

機関番号：14401
 研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21700448
 研究課題名 (和文) マウスモデルを用いたオートファジー遺伝子異常に起因する疾患病因の解析
 研究課題名 (英文) Analysis of autophagy deficiency-related disease by mouse model

研究代表者
 齋藤 達哉 (SAITOH TATSUYA)
 大阪大学・微生物病研究所・助教
 研究者番号：60456936

研究成果の概要 (和文)：オートファジーの欠如が自然免疫応答に与える影響について、マウスをモデル生物として用いて解析を行った。オートファジーに関わる Atg9a 遺伝子を欠損したマウスを作製し、胎生線維芽細胞において、Atg9a 遺伝子が二重鎖 DNA により誘導される自然免疫応答を制御していることを見出した。二重鎖 DNA による自然免疫応答が過剰に誘導されると強い炎症が引き起こされるため、Atg9a の機能制御は炎症性疾患の治療に役立つ可能性がある。

研究成果の概要 (英文)：We have examined a role of autophagy in the regulation of innate immune response using mutant mice deficient in autophagy-related protein. We generated Atg9a-deficient mice and found that Atg9a controls dsDNA-induced innate immune response in embryonic fibroblasts. Because aberrant activation of innate immune response by dsDNA often results in the development of massive inflammation, a regulation of Atg9a function might be useful for the therapy of inflammatory disease induced by dsDNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：オートファジー、自然免疫、感染症、炎症、メンブレントラフィック

1. 研究開始当初の背景

蛋白質の分解機構は生命機能の制御において重要な役割をはたしており、以前よりユビキチン・プロテアソームなどを介した蛋白質分解に関する解析が進められてきた。加えて近年では、オートファジーと呼ばれる長寿命蛋白質の分解や細胞小器官構成成分の再利用などに重要な役割を果たす蛋白質分解機構が、実は様々な生命現象の制御に重要であることが明らかになり、その生理的、病理的

な役割に関する解析が積極的に進められている。オートファジーは、細胞死の制御や異常凝集蛋白質の分解を行うことで神経変性などの疾患の発生に深く関わり、さらに、細胞内に侵入した病原微生物の直接的な排除においても非常に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。また最近になり、オートファジー関連遺伝子 Atg16L1 のアミノ酸置換変異が炎症性腸疾患の発症と相関すること、さらに別のオートファジー関

連遺伝子 *Beclin1* の発現量低下により癌の発症率が上昇することが相次いで報告されたが、その病因についてはまだ不明な点が多い。そのため、オートファジー遺伝子異常と疾患の関わりへの解明が望まれている。

2. 研究の目的

オートファジー関連因子は炎症性疾患の発症との関わりを持つため、自然免疫応答の制御に関わっていることが想定される。そこで、様々なオートファジー関連因子の遺伝子欠損マウスを用いて、オートファジー関連遺伝子が自然免疫応答において果たしている役割を検討する。2009年度は、病原体の二十鎖DNAにより誘導される自然免疫応答、2010年度は一本鎖DNAにより誘導される自然免疫応答に関して解析を行った。

3. 研究の方法

- (1) オートファジー関連遺伝子やオートファジーによる自然免疫応答制御に関わっていると想定される遺伝子の欠損マウスから、自然免疫応答に関わる様々な細胞を分離する。
- (2) 細胞を病原体やその構成成分で刺激し、インターフェロンやサイトカインの産生に、解析対象の遺伝子が関わっているかどうかを検討する。
- (3) 解析対象の遺伝子が関わっている自然免疫応答を見つけた際には、シグナル伝達因子の活性化状態・細胞内局在を解析し、メカニズムを明らかにする。

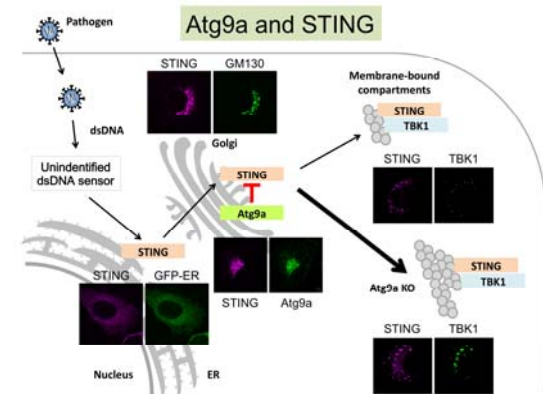
4. 研究成果

2009年度。

自然免疫機構は、パターン認識受容体を介して病原性微生物の構成成分を認識し感染防御応答を誘導することによって、宿主を病原性微生物から守っている。病原性微生物の核酸はパターン認識受容体を介した自然免疫応答を強く誘導し、また死細胞のdsDNAも自然免疫機構を介して炎症を誘導することが知られている。本年度は、dsDNAの刺激によってダイナミックな膜動態の変化が誘導されること、その膜動態がオートファジー関連因子である *Atg9a* によって制御されていることを報告した。

