

先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 実績報告書

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	自然免疫におけるオートファジー誘導と組織恒常性維持の分子機構解析
研究機関・ 部局・職名	東北大学・大学院薬学研究科・准教授
氏名	矢野 環

1. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

2. 収支の状況

(単位:円)

	交付決定額	交付を受けた額	利息等収入額	収入額合計	執行額	未執行額	既返還額
直接経費	120,000,000	120,000,000	0	120,000,000	120,000,000	0	0
間接経費	36,000,000	36,000,000	0	36,000,000	36,000,000	0	0
合計	156,000,000	156,000,000	0	156,000,000	156,000,000	0	0

3. 執行額内訳

(単位:円)

費目	平成22年度	平成23年度	平成24年度	平成25年度	合計
物品費	4,068,262	38,175,485	28,989,259	28,939,339	100,172,345
旅費	0	238,540	466,095	353,350	1,057,985
謝金・人件費等	0	3,471,560	3,938,872	2,344,507	9,754,939
その他	0	1,966,577	3,251,076	3,797,078	9,014,731
直接経費計	4,068,262	43,852,162	36,645,302	35,434,274	120,000,000
間接経費計	1,233,000	13,170,000	10,995,000	10,602,000	36,000,000
合計	5,301,262	57,022,162	47,640,302	46,036,274	156,000,000

4. 主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関名
蛍光実体顕微鏡	Leica社製 M205FA	1	2,994,495	2,994,495	2011/3/29	東北大学
インキュベータ	三洋電機(株) 製MIR-554	1	724,500	724,500	2011/5/30	東北大学
LightCycler	(独)ロシュ・ダイアグノス ティック社製 DX400TL	1	2,877,000	2,877,000	2011/8/23	東北大学
Dual-Glo Luciferase Assay System	E2980 プロメ ガ 10× 100ml	1	1,890,000	1,890,000	2012/1/27	東北大学
コンパクト多機能遠心機	ベックマン・ コールター社 製 Allegra X- 30R	1	840,000	840,000	2012/2/17	東北大学
LightCycler カローセル遠心機	ロシュ・ダイ アグノス ティツ	1	521,640	521,640	2012/2/17	東北大学
Dual-Glo Luciferase Assay System	E2980 プロメ ガ 10× 100ml	1	1,890,000	1,890,000	2012/2/21	東北大学
インキュベータ	三洋電機(株) バイオメディ カ製 MIR-	1	756,000	756,000	2012/2/23	東北大学
バイオシェーカー	(株)タイテック 製 BR- 180LF	1	1,470,000	1,470,000	2012/2/24	東北大学
液体窒素保存容器	Taylor- Wharton社製 LS3000	1	583,275	583,275	2012/2/27	東北大学

様式20

ルーチン倒立顕微鏡	ライカマイクロシステムズ社製 DMIL LED HC	1	512,400	512,400	2012/2/28	東北大学
高感度・高速冷却カラーデジタルカメラシステム	ライカマイクロシステムズ社製	1	2,522,100	2,522,100	2012/2/28	東北大学
遠心式濃縮機	タイテック(株)製 VR-96	1	1,417,500	1,417,500	2012/2/29	東北大学
超高圧水銀光源	ライカマイクロシステムズ社製	2	750,750	1,501,500	2012/3/12	東北大学
高感度・高速冷却カラーデジタルカメラシステム	ライカマイクロシステムズ社製	1	2,240,700	2,240,700	2012/3/21	東北大学
超高圧水銀光源	ライカマイクロシステムズ社製 EL6000	1	718,200	718,200	2012/12/26	東北大学
Dual-Glo Luciferase Assay System	プロメガ E2980 10x100mL	1	1,890,000	1,890,000	2013/1/11	東北大学
等電点電気泳動装置	バイオラッドラボラトリーズ社製 プロティアンi12 IEFシステム	1	1,929,375	1,929,375	2013/7/9	東北大学

