

令和元年6月18日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19559

研究課題名(和文) 妊娠期におけるウイルス感染により規定される子孫自然免疫系維持機構について

研究課題名(英文) Study on innate immune cells function of mice born from mice receiving virus infection during pregnancy

研究代表者

河合 太郎 (KAWAI, Taro)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授

研究者番号：50456935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：自然免疫細胞は初期の感染に応じて性質が変化し、次の感染に対する応答が変化することが示唆されている。本研究では、胎児期における自然免疫活性化が子孫の免疫系成立に及ぼす影響について調べた結果、ウイルスRNAを投与した妊娠マウスの仔の自然免疫細胞では細菌成分LPSによる炎症性応答が低下する寛容傾向にあることを見出した。このことは胎児期での自然免疫活性化がその後の免疫応答の方向性を規定することを示唆している。また、脱メチル化酵素TET-1やV型ATPase複合体の構成因子がLPSに対する自然免疫応答を負に制御している可能性を見出し、これらが免疫寛容の維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自然免疫系の破綻はがん、自己免疫疾患、アレルギー等様々な疾患を誘導することが知られている。本研究は、マウスにおいて妊娠期にウイルスRNAに暴露された母マウスから生まれた仔マウスの自然免疫細胞の活性化が低下しており一種の免疫寛容を呈している可能性を示した。このことから、自然免疫細胞の機能は胎児期にある程度規定されていることが示唆された。このことは、自然免疫系が関与する疾患において、胎児期での感染暴露経験がその後の疾患発症に関連している可能性があることから、本研究成果は、免疫系の成立機構を理解する学術的意義に加え、疾患治療や診断において社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that innate immune cells have a capacity to change their responsibility to the second infection, depending on the initial infection they received. In this study, we investigated the effect of the initial infection during embryo on their innate immune quality after birth. We found that innate immune cells of mice born from pregnant mice receiving viral RNA showed decreased production of inflammatory cytokines during bacterial LPS exposure and showed innate immune tolerance. This suggests that the innate immune cells function is established during embryo. In addition, we also found that Tet methylcytosine deoxygenase 1 (TET1) and a component vacuolar ATPase are required for negative regulation of LPS-induced cytokine induction, suggesting that these proteins play important roles in mediating innate immune tolerance.

研究分野：自然免疫

キーワード：自然免疫 炎症 マクロファージ サイトカイン 遺伝子発現 シグナル伝達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体防御において主要な役割を果たす免疫系は大きく自然免疫と獲得免疫に分けられる。獲得免疫の中心となる B 細胞や T 細胞は遺伝子再構成による多様性獲得とともに記憶細胞に分化することで免疫記憶を維持し二度目の感染に備えることができるのに対し、自然免疫系の担当細胞であるマクロファージや樹状細胞は、Toll-like receptor (TLR) ファミリーに代表される自然免疫受容体を介する病原体の初期認識や炎症応答の惹起等を通して、病原体の初期排除や獲得免疫の形成に必須の役割を果たすが、これら細胞に「記憶」を保持する仕組みが備わっているかは不明である。しかし、自然免疫にも「記憶」に類似した機構が存在することを示唆する報告近年続いている。グラム陰性細菌の細胞壁成分であり TLR4 のリガンドであるリポ多糖 (LPS) で初期刺激を加えたマクロファージでは、その後の細菌刺激による炎症性サイトカイン産生能が減少し、Immune tolerance の状態になる。一方、真菌の細胞壁成分 β -glucan で初期刺激した場合、その後の細菌刺激による炎症性サイトカイン産生が上昇することが報告されている。この現象は Trained immunity と提唱されている。このように、自然免疫細胞は初期の感染に応じて機能変化し、次の感染に備えるという記憶を保持していると考えられる。しかし、Immune tolerance や Trained immunity を規定する分子機構は不明である。また、これらの事象は、主に生体から取り出した自然免疫細胞や同一個体内での性質変化を中心に研究がなされており、胎児期における病原体暴露が子孫の自然免疫細胞の性質に及ぼす影響については不明な点が多い。自然免疫細胞が産生するサイトカインの違いがアレルギーや自己免疫疾患の発症と関連していることや、近年これら疾患患者が増えていることから、本研究は、自然免疫細胞が記憶を持つという概念のみならず、胎児期の自然免疫活性化により成人期の疾患が規定されるという新たな概念の創出に繋がることを期待される。

