

免疫応答を制御するヘルパー T細胞の分化とPI3K経路

永井 重徳

1. はじめに

細菌などの感染体が我々の体に侵入してきたときに、それを排除しようとして働く（正の）免疫応答はもちろん重要であるが、排除の後に免疫応答を収束させることもまた、行きすぎた免疫反応を抑制するという意味において必要である。また、自己の組織に対して免疫系が反応する場合、自己免疫疾患に陥る可能性があるため、これを回避するための免疫抑制反応もまた、重要な意味を持つ。すなわち、適切に正負の免疫応答のバランスがとられることで、免疫学的恒常性が保たれている。筆者らはこれまでに、免疫応答を担うヘルパー T (helper T: Th) 細胞の分化について、特にホスホイノシチド3-キナーゼ (phosphoinositide 3-kinase: PI3K) 経路に着目して研究を行ってきた。Th細胞は、抗原提示の際に受け取るサイトカインの種類によって、Th1, Th2, Th17など違った機能を持つエフェクター細胞に分化する。これまでに、IL-17やIL-22を産生して細菌感染症の発症などに関与するTh17細胞の分化について、PI3K経路の関与を検討してきた。Th17分化には、マウスにおいてIL-6およびTGF β シグナルが必要であり、転写因子ROR γ tがIL-17発現に重要であることが知られている。筆者らは、分化に際し、PI3K経路がAktを介して下流に存在するmTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) を活性化し、その結果、①ROR γ t抑制因子であるGfi-1の不活性化、および②ROR γ tの核移行促進によって、Th17分化を正に制御することを明らかにした¹⁾。一方で、これらエフェクター細胞の機能を抑制する抑制性Th細胞の分化についても、PI3Kが関与することが知られており、最近我々が明らかにした結果も含めて本稿で紹介したい。

2. クラスI_A PI3Kについて

PI3Kは、イノシトール環の3'位にリン酸基を付加する酵素であり、細胞周期・生存・増殖などさまざまな細胞活動に関わっている²⁾。クラスIからIIIまでが存在するが、その中でも最もよく研究されているのが、触媒サブユニットと制御サブユニットからなるクラスI PI3Kであり、Gタンパク質共役受容体・チロシンキナーゼ受容体・増殖因子受容体など、さまざまな受容体の下流に存在し、活性化される。クラスIはさらにクラスI_AとI_Bに大別され、クラスI_Bに比べてクラスI_Aは触媒サブユニットと制御サブユニットの組み合わせがバラエティに富んでいる(図1)。一方で、クラスII PI3Kは触媒サブユニットのみであり、他のさまざまなタンパク質と結合する。クラスIII PI3Kの触媒サブユニットは現在のところVps34のみであり、主にオートファジーに関係することが知られている。

クラスI PI3Kは、PI(4,5)P₂にリン酸基を付加してPI(3,4,5)P₃にするが、これがPHドメインを持つさまざまな分子をリクルートし、シグナルを伝える。特に三つのアイソフォームを持つAktと呼ばれる分子が、最もよく研究されている。Aktには重要なリン酸化部位が、Thr308とSer473の2か所あり、それぞれPDK1 (3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ) およびmTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2) によってリン酸化される。PI3Kの活性化により、PDK1とAktがどちらも膜近傍にリクルートされ、PDK1によるAktリン酸化を促進する。リン酸化Aktは、その下流にあるターゲット分子をリン酸化することで、細胞増殖・代謝・生存・運動性などさまざまな細胞活動に関与する。代表的なターゲット分子として、TSC1/2やFoxo1/3があげられる(図2)。AktはTSC1/2を抑制し、TSC1/2がRhebを抑制するため、結果的にAktの活性化によってRhebの機能が亢進する。RhebはmTORC1を活性化するため、mTORC1による細胞増殖や代謝亢進が起こる。また、転写因子Foxo1はAktによりリン酸化されると核内から細胞質へと移行するため、転写因子としては働けなくなる。すなわちAktにより活性が阻害される。Foxo1は主に細胞分化・アポトーシス・細胞周期に関与している。