5. 研究成果の概要

細胞内に侵入する細菌やウイルス感染防御や炎症に関わる「オートファジー」の仕組みを分子や細胞のレベルで理解する研究を行った。その結果、細胞内寄生細菌に対するオートファジー誘導の機構解析から、新規な機構の重要性を提唱すると同時に、その促進が既存の抗生物質が効きにくい菌感染に対する新規治療薬のシーズとなる可能性を示した。また、炎症性腸疾患であるクローン病の遺伝的原因であるオートファジー不全がもたらす組織恒常性破綻の分子機構を検討し、これまで統一的な解明の成されていないクローン病病態全体を説明しうる機構を解明した。また、病態の根本原因に関する新規な知見を得ることにより新たな治療薬開発の基盤を得た。

課題番号	LS011
------	-------

先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 研究成果報告書

本様式の内容は一般に公表されません

研究課題名 (下段英語表記)	自然免疫におけるオートファジー誘導と組織恒常性維持の分子機構解析
	Induction of Autophagy and its Function in Tissue Homeostasis in Innate Immunity
研究機関・部局・ 職名 (下段英語表記)	東北大学・大学院薬学研究科・准教授
	Tohoku University, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor
氏名 (下段英語表記)	矢野 環
	Tamaki Yano

研究成果の概要

(和文): 本研究は、感染や炎症に関わるオートファジーの仕組みを、ショウジョウバエをモデルとして使って総合的に理解することで細胞内に侵入する病原体による感染症と炎症性腸疾患に対する新規治療の基盤を目指した。その結果、(1)細胞内侵襲性の病原体に対するオートファジー誘導の分子基盤を解明し、新規オートファジー誘導剤の可能性を示し、(2)オートファジー不全を遺伝的背景とするクローン病病態発症の根本的原因が、腸内常在菌のもたらず刺激の緩和不全であることを明らかにした。(2)はオートファジーが細胞非自立的に組織恒常性に機能しているという新規な概念を示したのみならず、クローン病の根治療法のブレークスルーとなる成果である。

(英文): The purpose of this project is to clarify the mechanism of autophagy induction against intracellular pathogens, and the mechanism of inflammation caused by the autophagy defect. The main results and the possible future applications of this project are as below:

1. Showed that aggregate formation around pathogens is the key mechanism of autophagy induction, which suggests the novel target of chemicals for autophagy stimulation.
2. Unveiled the molecular signaling deficient in crohn's disease using *Drosophila* model system, which opens the door to novel, fundamental therapeutic methods and chemicals for the crohn's disease.

様式21

1. 執行金額 156,000,000 円
(うち、直接経費 120,000,000 円、 間接経費 36,000,000 円)

2. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

3. 研究目的

自然免疫はほとんどすべての多細胞生物が有する免疫系であり、ヒトにおいても感染防御の最前線で機能している。我々は、自然免疫における病原体認識分子に関する研究の過程で、細胞内寄生細菌に対する自然免疫応答としてオートファジーが病原体認識依存的に誘導され、その除去に機能していることを明らかにしてきた。細胞内寄生細菌は宿主の細胞内に侵入して増殖するため、既存の抗生物質が効きにくい病原体である。オートファジーは細胞の恒常性維持に機能する細胞内分解系で、基底状態で機能して自己成分の分解を行うが、近年、誘導により自己由来成分の凝集体や細胞内に侵入した病原体の排除に働くことが明らかにされ、その多様な機能が注目されている。さらに、オートファジーの不全は炎症性疾患の原因となる。クローン病は難治性の炎症性腸疾患であり、遺伝的要因としてオートファジー関連遺伝子である Atg16L1、さらには病原体認識分子である NOD2 における変異が示されている。これらの事実は、オートファジーが病原体非感染時にも腸管恒常性に寄与しており、その破綻が自然免疫応答を介して炎症性疾患を引き起こすこと、および、その病態に病原体認識分子由来のシグナルが関与していることを示唆しているが、その分子機構が不明なために、クローン病は根本的な治療ができていない。以上の背景をふまえ、本研究では以下の3項目を研究目的とした。

(1) 病原体認識分子依存的なオートファジー誘導とその空間的制御の分子機構解明

(2) オートファジー不全による細胞死と腸内幹細胞増殖・分化の制御機構の解析

(3) 腸管恒常性におけるオートファジーの機能解析とその破綻による炎症性疾患発症機構解明

以上の3項目を有機的に連携させ、(1)ではオートファジー誘導に関与する因子、特に認識分子特異的にオートファゴソームをリクルートするアダプター因子の機能を明らかにすることで、病原体特異的なオートファジー誘導剤の分子基盤を確立する。(2)ではショウジョウバエを用いて腸管特異的オートファジー不全モデル動物を作製し、オートファジー不全のもたらす細胞死と幹細胞増殖・分化を解明する。(3)は(2)と連携させて遂行し、オートファジー不全のもたらす組織恒常性破綻の分子機構を解明することで、クローン病の根治療法に道を開くことが目的である。

