

創薬標的の探索を目指した IL-1 関連遺伝子改変マウスライブラリーの作製と解析

Generation and analysis of IL-1-related gene manipulated mouse library to develop novel therapeutics

課題番号：24220011

岩倉 洋一郎 (IWAKURA YOICHIRO)

東京理科大学・生命医科学研究所・教授



研究の概要：動物細胞が分泌するサイトカインと呼ばれる一群の蛋白質の中で、IL-1 は感染症や自己免疫、肥満、糖尿病、発熱、ストレス応答など種々の疾病の病態形成や生体の恒常性維持において重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。本研では IL-1 およびその下流で活性化される遺伝子群の遺伝子改変マウスを作製し、これらの遺伝子の機能解析を行い、疾病治療への手がかりを得ることを目指した。

研究分野：実験動物学

キーワード：IL-1、IL-1 関連遺伝子、サイトカイン、遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

IL-1 は免疫系、神経系、内分泌系それぞれの中で重要な役割を果たすと同時に、これら相互を協調させるための機能も果たしており、生体の恒常性維持、感染防御などにおいて中心的役割を果たすことがわかってきた。従って、IL-1 およびその下流遺伝子の機能解析は医学生物学領域において重点的に研究を進めるべき分野の 1 つと考えられ、実験動物学的立場からの研究の推進、研究基盤整備を行う必要がある。

2. 研究の目的

本研究では IL-1 およびその下流で活性化される C 型レクチン受容体ファミリー、および C1qTNF ファミリーに焦点を絞り、自己免疫やアレルギー、骨代謝などに於ける機能を解析し、生体の恒常性維持や疾病に於ける役割を解明すると共に、治療への糸口を見いだすことを目的とする。作製した遺伝子改変マウスは広く研究者に配布し、当該分野の研究促進を図る。

3. 研究の方法

IL-1 関連遺伝子の生体内における機能を明らかにするために、遺伝子改変マウスを作製し、機能を解析する。このため、種々の疾病を人為的に引き起こしたり、疾患モデルと掛け合わせたり、あるいは病原体を感染させる事により、野生型マウスとの違いを免疫学的、病理学的解析を行う。さらに、分子メカニズムを明らかにするために、細胞レベル、分子レベルの解析を行う。

4. これまでの成果

1) IL-1 関連分子の機能解析

IL-1 の阻害因子である IL-1 受容体アンタゴニスト(IL-1Ra)欠損(KO)は自己免疫性関節炎を自然発症することから、IL-1 シグナルの適切な制御は免疫系の恒常性維持に重要である。しかし、これまでその制御機構は良くわかっていなかった。2 型 IL-1 受容体 (IL-1R2) は細胞内シグナル伝達ドメインを欠いており、その生体での役割は不明であった。そこで IL-1R2 KO マウスを作製し、コラーゲン誘導関節炎(CIA)を誘導したところ、野生型より重症化する事が分かった。また、これはマクロファージの過剰な活性化のためである事が分かった(Shimizu et al., *in press*)。従って、IL-1R2 は特定の細胞に対してデコイ受容体として機能する事により、生体に於ける炎症応答を制御していると考えられる。

IL-1Ra KO マウスに発症する関節炎は IL-17 欠損で完全に抑制されることから、IL-17 が重要な役割を果たしている事が分かる。IL-17 産生細胞である Th17 の分化は通常 TGF- β と IL-6 により誘導されるが、IL-1Ra KO マウスでは過剰な IL-1 シグナルが IL-6 の機能を代替できる事が分かった (Ikeda et al., 2014)。また、このマウスでは関節炎を誘導する主な IL-17 産生細胞は Th17 ではなく、 $\gamma\delta$ T 細胞であり、IL-1 + IL-23 で IL-17 を誘導できる事を明らかにした。一方、Rag2/IL-1Ra 欠損マウスは大腸炎を発症する事を見出し、自然免疫リンパ球 3 からの IL-17 産生が重要な役割を果たしている事を明らかにした(Akitsu et al., 2014)。IL-1 の下流で多様な細胞が IL-17 産生を行う事が分かった。

2) C型レクチンファミリー分子の解析

これまでに Dectin-1 や Dectin-2、Dc1r などの遺伝子欠損マウスを作製し、これらが真菌感染防御や樹状細胞の分化成熟に重要な役割を果たしている事を示してきた。本研究では Dectin-2 が真菌感染防御に関与するだけでなく、結核菌感染に於いても重要な役割を果たしている事を示した (Yonekawa, Saijo et al., *Immunity*, 2014)。また、Dc1r は樹状細胞の分化成熟に関与しており、免疫系の恒常性維持にきわめて重要な役割を果たしている事を示してきたが、本研究では、破骨細胞の分化成熟も制御している事を明らかにした。この知見は Dc1r が骨代謝疾患の治療標的としても有望である事を示している。新たに3系統の同ファミリー遺伝子欠損マウスを作製し、現在解析中である。

