

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07239

研究課題名(和文) 自然免疫の記憶機構のゲノム解析

研究課題名(英文) Genome analysis for innate immune memory

研究代表者

布施 直之 (Fuse, Naoyuki)

東北大学・薬学研究科・助教

研究者番号：80321983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、自然免疫にも適応免疫のような感染菌を記憶する機構が存在することが認知されてきたが、そのメカニズムは未だ不明な点が多い。私達は、ショウジョウバエに低病原性菌を感染させ訓練すると、その後の高病原性菌の感染において生存率が上昇することを検出した。この実験系を用いて、RNA-Seqによる免疫記憶のトランスクリプトーム解析を行い、訓練によって本感染時の発現が増強する398遺伝子を同定した。これらの遺伝子の多くはヒストン修飾によって発現が制御される免疫関連の遺伝子であった。これらの結果から、ショウジョウバエの免疫記憶において、ヒストン修飾などのエピゲノム制御が重要な役割を果たす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「自然免疫の記憶」は臨床的にも注目されている。例えば、BCGワクチンは、結核菌に対するワクチンとして広く利用されているが、他の様々な感染症に対しても抵抗性を示すことが知られていた。近年、この現象が「自然免疫の記憶」に因ることが明らかになり、将来起こるかもしれない新型の感染症にも応用できる可能性が示された。本研究は、「自然免疫の記憶」の基本的なメカニズム解明することを目指しており、その成果は、「自然免疫の記憶」を応用した、幅広い病原体に応答できるワクチンの開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Innate immunity is an evolutionarily conserved primitive defense system, and is currently realized to carry memory capacity of immune response as adaptive immunity does. However, its mechanism remains to be elusive. We study “innate immune memory” using fruit fly, *Drosophila*, that eliminates pathogens solely via innate immunity. Here, we found that comparing with naive flies, the flies trained to primary infection with some kinds of bacteria showed higher resistance against secondary infection with pathogenic bacteria. From RNA-Seq analysis, we identified 398 genes, whose expressions after secondary infection were up-regulated in training-dependent manners. These genes significantly enriched the immune genes regulated by Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase (SAGA), a histone modification complex. These results suggest that epigenetic reprogramming for gene expression might be involved in innate immune memory in insects as well as in mammals.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：自然免疫 記憶 ショウジョウバエ

## 1. 研究開始当初の背景

生物は常に細菌やウイルスなどの外敵に晒されているので、侵入する外敵を排除する免疫機構は、個体が生き残り子孫を残すために必須のメカニズムである。免疫機構は、自然免疫と適応免疫の2つのメカニズムに大別される。自然免疫は、進化的に保存された基本的な免疫機構であり、哺乳類ではマクロファージなどが担い、抗菌ペプチドの産生や貪食などを通して、細菌を死滅させる機構である。一方、適応免疫は、脊椎動物で進化した機構であり、リンパ球が抗原特異的な抗体を産生し、病原体を中和し排除している。自然免疫は、病原体のパターンを認識して、感染に素早く応答できる利点をもつ。一方、適応免疫は、時間を要する反応であるが、ゲノムの再編成によって、一度遭遇した抗原を記憶し、再び同じ抗原に遭遇した時、増強された素早い免疫応答を行うことができる。従来、自然免疫には適応免疫のような免疫記憶が存在しないと考えられてきた。しかし、近年の研究から、自然免疫においても、免疫記憶の仕組みが存在することが示唆されている。例えば、自然免疫のみを有するショウジョウバエを用いた実験では、事前に低濃度の細菌を感染させ訓練すると、その後の致死量の菌の感染(本感染)に対して抵抗性を持つことが示された(Pham, 2007)。また、このような現象は、無脊椎動物だけではなく、哺乳類や植物を含めた様々な生物でも観察されている(Rodrigues, 2010など)。このように、「自然免疫の記憶(innate immune memory)」は、近年、広く認知されてきた(Netea, 2016)が、そのメカニズムは未だ不明な点が多く残されている。例えば、哺乳類のマクロファージなどを用いた研究から、免疫訓練による遺伝子発現の増強にヒストン修飾が関与することが示唆され、自然免疫の記憶にエピゲノム制御が重要な役割を果たすことが示唆されている(Foster, 2007)。しかし、免疫情報がどのようにしてエピゲノム情報に転換するのか、よくわかっていない。また、免疫記憶において、個体レベルで何が起きているのか、不明である。