DsDNAによる自然免疫の活性化には膜貫通蛋白質であるSTINGが重要な役割を果たしていることが知られているが、本年度の研究ではdsDNA刺激によってSTINGがEndoplasmic reticulumからGolgi apparatusを介して細胞質内の未知構造体に移行し、下流のシグナル伝達因子であるTBK1を活性化することを明らかにした。DsDNAで刺激した細胞において、

STINGはオートファジーによって分解を受けるp62/SQSTM1と共局在を示したため、様々なオートファジー関連因子とSTINGの局在を調べた結果、STINGはGolgi apparatusにおいて *Atg9a* と共局在し、さらに細胞質においてLC3と共局在することを見出した。また、オートファジーが誘導される際に隔離膜に移行することが知られているULK1, *Atg5*, *Atg14L* の局在はdsDNA刺激によって変化しないことから、STINGが局在する細胞内構造体はオートファゴソームではないことも明らかとなった。そこで、dsDNAによる自然免疫活性化における *Atg9a* の役割を新たに作製した *Atg9a* 遺伝子改変マウスを用いて解析し、*Atg9a* を欠損した胎生繊維芽細胞ではdsDNA刺激によるSTING・TBK1両陽性の構造体の形成が促進していることを見出した。この結果に一致して、*Atg9a* を欠損した繊維芽細胞はdsDNA刺激に応じて過剰のインターフェロン・サイトカインを産生することも明らかとなった。また、*Atg7* を欠損した繊維芽細胞はdsDNA刺激に正常に反応することから、*Atg9a* はオートファジー関連因子としてではなく、そのユニークな機能を介して自然免疫応答を制御していると考えられた。



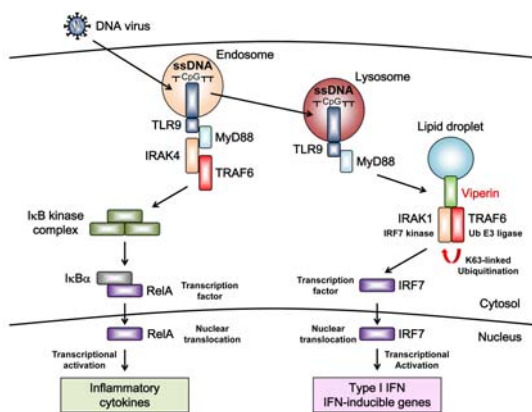
2010年度。

本年度は、核酸を認識するパターン認識受容体Toll-like receptor (TLR) 7/9のシグナル伝達経路の解析結果を報告し、また、現在までに報告されているオートファジーと炎症との関係を取りまとめた総説を発表した。

自然免疫機構は、パターン認識受容体を介して核酸などの病原体構成成分を認識し、宿主を病原性微生物の感染から守っている。また、宿主の核酸が自然免疫機構によって認識されると、自己免疫疾患になることが知られている。よって、核酸が誘導する自然免疫応答のメカニズムを明らかにすることは、感染症と自己免疫疾患を理解するために重要で

ある。

形質細胞様樹状細胞（以下 pDC）は、TLR7/9によりI型インターフェロンを誘導することで、感染防御応答に関わっている。過去の報告から、pDCからのI型インターフェロンの産生にはオートファジーが関わっていること、そしてオートファジー関連因子は脂肪滴（Lipid droplets）の形成に関わっていることが明らかになっている。そこで、脂肪滴のI型インターフェロン産生への関与を検討した。インターフェロン誘導性因子であり、脂肪滴上に局在するViperinに着目し解析を行ったところ、Viperin欠損マウスより調整したpDCでは、TLR7/9リガンドによって誘導されるI型インターフェロンの産生が顕著に減少していることが明らかとなった。一方で、ViperinはRIG-like receptorによって誘導されるI型インターフェロン産生や、TLRやNod-like receptorを介した炎症性サイトカイン産生には関わっていなかった。ViperinはTLR7/9の下流でシグナル伝達因子として働くIRAK1とTRAF6に結合し、これらの因子を脂肪滴周辺にリクルートしていることが明らかとなった。Viperinを欠失した細胞では、TRAF6に依存するIRAK1のK63リンクのユビキチン化が減弱しており、I型インターフェロン産生異常の原因と考えられた。以上の結果から、pDCにおいては、核酸を認識するリソソーム上のTLR7/9からのシグナルが、脂肪滴の表面を中継点として転写因子IRF7に伝わり、I型インターフェロンの産生が誘導されると考えられる。



5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 11 件）

(1) Crohn disease: A current perspective on genetics, autophagy and immunity. Stappenbeck TS*, Rioux JD*, Mizoguchi A*,

Saitoh T*, Huett A*, Darfeuille-Michaud A*, Wileman T*, Mizushima N*, Carding S*, Akira S*, Parkes M*, Xavier RJ* (*All authors equally contributed to this work). *Autophagy*. 2011 Apr;7(4):355-74. 査読あり

(2) Antiviral Protein Viperin Promotes Toll-like Receptor 7- and Toll-like Receptor 9-Mediated Type I Interferon Production in Plasmacytoid Dendritic Cells.

