

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料
〔平成30年度研究進捗評価用〕

平成27年度採択分

平成30年5月29日現在

研究課題名（和文） **自然免疫の包括的理解**

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

課題番号：15H05704

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・特任教授



研究の概要：ノックアウトマウスにおける遺伝子、蛋白質の発現変化を網羅的に野生型マウスと比較解析するとともに、その分子に会合する新たな分子の同定も行い、これらの解析で新たに同定された分子の生理機能をノックアウトマウスの作製解析によって明らかにしていく事により、病態の発症及び進行メカニズムに対する理解を深める。このように一つの分子にこだわらず、自然免疫に重要な役割を果たす分子群の機能を生体レベルで全てを明らかにすることにより、自然免疫系の分子機構を包括的に理解し、免疫系の全体像を明らかにする。

研究分野：医歯薬学、免疫学

キーワード：自然免疫、mRNA 安定性制御、M2 マクロファージ、炎症

1. 研究開始当初の背景

自然免疫と様々な疾患の関係性の研究は近年急速に進んでいる。私達はこれまでに自然免疫による病原体認識に重要な受容体であるTLRファミリー分子の機能をノックアウトマウスを作製することにより明らかとしてきた。このTLRは細胞内シグナル伝達経路を活性化し、様々な遺伝子の誘導を促す。また、TLRはその認識する病原体及び内因性因子や細胞種により特異的な液性因子の産生パターンを示す。TLRを介したこれらの自然免疫系のシグナル伝達経路の殆どが明らかにしてきたが、このシグナル伝達経路の活性化により誘導される様々な遺伝子については、その役割が不明なものが多い。

2. 研究の目的

我々は最近、それらのTLRシグナル依存的に発現誘導される遺伝子について検討を行った。その結果、TLRシグナルによって誘導されるRegnase-1やJmjd3の発見へとつながり、これらの分子の研究から世界に先駆けてmRNA安定性の管理機構、及び疾患特異的M2マクロファージの制御の現在の自然免疫の分野では非常に注目を浴びている研究分野へと発展した。これらのテーマについて研究を進めることにより、自然免疫の新分野を包括的に理解することを目的としている。

3. 研究の方法

様々な組織で特異的Regnase-1を欠損させたマウスを樹立し、様々な臓器特異的な機能

を検討する。また、自然免疫に関与するサイトカインや転写因子等をターゲットとし、それらのmRNA安定性の管理に関わる新規遺伝子の発現を目指す。

発現クローニングを用いたin vitroでの網羅的スクリーニング、及びCrispR/Cas9を用いてノックアウトマウスの作成及び解析を行うことで、M2マクロファージの分化、及び活性化機構発動に関わる未知の分子の探索、様々な疾患に関与するM2マクロファージを検索し、疾患特異的M2マクロファージの分化・活性化経路の解明を狙う。

4. これまでの成果

(1) mRNA安定性制御機構の解明

(i) Regnase-1の制御分子メカニズムの解明

Regnase-1のIKKによるリン酸化部位にアミノ酸変異を施してIKKによるリン酸化及び分解を受けないノックインマウスを作製した。このマウスは実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)に対して耐性を示した。次に、様々なサイトカイン刺激時のRegnase-1の応答を調べた。その結果インターロイキン17(IL-17)によりRegnase-1がリン酸化を受けることが明らかとなり、これがRegnase-1のRNA分解活性に直接影響している可能性が示された。なおかつIL-17によるリン酸化はIKK阻害変異体由来の細胞においても確認され、IKKによるリン酸化および分解とは異なるメカニズムでRNA分解活性が制御されていると考えられた。

(ii) 組織・細胞ごとのRegnase-1の機能解析

腸管上皮細胞を対象としたRegnase-1-コンデ

イシヨナルノックアウト (cKO) マウスを用い、大腸炎における生理的機能解析を行った。デキストラン硫酸 (DSS) 誘発潰瘍性大腸炎モデルでは、Reg1-cKO マウスでは大腸炎に強い抵抗を呈した。アゾキシメタン・DSS 投与による大腸腫瘍形成モデルにおいても、Reg1-cKO マウスでは、腫瘍形成スコアが有意に少なかった。