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子免疫学分野
(〒113-8549 東京都文京区湯島1-5-45)

Role of PI3K pathway on immunoregulatory helper T cell differentiation

Shigenori Nagai (Department of Molecular Immunology, Graduate School of Medicine and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University (TMDU), 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8549, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910692

© 2019 公益社団法人日本生化学会

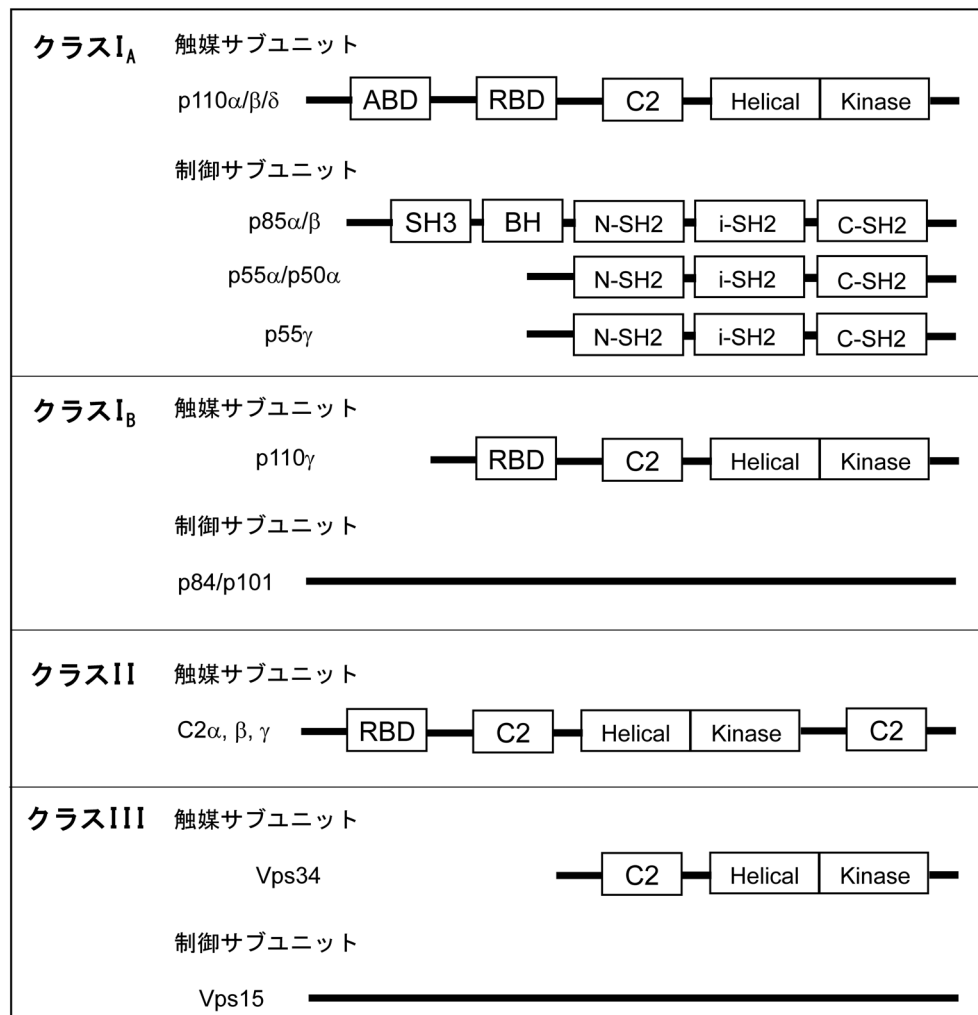


図1 PI3Kファミリーの構造的特徴

PI3Kはその構造から四つのクラスに分類される。ABD：アダプター結合ドメイン，RBD：Ras結合ドメイン，C2：リン脂質結合ドメイン，Helical：ヘリカルドメイン，Kinase：触媒ドメイン，BH：Bcl-2ホモロジードメイン，SH2：Srcホモロジー2ドメイン，SH3：Srcホモロジー3ドメイン。

