

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590382
 研究課題名（和文）皮膚リーシュマニア感染モデルを用いた宿主 microRNA システムの機能解析
 研究課題名（英文）Analysis of the functions of microRNAs in host immune responses to infection with *Leishmania major*
 研究代表者
 田邊 将信 (TANABE MASANOBU)
 慶應義塾大学・医学部・講師
 研究者番号：80051928

研究成果の概要（和文）：私達は microRNA の宿主免疫機構における機能を明らかにするため、1 種類の microRNA を欠損した(miR-/-と略) マウスの *Leishmania major* (*L. major*) 感染モデルを用いて解析を行った。*L. major* 感染では、BALB バックグラウンドの KO マウスは B6 対照群と同等の高い抵抗性を示し、足病変の腫大は軽度で、足病変内原虫数も有意に少数であった。免疫機能解析および骨髓移植実験から、骨髓造血系細胞がこの miR-/-マウスの *L. major* 感染に対する高い抵抗性に関与している可能性、さらには miR-/-マウスの樹状細胞やマクロファージの抗原提示能の低下がこの抵抗性の原因になっている可能性が示唆された。しかし、この microRNA が標的とする遺伝子を特定することは出来なかった。

研究成果の概要（英文）：To clarify a role of microRNA in host immune system, gene-targeted microRNA-deficient mice (BALB/c background; miR-/-) were immunologically analyzed after infection with *Leishmania major* (*L. major*). Whereas BALB/WT mice developed progressive non-healing lesions with numerous parasites within them, the miR-/- mice controlled disease progression and had relatively small lesions with fewer parasites. Immunological studies and bone marrow (BM) transplantation suggest that BM myeloid cells may be essential for the resistance of miR-/- mice to *L. major* infection, and also that impairment of antigen presentation of dendritic cells and/or macrophages may be responsible for the resistance of miR-/- mice. However, the target molecules of this microRNA remained unidentified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：microRNA、*Leishmania major*、感染症、遺伝子欠損マウス、免疫学、国際情報交換

1. 研究開始当初の背景

microRNA は、19-24bp の非常に短い RNA で

あり、現在すでに 500 種類以上が報告されている。その配列は種を超えて広く保存されて

いることから、生物の生存に取って基本的な役割を担った重要な分子であることが推定されている。microRNA は、複数の標的となる mRNA (タンパク質をコードする RNA) の相補配列に直接作用して、その翻訳の阻害、安定性の破壊、あるいは直接的な切断を通してそれらの遺伝子発現を制御し、生命現象を調節していると考えられている。宿主免疫システムに限って言えば、いくつかの microRNA が免疫系組織に発現しており、宿主免疫応答に重要な役割を果たしていることが推定されてはいるが、その多くは単にその発現を確認したにすぎず、個々の microRNA の発現制御や免疫応答における発現意義を解析した報告は少なく、その生理機能は依然としてほとんど理解できていない。そこで、申請者らは、バイオインフォマティクスを用いた全ゲノム的な microRNA の発現解析を行い、免疫系、特にマクロファージ (MΦ) や樹状細胞 (DC) といった自然免疫細胞に特異的に発現する microRNA 群を同定し、さらには、microRNA 欠損マウス、あるいは高発現マウスといった遺伝子改変マウスを数種類作出した。私たちは、このようなマウスを有効に利用することで、microRNA の宿主免疫システムにおける生理機能を解析することにした。

2. 研究の目的

寄生虫のヒトへの侵入・寄生メカニズムは、宿主である人体の免疫応答機構と寄生虫の回避機構とのせめぎ合いの中で成立しており、宿主の遺伝的背景や免疫応答の指向性が、寄生虫排除の成否を規定することはよく知られている。従って、寄生虫感染に対する宿主の免疫応答の分子機構を理解することが、寄生虫感染症の病態理解や治療戦略に必要不可欠と考えられるが、その詳細は未だ明らかとはなっていない。申請者らは、寄生虫感染時の宿主免疫応答における新たな分子機構として、非翻訳 RNA (non-coding RNA) の

一種である microRNA の機能に注目し解析を行ってきた。また in vivo での機能解析に向けて、microRNA 欠損マウスを自ら作出し、あるいは国外共同研究者から譲り受け継代・維持している。本申請では、その中の 1 種類の microRNA を欠損したマウスに焦点を当て、このマウスの *L. major* 感染に対する抵抗性機構を解析し、この microRNA の宿主免疫応答における機能の解明を目的として研究を計画した。

