疫寛容維持のメカニズムを、野生型マウスと各種サイトカインレポーターマウスやシグナルレポーターマウスを用いて解析する。(3)炎症の収束から組織修復に変換する細胞と因子を同定し、炎症性疾患の治療に結びつく全く新しい方法論を提案する。本研究の推進によってサイトカインのシグナルネットワーク調節の分子機構が明らかになれば、これらの炎症が関与する多くの疾患の病態の理解や全く新しい治療方法が開発される可能性がある。

### 3. 研究の方法

(1)我々は T 細胞受容体(TCR)の刺激に応じて転写誘導される Foxp3 誘導因子として NR4a ファミリーを発見した。本研究では Foxp3Cre を用いて NR4a を Treg 特異的に欠損したマウスを作製し NR4a の Treg の維持における生理的意義を明らかにする。(2) iTreg(induced Treg)は定常状態では腸管に多く存在しており、消化管内の Treg のおよそ 2/3 が iTreg と言われる。この腸管内 iTreg の発生にはクロストリジウム属などの腸内細菌が必要である。本研究では Smad3 欠損あるいは Smad2 欠損樹状細胞を用いてクロストリジウム属菌による TGF を介した iTreg 誘導機構の解明を行なう。(3)神経炎症モデルである脳虚血モデルを用いて炎症性サイトカインの組織損傷における意義を明らかにする。

### 4. 研究成果

(1)NR4a による Treg の維持機構の解明  
我々は Treg に高発現し Foxp3 プロモーターを直接活性化しうる転写因子として NR4a

ファミリーを単離した。Treg 特異的 NR4a 欠損マウスを作製したところ、このマウスは加齢とともに自己抗体の産生を伴う自己免疫疾患で死亡した。マイクロアレイ解析を行ったところ NR4a 欠損 Treg は IL-4, IL-5, IL-13 などの Th2 サイトカイン、および Tfh 関連サイトカイン IL-21 の産生が更新し、さらに CD25, CTLA4, *Irf4*(EOS) の発現が低下していた。NR4a 欠損 Treg の生体内での運命を調べるために NR4a 欠損 Treg を T 細胞欠損マウスに移入したところ、早期に SLE 様の自己免疫疾患を発症し移入した Treg は多くは Foxp3 の発現が低下し Th2 や Tfh の表現型をもった細胞に転換していた。Whole-genome ChIP の結果、NR4a1 が *Irf4* のプロモーター部分に会合していることが証明された。また NR4a は IL-4 や IL-21 遺伝子にも直接結合し、これらの転写を負に制御することも示された。すなわち NR4a は Treg において Foxp3 と Eos の発現を正に制御し、一方で Th2, Tfh エフェクター機能に重要な IL-4 や IL-21 などの炎症促進分子の発現を抑制する機能があることがわかった。本研究成果は *J.Exp.Med* (2015;212:1623-40)に掲載された。

(2)クロストリジウム属菌による樹状細胞からの TGF シグナルによる iTreg 誘導制御機構の解明

消化管における Treg の多くは TGF によって誘導される iTreg である。iTreg の誘導には腸内細菌、特にクロストリジウム属菌が重要であることが知られている。そこで *Clostridium Butyricum* (CB) 菌の芽胞をマウスに2週間投与したところ iTreg の増加と DSS 誘導性腸炎の抑制が見られた。CB はグラム陽性菌でありその主な樹状細胞活性化菌体成分はペプチドグリカン(PGN)である。PGN は TLR2-ERK-AP1 経路を介して TGF プロモーターを活性化した。さらに TGF の強力な発現誘導には TGF そのものの刺激(オートインダクション)が必要であることが見出された。驚いたことに Smad3 欠損樹状細胞では TGF の産生が激減するのに対し、Smad2 欠損では逆に TGF 産生が促進された。Smad3 は p300 ヒストンアセチル化酵素を TGF プロモーター上にリクルートし、Smad2 はこれを抑制することが明らかとなった。本研究成果は *Immunity* (2015;43:65-79)に掲載された。