3. pTreg分化とPI3K

1) Treg細胞

制御性T (regulatory T : Treg) 細胞は、過剰な免疫応答の抑制や自己寛容に重要な役割を果たす細胞である。ヘルパーT細胞のうち、CD25 (IL-2受容体α鎖)を高発現し、forkhead box P3 (Foxp3)と呼ばれる転写因子を発現しているのが特徴である³⁾。Treg細胞は、その生成の違いから胸腺由来 (thymus-derived) Treg (tTreg)と末梢誘導性 (peripherally-induced) Treg (pTreg)の二つに大別される。tTregは胸腺で分化し、その後末梢へと流れていくが、pTregは他のTh細胞と同様に、末梢においてナイーブTh細胞が、抗原刺激およびTGFβシグナルを受けて、Smad2/3のシグナルを介してFoxp3発現が増強することによって分化する。一方、Aktの下流で、mTORC1を介

するHIF-1αの活性化によってFoxp3が分解されることと、Foxp3の転写領域に結合して転写を促進するFoxo1がAktによってリン酸化され不活性化することから、PI3K-Akt経路はpTreg分化を負に制御することが明らかになっている⁴⁾。ところががん研究の領域では、がんの発生や組織リモデリングにおいてTGFβとPI3K-Aktシグナルとは強い関係があることが知られており、TGFβシグナルによって主にAktのSer473がリン酸化される。しかし、Th細胞におけるPI3K-Aktシグナルに対するTGFβの役割についてはあまり検討されていなかったため、我々はその関係性について調べた⁵⁾。

