

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06868

研究課題名（和文）TNFシグナル関連分子群に着目したマクロファージの運命決定制御機構の解明

研究課題名（英文）Research about the regulatory mechanism of fate determination of macrophages focusing on TNF signal-associated molecules

研究代表者

山条 秀樹 (Sanjo, Hideki)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：50391967

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：マクロファージの機能制御に関与する運命決定機構の包括的な理解に向けて、本研究では主に免疫制御に重要な細胞死経路であるFasシグナル伝達のマクロファージにおける役割や、TNFシグナル伝達分子TAK1の関与に着目して研究を行なった。その結果、マクロファージはFasシグナルによる細胞死誘導に耐性である、TAK1欠損マクロファージはFasシグナルによる細胞死誘導に高感受性である、TAK1はRIPK1分子のキナーゼ活性を負に調節することでFas誘導性細胞死抑制に関与する、マクロファージ内TAK1は炎症誘発性細胞死誘導を抑制することで組織恒常性維持に寄与する、ことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マクロファージに潜む炎症誘発性細胞死に対するTAK1分子を起点とする抑制制御機構に関する一連の解明は、組織恒常性維持、とりわけ自然炎症による自己炎症性疾患の発症予防という観点から、マクロファージ研究の発展・深化に寄与する実に興味深い成果であると言える。さらには、この機構の発見は各種炎症疾患に対する治療戦略を考察する上で重要な情報を提供するものと考えられ、創薬への応用といった医療分野に及ぼす効果も充分期待される。本研究成果は、マクロファージの状態が生体組織に与える影響を考える上で実に洞察に富むものと言え、よって極めて学術的かつ社会的意義の深い研究成果であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Toward a comprehensive understanding of the mechanisms governing cell-fate decisions that regulate macrophage function, I primarily investigated the role of Fas signaling, an important cell death pathway for immune regulation, in macrophages and the involvement of TAK1, a molecule essential for TNF signaling, in the Fas-mediated signaling pathway in this study. We revealed that: 1) macrophages are resistant to Fas-induced cell death, 2) TAK1-deficient macrophages are highly susceptible to Fas-induced cell death, 3) TAK1 is involved in the suppression of Fas-induced cell death by negatively modulating RIPK1 kinase activity, and 4) TAK1 in macrophages contributes to tissue homeostasis by restraining the induction of proinflammatory cell death.

研究分野：免疫学、病態医化学

キーワード：マクロファージ Fasシグナル伝達 TAK1 炎症誘発性細胞死 組織恒常性 自然炎症 自己炎症性疾患

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年の研究進展から生体制御に寄与するマクロファージの役割が明らかになりつつある。とりわけマクロファージは、1)炎症応答の惹起、2)炎症応答の収束、という全く異なる機能を生体の置かれた状況に応じて発揮することで生体防御に関わっており、マクロファージを介した組織恒常性維持における役割が注目の的となっている。しかしながら、その機能発揮の基盤となるマクロファージの運命決定を説明する制御機構については依然として不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、マクロファージの機能制御に関する運命決定機構の包括的な理解を目指し、中でも TNF シグナル伝達分子 TAK1 の未知の機能に着目し、マクロファージの生死を司る TAK1 を起点とするシグナル伝達制御機構の破綻により生じる炎症性細胞死機構と病態生理との関連性、炎症時のマクロファージの分化成熟を規定する TAK1 が関与する未知の細胞内シグナル伝達経路、についてその解明を目的とする。