(2) マクロファージサブタイプの解析

マクロファージが関わる疾患として癌を標的とし、tumor associated macrophage (TAM) について、活性化機構について研究を行った。インターフェロンは癌の治療法として有効な手段の一つであるので、マクロファージの中でインターフェロン誘導性の分子は癌の発症・進行に関与していると考え、制御因子の探索を行った。その結果、いくつかのインターフェロン誘導性分子の中から、Basic leucine zipper transcription factor ATF-2 (Batf2) を同定した。この遺伝子欠損マウス (Batf2^{-/-}) を作製し、メラノーマを移植した所、野生型と比較して著しい癌の増大が確認された。次に Batf2 欠損下における癌の増大のメカニズムについて検討を行った。Batf2^{-/-}マウスの癌組織中に居るマクロファージは IL-12p40 の産生が殆ど起こっていないことがわかった。また癌組織中の CD8⁺T 細胞の数が有意に減少していることも明らかにした。以上の事から、癌周辺のマクロファージは Batf2 の発現が上昇すると IL-12p40 を発現し、その結果として CD8⁺T 細胞を増殖させて、がんを抑制する機能を持っているということを示した。

5. 今後の計画

(1) mRNA 安定性制御機構の解明

(i) Regnase-1 の制御分子メカニズムの解明
IL-17 による細胞刺激における炎症関連遺伝子の mRNA の安定化メカニズムにおいて、今回提唱された Regnase-1 のリン酸化を通じた活性調節メカニズムは重要な寄与をもたらしていることが想定される。今後は IL-17 によってリン酸化を受けないような改変したマウスの作製を行い、このマウスやマウス由来の細胞が様々な炎症性刺激に対して耐性を示すかどうかを検証していく予定である。

(ii) 組織や細胞ごとの Regnase-1 の機能解析

Regnase-1 flox マウスと種々の細胞・組織特異的 Cre マウスとの交配によって、Regnase-1 の役割についてシングルセル解析を中心に研究を推進していく予定である。また、本年度の研究成果について取りまとめ中である。

(2) マクロファージの研究

これまでの研究で癌組織の中には複数種のマクロファージが存在していることが明らか

となっている。そこでシングルセルレベルの解析ができる器機、もしくは多重染色ができる FACS 機器を用いて、癌組織中のマクロファージサブタイプの分類とそれぞれの役割の検討を行う。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

<論文>

(1) Kanemaru H, Yamane F, Tanaka H, Maeda K, Satoh T, Akira S. Int Immunol. BATF2 activates DUSP2 gene expression and upregulates NF- κ B activity via phospho-STAT3 dephosphorylation. 2018. in press.

(2) Nakagawa K, Matsuki T, Zhao L, Kuniyoshi K, Tanaka H, Ebina I, Yoshida KJ, Nabeshima H, Fukushima K, Kanemaru H, Yamane F, Kawasaki T, Machida T, Naito H, Takakura N, Satoh T, Akira S. Schlafen-8 is essential for lymphatic endothelial cell activation in experimental autoimmune encephalomyelitis. Int Immunol. 30:69-78, 2017.

(3) Kanemaru H, Yamane F, Fukushima K, Matsuki T, Kawasaki T, Ebina I, Kuniyoshi K, Tanaka H, Maruyama K, Maeda K, Satoh T, Akira S. Antitumor effect of Batf2 through IL-12 p40 up-regulation in tumor-associated macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A. 114:E7331-7340, 2017.

(4) Maeda K, Akira S. Regulation of mRNA stability by CCCH-type zinc-finger proteins in immune cells. Int Immunol. 29:149-155, 2017. Review.

(5) Satoh T, Nakagawa K, Sugihara F, Kuwahara R, Ashihara M, Yamane F, Minowa Y, Fukushima K, Ebina I, Yoshioka Y, Kumanogoh A, Akira S. Identification of an atypical monocyte and committed progenitor involved in fibrosis. Nature. 541:96-101, 2017.

<受賞>

(1) 佐藤 荘、大阪大学賞 (2017)

(2) 佐藤 荘、第 13 回麒麟児賞 (2017)

(3) 佐藤 荘、平成 29 年度科学技術分野 文部科学大臣表彰の若手科学者賞 (2017)

(4) Shizuo Akira, Highly Cited Researchers (2017)

ホームページ等

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