4. 研究計画・方法

本研究では感染症と炎症性疾患におけるオートファジーの持つ生理的意義を分子・細胞から個体レベルまでシームレスに解析した。各項目の計画・方法を記す。

(1) 細胞内寄生細菌感染時におけるオートファジー誘導とその空間制御の分子機構の解明

リステリア菌感染によって認識分子依存的にオートファジーが誘導される。我々が本研究開始前にすでに確立しているショウジョウバエ培養細胞 S2 細胞を用いた認識分子依存的なオートファゴソーム形成系により、認識分子とアダプター分子がオートファジー関連因子複合体を感染した病原体周辺にリク

ルートする機構を、認識分子・アダプター分子を中心とした生化学的手法、感染細胞の免疫染色等組織学的手法、さらに、ショウジョウバエ個体を用いた感染実験により明らかにした。また、オートファゴソーム形成の空間的制御に関与する miRNA の同定を細胞内寄生細菌感染細胞からの miRNA の単離と次世代シーケンスによる網羅的解析を行った。

(2) 腸管上皮組織におけるオートファジー不全は腸管炎症の原因となる。しかしながら、モデルマウスによる解析では獲得免疫の影響による炎症亢進があることで、自然免疫としてのオートファジーの機能解析とその不全による炎症誘発機構の解明がほとんど成されていなかった。そこでまず、自然免疫のみを有するショウジョウバエを用いて腸管特異的オートファジー不全モデル動物を作製し、組織学的検討によりオートファジー不全が腸管幹細胞の分裂・分化、分化した細胞の細胞死に影響を与えているかを詳細に解析した。

(3) 我々は本研究開始までに、腸管上皮細胞特異的オートファジー不全ショウジョウバエ個体はデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)経口摂取による腸管細胞障害に感受性であり、個体死が起きやすくなることを示していた。そこで、この DSS 摂取による個体死の回復を指標に、オートファジー不全により生じる病態に関与する遺伝子をゲノム網羅的にスクリーニング、同定し、解析を行った。

5. 研究成果・波及効果

上記の項目の内、2, 3は計画通り平成24年度から互いに連携させて遂行させた。そこで、項目1と項目2, 3(以下、項目2とする)についてその成果を記す。

(1) 項目1: 細胞内寄生細菌特異的オートファジー誘導は自然免疫応答である抗菌ペプチド発現誘導とは異なり、病原体認識分子 PGRP-LE の菌細胞壁成分への結合がその後のシグナルを活性化するには十分ではなく、アダプタータンパク質 Ref(2)P のユビキチン結合を介した菌への結合と、PGRP-LE と Ref(2)P の複合体形成がオートファジー誘導のトリガーに十分であること、またそれに Ref(2)P の PB1 ドメインの塩基性アミノ酸が重要であることを示した。これに対し、オートファジーがその抵抗性に必要であることが示されている水疱性口内炎ウイルス(VSV)に対しては Ref(2)P タンパク質が必須だが、そのユビキチン結合が不必要であり、細胞内寄生細菌に対するオートファジー誘導とは異なる機構でオートファジーがその抵抗性に働いていることを示した。病原体認識分子とアダプター分子の複合体形成には双方のタンパク質の相互作用面の電荷が重要であり、これは病原体認識依存的オートファジー誘導剤のターゲットとなり得る。

(2) 項目2: ショウジョウバエをモデル系とし、腸管上皮細胞特異的オートファジー不全が DSS 経口投与による個体を起こすこと、腸管幹細胞数の増加と分裂亢進をもたらすこと、腸管上皮細胞に細胞死は起こさないが、細胞極性に異常が生じること、腸管上皮細胞における上記の異常に腸内細菌が関与することを示した。これにより、マウスモデル系と同様の表現型が得られ、さらに詳細な解析が可能となった。そこで、腸管上皮特異的オートファジー欠損個体の DSS 感受性を回復させる遺伝子欠損のゲノム網羅的スクリーニングを行い、常染色体について完了、同定遺伝子の解析から、腸管におけるオートファジー不全がもたらす個体死に上皮細胞の極性を規定する遺伝子が関与していることを明らかにした。また、すでに分化した上皮細胞におけるオートファジー不全が、上皮細胞からのサイトカインの分

6. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 3 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 1 件 1. Intracellular recognition of pathogens and autophagy as an innate immune host defense. <i>Journal of Biochemistry</i> (2011) 150, 143-149 Tamaki Yano and Shoichiro Kurata ISSN 1756-2651, http://jb.oxfordjournals.org/content/150/2/143.long</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 2 件 1. ショウジョウバエを用いたオートファジーと感染・免疫の解析 矢野 環 炎症と免疫 Vol.20 No.2(2012年3月号) ISSN 0918-8371</p> <p>2. 細胞内侵入性細菌と宿主のオートファジーを介した攻防 矢野 環 生化学 Vol.85 NO.2 (2013) 92-97 ISSN 0037-1017</p> <p>(未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 20 件</p>	<p>専門家向け 計 19 件 1. 日本生体防御学会第22回総会 矢野環(シンポジスト) 「細胞内増殖性病原体に対する生体防御反応としてのオートファジー誘導」 那覇、平成23年6月29日～7月1日 2. 日本比較免疫学会第23回学術集会 矢野 環、若林康介、倉田祥一朗 「ショウジョウバエ体液細胞におけるオートファジー誘導による病原体排除」 横浜、平成23年8月21日～23日 3. 日本生化学会第84回大会 大西健太、矢野環、倉田祥一朗 「ショウジョウバエ変態期における不要組織細胞死の機構解析」 京都、平成23年9月21日～24日 4. 日本分子生物学会第34回年会 白田陽一、塩川裕子、矢野環、大島吉輝、倉田祥一朗 「リステリア菌感染によるオートファジー誘導をおこすペプチドグリカン認識タンパク質(PGRP)-LE のドメイン解析」 横浜、平成23年12月13日～16日 5. 日本薬学会第132年会 大西健太、矢野環、倉田祥一朗 「ショウジョウバエ変態期における自己組織の排除機構」 札幌、平成24年3月28日～31日 6. New Perspectives on Immunity to Infection (EMBO Symposia) “Distinct Mechanisms of the Activation of Innate Immune Responses by Peptidoglycan Recognition Protein (PGRP)-LE in <i>Drosophila</i>” Tamaki Yano, Yoichi Shirata, Yuko Shiokawa, Shizuka Mita, Yoshiteru Oshima and Shoichiro Kurata EMBL Heidelberg, Germany May 19-22, 2012 7. 6th International Symposium on Autophagy 2012 in Okinawa</p>

