

令和元年5月17日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15725

研究課題名(和文) 抗ウイルス免疫応答における新規細胞間接触依存シグナル伝達経路の解析

研究課題名(英文) Analysis of a novel cell-cell contact-dependent signaling pathway in antiviral immune response

研究代表者

熊谷 雄太郎 (Kumagai, Yutaro)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：00528408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルスに対する免疫応答において重要な役割を果たすサイトカインI型インターフェロンの産生調節機構を調べる過程において新規の細胞間接触依存シグナル伝達経路を発見し、その分子機構を詳細に調べた。結果、当該シグナル伝達を惹起するのに必要な分子や、その下流に位置する分子、またそのシグナルにより誘導される遺伝子発現プログラムを網羅的に明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IFNの制御は抗ウイルス自然免疫応答のみならず、IFNのアジュバントとしての機能に関連した獲得免疫系の制御、自己免疫疾患への関与など非常に重要であり、今回の研究によって明らかになった新規の分子機構により今までできなかった治療、予防等へ繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We found a novel cell-cell contact dependent mechanism which controls production of type I interferon, a cytokine important for antiviral immune response. We investigated molecular mechanism of the cell-cell contact dependent signaling. Molecules inducing the cell-cell contact signaling, required downstream molecules, and gene expression program evoked by the signaling have been elucidated.

研究分野：免疫学

キーワード：抗ウイルス免疫応答 I型インターフェロン 細胞間接触

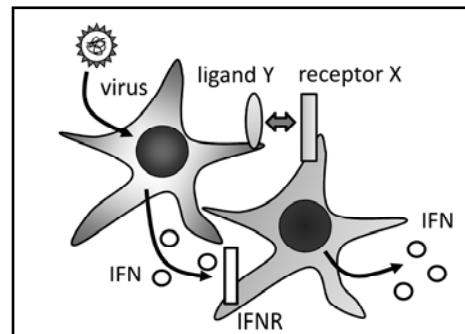
様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

I 型 IFN はウイルス感染時に産生され多様な抗ウイルス応答を引き起こすサイトカインであり、その産生または機能の異常はウイルス感染に対する重大な脆弱性を引き起こすことが分かっている。我々は I 型 IFN 産生をモニタリングできるマウス、Ifna6gfp マウスや Ifnb1gfp マウスを作製し、IFN 産生細胞の同定や産生に必要なシグナル伝達経路の同定を行ってきた。プラズマサイト様 DC (pDC)が TLR-MyD88 のシグナル伝達経路を用いて、コンベンショナル DC (cDC)が RLR-IPS-1 のシグナル伝達経路を用いてウイルス認識、I 型 IFN 産生を行うことを生体内で初めて示し、かつ肺でのウイルス感染に対して I 型 IFN を産生し抗ウイルス免疫応答を引き起こす細胞として肺胞マクロファージを初めて同定した(Kumagai et al, Immunity, 2007)。また、pDC, cDC において、ウイルスの増殖や I 型 IFN による正のフィードバックシグナルの抗ウイルス免疫応答への必要性を解析し、cDC においてはウイルスの増殖および I 型 IFN 受容体(IFNR)を介したフィードバックシグナルなしには IFN を産生し得ないこと、一方 pDC においては IFN の正のフィードバックによってウイルス増殖の必要性がなしに IFN を産生し得ることなどを示した(Kumagai et al, J. Immunol, 2009)。

2. 研究の目的

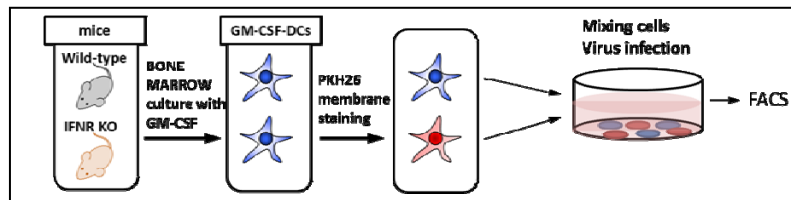
このように IFN の発現制御に必要な分子機構は、病原体の認識に関わる pattern recognition receptor (PRR)から下流のシグナル伝達経路、さらには重要な転写因子(IRF3, IRF7)などが同定されており、かつ IFN を産生する細胞についても各種同定されている。しかしながら各細胞がどのように協同して IFN 産生を行い、抗ウイルス免疫応答を制御しているのか、IFN 産生の経時的なダイナミクスはどのように制御されているのかなどについてはよくわかっていない。



