

2012年4月26日

2011年度採択 研究推進プログラム(基盤研究)研究成果報告書

採択者 (研究代表者)	所属機関・職名：立命館大学生命科学部生命医科学科・教授 氏名：堀 利行
研究課題	ヘルパーT細胞分化における Hippo 経路分子 Lats2 の役割

・研究計画の概要

研究計画について、概要を記入してください。

IL-17 を産生するヘルパーT細胞 Th17 は、関節リウマチをはじめとして多くの慢性炎症性疾患の発症に関わると考えられている。研究代表者は、1987年に IL-2 依存性ヒトT細胞株 Kit225 を樹立したが (Blood 70:1069, 1987)、この細胞はその後 IL-23 レセプターを構成的に発現し IL-17 を産生することが見いだされ、Th17 のモデル細胞と見なされるようになってきている。一方、研究代表者は、ヒト白血病細胞株 KG-1a より新規セリン・スレオニンキナーゼとして kpm (warts のヒト相同体、別名 Lats2) を同定、単離して以来 (Oncogene 19:3101, 2000)、この分子を中心に細胞の増殖制御に関わる Hippo 経路について研究してきた (J Biol Chem 278:17609, 2003; Blood 112:3856, 2008)。最近、制御性T細胞 (Treg) の分化に関わる転写因子 Foxp3 により上記 Lats2 の発現が誘導されることが報告された (Cancer Res 71:2162, 2011)。そこで、本研究では、Kit225 を用いてヘルパーT細胞にける Foxp3 および Lats2 の発現調節機構および Lats2 の役割を明らかにすることを目的とした。具体的には、Kit225 細胞の Th17 としての性質を検証した上で、この細胞に Foxp3 と Lats2 の発現を誘導する培養条件を探索し、そのような条件下で IL-17 の産生能がどのように影響されるかについて検討した。

・研究成果の概要

研究成果について、概要を記入してください。

Kit225 を Th17 モデルとする妥当性の検討： RT-PCR および培養上清の ELISA により Kit225 の IL-17 産生を測定した。その結果、Kit225 は通常の IL-2 添加の培養条件で IL-17F を産生していて IL-23 によってその量が増加した。一方、IL-17A については mRNA レベルでもタンパク質レベルでも発現量が低値であったがこれも IL-23 の添加により増加した。以上の結果から、Kit225 細胞はヒト Th17 細胞のモデルとしてよいと判断した。

Foxp3 による Lats2 の発現誘導の確認：コントロールベクターまたは Foxp3 発現ベクターをトランスフェクトして Lats2 の発現を RT-PCR および抗 Lats2 抗体を用いた RT-PCR および Western blot にて比較したところ Foxp3 によって Lats2 の発現が誘導されることを確認した。

Foxp3 発現を誘導する培養条件の探索：Th17 と Treg は免疫学的機能が正反対であるが、TGF- β とレチノイン酸(RA) の作用によって前者が後者に形質変換する可能性が指摘されている (Nat Rev Immunol 9:883, 2009 など)。そこで、Kit225 にこれらの試薬を加えて培養し、Foxp3 陽性の Treg に類似した細胞に分化するかどうかを検討した。その結果、TGF- β とレチノイン酸(RA)を同時に加えると Kit225 の Foxp3 発現が増加し、IL-17 の産生が減少すること、すなわち Treg 様細胞に分化することが分かったが、予想に反して Lats2 の発現は低下していた。個々の因子について活性を調べたところ、TGF- β が Lats2 の発現を抑制することが示された。

これまでのところ、Kit225 に Foxp3 の発現を誘導することはできたが、Lats2 の発現を誘導する培養条件を見つけるには至っていないが、ヘルパーT細胞において Lats2 が必ずしも Foxp3 による従属的な発現制御を受けるものではないという新しい知見が得られた。