<p>“The function of Atg genes and bacteria sensor, PGRP-LE, in homeostasis of Drosophila gut epithelia” Tamaki Yano and Shoichiro Kurata Okinawa Oct 28 – Nov 1, 2012</p> <p>8. 6th International Symposium on Autophagy 2012 in Okinawa “Functional analysis of Ref(2)P and PGRP-LE in autophagy induction” Kosuke Wakabayashi, Yoichi Shirata, Yuko Shiokawa, Yoshiteru Oshima, Tamaki Yano and Shoichiro Kurata Okinawa Oct 28 – Nov 1, 2012</p> <p>9. 第17回東北大学学際ライフサイエンスシンポジウム 「自然免疫応答としてのオートファジー:その誘導と機能」 矢野環 仙台 平成24年11月6日</p> <p>10. 第85回日本生化学会大会 「オートファジー誘導における細菌認識分子 PGRP-LE 複合体の解析」 若林康介、白田陽一、塩川裕子、大島吉輝、矢野環、倉田祥一朗 福岡 平成24年12月14日-16日</p> <p>11. 日本比較免疫学会第25回学術集会 「ショウジョウバエ細菌認識分子 PGRP-LE による菌感染依存的オートファジー誘導機構」 矢野環、若林康介、白田陽一、村野聡、倉田祥一朗 2013年8月26日 岡山</p> <p>12. 第86回日本生化学会大会 「ショウジョウバエ PGRP-LE と Ref(2)P の集積によるリステリア菌選択的オートファジー誘導機構」 矢野環、若林康介、白田陽一、村野聡、倉田祥一朗 2013年9月11日~13日、横浜</p> <p>13. 第12回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィオーラム2013 「ショウジョウバエ腸管炎症モデルを用いたオートファジー不全による炎症関連遺伝子のゲノム網羅的探索」 長井広樹、矢野環、倉田祥一朗 2013年9月14日、東京</p> <p>14. 第36回日本分子生物学会年会 「オートファジー不全による腸管炎症ショウジョウバエモデルを用いた関連遺伝子のゲノム網羅的探索」 長井広樹、矢野環、倉田祥一朗 2013年12月3~6日、神戸</p> <p>15. 第36回日本分子生物学会年会 「ペプチドグリカン認識タンパク質 PGRP-LE と Ref(2)P による菌感染依存的なオートファジー誘導機構の解明」村野聡、若林康介、白田陽一、矢野環、倉田祥一朗 2013年12月3~6日、神戸</p> <p>16. 第79回日本生化学会東北支部会例会 「ペプチドグリカン認識タンパク質 (PGRP)-LE による菌感染依存的なオートファジー誘導機構の解明」 村野聡、若林康介、矢野環、倉田祥一朗 2013年5月11日、仙台</p> <p>17. Gordon Research Conferences, Autophagy in Stress, Development & Disease “Mechanistic analyses of bacteria sensor and p62 dependent induction of xenophagy” Tamaki Yano, Kosuke Wakabayashi, Satoshi Murano, Yoichi Shirata, and Shoichiro Kurata March 16-21, 2014 Lucca (Barga), Italy</p> <p>18. 弘前大学機器分析センターセミナー 「自然免疫応答としてのオートファジーと疾患制御」 矢野環 2014年1月17日、弘前</p> <p>19. 第7回オートファジー研究会 「ショウジョウバエクローン病モデルによる腸管上皮細胞におけるオートファジーの機能解析」 矢野環 2013年12月19~21日、掛川</p> <p>一般向け 計1件</p> <p>1. 平成25年度日本動物学会関東支部公開講演会 「昆虫から探る免疫の仕組み ~宿主と病原体の攻防~」 矢野環 2013年8月31日、東京</p>
--

様式21

図書 計1件	1. Autophagy Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging ISBN: 978-0-12-405529-2 432 pages Ch.14 pages 203-210 “Elimination of Intracellular Bacteria by Autophagy” Tamaki Yano and Shoichiro Kurata
産業財産権 出願・取得 状況 計0件	(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件
Webページ (URL)	東北大学大学院薬学研究科生命機能解析学分野ホームページ http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seimei/most_advanced.html
国民との科 学・技術対話 の実施状況	1. 平成23年度ひらめきときめきサイエンス(日本学術振興会) 「東北大学サイエンス・エンジェルと触れる昆虫機能の不思議」 平成23年8月6日実施 実施場所:東北大学薬学部 対象者:高校生11名 内容: 1.昆虫を使って遺伝子の働きを実際に目でみて感じてもらう 2. 遺伝子の働きを誘導してみる 3. サイエンス・エンジェルと対話する 上記に実施分担者として参加し、参加高校生への実験指導をおこなった。 2. 平成25年度日本動物学会関東支部公開講演会(2013年8月31日、東京)において、主として高校教諭、高校性と自然免疫、オートファジーについて対談した。(参加者数 約150人)
新聞・一般雑 誌等掲載 計2件	1. 人材育成情報誌 オガーレ! Vol.11 2013.3 P.4-5 「未来をつかもう! しごと図鑑」 2. 東北大学 女性研究者ファイル 2012 (杜の都 ジャンプアップ事業 for 2013) [研究者コラム] P.12-13
その他	特になし

7. その他特記事項

平成23年度の前半は東日本大震災からの復旧が大きな課題であった。研究室が建物最上階であったため、機器、試薬等の破損などの様々な損害があり、機器のおおよその復旧に約半年、事務書類、耐震対策など事後対応の関連部署による確認への対応等は2年近くを費やした。また、震災前後に求人を行うタイミングであったことは、通常時よりも厳しい状況であった。