

## 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：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592741

研究課題名(和文)免疫監視システム制御に関わる新規シグナル分子機構の解明

研究課題名(英文)Identification of novel signaling molecules controlling immune surveillance

研究代表者

松口 徹也 (MATSUGUCHI, TETSUYA)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：10303629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：免疫監視機構の効果的な制御は、重篤疾患の予防に繋がることから社会的意義も大きいですが、その詳細な分子機構は不明である。また近年、運動負荷と免疫の関係が注目されている。本研究ではJNK特異的フォスファターゼであるDUSP16がTh1/Th2分化バランスをTh2方向に偏位させること、MAPキナーゼシグナルの上流キナーゼであるCot/Tpl2が抗原提示細胞におけるIL-12 mRNAの分解を促進することを示した。これら2つの蛋白は免疫監視制御のkey分子であると考えられる。また、メカニカルストレスの1種である超音波刺激が、TLRシグナルによるケモカイン産生を抑制することで抗炎症作用を持つことを示した。

研究成果の概要(英文)：The good control of immune surveillance is socially significant as it is essential for the prevention of severe diseases. However, the molecular mechanisms of immune surveillance have not been well defined. Recently, the relationship between exercise and immunity has attracted a lot of attention. Here, we have shown that DUSP16, a JNK-specific MAP kinase phosphatase, is functionally important to deviate Th1/Th2 balance toward Th2. Our research results have also revealed that Cot/Tpl2, an upstream kinase of the MAP kinase cascade, functionally decreases IL-12 p40 mRNA. Thus, these two molecules are considered as key controlling molecules of immune surveillance. We have furthermore shown that the ultrasound, one of the mechanical stresses, can be anti-inflammatory by inhibiting TLR signals.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：機能系基礎歯科学

キーワード：シグナル伝達 メカニカルストレス T細胞 細胞分化 Th1/Th2 骨芽細胞 ケモカイン サイトカイン

### 1. 研究開始当初の背景

免疫監視とは、元来、自然発症するガン細胞を認識・排除する免疫系の監視システムとして1960年代にBurnet によって初めて提唱されたが、現在では、腫瘍免疫だけでなく外来病原体の脅威からの生体防御機構を含めた security system として広く知られている。免疫監視の破綻はガン、難治性感染症などの重篤疾患に繋がることから、免疫監視機構の効果的な制御の重要性は明白であるが、ゲノム科学を含めた近年の飛躍的な研究の進歩にもかかわらず、この制御機構の全貌は依然として明らかにされていない。また近年、運動負荷が免疫機能に影響を与えることが注目されている。

免疫監視制御システムの重要な基盤となるのは、自然免疫系の樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞からCD4+T細胞へと抗原情報が伝えられる抗原提示と呼ばれるステップである。抗原提示を受けたナイーブCD4+T細胞は、エフェクターヘルパーT(Th)細胞へと分化するが、分化形式の違いによって異なった種類のサイトカインを産生する。Th1細胞は主にIFN $\gamma$ を産生することで細胞性免疫を誘導し、CD8+細胞傷害性T細胞(CTL)、ナチュラルキラー(NK)細胞やマクロファージの活性化を介して、ウイルスや細胞内細菌感染細胞、ガン細胞などを標的とする。Th2細胞は、主にIL-4、IL-5、IL-13を産生することで体液性免疫を誘導し、主に寄生虫や細胞外感染細菌などを標的とする。Th17はIL-17A/Fを産生することで好中球主体の炎症反応を誘導する。一方iTregはTGF $\beta$ やIL-10を分泌し、免疫抑制機能を有する。これらのThの分化様式は、抗原提示時の抗原提示細胞や周囲細胞から分泌されるサイトカイン濃度によって影響されることが知られ、特にTh1/Th2分化は、それぞれIL-12、IL-4によって促進される。各種の遺伝子欠損マウス等を用いた実験から、ガン細胞に対する免疫監視にはTh1 分化に伴い産生さ

れるIFN $\gamma$ が根幹となることが証明されている。

### 2. 研究の目的

(1) 免疫監視に関わるkey分子の同定:

過去の報告および予備実験データより、免疫監視制御のkeyシグナル分子候補としてフォスファターゼであるDUSP16(MKP-M) およびCot/Tp12キナーゼの2分子を同定した。これらの分子の免疫制御における役割をin vitro、in vivo両面で検討することを目的とした。

(2) メカニカルストレスと免疫監視能:

メカニカルストレス負荷が、骨芽細胞におけるケモカイン産生能に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 免疫監視制御における DUSP16、Cot/Tp12 両分子の機能的役割の解析 (in vitro および in vivo 両面に渡る):