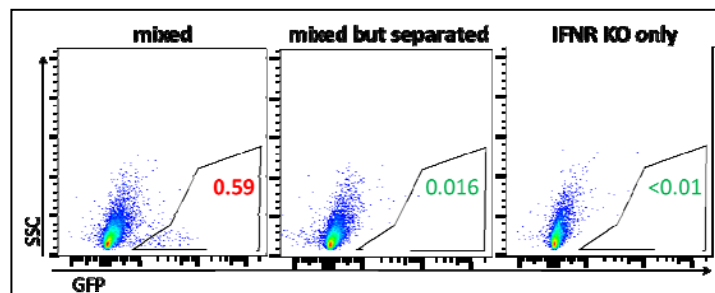
我々は I 型 IFN 産生を GFP の蛍光によってモニタリングできるマウスを利用し I 型 IFN 発現の顕微鏡下において経時的に追跡する研究を行う途上において、樹状細胞が細胞間接触依存的に I 型 IFN を産生する新規のシグナル伝達経路が存在することを示した(右上図)。本研究においては細胞間接触による相互作用を実現するシグナル伝達機構とそれを媒介する分子機構を同定し、同定された分子による抗ウイルス応答の誘導法の探索を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

野生型(WT)マウス由来 cDC と IFNR 欠損(IFNR KO) Ifna6gfp マウス由来の cDC を混合し、ウイルスに感染させる実験を行った(右図)。



すると、IFNR KO 細胞のみでは GFP 陽性細胞は見られなかったが(図右)、WT 細胞と混合すると GFP 陽性細胞が見られた(図左)。WT 細胞は GFP をもたないマウスから調製しているため、GFP 陽性になりうる細胞は IFNR KO 細胞由来のもののみであり、これは IFNR



KO 細胞が IFN を産生していることを意味する。さらに、可溶性タンパク質等は通過できる 0.4 μm のポアを持つ膜で WT cDC と Ifna6gfp IFNR KO cDC を隔てて培養した場合においては GFP 陽性細胞が見られなかった(図中央)。これは IFNR KO cDC からの IFN 産生には可溶性メディエーターによる相互作用によっても起こらず、細胞間接触による相互作用が必要であることを示唆している。これらの結果から、cDC は IFNR を介した正のフィードバック以外に細胞間接触による抗ウイルス免疫応答、IFN 産生促進機構があることが示唆される。

この実験系を用い、以下の実験を行った。

- (1) 上記実験系において IFNR KO Ifna6gfp 細胞を別の遺伝子の欠損細胞に置き換え、細胞間接触シグナル伝達による IFN 誘導に必要な遺伝子を同定する。
- (2) 上記実験系において WT 細胞を種々の遺伝子の欠損細胞に置き換え、細胞間接触シグナル伝達を引き起こすために必須の分子を同定する。
- (3) 上記実験系において IFNR KO 細胞を経時的にソーティングによって回収し、トランスクリプトーム解析を行うことで細胞間接触シグナル伝達により引き起こされる応答を特徴づける。特に、必須の転写因子等を同定する。

4. 研究成果

(1) 細胞間接触シグナル伝達による IFN 誘導には IPS-1 が必須である。

cDC がウイルスを認識し I 型 IFN を産生するには RIG-I-like receptor (RLR) とその下流に位置するアダプター分子 IPS-1 が必須であることが知られている。細胞間接触シグナル伝達がこれら分子の必要性を回避するか、すなわち、IPS-1 欠損細胞においても細胞間接触シグナル伝達があれば IFN を産生するかを調べるために、WT 細胞と IPS-1 欠損 *Ifna6gfp* 細胞を混合し、ウイルスに感染させた後 GFP を FACS によって観測した。すると、GFP は産生されなかったことから、RLR-IPS-1 経路は細胞間接触シグナル伝達によって補われることはなく、当該経路によるウイルス認識は IFN 産生に必須であることが確認された。

(2) 細胞間接触シグナル伝達の誘導には IRF3, IRF7 が必須である。

細胞間接触によりシグナルが伝達される際、伝達する側の細胞に必須の遺伝子を調べるため、種々の KO 細胞と IFNR 欠損 *Ifna6gfp* 細胞とを混合しウイルス感染させた後に GFP を FACS により観測する実験を行った。すると、IRF3 欠損によっては GFP 産生が障害されなかったが、IRF7 欠損により若干減少し、IRF3/IRF7 二重欠損によって完全に消失した。すなわち、ウイルス感染により細胞間接触シグナル伝達を司る分子（前ページ「2. 研究の目的」の項の図中のリガンド Y）が発現すると考えられるが、この発現には IRF3/IRF7 が関与していることを示唆している。