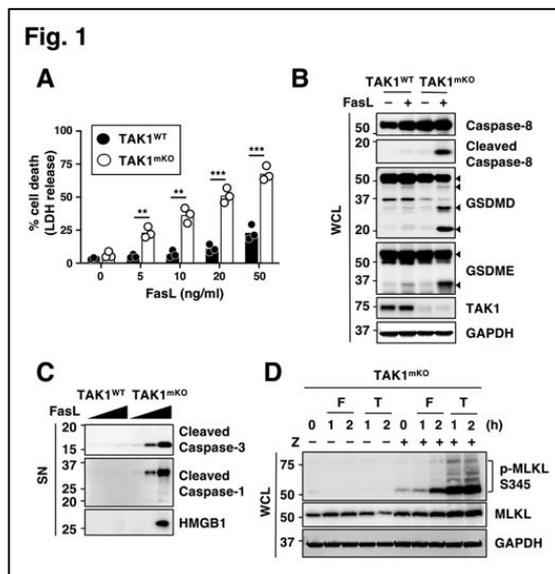
### 3. 研究の方法

本研究課題遂行のため、主に TNF 欠損背景下のマクロファージ特異的 TAK1 欠損マウス (TAK1<sup>mkO</sup>) を利用して、次の解析を行なった。分化誘導した骨髄由来マクロファージ (bone marrow-derived macrophages: BMDMs) を使った、1)細胞死アッセイ、2)イムノブロットイングによる細胞内シグナル伝達経路の解析、3)精製した RNA を用いて目的遺伝子の発現について real-time PCR 解析、を行なった。さらにマウスから様々な臓器を摘出し、1)細胞調製後 Flow cytometry による免疫細胞集団解析、2)組織標本を作成し組織病理学的解析、を行なった。また炎症惹起物質として知られる酵母由来成分ゼイモサンを用いたマウス急性腹膜炎モデルを利用して、腹膜炎誘導後の免疫細胞集団について Flow cytometry による比較解析をマクロファージ特異的 TAK1 欠損マウス (TAK1<sup>M</sup>) を用いて行なった。

### 4. 研究成果

#### マクロファージの生死を司る TAK1 を起点とするシグナル伝達制御機構とその破綻により生じる炎症性細胞死機構と病態生理との関連性について

これまでに TNFR1 シグナルや TLR シグナルを介したマクロファージの生存維持に TAK1 が重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。そこで本研究では、細胞死誘導受容体として知られ、免疫応答や組織恒常性維持に重要な役割を果たす TNFR ファミリーの 1 つ Fas に着目し、マクロファージの生存維持や Fas シグナルと TAK1 との関連性といった未知の課題に取り組んだ。その結果、1) C57BL/6 マウス由来 BMDM は Fas のリガンドである FasL の刺激による細胞死誘導に耐性を示すこと、2) TAK1<sup>mkO</sup> マウス由来 TAK1 欠損 BMDM は FasL 刺激による細胞死誘導に高感受性を示すことを発見した (Fig.1A)。マクロファージにおける Fas のシグナル伝達経路について生化学的な解析を行なったところ、TAK1 欠損 BMDM では低濃度の FasL 刺激により Caspase-8 の活性化のみならず、パイロトーシスにおける細胞死実行因子である GSDMD や GSDME のタンパク分解を認め (Fig.1B)、さらに細胞膜損傷による細胞内タンパクの細胞外漏出も確認された (Fig.1C)。一方で、計画的ネクロシスのシグナル伝達経路で働くことが知られる MLKL 分子の FasL 刺激によるリン酸化は、対照および TAK1 欠損 BMDM 共に検出されず、caspase 阻害剤である Z-VAD-FMK 存在下でのみそのリン酸化を検出した (Fig.1D)。以上の結果から、1) TAK1 は Fas シグナルによるマクロファージの細胞死誘導に対し抑制作用を有する、2) TAK1 欠損マクロファージに見られた細胞死は Caspase-8/GSDMD-GSDME 依存的経路によるアポトーシスのみならず、パイロトーシス様の特徴を示す、3) TAK1 欠損マクロファージに見られた細胞死において、計画的ネクロシス経路は関与しない、ことが示唆された。



次に、TAK1 がマクロファージの Fas シグナル伝達においてどこに作用することで細胞死抑制をもたらすのかについて調べた。興味深いことに、TAK1 欠損 BMDM では FasL 刺激により RIPK1 分子のキナーゼ活性の指標となる 166 番目のセリン (S166) のリン酸化の亢進と c-FLIP 分子の著減が認められた (Fig.2A)。この結果から、TAK1 は RIPK1 分子のキナーゼ活性を負に制御することで、Fas シグナルによる細胞死を抑制している可能性が考えられた。そこでこの仮

説を検証するために、キナーゼ不活性型 RIPK1 を発現するマクロファージ特異的 TAK1 欠損マウス (TAK1<sup>mKO</sup>RIPK1<sup>D138N/D138N</sup>) を作製し、TAK1<sup>mKO</sup> マウスと比較解析を行なった。その結果、キナーゼ不活性型 RIPK1 を発現する TAK1 欠損 BMDM は低濃度の FasL 刺激による細胞死に低感受性を示し (Fig.2B)、Caspase-8 や Caspase-3 の活性化の抑制、PARP や GSDMD や GSDME の分解抑制、そして細胞内タンパクの細胞外漏出の抑制を確認した (Fig.2C & D)。以上まとめると、TAK1 はマクロファージの Fas シグナルにおいて、RIPK1 のキナーゼ活性を負に調節することで、細胞死実行を抑制していることが明らかとなった。