マウス脾臓由来のナイーブ CD4 陽性 T 細胞の CD3 刺激による in vitro Th 分化実験系における DUSP16 の発現量変化を調べた。次に同分化実験系において、アデノウイルスによる DUSP16 の強制発現が Th 分化様式に及ぼす影響を解析した。

野生型およびドミナントネガティブ(DN)変異型のDUSP16のコーディング配列をマウスLckプロモーター下流に繋いだ発現プラスミドを受精卵に導入することで、T細胞特異的な野生型およびDN型のDUSP16トランスジェニック(Tg)マウスを作成した。またES細胞を用いた通常の方法によってDUSP16 遺伝子欠損マウスを作成し、その表現型を解析した。

上記の3種のDUSP16遺伝子改変マウスおよびCot/Tp12 遺伝子欠損マウス(既報)から、ナイーブCD4陽性T細胞とマクロファージを単離し、in vitro 刺激実験によって、それぞれの細胞種のサイトカイン産生能、Th 分化様式を解析した。以上の所見から、サイトカイン産生能およびTh 分化様式におけるDUSP16

とCot/Tp12 の役割を明らかにした。

in vivoにおける抗原特異的免疫反応を解析する目的で、野生型およびDN変異型のT細胞特異的DUSP16Tgマウスに対して卵白アルブミン(OVA)による感作を複数回行い、感作後血清中のOVA特異的免疫グロブリンサブタイプ濃度を測定した。

Cot/Tp12遺伝子欠損マウスより腹腔マクロファージを単離し、LPS誘導性のIL-12産生量を野生型マクロファージと比較し、その産生分子メカニズムにおけるCot/Tp12の役割について検討した。

(2) メカニカルストレスが骨芽細胞の分化能およびケモカイン産生能に及ぼす影響の解明：

骨芽細胞(初代培養および培養細胞株)に低出力超音波(LIPUS)を照射し、LPS誘導性のケモカイン産生能に及ぼす影響を、リアルタイムPCR定量法で調べた。

骨芽細胞および間葉系幹細胞株にLIPUS刺激を加え、それぞれの骨・脂肪細胞分化におよぼす影響を、細胞染色、リアルタイムPCR定量法等で解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 免疫監視制御におけるDUSP16、Cot/Tp12両分子の機能的役割の解析：

マウス脾臓由来のナイーブCD4陽性T細胞のCD3刺激によるTh分化実験系において、DUSP16の遺伝子・蛋白発現レベルはTh1分化に伴って低下し、逆にTh2分化に伴って著しく上昇した。これはTh2分化細胞におけるDUSP16遺伝子プロモーター領域のヒストンH3/H4アセチル化レベルの上昇を伴っていた。またヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤であるトリコスタチンAの処理によって、DUSP16の遺伝子発現が著明に上昇することを確認した。次に、アデノウィルスベクターを用いて、マウスナイーブCD4陽性T細胞に

DUSP16を強制発現させ、そのin vitro Th分化に対する影響を調べたところ、野生型DUSP16を強発現させることでTh分化をTh2方向に、逆にDN型DUSP16の強制発現によってTh1方向に偏位が誘導されることを認めた。

樹立したDUSP16遺伝子欠損マウスについては、形態的に尾末端に特徴的な鉤状の変形を呈し、同部の椎間円板の形成不全を認めた。よって、DUSP16が骨格形成に必須の役割を果たすと考えられた。一方、末梢血、胸腺のリンパ球分画に著明な異常は見られなかった。

DUSP16遺伝子欠損マウスの腹腔内LPS投与実験において、野生型マウスに比較して、血中TNF $\alpha$ 濃度の軽度上昇とIFN $\gamma$ 濃度の著明な上昇を認めた。一方、DUSP16遺伝子欠損マウスから単離した腹腔マクロファージのLPS刺激実験においては、TNF $\alpha$  mRNA上昇の遅延を認めたが、IFN $\gamma$ 、IL-12 p40 mRNAレベルは軽度の上昇を認めただけであった。

野生型DUSP16およびそのDN変異体のT細胞特異的Tgマウスに対してOVA感作後血清中の抗原特異的免疫グロブリンサブタイプ濃度を測定したところ、同じ処理を加えたコントロールのC57BL/6マウスに比べて、DN型DUSP16 TgマウスではOVA特異的IgG2a濃度が高値を示した。一方、野生型DUSP16 Tgマウスでは、コントロールマウスに比べOVA特異的IgG1およびIgEの血清濃度が高値を示した。