## 2. 研究の目的

本研究は、ショウジョウバエのゲノム科学的手法を用いて、「自然免疫の記憶」のメカニズムを明らかにすることを目的とする。本研究は、ゲノム、エピゲノム、トランスクリプトームを統合的に解析することで、免疫機構の未知のメカニズムにアプローチする挑戦的な課題である。

今回、トランスクリプトーム解析から、免疫記憶における遺伝子発現の変化を調べた。さらに、免疫記憶に関与する遺伝子の同定を目指し、ゲノムワイド関連解析(GWAS)の条件検討を行った。

## 3. 研究の方法

まず始めに、免疫記憶を検出する実験系の構築を目指した。ショウジョウバエに様々な細菌を感染させ、訓練と本感染後の生存率を測定した。その結果、病原性が低い菌(*Micrococcus luteus*: ルテウス菌)を感染させ訓練し、その後に病原性が高い菌(*Staphylococcus aureus*: 黄色ブドウ球菌)を本感染することで、訓練効果を明確に検出できる実験系を確立した(Fig. 1)。この実験系を用いて、RNA-Seqによる免疫記憶のトランスクリプトーム解析を行った。

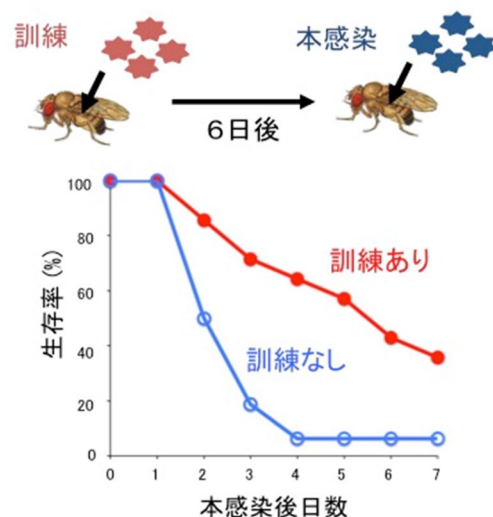


Fig. 1 免疫記憶を検出する実験系  
ルテウス菌で訓練し、黄色ブドウ球菌で本感染を行い、生存率を測定することで、明確な訓練効果を検出した。

ゲノムワイド関連解析 (GWAS) は、多数の個体の形質とゲノムを比較解析することで、形質に関連する遺伝子をゲノム網羅的に同定する手法である。ショウジョウバエでは、ゲノム配列が決定されている多数の系統を揃えたライブラリーがあり、それを用いて GWAS を行なうことができる。例えば、過去に、ショウジョウバエの GWAS を用いて、感染抵抗性を制御する遺伝子が同定されている (Bou Sleiman, 2015)。この手法を用いて、多数の系統について免疫訓練の効果を定量的に測定し、ゲノム配列との比較から訓練効果に関連する遺伝子をゲノム網羅的に同定する。

#### 4. 研究成果

RNA-Seq 解析から、訓練によって本感染時の発現が増強する 398 遺伝子を同定した (Fig. 2)。興味深いことに、これらの遺伝子の多くは免疫関連の遺伝子であり、中でも特にヒストン修飾 (H3K9, K14 のアセチル化) によって発現が制御される遺伝子群

(Zsindely, 2009) であった。これらの結果から、免疫訓練によって H3K9, K14 のアセチル化が変化し、このヒストン修飾を目印に本感染時の遺伝子発現が上昇し、感染抵抗性が増強するという仮説をたてた。この仮説を検証するために、ヒストンアセチル化酵素のノックダウンの表現型を調べている。さらに、逆のパターンで、訓練によって本感染時の発現が抑制される 301 遺伝子も同定した (Fig. 3)。興味深いことに、これらの遺伝子の多くは神経系で発現し、神経伝達を制御する遺伝子であった。この結果から、免疫系と神経系のクロストークを予想させる。今後、この予想についても検討する。遺伝学的な手法を用いて、神経細胞で遺伝子の機能をノックダウンし、感染抵抗性や免疫記憶への影響を調べる。免疫記憶に寄与する遺伝子が同定された場合は、その遺伝子が発現する細胞や免疫系への作用機序を調べる。