TAK1<sup>mKO</sup> マウスは specific pathogen-free (SPF) 環境下で飼育しているにも関わらず、約 7 割のマウスに病的症状を呈し、特に成長遅延やうずくまり等の所見が観察された。そのような病的マウスを調べたところ、腹膜炎や肝炎を発症していることが判明した。特に Flow cytometry による解析から、腹腔内や肝臓において、組織常在マクロファージの著減と好中球や単球の浸潤蓄積が顕著に認められた。TAK1<sup>mKO</sup> マウスが自然炎症を発症する原因を探る上で、TAK1 欠損マクロファージに認められるパイロトシス様の炎症誘発性細胞死が起点となっているのではないかと推測した。そこでこの仮説を検証するために、TAK1<sup>mKO</sup> マウスと TAK1<sup>mKO</sup>RIPK1<sup>D138N/D138N</sup> マウスとの間で認められる無菌性腹膜炎の発症の度合いについて比較解析した。その結果、TAK1<sup>mKO</sup> マウスと比べて TAK1<sup>mKO</sup>RIPK1<sup>D138N/D138N</sup> マウスでは腹膜炎の自然発症が有意に低下していた (Fig.3)。一方で、研究代表者らによるこれまでの研究成果から、TLR-TRIF 経路の活性化による TAK1 欠損マクロファージの炎症誘発性細胞死誘導を見出している。そこでこの経路の自然炎症発症における関与を検証するため、TAK1<sup>mKO</sup>TRIF<sup>-/-</sup> マウスを作製した。その結果、TRIF 欠損は TAK1<sup>mKO</sup> マウスにおける自然発症の抑止に影響を及ぼさなかった (Fig.3)。以上の結果から、TAK1<sup>mKO</sup> マウスに認められる自然炎症の発症理由の 1 つに、組織常在マクロファージの生存維持機構の破綻に起因することが示唆された。

### 炎症時のマクロファージの分化成熟を規定する TAK1 が関与する未知の細胞内シグナル伝達経路の探究

骨髄単球由来マクロファージの分化成熟や生存維持を説明する分子基盤については、これまで十分な検証がなされておらず、故に依然として不明な点が多い。そこでゼイモサン誘導性急性腹膜炎モデルを利用して、誘導される単球由来マクロファージの推移について対照及びマクロファージ特異的 TAK1 欠損マウス (TAK1<sup>M</sup>) を用いて比較解析した。その結果、両マウス群の腹腔内において、接種後 18 から 20 時間後には炎症性単球の動員が、さらに接種後 36 から 40 時間後には炎症性単球由来マクロファージが同程度認められた。ところが驚くべきことに、対照マウスでは接種後 48 時間後には分化成熟したマクロファージが認められたのに対し、TAK1<sup>M</sup> マウスでは分化成熟したマクロファージはほぼ認められず、また炎症性単球由来マクロファージも激減していた。その一方で単球が蓄積しているのが判明した。この傾向はゼイモサンを接種後少なくとも 14 日まで確認された。以上の結果は、1) 単球からマクロファージに分化成熟していく過程で、TAK1 分子が重要な役割を果たすこと、2) マクロファージ前駆細胞と見られる未熟な細胞集団の存在、を示唆している。そこで現在、この新規マクロファージ前駆細胞集団に着目して、RNA-seq 法による遺伝子発現解析や増殖や生存の観点から解析を進めている。

Fig. 2

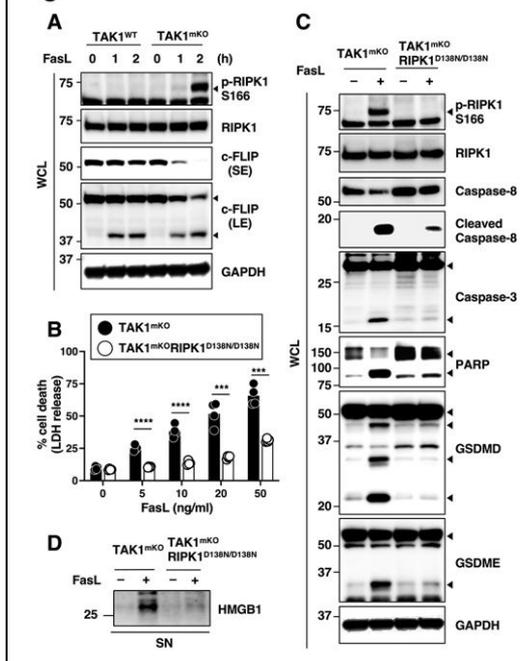
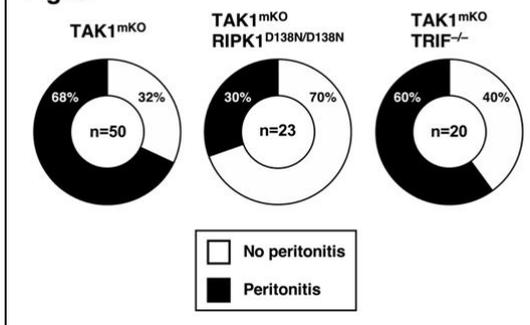