(3) 細胞間接触シグナル伝達による IFN 誘導に必要な転写因子の同定。

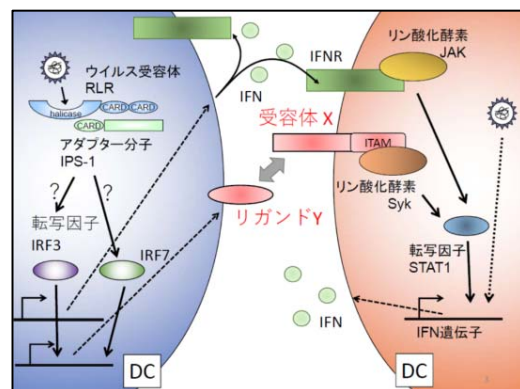
細胞間接触シグナル伝達により誘導される遺伝子発現を網羅的に調べる目的から、WT 細胞と IFNR KO 細胞を混合し、ウイルス感染させた後に IFNR KO 細胞を経時的に回収し RNA-seq 解析に供した。すると、I 型 IFN 刺激によって誘導される典型的な遺伝子群の一部を含む極めて限定的な遺伝子発現のみが亢進していることが判明した。そこで、上記の IRF3/IRF7 だけでなく、IFN 応答に関与する転写因子である Stat1 の関与を調べるために、WT 細胞と IFNR KO 細胞を混合、ウイルス感染した後に p-STAT1 (Y701) 抗体による FACS 解析を行った。すると、WT 細胞においてはリン酸化が見られたが、IFNR KO 細胞においてはリン酸化が見られなかった。すなわち、Stat1 は遺伝子発現に関与していないことを示唆している。

さらに、IFNR/Stat1 二重欠損 *Ifna6gfp* マウスを作製し、このマウス由来の細胞と WT 細胞を混合しウイルス感染後に GFP を観測することで Stat1 の役割を調べた。上記の結果から予測されたものと違い、Stat1 欠損によって GFP の発現は消失した。すなわち、細胞間接触シグナル伝達による IFN の産生誘導に Stat1 は必須であることを意味する。

Stat1 の Y701 リン酸化が見られなかったことから、通常の IFN 応答における Jak/Tyk ではないキナーゼの関与が推測される。そこで、種々のキナーゼ阻害剤を混合培養に添加し GFP 発現を調べたところ、Syk の阻害剤である piccattanol, R406 によって GFP の発現が阻害されることが示された。

以上の結果をまとめると右図のようなシグナル伝達経路の存在が推測される。ウイルスは樹状細胞に感染すると RLR-IPS-1 依存シグナル伝達を活性化し、IRF3, IRF7 依存的に IFN とリガンド Y を発現する。一方、リガンド Y はその受容体を通じて隣接する細胞の細胞間接触シグナル伝達経路およびその下流に位置する Stat1 を活性化し、IFN 産生を誘導する。

今後はシグナル伝達経路の全容を明らかにするために、受容体、リガンドの分子実態を補足する研究を進める予定である。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Vandenbon A, Kumagai Y, Lin M, Suzuki Y, Nakai K: Waves of chromatin modifications in mouse dendritic cells in response to LPS stimulation. *Genome Biol* 2018, 19(1):138.
2. Maruyama K, Takayama Y, Sugisawa E, Yamanoi Y, Yokawa T, Kondo T, Ishibashi KI, Sahoo BR, Takemura N, Mori Y, Kanemaru H, Kumagai Y, Martino MM, Yoshioka Y, Nishijo H, Tanaka H, Sasaki A, Ohno N, Iwakura Y, Moriyama Y, Nomura M, Akira S, Tominaga M: The ATP Transporter VNUT Mediates Induction of Dectin-1-Triggered Candida Nociception. *iScience* 2018, 6:306-318.
3. Teraguchi S, Kumagai Y: Estimation of diffusion constants from single molecular measurement without explicit tracking. *BMC Syst Biol* 2018, 12(Suppl 1):15.
4. Takemura N, Kurashima Y, Mori Y, Okada K, Ogino T, Osawa H, Matsuno H, Aayam L, Kaneto S, Park EJ, Sato S, Matsunaga K, Tamura Y, Ouchi Y, Kumagai Y, Kobayashi D, Suzuki Y, Yoshioka Y, Nishimura J, Mori M, Ishii KJ, Rothenberg ME, Kiyono H, Akira S, Uematsu S: Eosinophil

depletion suppresses radiation-induced small intestinal fibrosis. Science translational medicine 2018, 10(429).

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：Nina Trost

ローマ字氏名：Nina Trost

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。