さらに、GWAS のための予備実験を行った。DSPR (The Drosophila Synthetic Population Resource) ライブラリー (Long, 2014) の 55 系統を用いて、ルテウス菌の訓練有、または無の個体について、黄色ブドウ球菌の本感染後の生存率を測定した。その結果、訓練効果 (訓練有 / と無の生存率の差) は、黄色ブドウ球菌に対する通常の感染抵抗性 (訓練無の生存率) とは独立であり、訓練効果は通常の免疫シグナルとは異なる機構で制御されていることが示唆された。今後、約 200 系統について訓練効果を測定して、GWAS を行い、免疫訓練に関連する遺伝子をゲノム網羅的に同定する。同定した遺伝子の機能を調べることで、自然免疫の記憶のメカニズムの解明を目指す。

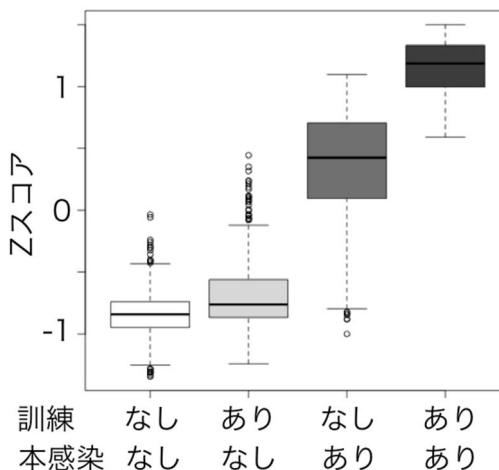


Fig. 2 RNA-Seq 解析で検出された 398 遺伝子の発現変動パターン。縦軸は標準化された発現変動幅を示す。この遺伝子群は、訓練によって発現が増強する。

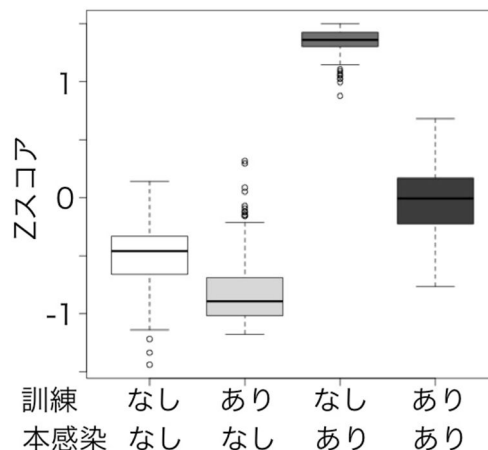


Fig. 3 RNA-Seq 解析で検出された 301 遺伝子の発現変動パターン。縦軸は標準化された発現変動幅を示す。Fig. 2 とは逆のパターンで、この遺伝子群は、訓練によって発現が抑制される。

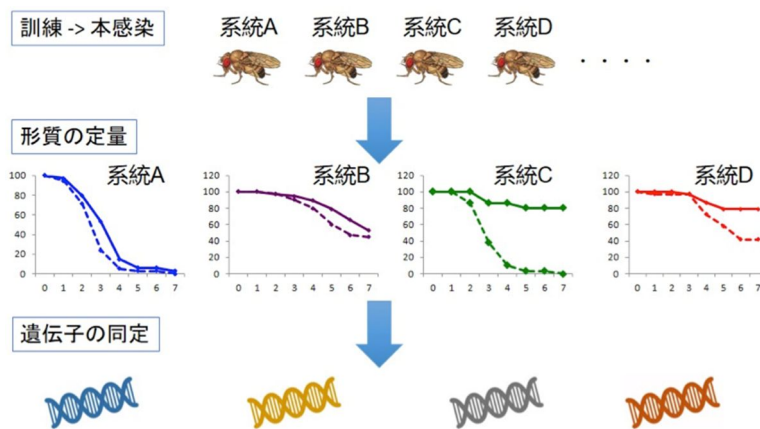


Fig. 4 免疫記憶のGWASの予備実験

複数の系統について、訓練、本感染後の生存率を調べた。系統Cのように、訓練無しの時の生存率（点線）は低いが、訓練有りの時の生存率は高くなる系統があった。

本研究は、自然免疫の記憶のメカニズムを明らかにすることを目指しており、その成果は自然免疫の記憶を利用した医療に応用できる可能性がある。近年、医学的にも「自然免疫の記憶」の重要性が再認識されている。例えば、結核菌に対するワクチンのBCG (Bacille de Calmette et Guérin) を接種した新生児は、敗血症などの他の感染症に対する死亡率も低下することが報告され、この現象が自然免疫の記憶に因ることが明らかとなった (Kaufmann, 2018 など)。一般的なワクチンは、適応免疫の記憶機構を利用し、抗原特異的な抗体を産生するリンパ球を獲得する。しかし、その高い特異性ゆえに、抗体の認識を回避する変異型の病原体や、人類が過去に感染したことがない新型の病原体には効果がない。先に挙げたBCGワクチンが、なぜ自然免疫の記憶を惹起しているのか、不明であり興味深い問題であるが、自然免疫の記憶のメカニズムを解明し、それを応用することによって、多様な病原体に広く応答できるワクチンを作れる可能性がある。さらに、そのような幅広く対応できるワクチンは、将来蔓延するかもしれない新型の病原体に対抗できる可能性があり (O'Neill, 2020)、本研究の成果から予想されるインパクトは非常に大きなものであると期待している。