Fig. 3



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tokumaru Shigeo, Yamamoto Yuta, Yoshizawa Kazuki, Soejima Yuji, Sanjo Hideki, Taki Shinsuke	4. 巻 35
2. 論文標題 Interferon regulatory factor-2 is required for the establishment of the gut intraepithelial T-cell compartment	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 231 ~ 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxac058	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 Yamaguchi Masaki, Nakamura Tsuyoshi, Sanjo Hideki	4. 巻 35
2. 論文標題 White Blood Cell Counting Device for Dairy Cattle Using Microchannel Incorporating Light Scattering	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sensors and Materials	6. 最初と最後の頁 1281 ~ 1281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18494/Sam4090	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 Kasahara Tomoki, Tanaka Megumu, Zhao Yunlu, Kamiyoshi Akiko, Sakurai Takayuki, Ichikawa-Shindo Yuka, Kawate Hisaka, Matsuda Yorishige, Zhang Yan, Guo Qianqian, Li Peixuan, Hoshiyama Ken, Li Jiake, Onishi Naho, Hayashi Marina, Sanjo Hideki, Ishida Kumiko, Tanaka Satoshi, Kawamata Mikito, Shindo Takayuki	4. 巻 171
2. 論文標題 Receptor activity-modifying proteins of adrenomedullin (RAMP2/3): Roles in the pathogenesis of ARDS.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Peptides	6. 最初と最後の頁 171118 ~ 171118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.peptides.2023.171118	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 Kajihara Ryo, Sakai Hironori, Han Yibing, Amari Kei, Kawamoto Makiko, Hakoyama Yusuke, Nagashio Sachiho, Yamada Shin-ichi, Sanjo Hideki, Kurita Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Presence of periodontitis may synergistically contribute to cancer progression via Treg and IL-6	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-15690-w	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 Maeda Kengo, Nakayama Jun, Taki Shinsuke, Sanjo Hideki	4. 巻 209
2. 論文標題 TAK1 Limits Death Receptor Fas-Induced Proinflammatory Cell Death in Macrophages	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1173 ~ 1179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2200322	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 Yamamoto Yuta, Yoshizawa Kazuki, Takamoto Masaya, Soejima Yuji, Sanjo Hideki, Taki Shinsuke	4. 巻 618
2. 論文標題 Circulating T cells and resident non-T cells restrict type 2 innate lymphoid cell expansion in the small intestine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 93 ~ 99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.06.007	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 Wei Yangxuan, Tanaka Megumu, Sakurai Takayuki, Kamiyoshi Akiko, Ichikawa-Shindo Yuka, Kawate Hisaka, Cui Nanqi, Kakahara Shinji, Zhao Yunlu, Aruga Kohsuke, Sanjo Hideki, Shindo Takayuki	4. 巻 162
2. 論文標題 Adrenomedullin Ameliorates Pulmonary Fibrosis by Regulating TGF- $\beta$ -Smads Signaling and Myofibroblast Differentiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/endo/bqab090	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 Tomita Takeshi, Kato Masayoshi, Mishima Taishi, Matsunaga Yuta, Sanjo Hideki, Ito Ken-ichi, Minagawa Kentaro, Matsui Toshimitsu, Oikawa Hiroyuki, Takahashi Satoshi, Takao Toshifumi, Iwai Noriki, Mino Takashi, Takeuchi Osamu, Maru Yoshiro, Hiratsuka Sachie	4. 巻 12
2. 論文標題 Extracellular mRNA transported to the nucleus exerts translation-independent function	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-23969-1	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hideki Sanjo
2. 発表標題 Novel regulatory mechanism of TAK1 in macrophages to limit death receptor Fas-induced proinflammatory cell death
3. 学会等名 JSICR/MMCB2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kengo Maeda, Shinshuke Taki, and Hideki Sanjo
2. 発表標題 TAK1 limits death receptor Fas-induced proinflammatory cell death in macrophages
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuta Yamamoto, Kazuki Yoshizawa, Hideki Sanjo, Shinsuke Taki
2. 発表標題 Local cellular crosstalk restricts innate lymphoid cell population size in the small intestine.
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2021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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------