(3)炎症の収束に関与する新たな分子機構の解明と治療への応用

本基盤 S 研究目標のひとつは炎症の収束過程の分子基盤とそれに関与する細胞の性質を明らかにして疾患治療に役立てることである。我々はマウス脳梗塞モデルを用い

て炎症の促進と組織傷害の拡大に寄与する分子細胞レベルでのメカニズムを明らかにして来た。組織破壊によって死細胞より放出される DAMPs (Damage-associated molecular patterns) としてペルオキシレドキシシン (Prx) を同定した。Prx はマクロファージに添加すると急速に細胞内に取り込まれてリソゾームによって分解された。そこで Prx に特異的な受容体が存在すると考えて Prx 受容体遺伝子のクローニングを試みた。蛍光標識 Prx を用いた発現クローニングの結果、取り込み受容体としてスカベンジャー受容体 Msr1 を同定した。一方 ENU 処理したマクロファージ Raw 株細胞より Prx を取り込めなくなった変異クローン株を単離した。複数の独立株で様々なスカベンジャー受容体といくつかの転写因子の発現が低下していることがわかった。遺伝子の戻し実験によってタイプ A スカベンジャー受容体 Msr1 や Marco を遺伝子導入すると Prx 取り込み能が回復した。さらに転写因子 *Mafb* の強制発現でも内因性の Msr1 の発現が回復し Prx の取り込みが回復した。*Mafb* は Msr1 のプロモーター領域に会合して Msr1 の転写を促進することがわかった。これらのスカベンジャー受容体と *Mafb* の脳梗塞後の炎症における役割を明らかにするために Msr1/Marco 欠損マウス、マクロファージ特異的 *Mafb* 欠損マウスを用いて脳梗塞モデルを行なった。その結果これらのマウスでは梗塞体積の増大や神経症状の悪化が認められ、通常 2-3 日で消失するはずの Prx などの DAMPs が 4 日目以降も残存していた。すなわちスカベンジャー受容体は DAMPs をクリアランスすることで炎症の収束に寄与することが考えられる。さらに浸潤マクロファージを経時的に解析したところ浸潤直後の 1 日目では Msr1 の発現は低いがその後日を追うごとに発現が増加し、Prx の取り込み能が増加した。Msr1 の発現を指標に FACS によって分離して遺伝子発現を比較したところ、Msr1<sup>low</sup> マクロファージは IL-1 や IL-23 などの炎症性の因子を強く発現し、一方で Msr1<sup>high</sup> マクロファージは炎症性サイトカインの発現は低く逆に IGF1 などの組織修復に働くと思われる因子の発現が高かった。したがって炎症収束に働く Msr1<sup>high</sup> マクロファージは修復性マクロファージと考えられる。炎症性から修復性への転換の分子機構については現在検討中であるが、先に見出した *Mafb* が鍵を握って

いる可能性が高い。*Mafb* の発現はレチノイン酸受容体 RAR で活性化されることが知られている。そこでアゴニスト Am80 を投与したところ脳梗塞後の炎症の抑制と梗塞体積の減少が認められた。以上のことから本研究によって *Mafb*-Msr1 を介した新たな炎症収束機構と、それに関与する修復性マクロファージを同定した。本研究成果は *Nature Med.* 2017, 23: 723-732. に掲載された。

#### 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 42 件) すべて査読あり

1. Hibino S, Chikuma S, Kondo T, Ito M, Nakatsukasa H, Omata-Mise S, Yoshimura A. Inhibition of Nr4a receptors enhances anti-tumor immunity by breaking Treg-mediated immune tolerance. *Cancer Res.* 2018. in press pii: canres.3102.2017. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3102
2. Tadokoro Y, Hoshii T, Yamazaki S, Eto K, Ema H, Kobayashi M, Ueno M, Ohta K, Arai Y, Hara E, Hartada K, Oshima M, Arai F, Yoshimura A, Nakauchi H, Hirano A. Spred1 Safeguards Hematopoietic Homeostasis against Diet-Induced Systemic Stress *Cell Stem Cell* 2018, 22: 713-725. doi: 10.1016/j.stem.2018.04.002
3. Kondo T, Morita R, Okuzono Y, Nakatsukasa H, Sekiya T, Chikuma S, Shichita T, Kanamori M, Kubo M, Koga K, Miyazaki T, Kassai Y, Yoshimura A Notch-mediated conversion of activated T cells into stem cell memory-like T cells for adoptive immunotherapy *Nature Commun* 2017; 8:15338. doi: 10.1038/ncomms15338.
4. Shichita T, Ito M, Morita R, Komai K, Noguchi Y, Ooboshi H, Koshida R, Takahashi S, Kodama T, Yoshimura A. MAFB prevents excess inflammation after ischemic stroke by accelerating clearance of damage signals through MSR1. *Nature Med.* 2017, 23: 723-732. doi: 10.1038/nm.4312
5. Okada, M., S. Chikuma, T. Kondo, S. Hibino, H. Machiyama, T. Yokosuka, M. Nakano, and Yoshimura A. Blockage of Core Fucosylation Reduces Cell-Surface Expression of PD-1 and Promotes Anti-tumor Immune Responses of T Cells. *Cell Reports* 2017; 20: 1017-1028. doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.027.
6. Yoshimura, A., Ito, M., Chikuma, S., Akanuma, T., and Nakatsukasa, H. Negative Regulation of Cytokine Signaling in Immunity. *Cold Spring*

*Harb Perspect Biol.* 2017; doi:  
10.1101/cshperspect.a028571

7. Masamoto Y, Arai S, Sato T, Yoshimi A, Kubota N, Takamoto I, Iwakura Y, Yoshimura A, Kadowaki T, Kurokawa M. Adiponectin Enhances Antibacterial Activity of Hematopoietic Cells by Suppressing Bone Marrow Inflammation. *Immunity*. 2016 ; 44(6): 1422-33. doi: 10.1016/j.immuni.2016.05.010.