2) pTreg分化においてTGFβがPI3K-Akt経路に及ぼす影響

まず、TGFβ添加によるAktおよびその下流のFoxo1のリン酸化状態を調べたところ、刺激数時間後ではほとん

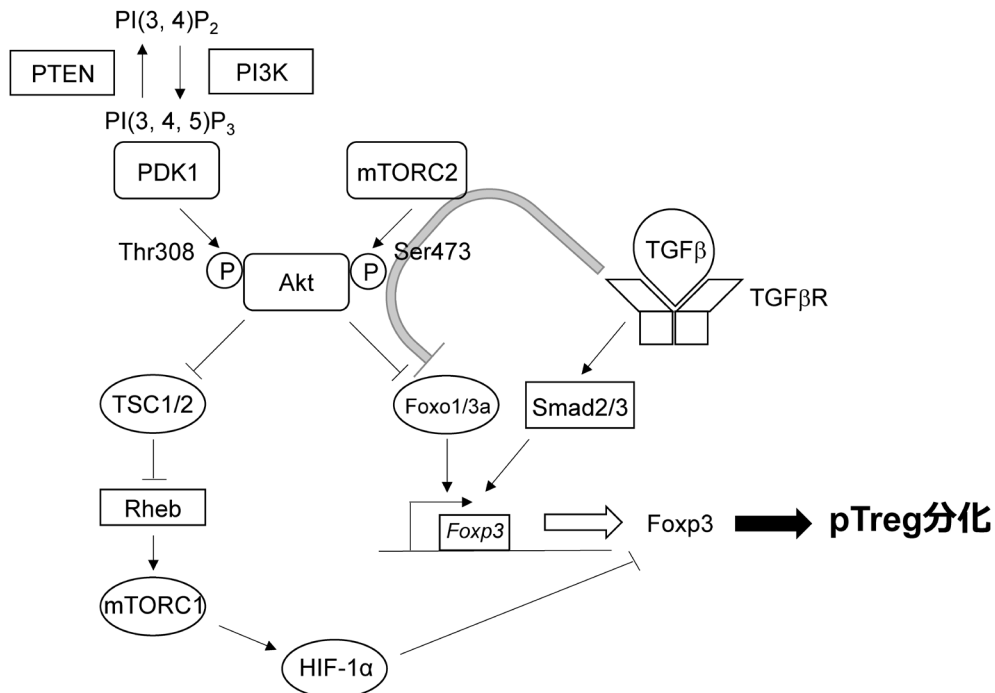


図2 TGF β シグナルによる末梢誘導性制御性T細胞 (pTreg) 分化におけるネガティブフィードバック機構
TGF β シグナルによって *Foxp3* 遺伝子の転写が上昇する一方で、PI3K-Akt経路の活性化によって、①mTORC1を介するHIF-1 α 活性化および②Foxo1のリン酸化による不活性化が起こり、*Foxp3*発現は阻害されることから、PI3K経路はpTreg分化を負に制御している。しかしTGF β 刺激から24時間以上経つと、TGF β シグナルがmTORC2-Akt経路を活性化するようになり、その結果Foxo1がリン酸化を受けて不活性化し、*Foxp3* 遺伝子の転写を阻害するようになる。TGF β R : TGF β 受容体。

ど変化がなかったものの、添加24時間後にAktのSer473のリン酸化（以下Ser473 pAkt）およびFoxo1のSer256のリン酸化（以下Ser256 pFoxo1）が増強され、TGF β によるAkt活性化とそれに伴うFoxo1のリン酸化（不活性化）がみられた。そこで次に、活性型Aktと変異型エストロゲン受容体 (mutated estrogen receptor : mer) の融合タンパク質を発現するAkt-merトランスジェニック (transgenic : Tg) マウスから取り出した細胞に、4-hydroxytamoxifen (4-HT) を作用させるとAktを活性化できることを利用して、(TGF β 非依存的に) Aktを恒常的に活性化させた場合、TGF β を添加することでどのような変化がみられるかを検討した。まず、4-HTを添加するとAktが活性化されpTregが誘導されたが、このときSer473 pAktおよびSer256 pFoxo1が増強されることが確認された。ところがこのときTGF β を加えると、Foxo1による*Foxp3* 遺伝子の転写が抑制され、pTreg細胞の割合が減少した。次に、クラスI α PI3Kの制御性サブユニットを欠損するp85 α KOマウス由来の細胞を用い、TGF β の下流でクラスI α PI3Kが働いているかどうか検討した。するとこの場合、Ser473 pAktとSer256 pFoxo1のどちらのリン酸化も大きく阻害された。このとき、*Foxp3*発現はp85 α KO由来細胞の方が野生型由来細胞に比べて高いことが確認された。すなわち、クラスI α PI3Kが働かない状態

では、TGF β によるAktおよびFoxo1の活性化が阻害され、その結果*Foxp3*発現が回復することが明らかになった。

以上のことから、TGF β はmTORC1活性を変化させることなく、AktのSer473のみをリン酸化して活性化し、これがFoxo1をリン酸化・不活性化し、*Foxp3*の発現を抑制することが示された。これはpTreg分化におけるTGF β によるネガティブフィードバック機構であると考えられる (図2)。

3. Tr1分化とPI3K

1) Tr1細胞

IL-10は抗炎症性サイトカインであり、さまざまな免疫細胞から産生され、過剰な免疫応答を抑制する。そのため、IL-10ノックアウト (KO) マウスでは腸炎を発症することが知られている。Th細胞の中では、Foxp3⁺ Treg細胞がIL-10を産生する他、Foxp3陰性であるI型制御性T細胞 (type I regulatory T cell : Tr1 cell) から主に産生される。Tr1細胞をIL-10ノックアウトマウスに移入すると、腸炎や自己免疫疾患の症状が改善されることから、Treg細胞と同様にTr1細胞は免疫寛容に関わるサブセットと考えられている⁶⁾。Tr1分化は、もともと*in vitro*においてナイーブ (抗原に未感作) Th細胞にIL-10を加えること

