

科学研究費補助金（特別推進研究）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成20年度採択分

平成23年5月25日現在

研究課題名（和文） **自然免疫の包括的研究**

研究課題名（英文） **Comprehensive study of innate immunity**

研究代表者

審良 静男 (AKIRA SHIZUO)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・教授



研究の概要：自然免疫は病原体の侵入に対し初期炎症応答を起こすと共に、その後の獲得免疫を活性化させる機構である。本研究では、病原体の認識から炎症応答に致る調節機構を、網羅的に同定し、遺伝子欠損マウスの作製、イメージングなどを通じて機能を解析する。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：自然免疫、サイトカイン、蛋白質分解

1. 研究開始当初の背景

自然免疫による病原体認識機構の研究は近年急速に進んでいる。申請者らは、自然免疫による病原体認識に重要な受容体である Toll-like receptor (TLR) ファミリー分子の機能を遺伝子欠損マウスを作製することにより明らかとしてきた。TLR は細胞内シグナル伝達経路を活性化し、炎症性サイトカインや I 型 IFN などの液性因子の産生を促す。また、RNA ウイルスに由来する RNA は細胞質内において RIG-I、MDA5 と呼ばれるヘリカーゼ蛋白質により認識され、I 型 IFN 産生が誘導される。我々はこの細胞質内 RNA ウイルス認識機構に対しても検討を加え、RIG-I、MDA5 欠損マウスを作製することによりこれらの分子が異なる RNA ウイルス認識に重要であることを明らかにした。一方、二本鎖 DNA も細胞質内において自然免疫により認識され I 型 IFN 産生が誘導される。しかしながら、自然免疫に関わる分子の全体像は未だ明らかでなく、自然免疫応答のダイナミックな調節メカニズムはほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

病原体認識に関わるパターン認識受容体 (PRR) 群の自然免疫における役割の解明を足がかりに、自然免疫系の分子機構を包括的に理解し、獲得免疫系成立のメカニズムを明らかにしていく。さらに、自然免疫系の細胞に発現し、その活性制御に関わるものが予想される細胞表面分子群、細胞内シグナル伝達分子群や、細菌、ウイルス感染によって活性化される蛋白質、核酸分解の制御遺伝子の生理機能を、遺伝子改変マウスの作製解析により明らかにする。また、自然免疫細胞挙動や活

性の生体内における可視化（イメージング）を行い、免疫系の制御機構の理解を深めることを目指す。

3. 研究の方法

①自然免疫に関わる分子群の遺伝子欠損マウスの作製、解析②病原体刺激に対する遺伝子発現におけるシグナル伝達分子の影響に対する網羅的解析③自然免疫に関わる新規分子の同定と機能解析④蛋白質、核酸分解制御に関わる分子の自然免疫応答における機能解析⑤自然免疫細胞の挙動、感染に対する活性化の生体内における解析

4. これまでの成果

(1)我々は下記 microarray 解析により TLR 誘導遺伝子として Zc3h12a を同定した。Zc3h12a は CCCH 型 Zinc finger 領域を持つ蛋白質である。Zc3h12a 欠損マウスを作製すると自己免疫炎症性疾患を自然発症した。Zc3h12a 欠損マクロファージは TLR 刺激に対する IL-6 や IL-12p40 遺伝子発現が増加しており、これが、3' -untranslated region (UTR) を介した mRNA の安定化制御による事が明らかとなった。Zc3h12a 蛋白質は CCCH 型 Zinc finger 領域を持つ RNA 結合蛋白質であるが、Zinc finger 領域以外に新規 nuclease 領域を持ち、実際に IL-6 3' -UTR RNA を切断する endonuclease 活性を持ち、Zc3h12a の機能に RNase 領域が必須であることが明らかとなった。このように、TLR 刺激により誘導される Zc3h12a は、一連の遺伝子群の mRNA 不安定化を制御することにより炎症をコントロールし、炎症性疾患発症を抑えていることが明らかとなった。

(2)自然免疫での病原体感染に対する遺伝子

発現は、転写因子だけではなく、Epigeneticにも制御される。ヒストン修飾に関わる酵素遺伝子発現の網羅的解析から、TLRにより発現誘導されるヒストン 3K27 脱メチル化酵素 Jmjd3 を同定した。Jmjd3 遺伝子欠損マウスを作製すると Jmjd3 欠損マウス由来マクロファージは TLR 応答や細菌感染に対する応答に異常を認めなかったが、寄生虫感染に対するマクロファージ応答が著明に障害されていた。どのような遺伝子が Jmjd3 により調節されているかを ChIP-Seq 法により網羅的に解析し、一連の標的遺伝子を同定した。その標的遺伝子のうち転写因子である IRF4 は Jmjd3 のマクロファージ機能に重要であることが明らかとなった。