2. 研究の目的

最近の研究から、未分化な自然免疫細胞である単球にグラム陰性細菌の細胞壁成分であり起炎作用を持つ LPS で初期刺激を行うことで分化させたマクロファージでは細菌成分であるリポペプチド刺激による炎症性サイトカイン産生能が減少することが示されている。一方、真菌の細胞壁成分である β -glucan で刺激し分化させた場合では、リポペプチド成分刺激による炎症性サイトカイン産生能が上昇することが報告されている。すなわち、自然免疫細胞の初期刺激に応じて、その後の病原体に対する免疫応答性が規定されており、自然免疫細胞にも何らかの記憶システムが存在していることが示唆される。初期刺激を受けたマクロファージでは DNA のメチル化やアセチル化などのヒストン修飾の違いが生じており、それによって生じるプロモーター活性の違いが炎症性サイトカイン産生能の差異の原因であると考えられている。他方、疫学的な解析から、妊娠期において母体がインフルエンザウイルス等のウイルスに感染した場合、生まれた子供は生育後、自閉症や統合失調症を発症するリスクが高まることが報告されている。脳に局在するマクロファージとして知られているミクログリアは、炎症性サイトカインや活性酸素等を産生することで死細胞、感染細胞、腫瘍などの排除を行い、脳内の恒常性維持に寄与している。しかしながら、自閉症患者ではミクログリアが過剰に機能することが自閉症の発症に関連していることが示唆されており、Trained Immunity がヒトにおいても保持されていることが示唆される。そこで、本研究では、自閉症のモデルマウスとして MIA (Maternal Immune Activation) モデルを用いて、このマウスにおける Trained immunity や Immune tolerance の解析を行い、その背景に存在する分子機構を明らかにすることを旨とする。MIA とはウイルス感染を模倣する人工合成二重 RNA である poly (I:C) を妊娠マウスに投与し、ウイルスに対する自然免疫応答を惹起した状態のことであり、この妊娠マウスから生まれた仔マウスは、自閉症様行動を示すことから、自閉症のモデルマウスとして広く使用されている。しかしながら、免疫系への影響については不明な点が多く、本研究で MIA モデルマウスでの自然免疫細胞の活性化に着目し解析を行う。また、Trained immunity や Immune tolerance を規定する分子機構の詳細を理解するため、LPS 刺激後のマクロファージ内での遺伝子発現変化、シグナル伝達分子の活性化状態、DNA メチル化の変化等を解析することを通して、これらの制御に関わる因子の実態を明らかにする。さらに、自然免疫細胞の Immune tolerance の機構として、小分子 RNA やエピジェネティック制御に加え TLR4 の細胞表面の内在化が報告されていることから、これらに着目した解析も行う。

3. 研究の方法

MIA モデルマウスを確立し、そのマウスから樹状細胞やマクロファージを調整し、LPS で刺激後のサイトカイン遺伝子発現、分化マーカーの発現、シグナル伝達分子の活性化をそれぞれ定量 PCR、FACS 解析、ウェスタンブロットで解析を行う。

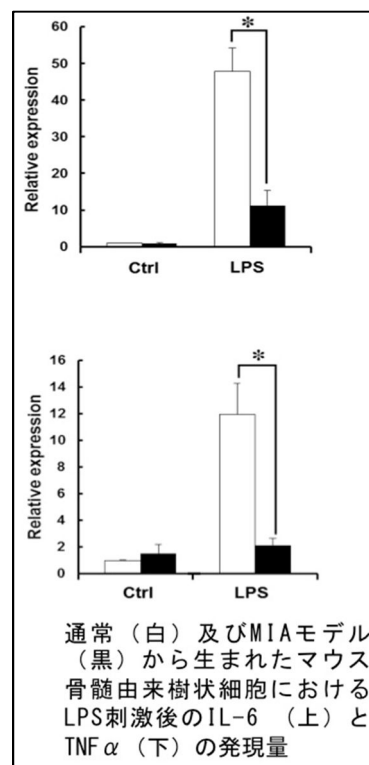
エピジェネティック制御の関与を調べる為、DNMT3A、DNMT3B、DNMT3L、DNMT1、UHRF-1、TET1、TET2、TET3 といったヒストン修飾関連分子を欠損するマウスマクロファージ細胞株の樹立を行い、LPS 刺激後のサイトカイン遺伝子の発現に差が生じるか検討を行う。

