

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔平成28年度研究進捗評価用〕

平成25年度採択分  
平成28年3月5日現在

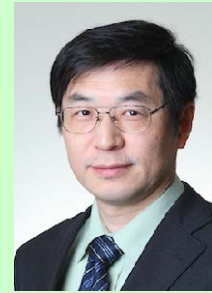
炎症抑制と組織修復を促す細胞シグナルの解明

Identification of Cellular Signaling Mechanism that regulates inflammation and tissue repairing

課題番号：25221305

吉村 昭彦 (YOSHIMURA AKIHIKO)

慶應義塾大学・医学部・教授



研究の概要

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。特に炎症細胞の活性化シグナル、炎症を収束させる制御性T細胞を産み出すシグナル、炎症を収束させる負のシグナル、さらに組織修復にかかわる未知のシグナルの解明をめざす。

研究分野：基礎医学 免疫学

キーワード：炎症 免疫制御 シグナル伝達

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 $\beta$  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 $\beta$  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. これまでの成果

(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 *Ikzf4* 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。本研究は本年度 *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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  プロモーターを活性化した。さらに TGF $\beta$  の強力な発現誘導には TGF $\beta$  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 $\beta$  の産生が激減するのに対し、Smad2 欠損では逆に TGF $\beta$  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。本研究は本年度 *Immunity* (2015;43: 65-79) に掲載された。

(3) 新規インフラマゾーム活性化因子 BTK の発見と脳梗塞後の炎症における役割の解明

我々は BTK チロシンキナーゼ阻害剤が NLRP3 インフラマゾームの活性化を抑制することで IL-1 $\beta$  産生を抑制するを発見した。BTK 欠損マウスではインフラマゾームの活性化が低下していた。生化学的な解析から BTK は酵素活性依存的に NLRP-ASC 複合体の重合を促進し caspase1 の活性化を誘導することがわかった。次に IL-1 $\beta$  欠損マウス、caspase1 欠損マウス、および BTK 阻害剤イブルチニブを用いて脳虚血による炎症や脳梗塞体積や

神経炎症の程度を評価した。その結果脳梗塞における組織傷害において caspase1 および IL-1 $\beta$  が促進的に働くことが判明した。さらに BTK 阻害剤投与によって IL-1 $\beta$  の産生が抑制され、また脳梗塞体積は減少し、神経症状の改善も見られた。イブルチニブは、慢性リンパ性白血病の治療薬として米国で承認された薬で、関節リウマチや自己免疫疾患の治療薬としても期待されており、脳虚血後の神経障害の改善にも有効である可能性が示唆された。本研究の成果は本年度 *Nature Communications* (2015;6:7360) に掲載された。

## 5. 今後の計画

(1) NR4a に会合する分子のプロテオーム解析を行い、転写制御に必要な因子を明らかにする。

(2) TGF $\beta$  は線維化にも深く関与するので Smad2 欠損マウスの病態モデルを活用して、抑制性樹状細胞が神経再生や組織修復と関連するかを明らかにする。今後修復性マクロファージの性格づけと分化誘導のメカニズムを明らかにして行く。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)  
Sekiya T, et al. Suppression of Th2 and Tfh immune reactions by Nr4a receptors in mature Treg cells. *J Exp Med.* 2015, 212(10):1623-40.

Kashiwagi I et al. Smad2 and Smad3 Inversely Regulate TGF- $\beta$  Autoinduction in *Clostridium butyricum*-Activated Dendritic Cells. *Immunity.* 2015, 43(1):65-79.

Ito M et al. Bruton's tyrosine kinase is essential for NLRP3 inflammasome activation and contributes to ischaemic brain injury. *Nat Commun.* 2015 Jun 10;6:7360.

## 新聞掲載

① 腸内細菌が免疫調節たんぱく質と免疫制御細胞を誘導し腸管免疫の恒常性を保つしくみを解明

平成27年 7/1 日刊工業新聞, 化学工業日報 7/2 日本経済産業新聞

② 脳梗塞後の炎症が悪化するメカニズムを解明

平成27年 6/11 日本経済新聞 6/12 日刊工業新聞 6/22 薬事日報 7/2 毎日新聞 7/23 朝日新聞朝刊