(3) 自然免疫受容体からのシグナルは転写因子 NF- κ B や IRF ファミリーを活性化し、炎症性サイトカインや I 型 IFN を誘導する。そこで、これら転写因子活性化に関わる分子を得るため発現スクリーニングを行った。その結果、二重鎖 DNA 刺激に伴いプロモーター活性を有為に上昇させるクローンとして TRIM56 を得ることができた。TRIM56 は細胞質内二本鎖 DNA 認識に重要であると考えられた。TRIM56 はユビキチンリガーゼとして機能し、STINGK63 型ポリユビキチン化することが分かった。この修飾により STING はホモ二量体を形成し、その結果 TBK1 との結合が可能になる。TRIM56 と二重鎖 DNA との間に結合が認められないことから、TRIM56 自身は DNA センサーとして機能しているわけではなく、STING の調節分子として機能していると考えられる。

(4) オートファジー関連因子のなかでも Atg16L1 遺伝子はクローン病発症との関わりが指摘されており、炎症応答を制御していることが推測されていた。我々は Atg16L1 遺伝子欠損マウスを作製し、このマウスを用いて、Atg16L1 がオートファジーに必須の遺伝子であること、さらに Atg16L1 を欠損したマクロファージはグラム陰性細菌の内毒素に反応して炎症性サイトカイン IL-1 β を過剰に産生することを明らかにした。また、血球系において Atg16L1 を欠損したキメラマウスは、化学物質によって誘導した実験性腸炎に感受性が高く、Atg16L1 が腸管における炎症応答を抑制している可能性が示唆された。

(5) IFN \cdot 、IL-6 など、感染により発現誘導される分子の挙動をモニターする目的でこれら遺伝子プロモーター下に GFP、YFP 遺伝子を組み込んだノックインマウスを作製した。Flow cytometry を用いた解析から、ウイルスや細菌感染に対し IFN β を産生する細胞の同定に成功した。

5. 今後の計画

今後、自然免疫に関わる分子の同定を更に進めていくと共に、これまで得られた関連分子

の機能解析を行っていく。また、自然免疫細胞の挙動、感染に対する活性化の生体内における解析に関しても重点的に解析を進めていく。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)
(研究代表者は二重線、研究分担者は一重下線、連携研究者は点線)

[論文]

- (1) Saitoh, T., Satoh, T., Yamamoto, N., Uematsu, S., Takeuchi, O., Kawai, T. and Akira, S. Antiviral Protein Viperin Promotes Toll-like Receptor 7- and Toll-like Receptor 9-Mediated Type I Interferon Production in plasmacytoid dendritic cells. *Immunity*. 34(3):352-363. 2011.
- (2) Tsuchida, T., Zou, J., Saitoh, T., Kumar, H., Abe, T., Matsuura, Y., Kawai, T. and Akira, S. The Ubiquitin Ligase TRIM56 Regulates Innate Immune Responses to Intracellular Double-Stranded DNA. *Immunity*. 35(5):765-776. 2010.
- (3) Satoh, T., Takeuchi, O., Vandenbon, A., Yasuda, K., Tanaka, Y., Kumagai, Y., Miyake, T., Matsushita, K., Okazaki, T., Saitoh, T., Honma, K., Matsuyama, T., Yui, K., Tsujimura, T., Standley, D.M., Nakanishi, K., Nakai, K. and Akira, S. The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat Immunol*. 11(10):936-944. 2010.
- (4) Kawai, T. and Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 11(5): 373-384. 2010.
- (5) Takeuchi, O. and Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 140(6): 805-820. 2010.
- (6) Satoh, T., Kato, H., Kumagai, Y., Yoneyama, M., Sato, S., Matsushita, K., Tsujimura, T., Fujita, T., Akira, S. and Takeuchi, O. LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(4):1512-1517. 2010.
- (7) Kawagoe, T., Takeuchi, O., Takabatake, Y., Kato, H., Isaka, Y., Tsujimura, T. and Akira, S. TANK is a negative regulator of Toll-like receptor signaling and is critical for the prevention of autoimmune nephritis. *Nat Immunol*. 10(9):965-972. 2009.
- (8) Matsushita, K., Takeuchi, O., Standley, D.M., Kumagai, Y., Kawagoe, T., Miyake, T., Satoh, T., Kato, H., Tsujimura, T., Nakamura, H. and Akira, S. Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay. *Nature*. 458(7242):1185-1190. 2009.
- (9) Saitoh, T., Fujita, N., Jang, M.H., Uematsu, S., Yang, B.G., Satoh, T., Omori, H., Noda, T., Yamamoto, N., Komatsu, M., Tanaka, K., Kawai, T., Tsujimura, T., Takeuchi, O., Yoshimori, T. and Akira, S. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature*. 456(7219):264-268. 2008.

[受賞]

- (1) Shizuo Akira, The 2011 Canada Gairdner Awards(2010)
- (2) Shizuo Akira, Avery-Landsteiner Prize(2010)
- (3) 審良静男、慶應医学賞(2010)
- (4) Shizuo Akira, Hans Bloemendal Medal(2009)
- (5) 審良静男、平成 21 年度 文化功労者(2009)
- (6) Shizuo Akira, National Academy of Sciences of USA, Foreign Associate(2009)

ホームページ等

<http://hostdefense.ifrec.osaka-u.ac.jp/ja/index.html>