TLR4 の内在化に関連することが予想される V 型 ATPase 複合体構成成分や輸送タンパク質に着目し、これらを欠損するマクロファージ細胞株を樹立し、LPS に対する自然免疫応答やシグナル伝達分子の活性化を解析する。

4. 研究成果

妊娠 12.5 日目の C57/BL6 マウスに、poly (I:C) を腹腔内投与し、生まれた仔マウスにおける自然免疫応答の解析を行った。その結果、poly (I:C) 投与マウスより生まれたマウスの骨髄細胞を GM-CSF 存在下で分化させた樹状細胞では、LPS 刺激後の炎症性サイトカイン IL-6 や TNF の産生量が低下していた (図)。このことから、poly IC の刺激を受けた母マウスから生まれた仔マウスでは、自然免疫応答が寛容化していることが示唆された。また、poly IC 投与マウスより生まれた仔マウス由来のマクロファージを用いて同様の実験を行ったところ、サイトカイン産生の減少が認められ、このマウスでは広く自然免疫応答が低下していることが示唆された。一方、これら自然免疫細胞の表面マーカーは通常マウスと同様であったこと、サイトカイン遺伝子の発現を制御する転写因子 NF

B や IRF3 の LPS 刺激後の活性化 (リン酸化) 状態については変化がなかったことから、分化やシグナル経路に影響を与えたものではないと考えられた。これまで、自然免疫細胞の Immune tolerance の機構として、小分子 RNA やエピジェネティック制御に加え、TLR4 の細胞表面発現の低下等が報告されている。そこで、まずエピジェネティック制御の関与を調べる為、ヒストン修飾関連分子 7 種類に着目した。現在、DNMT3A、DNMT3B、DNMT3L、DNMT1、UHRF-1、TET1、TET2、TET3 を欠損するマウスマクロファージ細胞株を樹立中である。予備的ではあるが、脱メチル化関連酵素 TET1 を欠損した細胞において、興味深いことに LPS 刺激後の IL-6 の産生量が増大している知見を得たことから、この分子が LPS に対する Immune tolerance の維持に関連していることが示唆された。今後、IL-6 遺伝子上のメチル化状態について LPS 刺激前後の野生型と TET-1 遺伝子欠損細胞間で比較検討する必要がある。また、LPS に対する Immune tolerance の機構の一つとして、LPS 受容体 TLR4 の細胞表面からの内在化が示唆されている。TLR4 は細胞表面で LPS を受容すると細胞内アダプター分子 MyD88 と結合し NF- B の活性化を誘導し炎症性サイトカインの発現を誘導する。その後、TLR4-LPS 複合体は内在化しエンドソームへ輸送され、そこで別のアダプター分子 TRIF と結合し I 型インターフェロン産生誘導に関わる転写因子 IRF3 の活性化が誘導する。我々はリソソームやエンドソームの酸性化維持機構に着目して解析を行った。V 型 ATPase 複合体の構成成分である ATP6V0D2 を欠損するマクロファージ細胞株を樹立し解析を行ったところ、この細胞では LPS 刺激後の IL-6 の過剰産生を認めた。また、NF- B の活性化も上昇を認めた。さらに詳細に調べると、LPS 刺激後の TLR4 の内在化が抑制されていた。したがって、エンドソームの酸性化は、LPS に対する Immune tolerance の維持に必要であることが示唆された。以上のことから、Immune tolerance を規定する機構として複数の制御機構が存在していることが示唆された。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- 1 Dewi Pamungkas Putri D, Kawasaki T, Murase M, Sueyoshi T, Deguchi T, Ori D, Suetsugu S, Kawai T. PtdIns3P phosphatases MTMR3 and MTMR4 negatively regulate innate immune responses to DNA through modulating STING trafficking. *J Biol Chem*. 2019 May 24;294(21):8412-8423. doi: 10.1074/jbc.RA118.005731. 査読あり
- 2 Kawasaki T, Kawai T. Discrimination between self and non-self-nucleic acids by the innate immune system. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2019 344:1-30. doi: 10.1016/bs.ircmb.2018.08.004. 査読あり
- 3 Sok SPM, Ori D, Nagoor NH, Kawai T. Sensing self and non-self DNA by innate immune receptors and their signaling pathways. *Crit Rev Immunol*. 2018; 38(4):279-301. doi: 10.1615/CritRevImmunol.2018026540. 査読あり
- 4 Sueyoshi T, Kawasaki T, Kitai Y, Ori D, Akira S, Kawai T. Hu Antigen R regulates antiviral innate immune responses through the stabilization of mRNA for Polo-like kinase 2. *J Immunol*. 2018 Jun 1;200(11):3814-3824. doi: 10.4049/jimmunol.1701282. 査読あり
- 5 Murase M, Kawasaki T, Hakozaki R, Sueyoshi T, Putri DDDP, Kitai Y, Sato S, Ikawa M, Kawai T. Intravesicular acidification regulates lipopolysaccharide inflammation and tolerance through TLR4 trafficking. *J Immunol*. 2018 Apr 15;200(8):2798-2808. doi: 10.4049/jimmunol.1701390. 査読あり
- 6 Kawasaki T, Ito K, Miyata H, Akira S, Kawai T. Deletion of PIKfyve alters alveolar macrophage populations and exacerbates allergic inflammation in mice. *EMBO J*. 2017 Jun 14;36(12):1707-1718. doi: 10.15252/embj.201695528. 査読あり