Cot/Tp12遺伝子欠損マウスより単離した腹腔マクロファージは、LPS誘導性のIL-12産生量が著明に増加しており、IL-12 mRNAの安定性が野生型マクロファージに比べて上昇していることを見いだした。これはLPSによって誘導されるRNA分解タンパクであるMCPI-P1の産生量がCot/Tp12シグナルによって増強されるためであることを解明した。

(2) メカニカルストレスが骨芽細胞のケモ

カイン産生に及ぼす影響：

骨芽細胞における LPS 誘導性の 2 種類のケモカイン (CXCL1 および CXCL10) mRNA 発現誘導は、LIPUS の同時刺激によって著明に低下した。次にこれは、超音波刺激が細胞内の TLR4-MyD88 結合の解離を誘導するためであることを見いだした。これらの所見はメカニカルストレスが抗炎症性に働きうることを示唆している。

#### 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)

1. Nakao J, Fujii Y, Kusuyama J, Bandow K, Kakimoto K, Ohnishi T, Matsuguchi T. Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) inhibits LPS-induced inflammatory responses of osteoblasts through TLR4-MyD88 dissociation. *Bone*, 2014;58:17-25. doi: 10.1016/j.bone.2013.09.018. (査読有)
2. Ohnishi T, Bandow K, Kakimoto K, Kusuyama J, Matsuguchi T. Long-Time Treatment by Low-Dose N-Acetyl-L-Cysteine Enhances Proinflammatory Cytokine Expressions in LPS-Stimulated Macrophages. *PLoS ONE* 2014; 9(2): e87229. doi: 10.1371/journal.pone.0087229. (査読有)
3. Kusuyama J, Bandow K, Shamoto M, Kakimoto K, Ohnishi T, Matsuguchi T. Low Intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS) Influences the Multilineage Differentiation of Mesenchymal Stem and Progenitor Cell Lines through ROCK-Cot/Tpl2-MEK-ERK Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* 2014 289(15):10330-44. doi: 10.1074/jbc.M113.546382. (査読有)
4. Ballak DB, van Essen P, van Diepen JA, Jansen H, Hijmans A, Matsuguchi T, Sparrer H, Tack CJ, Netea MG, Joosten LA, Stienstra R. MAP3K8 (TPL2/COT) affects obesity-induced adipose tissue inflammation without systemic effects in humans and in mice. *PLoS One*. 2014;9(2):e89615. doi: 10.1371/journal.pone.0089615. (査読有)
5. Matsui I, Hamano T, Mikami S, Inoue K, Shimomura A, Nagasawa Y, Michigami T, Ohnishi T, Fujii N, Nakano C, Kusunoki Y, Kitamura H, Iwatani H, Takabatake Y, Kaimori JY, Matsuba G, Okoshi K, Kimura-Suda H, Tsubakihara Y, Rakugi H, Isaka Y. Retention of fetuin-A in renal tubular lumen protects the kidney from nephrocalcinosis in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013, 304(6): F751-760. doi: 10.1152/ajprenal.00329.2012 (査読有)
6. Matsuguchi T. Mast Cells as Critical Effectors of Host Immune Defense against Gram-negative Bacteria. *Curr Med Chem*. 2012.;19(10): 1432-1442. (査読有)
7. Bandow K, Kusuyama J, Shamoto M, Kakimoto K, Ohnishi T, Matsuguchi T. LPS-induced chemokine expression in both Myd88-dependent and -independent manners is regulated by Cot/Tpl2-ERK axis in macrophages. *FEBS Letters* 2012; 586, 1540-1546. doi: 10.1016/j.febslet.2012.04.018. (査読有)
8. Musikacharoen T, Bandow K, Kakimoto K, Kusuyama J, Ohnishi T, Yoshikai Y, Matsuguchi T. Functional involvement of dual specificity phosphatase 16 (DUSP16), a c-Jun N-terminal kinase-specific phosphatase, in the regulation of T helper cell differentiation. *J Biol Chem*. 2011;286(28):24896-905. doi: 10.1074/jbc.M111.245019. (査読有)

[学会発表](計 15 件)

1. 楠山譲二、坂東健二郎、社本光央、柿元協子、大西智和、松口徹也：骨芽細胞の LIPUS 応答性はオステオポンチン発現によって減弱する、第 17 回超音波骨折治療研究会、2014 年 1 月 25 日、兵庫

2. 坂東健二郎、楠山譲二、久留光博、柿元協子、大西智和、松口徹也：骨芽細胞分化に対する遊離脂肪酸の影響、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 21 日、神戸

3. 前田綾、坂東健二郎、宮脇正一、松口徹也：自然免疫に重要な Myd88 と IL-1 は機械的刺激による骨芽細胞のケモカインの発現誘導に関与する、第 72 回日本矯正歯科学会大会、松本、2013 年 10 月 7 日