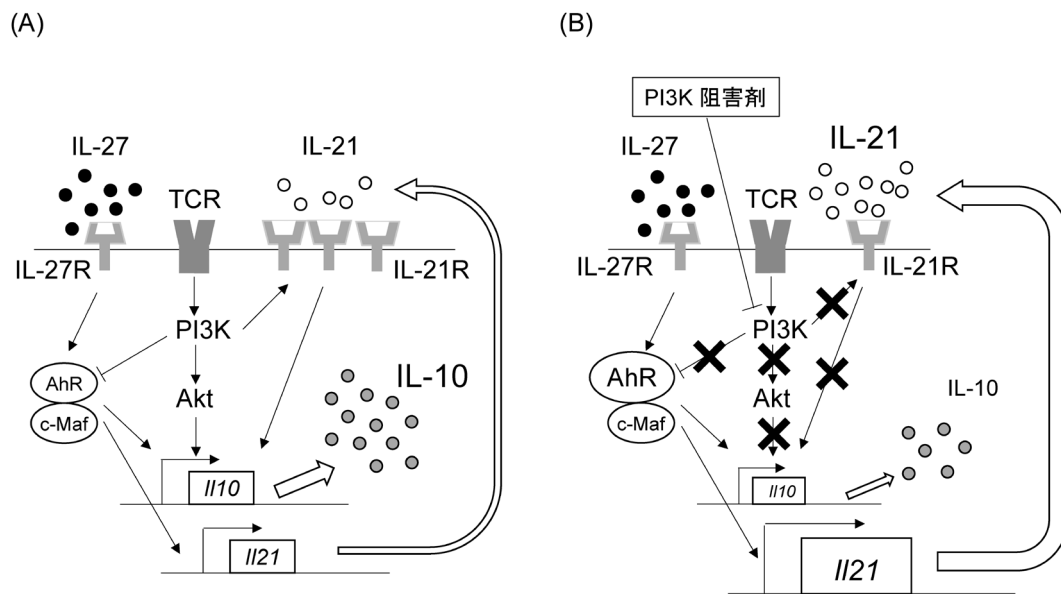


図3 PI3K経路によるTr1分化経路

PI3K阻害剤がない場合(A)に比べ、PI3K阻害剤が存在する場合(B)には、IL-27シグナルによって発現が高まるAhRの働きで、Tr1細胞自身から産生されるIL-21の発現量が増える。しかし、これを受け取るIL-21受容体(IL-21R)の発現量が減ってしまうため、結果的にIL-21シグナルによるIL-10発現量が低下し、Tr1分化が阻害される。

によって誘導できることが報告されており、オートクリンに誘導される。しかし、IL-10以外にもTh1型のサイトカインと考えられているIL-27によっても、効率的にTr1細胞へと分化できることが示された。IL-27によって、Tr1細胞の維持に必要とされるaryl hydrocarbon receptor (AhR), c-Maf, IL-21受容体(IL-21 receptor: IL-21R)の発現が誘導されるため、IL-27受容体を欠損するマウスでは、Tr1細胞の数が減少する⁷⁾。

2) Tr1細胞とPI3K

IL-10産生がPI3Kにより制御されることは、樹状細胞(dendritic cell: DC)に関しては以前より我々が報告していた⁸⁾。抗原提示細胞の一種であるDCは、ナイーブTh細胞への抗原提示に際し、リポ多糖(lipopolysaccharide: LPS)のような病原体のもつ病原関連分子パターン(pathogen-associated molecular patterns: PAMPs)を認識することによってサイトカインを産生する。ここで産生されるサイトカインはTh細胞サブセットの分化方向を決定するのに重要であり、たとえばIL-12が抗原提示時に産生されると、ナイーブTh細胞は、IFN γ を産生しマクロファージを活性化するTh1細胞へと分化する。このLPS刺激時にPI3K阻害剤を加えるか、あるいはPI3K KOマウス由来DCを用いるとIL-10産生が阻害されることから、DCからのIL-10産生はPI3Kによって正に制御されていることを見いだした。しかしIL-10を産生するTr1細胞の分化においてPI3Kがどのように関わっているかは不明であったので、我々はま