〔学会発表〕(計 25 件)

招待講演

- 1 河合太郎. 自然免疫受容体やそれらのシグナル伝達分子を標的とした疾患制御の可能性について. 第 1 回 Trans Chromosomics (TC) シンポジウム 2018 年
- 2 河合太郎. ウイルスや自己の核酸に対する自然免疫応答について. 日本ウイルス学会北海道支部第 52 回夏季シンポジウム 2018 年
- 3 Kawai T. The role of innate immune signaling pathways in anti-cancer immunity. 2nd International Conference on Molecular Biology and Biotechnology 2017 年
- 4 河合太郎. 自然免疫受容体による外因・内因性リガンド認識と獲得免疫誘導における役割. 第 12 回小胞体ストレス研究会 2017 年
- 5 Kawai T. Roles of DAMPs in mammalian immune responses to cancer. TLL-NAIST Joint Symposium 2017 2017 年

一般演題

- 1 Zainol IM, Kawasaki T, Kawai T. Human antigen R regulates innate immune response via mRNA stability. 第 47 回日本免疫学会学術総会 2018 年
- 2 Kawasaki T, Putri DDP, Kawai T. Regulatory role of MTMR3/4 in innate immune signaling. 第 47 回日本免疫学会学術総会 2018 年
- 3 Sok SPM, Ori D, Nagoor NH, Kawai T. Inhibition of NLRP3 in ammasome-mediated IL-1 release by 1'-acetoxychavicol acetate (ACA), a ginger-derived compound. 第 47 回日本免疫学会学術総会 2018 年
- 4 Nagayama M, Kawasaki T, Kawai T. Molecular mechanism of IL-33 production during allergic inflammation. 第 47 回日本免疫学会学術総会 2018 年
- 5 Monwan W, Kawasaki T, Kawai T. Identification of Nucleoporin (Nup) genes that mediate antiviral innate immune responses. The 6th International Conference on Biochemistry and Molecular Biology "Networking in molecular biosciences towards creativity and innovation" 2018 年
- 6 Okude H, Ori D, Kawasaki T, Murase M, Ishii KJ, Kawai T. Elucidation of cell death pathway induced by imiquimod (R837). EMBO Workshop "The inflammasomes" 2018 年
- 7 Sok SOM, Ori D, Nagoor NH, Kawai T. Tropical ginger compound, 1'-acetoxychavicol acetate (ACA), inhibits NLRP3 inflammasome activation. EMBO Workshop "The inflammasomes" 2018 年
- 8 Nakagawa M, Kawai T. TMEM41a negatively regulates antiviral immune responses. 第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年
- 9 Nagayama M, Kawasaki T, Taro Kawai T. Molecular mechanism of IL-33 production during allergic inflammation. 第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年