3) C1qTNF ファミリー分子の解析

C1qTNF ファミリー分子は補体分子 C1q に類似した構造を持つ。IL-1Ra 欠損マウスの関節炎部位で *C1qtnf3, 6* などの発現が亢進していたことから、遺伝子欠損マウスを作製し、解析した。その結果、C1qTNF6 が補体の第2経路の内因性調節因子であり、この分子を外部位から投与する事により、CIA を治療できる事を示した。人とマウスでこの分子は非常に高い相同性を有しており、また、関節リウマチ患者で血中濃度の亢進が見られる事から、マウスと同様に人でも C1qTNF6 タンパク質の投与が有効である事が期待される。同じファミリーの *C1qtnf3* の遺伝子欠損マウスを作製したところ、CIA が重症化することが明らかとなり、C1qTNF3 も同じく炎症抑制能を持つ事が分かった (Murayama et al., BBRC, 2014)。従って、これらの分子は共に炎症性疾患の治療薬になる可能性があり、臨床的にも重要な発見である。

4) 遺伝子改変マウスの作製と供給

本研究では8系統の新たな遺伝子欠損マウスを作製した。このうち3系統はゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 法を用いて作製した。

創薬や新規治療法の開発には単に網羅的な KO マウスの作製より、疾患関連遺伝子に焦点を絞り系統的に KO マウスを作製した方がより効率的であるとの観点から、本研究では IL-1 下流遺伝子に焦点を絞り、遺伝子改変マウスの作製、解析を行った。これらのマウスはインターネットに公開し、国内外からの供給要請に対応している。平成 24 年度からの3年間で、IL-1 α / β 、IL-17A/F、dectin-1/2 などの KO マウスを中心に、178 研究グループに対し延べ 202 件の遺伝子改変マウスの供給を行い、その結果、100 報以上の論文を公表し、これまでの論文の引用回数は毎年 3000 回に上っている。実験動物学の立場から当該領域の研究促進に貢献することができた。

5. 今後の計画

前年度までの研究成果を基盤として機能解析を継続すると共に、動物モデルから示唆された治療標的、あるいは炎症抑制分子の臨床応用への展開を検討する。さらに、これまでに樹立した遺伝子改変マウスに加えて新たに作製した改変マウスを広く当該分野の研究者に配布できる様にする。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

原著論文

1. Shimizu K, Nakajima A, Sudo K, Yang L, Mizoroki A, Ikarashi T, Horai R, Kakuta S, Watanabe T, and Iwakura Y. IL-1R type 2 suppresses collagen-induced arthritis inhibiting IL-1 signal on macrophages. *J Immunol. in press* (2015).
2. Akitsu, A., Kakuta, S., Saijo, S., and Iwakura, Y. Rag2-deficient IL-1 receptor antagonist-deficient mice are a novel colitis model in which innate lymphoid cell-derived IL-17 is involved in the pathogenesis. *Exp. Anim.*, **63**, 235-246 (2014).
3. Ikeda, S., Saijo, S., Murayama, M. A., Shimizu, K., Akitsu, A., and Iwakura, Y. Excess IL-1 signaling enhances the development of Th17 cells by downregulating TGF- β -induced Foxp3 expression. *J. Immunol.*, **192**, 1449-1458 (2014).

招待講演

1. 岩倉洋一郎、「創薬に於ける実験動物の役割」第 61 回日本実験動物学会市民公開講座「人々の健康に貢献する動物実験と実験動物の福祉」、札幌コンベンションセンター、2014.5.17.
2. Iwakura, Y., “Pathways in Inflammatory Diseases”, 15th International Congress of Immunology, Symposium 1 (chair and speaker), Milan, Italy, 2013.8.23.

特許申請

1. 岩倉洋一郎、海部知則、矢部力朗。樹状細胞免疫受容体活性化剤、樹状細胞免疫受容体活性化方法、破骨細胞形成抑制剤、破骨細胞形成抑制方法、樹状細胞分化・増殖阻害剤、樹状細胞分化・増殖阻害方法。出願日：2014年7月11日、特願：2014-143491

受賞

1. 岩倉洋一郎、トムソン・ロイター社「Highly Cited Researchers 2014」

HP : <http://www.rs.tus.ac.jp/iwakuralab/>