Saitoh T, Satoh T, Yamamoto N, Uematsu S, Takeuchi O, Kawai T, Akira S. *Immunity*. 2011 Mar 25;34(3):352-63. 査読あり

(3) The Ubiquitin Ligase TRIM56 Regulates Innate Immune Responses to Intracellular Double-Stranded DNA. Tsuchida T, Zou J, Saitoh T, Kumar H, Abe T, Matsuura Y, Kawai T, Akira S. *Immunity*. 2010 Nov 24;33(5):765-76. 査読あり

(4) The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. Satoh T, Takeuchi O, Vandenberg A, Yasuda K, Tanaka Y, Kumagai Y, Miyake T, Matsushita K, Okazaki T, Saitoh T, Honma K, Matsuyama T, Yui K, Tsujimura T, Standley DM, Nakanishi K, Nakai K, Akira S. *Nat Immunol*. 2010 Oct;11(10):936-44. 査読あり

(5) Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. Matsunaga K, Morita E, Saitoh T, Akira S, Ktistakis NT, Izumi T, Noda T, Yoshimori T. *J Cell Biol*. 2010 Aug 23;190(4):511-21. 査読あり

(6) Regulation of innate immune responses by autophagy-related proteins. Saitoh T, Akira S. *J Cell Biol*. 2010 Jun 14;189(6):925-35. Review. 査読あり

(7) Regulation of dsDNA-induced innate immune responses by membrane trafficking. Saitoh T, Fujita N, Yoshimori T, Akira S. *Autophagy*. 2010 Apr;6(3):430-2. Review. 査読なし

(8) Involvement of the NLRP3 Inflammasome in Innate and Humoral Adaptive Immune Responses to Fungal-Glucan. Kumar H, Kumagai Y, Tsuchida T, Koenig PA, Satoh T, Guo Z, Jang MH, Saitoh T, Akira S, Kawai T. *J Immunol*. 2009 Dec 15;183(12):8061-7. 査読あり

(9) Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. Saitoh T*, Fujita N*, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H,

Matsunaga K, Kageyama S, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Kawai T, Ishii K, Takeuchi O, Yoshimori T, Akira S (*Equally contributed) Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Dec 8;106(49):20842-6. 査読あり

(10) Differential involvement of ATG16L1 in Crohn's disease and canonical autophagy: analysis of the organization of the ATG16L1 complex in fibroblasts. Fujita N, Saitoh T, Kageyama S, Akira S, Noda T, Yoshimori T. J Biol Chem. 2009 Nov 20;284(47):32602-9. 査読あり

(11) Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. Matsunaga K, Saitoh T, Tabata K, Omori H, Satoh T, Kurotori N, Maejima I, Shirahama-Noda K, Ichimura T, Isobe T, Akira S, Noda T, Yoshimori T. Nat Cell Biol. 2009 Apr;11(4):385-96. 査読あり

[学会発表] (計 5 件)

(1) 齊藤達哉、審良静男.
形質細胞様樹状細胞による TLR7/9 を介した I 型 Interferon の産生においてユビキチンとオートファジー関連因子が果たす役割.

BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会)、ポスター発表、神戸、2010 年 12 月 8 日.

(2) Saitoh T, Fujita N, Yoshimori T, Akira S.

Regulation of nucleic acid-induced innate immune responses by membrane trafficking
The 14th International Congress of Immunology, Oral presentation, Kobe, Japan, Aug. 27, 2010.

(3) 齊藤達哉、藤田尚信、吉森保、審良静男.
オートファジー関連因子 Atg9a の欠失は二重鎖 DNA 刺激による膜蛋白質 STING の移行を介した自然免疫応答を促進する.

第 62 回日本細胞生物学会年会、ポスター発表、大阪、2010 年 5 月 19-20 日.

(4) 齊藤達哉、藤田尚信、吉森保、審良静男.
オートファジー関連因子による自然免疫応答の制御.

第 32 回日本分子生物学会年会、ワークショップ口頭発表、横浜、2009 年 12 月 10 日.

(5) Saitoh T, Fujita N, Yoshimori T, Akira S.

Regulation of innate immune response by autophagy-related protein.

The 5th International Symposium on Autophagy, Oral presentation, Otsu, Japan, Sep. 27, 2009.

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 達哉 (SAITOH TATSUYA)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号 : 60456936