#### 参考文献

- Pham et al., A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *PLoS Pathog.* 3, e26 (2007).
- Rodrigues et al., Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Science* 329, 1353-5 (2010).
- Netea et al., Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science* 352, aaf1098 (2016).
- Foster et al., Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* 447, 972-8 (2007).
- Bou Sleiman et al., Genetic, molecular and physiological basis of variation in *Drosophila* gut immunocompetence. *Nat. Commun.* 6, 7829 (2015).
- Zsindely et al., The loss of histone H3 lysine 9 acetylation due to dSAGA-specific dAda2b mutation influences the expression of only a small subset of genes. *Nucleic Acids Res.* 37, 6665-6680 (2009).
- Long et al., Dissecting complex traits using the *Drosophila* Synthetic Population Resource. *Trends Genet.* 30, 488-495 (2014).
- Kaufmann et al., BCG Educates Hematopoietic Stem Cells to Generate Protective Innate Immunity against Tuberculosis. *Cell* 172, 176-190 (2018).
- O'Neill et al., BCG-induced trained immunity: can it offer protection against COVID-19? *Nat. Rev. Immunol.* (2020). doi:10.1038/s41577-020-0337-y

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Masuko Keita, Furuhashi Hirofumi, Komaba Kanae, Numao Eriko, Nakajima Rumi, Fuse Naoyuki, Kurata Shoichiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Nuclear Lamin is required for Winged Eye-mediated transdetermination of Drosophila imaginal disc	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 724 ~ 731
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12608	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Masuko Keita, Fuse Naoyuki, Komaba Kanae, Katsuyama Tomonori, Nakajima Rumi, Furuhashi Hirofumi, Kurata Shoichiro	4. 巻 22
2. 論文標題 winged eye Induces Transdetermination of Drosophila Imaginal Disc by Acting in Concert with a Histone Methyltransferase, Su(var)3-9	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 206 ~ 217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2017.11.105	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kumada Kohei, Fuse Naoyuki, Tamura Tomomichi, Okamori Chisaki, Kurata Shoichiro	4. 巻 513
2. 論文標題 HSP70/DNAJA3 chaperone/cochaperone regulates NF- B activity in immune responses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 947 ~ 951
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.04.077	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iwashita Shinzo, Suzuki Hiroaki, Goto Akira, Oyama Tomohito, Kanoh Hirotaka, Kuraishi Takayuki, Fuse Naoyuki, Yano Tamaki, Oshima Yoshiteru, Dow Julian A. T., Davies Shireen-Anne, Kurata Shoichiro	4. 巻 11
2. 論文標題 A Receptor Guanylate Cyclase, Gyc76C, Mediates Humoral, and Cellular Responses in Distinct Ways in Drosophila Immunity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.00035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ueno H, Watanabe R, Fuse N, Kurata S
2. 発表標題 Search for the ligand of Gyc76C, a novel receptor activating the innate immune system
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nemoto K, Masuko K, Fuse N, Kurata S
2. 発表標題 Dilp8 is involved in Winged eye-mediated transdetermination of Drosophila imaginal disc
3. 学会等名 13th Japanese Drosophila Research Conference
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡森千咲、布施直之、倉田祥一郎
2. 発表標題 ショウジョウバエを用いた自然免疫の記憶機構の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木拓朗、石橋謙太郎、布施直之、倉田祥一郎
2. 発表標題 ショウジョウバエ腸管免疫の神経制御
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nemoto K, Masuko K, Fuse N, Kurata S
2. 発表標題 Dilp8 is involved in Winged eye-mediated transdetermination of imaginal disc
3. 学会等名 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石橋謙太郎, 鈴木拓朗, 布施直之, 倉田祥一郎
2. 発表標題 神経系によるショウジョウバエ腸管免疫制御機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 二村 麻莉子、上野 春奈、布施 直之、倉田 祥一郎
2. 発表標題 自然免疫応答におけるSpatzle isoformの役割
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----