- 10 Nakagawa M, Kawai T. Negative regulation of RIG-I mediated antiviral innate immune responses by TMEM41a. The 7th Global Network Forum Infection and Immunity 2018 年
- 11 Nagayama M, Kawasaki T, Kawai T. Molecular mechanism of IL-33 production during allergic inflammation. The 7th Global Network Forum Infection and Immunity 2018 年
- 12 Okude H, Ori D, Kawasaki T, Murase M, Ishii KJ, Kawai T. Induction of cell death by imiquimod (R837) and its role in immune responses. 第 46 回日本免疫学会学術集会 2017 年
- 13 Sueyoshi T, Kawasaki T, Kawai T. RNA-binding protein Hu antigen R (HuR) plays an important role in antiviral innate immune responses via mRNA stabilization. 第 46 回日本免疫学会学術集会 2017 年
- 14 Kawasaki T, Kawai T. Obesity regulation by PIKfyve, a lipid kinase, in macrophage. 第 46 回日本免疫学会学術集会 2017 年
- 15 Murase M, Kawaaki T, Hakozaiki R, Kawai T. Intravesicular acidification regulates lipopolysaccharide inflammation and tolerance through Toll-like receptor 4 trafficking. 第 46 回日本免疫学会学術集会 2017 年
- 16 Monwan W, Kawasaki T, Kawai T. Characterization of Nucleoporin (Nup) genes that mediate antimicrobial innate immune responses. 第 46 回日本免疫学会学術集会 2017 年
- 17 末吉拓也、川崎拓実、河合太郎. RNA 結合タンパク質 Hu antigen R(HuR) のウイルスに対する自然免疫における役割の解析. 生命科学系学会合同年次大会 2017 年
- 18 奥出遥奈、織大佑、川崎拓実、村瀬本弥、河合太郎. Imiquimod(R837) による TLR7 非依存的な細胞死の誘導. 生命科学系学会合同年次大会 2017 年
- 19 村瀬本弥、川崎拓実、箱崎理花、河合太郎. V 型 ATPase のサブユニット ATP6V0D2 による ARF6 を介した Toll-like receptor 4(TLR4)の細胞内輸送と LPS の認識で誘導される炎症応答・LPS トランスの制御機構の解明. 生命科学系学会合同年次大会 2017 年
- 20 長山瑞佳、川崎拓実、河合太郎. IL-33 産生を制御する分子機構の解明. 生命科学系学会合同年次大会 2017 年

〔図書〕(計5件)

- 1 加納 規資、織大祐、河合太郎．パターン認識受容体 (PRR) による自然免疫応答．The Frontiers in Life Sciences シリーズ免疫・炎症病態×治療 Update (南山堂) p2-10．2019年
- 2 河合太郎．自然免疫受容体による外因・内因性リガンド認識と獲得免疫誘導における役割．Pharma Medica (メディカルレビュー社) 35:p92-92．2017年
- 3 奥出遥奈、中川実優、川崎拓実、河合太郎．炎症・自然免疫研究の最近の進歩．血液内科 (科学評論社) 第75号第5号 (11月号) p551-557．2017年
- 4 鍛代悠一、河合太郎．がん細胞の DAMPs と自然免疫．炎症と免疫 (先端医学社) 2017．vol 25．p383-388．2017年
- 5 織大祐、河合太郎他．自然免疫．免疫ペディア (羊土社) 第二章 p84-116．2017年

〔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: <https://bsw3.naist.jp/kawai/>

6．研究組織

- (1)研究分担者 なし
- (2)研究協力者 なし

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。