8. Morita R, Suzuki M, Kasahara H, Shimizu N, Shichita T, Sekiya T, Kimura A, Sasaki K, Yasukawa H, Yoshimura A ETS transcription factor ETV2 directly converts human fibroblasts into functional endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(1): 160-5. doi: 10.1073/pnas.1413234112.

9. Taniguchi K, Wu LW, Grivennikov SI, de Jong PR, Lian I, Yu FX, Wang K, Ho SB, Boland BS, Chang JT, Sandborn WJ, Hardiman G, Raz E, Maehara Y, Yoshimura A, Zucman-Rossi J, Guan KL, Karin M. A gp130-Src-YAP module links inflammation to epithelial regeneration. *Nature*. 2015; 519(7541):57-62. doi: 10.1038/nature14228.

10. Ito M, Shichita T, Okada M, Komine R, Noguchi Y, Yoshimura A, Morita R. Bruton's tyrosine kinase is essential for NLRP3 inflammasome activation and contributes to ischaemic brain injury. *Nat Commun*. 2015; 6:7360. doi: 10.1038/ncomms8360.

11. Kashiwagi I, Morita R, Schichita T, Komai K, Saeki K, Matsumoto M, Takeda K, Nomura M, Hayashi A, Kanai T, Yoshimura A. Smad2 and Smad3 Inversely Regulate TGF- $\beta$  Autoinduction in Clostridium butyricum-Activated Dendritic Cells. *Immunity*. 2015; 43(1):65-79. doi: 10.1016/j.immuni.2015.06.010.

12. Sekiya T, Kondo T, Shichita T, Morita R, Ichinose H, Yoshimura A. Suppression of Th2 and Tfh immune reactions by Nr4a receptors in mature T reg cells. *J. Exp Med*. 2015; 212(10):1623-40. doi: 10.1084/jem.20142088.

〔学会発表〕(計 45 件)

1. Akihiko Yoshimura, “Induction of Stable TGF- $\beta$ -Mediated Regulatory T Cells by Epigenetic Modifications”  
2017 Keystone Symposia on TGF- $\beta$  in Immunity, Inflammation and Cancer. 1/ 9-14, 2017, Taos, New Mexico, USA

2. Akihiko Yoshimura “SPRED1, the gene responsible for Legius Syndrome, suppresses Ras activation by interacting with the GAP-related domain of neurofibromin” NF conference 2016 2016 6/20 Austin USA

3. Akihiko Yoshimura “SOCS, inflammation and tumor”  
CIACCO-2016 5th Annual symposium on Cytokines in Inflammation, Ageing, CanCer and

Obesity 2016 5/20 The Round Hearth Eastman, Québec, Canada

4. Akihiko Yoshimura “Regulatory T cell generation by transcription factors and epigenetics”  
AIM Series Seminar, Institute for Basic Science (IBS) 2016 2/24 Pohang, Korea

5. Akihiko Yoshimura “Regulation of regulatory T cell fate by NR4a nuclear factors” International Symposium on Epigenetics and Autoimmunity (ISEA) 4/25, 2015 Changsha, China

6. Akihiko Yoshimura, Minako Ito, Masahiro Okada, and Takashi Shichita “Molecular Basis for the Post-Ischemic Inflammation in the Brain”  
The 12th International Congress of Neuroimmunology Mainz, Germany, 11/9 - 13

7. Akihiko Yoshimura, Ikko Kashiwagi “Treg induction by gram-positive bacterium Clostridium Butylicum in the intestine is mediated by TLR2- and Smad3-dependent TGF- $\beta$  production in dendritic cells”  
The Fourth International Conference on Regulatory T Cells and Th Subsets and Clinical Application in Human Diseases 11/1-4, 2014, Shanghai, China.

8. YOSHIMURA Akihiko and SEKIYA Takashi Generation of regulatory T cells (Tregs) by TGF- $\beta$  and NR4a nuclear factor.  
The FIMSA International Symposium on Autoimmune Diseases Beijing China, 2013/17-20

9. Akihiko Yoshimura and Takashi Sekiya. The nuclear orphan receptor Nr4a family is essential for nTreg development and immune homeostasis. 1st RCCH international symposium. Seoul, 2013/6/10.

10. Akihiko Yoshimura and Takashi Sekiya. The nuclear orphan receptor Nr4a family is essential for nTreg development and immune homeostasis. 2013 Symposium on Epigenetics and Autoimmunity. Chengdu, China, 2013/6/19.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 1 件)

名称: 発明の名称: 繊維芽細胞から血管内皮細胞を製造する方法  
発明者: 森田林平、吉村昭彦  
権利者: 慶應義塾大学医学部  
種類: 特許

番号：2013-232517  
出願年月日：平成 25 年 11 月 8 日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等：<http://new2.immunoreg.jp>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

吉村 昭彦 (YOSHIMURA, Akihiko)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：90182815

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

関谷 高史 (SEKIYA, Takashi)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：80519207

木村 彰宏 (KIMURA, Akihiro)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20533318

七田 崇 (SHICHITA, Takashi)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：00598443

##### (4)研究協力者

なし