4. 松口徹也、楠山譲二、坂東健二郎、柿元協子、大西智和：MAP キナーゼフォスファターゼ (DUSP) mRNA の不安定性による細胞ストレス反応の制御機構、第 55 回歯科基礎医学会、2013 年 9 月 22 日、岡山

5. 楠山譲二、坂東健二郎、柿元協子、大西智和、松口徹也：CXCL3 は脂肪分化を正に制御する、第 55 回歯科基礎医学会、2013 年 9 月 22 日、岡山

6. 柿元協子、坂東健二郎、楠山譲二、久留光博、大西智和、松口徹也: LPS-induced IL-12 p40 mRNA is regulated by MCP1P-1 ribonuclease expression through Cot/Tpl2-MEK-ERK axis in macrophages、第86回日本生化学会大会、2013年9月11日、横浜

7. 楠山譲二、坂東健二郎、柿元協子、大西智和、松口徹也: CXCL3は脂肪分化を正に制御する、第18回アディポサイエンスシンポジウム、2013年8月24日、大阪

8. 大西智和、坂東健二郎、柿元協子、松口徹也: マウス頭蓋冠由来骨芽細胞の分化と解糖系の関係、2nd Joint meeting of the international bone and mineral society and the Japanese society for bone and mineral research、2013年5月28日、神戸

9. Kusuyama J、Bandow K、Kakimoto K、Ohnishi T、Matsuguchi T. Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) suppresses adipogenesis and promotes osteogenesis of mesenchymal stem cells through ROCK-Cot/Tpl2-MEK-ERK signaling pathway, "Toronto University Research Day", February 12 2013, Toronto, Canada

10. 大西智和、坂東健二郎、柿元協子、楠山譲二、松口徹也: N-アセチルシステインによる活性化マクロファージにおける炎症性サイトカインの発現上昇 第85回日本生化学会 2012年12月14日~12月16日 福岡

11. 楠山譲二、坂東健二郎、柿元協子、大西智和、松口徹也: 間葉系幹細胞の骨/脂肪分化によるケモカインの発現パターン 第35回日本分子生物学会 2012年12月11日~14日 福岡

12. 楠山譲二、坂東健二郎、柿元協子、大西智和、松口徹也: LIPUS(低出力超音波)刺激による間葉系幹細胞の分化方向調節機構 第11回日本超音波治療研究会 2012年11月17日 宮崎

13. 坂東健二郎、楠山譲二、柿元協子、大西智和、松口徹也: マクロファージにおけるLPSによるCot/Tpl2-ERK経路を介したケモカインの誘導 第54回歯科基礎医学会学術大会 2012年9月14日~16日 福島

14. 松口徹也、楠山譲二、坂東健二郎、柿元協子、大西智和: Low-Intensity Pulsed Ultra Sound(LIPUS)が炎症性遺伝子発現に及ぼす影響 第54回歯科基礎医学会学術大会 2012年9月14日~16日 福島

15. 松口徹也、坂東健二郎、楠山譲二、柿元協子、大西智和: JNK 特異的フォスファターゼDUSP16のヘルパーT細胞分化における機能的役割 歯科基礎医学会学術大会 2011年10月1日 岐阜

〔図書〕(計 2件)

1. 松口徹也: アンチエイジングシリーズ3 骨研究最前線 代謝・疾病のメカニズムから再生医療・創薬・リハビリ機器・機能性食品開発まで: 骨免疫と臨床応用の可能性 エヌ・ティー・エス ISBN 978-4-86469-078-2 2013 p123-p131.

2. Matsuguchi T. Roles of Kinases in Osteoblast Function, Advances in Protein Kinases, Gabriela Da Silva Xavier (Ed.), ISBN: 978-953-51-0633-3, InTech, DOI: 10.5772/38384.2012; 313-332.

〔その他〕

ホームページ等

鹿児島大学歯学部ホームページにてメカニカルストレスと免疫反応の関係についての研究成果がトピックスとして紹介された。  
<http://www.hal.kagoshima-u.ac.jp/kenkyu/topics20131118.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

松口 徹也 (MATSUGUCHI TETSUYA)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授  
研究者番号: 10303629

(2)研究分担者

大西 智和 (ONISHI TOMOKAZU)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授  
研究者番号: 30244247

坂東 健二郎 (BANDOW KENJIRO)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教  
研究者番号: 50347093

楠山 譲二 (KUSUYAMA JOJI)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教  
研究者番号: 70596105

柿元 協子 (KAKIMOTO KYOKO)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教  
研究者番号: 40274849