ず、*in vitro*におけるTr1分化系を用いて解析を行った⁹⁾。ナイーブTh細胞に、抗CD3 ϵ 抗体および抗CD28抗体を加えて3日間刺激をする際に、IL-27を加えることによりTr1細胞を誘導することができるが、ここにPI3K阻害剤LY294002あるいはクラスI α PI3K特異的阻害剤IC87114を加えると、Tr1分化が抑制された。また逆に、4-HTを添加したAkt-mer Tgマウス由来Th細胞を用いると、4-hydroxytamoxifen (4-HT)の作用によりAktが活性化されるが、このTh細胞では、対照群に比べてTr1細胞への分化が亢進したことから、PI3K-Akt経路がTr1分化を正に制御していることが明らかになった。ところで抗CD3 ϵ 抗体をマウス個体に投与すると、脾臓や腸間膜リンパ節・パイエル板などの免疫組織にTreg (Foxp3⁺CD4⁺T)やTr1 (IL-10⁺Foxp3⁻CD4⁺T)細胞を誘導できる。このときIC87114を投与しておくと、各組織におけるTr1細胞の割合が減少することから、*in vivo*においてもPI3K経路がTr1分化を制御することが示された。なお興味深いことに、Treg (Foxp3⁺CD4⁺T)細胞からもIL-10産生がみられるものの、これはIC87114による影響を受けないことから、TregからのIL-10産生はPI3K経路と無関係であることが示唆された。

では、実際にPI3K経路はTr1分化のどこに作用しているのだろうか？ これを知るためにTr1関連遺伝子に関して、IC87114の有無による発現を調べた。すると、Tr1細胞の維持に関わると考えられているIL-21の発現およびIL-10やIL-21の転写に関わるAhRの発現が、予想に反してPI3K阻害により上昇することを見いだした。そこで次

にIL-21受容体の発現について調べてみると、PI3K阻害剤によって発現量が減少していることがわかった。すなわち、PI3Kを阻害するとIL-21産生そのものは多くなるものの、IL-21受容体が減少するために結果的にIL-21シグナルを受け取れず、Tr1分化が抑制されると考えられた(図3)。実際に、IL-21を添加するとTr1分化が促進され、抗IL-21抗体を加えると分化が抑制され、またこれらサイトカインと抗体による効果がIC87114によってキャンセルされることからPI3K経路とIL-21の関係が裏づけられた。

5. おわりに

これまでに、たとえばがんに対する正の免疫応答を強めることでがんの増殖を抑える試みが古くからなされていたが、適度な強さに調節することが難しいためにしばしば副作用が強く出てしまい、がん免疫治療は否定的に捉えられていた。しかし近年、がんにおける免疫チェックポイント阻害療法が脚光を浴びており、これは端的に言えば免疫抑制シグナルを担う分子の機能を抗体で阻害して、抑制シグナルを解除することによって抗腫瘍免疫を高める治療法であり、非常に効果があることが示されている。すなわち、負の免疫応答をコントロールする方が、宿主に対するダメージが少なく副作用が出にくいいため、治療法として利用しやすいと考えられる。抑制性Th細胞のうち、Treg細胞はマウスのみならずヒトにおいてもすでによく研究されており、その強い免疫抑制作用から臓器移植やさまざまな疾患において、治療への応用が期待されている。ところが、腫瘍組織内に存在するTregは抗腫瘍免疫応答を抑制してしまうことから、この場合はむしろ抑制機能を解除することが大事になってくる。また、Tr1細胞については、その表現型の定義があいまいであることもあって、ナイーブなマウスにおいてすら、sub populationが多く存在することが示され¹⁰⁾、免疫抑制に関する個々のpopulationの役割については、これから徐々に明らかにされていくと思われる。今後、適所にかつ必要なときに効率的に抑制性Th細胞を誘導できるかどうか治療への応用の鍵となるため、これら細胞の分化機構や機能がさらに明らかにされることに期待したい。さらに筆者自身も、PI3Kの下流分子とこれら抑制性Th細胞との関わりを研究し、より特異性の高い制御方法の開発に結びつけたい。

著者寸描

●永井 重徳 (ながい しげのり)

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科准教授。博士(医学)。

■略歴 1995年東京大学薬学部卒業。97年同大学院薬学系研究科修士課程修了。2001年同大学院医学系研究科博士課程修了。02年慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室助手(07年より同助教)。同教室専任講師を経て13年より現職。

謝辞

本稿で紹介した内容については、主に慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室および、東京医科歯科大学歯学部分子免疫学分野で行った研究に基づいている。この場を借りて、関係してくださったすべての方々へ感謝したい。

文 献

- 1) Kurebayashi, Y., Nagai, S., Ikejiri, A., Ohtani, M., Ichiyama, K., Baba, Y., Yamada, T., Egami, S., Hoshii, T., Hirao, A., et al. (2012) PI3K-Akt-mTORC1-S6K1/2 axis controls Th17 differentiation by regulating Gfi1 expression and nuclear translocation of RORgamma. *Cell Rep.*, **1**, 360-373.
- 2) Fruman, D.A., Chiu, H., Hopkins, B.D., Bagrodia, S., Cantley, L.C., & Abraham, R.T. (2017) The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell*, **170**, 605-635.
- 3) Kanamori, M., Nakatsukasa, H., Okada, M., Lu, Q., & Yoshimura, A. (2016) Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends Immunol.*, **37**, 803-811.
- 4) Kurebayashi, Y., Nagai, S., Ikejiri, A., & Koyasu, S. (2013) Recent advances in understanding the molecular mechanisms of the development and function of Th17 cells. *Genes Cells*, **18**, 247-265.
- 5) Kurebayashi, Y., Baba, Y., Minowa, A., Nadya, N.A., Azuma, M., Yoshimura, A., Koyasu, S., & Nagai, S. (2016) TGF-beta-induced phosphorylation of Akt and Foxo transcription factors negatively regulates induced regulatory T cell differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **480**, 114-119.
- 6) Roncarolo, M.G., Gregori, S., Bacchetta, R., Battaglia, M., & Gagliani, N. (2018) The Biology of T Regulatory Type 1 Cells and Their Therapeutic Application in Immune-Mediated Diseases. *Immunity*, **49**, 1004-1019.
- 7) Apetoh, L., Quintana, F.J., Pot, C., Joller, N., Xiao, S., Kumar, D., Burns, E.J., Sherr, D.H., Weiner, H.L., & Kuchroo, V.K. (2010) The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat. Immunol.*, **11**, 854-861.
- 8) Ohtani, M., Nagai, S., Kondo, S., Mizuno, S., Nakamura, K., Tanabe, M., Takeuchi, T., Matsuda, S., & Koyasu, S. (2008) Mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase 3 differentially regulate lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production in dendritic cells. *Blood*, **112**, 635-643.
- 9) Nadya, N.A., Tezuka, H., Ohteki, T., Matsuda, S., Azuma, M., & Nagai, S. (2017) PI3K-Akt pathway enhances the differentiation of interleukin-27-induced type 1 regulatory T cells. *Immunology*, **152**, 507-516.
- 10) Brockmann, L., Soukou, S., Steglich, B., Czarnewski, P., Zhao, L., Wende, S., Bedke, T., Ergen, C., Manthey, C., Agaloti, T., et al. (2018) Molecular and functional heterogeneity of IL-10-producing CD4(+) T cells. *Nat. Commun.*, **9**, 5457.

■研究テーマと抱負 T細胞サブセットの分化・機能に及ぼすシグナル経路を解析する一方で、慢性炎症にかかわる免疫機構の仕組みについても研究している。

■ウェブサイト <http://www.tmd.ac.jp/mim/>

■趣味 スポーツ観戦、詰将棋。