3. 研究の方法

(1) *L. major* 感染に対する BALB/miR^{-/-}マウスの抵抗性

本研究で使うマウスは、B6 および BALB バックグラウンドの miR^{-/-}マウスである。このマウスは慶應大学医学部寄生虫学教室で継代・繁殖している。B6/WT、B6/miR^{-/-}、BALB/WT、BALB/miR^{+/-} および BALB/miR^{-/-}マウスの左後肢 footpad に 5×10^6 個の *L. major* promastigote を接種し、感染に対する抵抗性を解析した。この研究では、感染経過に伴う病変部の腫大を経時的に計測し、病変部及び所属リンパ節内の原虫数は限界希釈法を用いて測定した。

(2) 骨髄細胞移植キメラマウス

BALB/miR^{-/-}マウスの *L. major* 感染に対する抵抗性が骨髄造血系細胞依存性かどうかを解析するため、放射線照射 (5 Gy) した BALB/WT および miR^{-/-}マウスに骨髄細胞を移植する実験を行った。WT マウスには miR^{-/-}マウスの骨髄細胞、あるいは BALB/rag2^{-/-}と miR^{-/-}マウスの骨髄細胞を 4:1 の割合で混合したものを移植した。miR^{-/-}マウスには WT マウスの骨髄細胞を移植した。移植 2 ヶ月後、レシピエントマウスに *L. major* を感染させ、感染経過に伴う病変部のサイズおよび原虫数を測定した。

(3) *L. major* 感染 BALB/miR^{-/-}マウスにおける免疫応答変化

BALB/WT および miR^{-/-}マウスに *L. major* を感染させ、確立された方法で免疫機能解析を行った。感染後 2 週と 4 週に各群マウスの膝蓋リンパ節細胞を分離し、その構成細胞をフローサイトメーターで分析し、感染経過に伴う T cell subset およびその他の細胞の変動を解析した。また、リンパ節細胞をそのまま、あるいは CD4⁺ T cells を分離した後、phorbol-12-myristate acetate と calcium ionophore A23187、あるいは可溶性 *L. major* 抗原で刺激した場合の増殖活性およびサイトカイン産生量を測定した。また、所属リンパ節から Total RNA を分離し、RT-PCR 法を用いて各種遺伝子発現量を半定量的に解析した。

(4) *L. major* 感染における血清抗体価

L. major に感染した BALB/WT および miR^{-/-}マウスの感染経過に伴う *L. major* に対し特異的な血清抗体価を ELISA 法で測定した。また、IgG については抗原特異的な IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 抗体価についても測定した。

(5) 樹状細胞 (DC) およびマクロファージ (MΦ) の機能

感染していない BALB/WT および miR^{-/-}マウスの骨髄細胞から GM-CSF および M-CSF 存在下に誘導した樹状細胞 (BMDC) およびマクロファージ (BMMΦ) を用いて、in vitro で各種刺激 (LPS、*L. major* 感染) を加えた場合の反応性の違い (細胞生存率、サイトカイン産生量) を観察した。また、これらの細胞の抗原提示能を調べるため、DO11.10 マウス (OVA specific T cell receptor transgenic mouse) の T cell を用いて、BMDC および BMMΦ の抗原提示能 (T cell の増殖能および IL-2 産生能) を調べた。

(6) この microRNA の標的遺伝子の解析

バイオインフォーマティクスを縦横に駆使し、*L. major* 感染で膝蓋リンパ節において著しく変動した遺伝子に着目し、どの遺伝子が miR^{-/-}マウスの抵抗性に関与しているかを

解析した。また、この microRNA の標的遺伝子の解析、さらにはその標的遺伝子群の発現変動がどのように *L. major* 感染における抵抗性に関連しているかについても解析した。

4. 研究成果

(1) *L. major* 感染では、BALB/WT および BALB/miR^{+/-}マウスは共に高い感受性を示し、足病変は著しく腫大した。これに対して、B6 及び BALB バックグラウンドの miR^{-/-}マウスは共に B6/WT と同等の高い抵抗性を示し、足病変の腫大は軽度で (Fig. 1)、足病変内の虫体数も有意に少数であった。

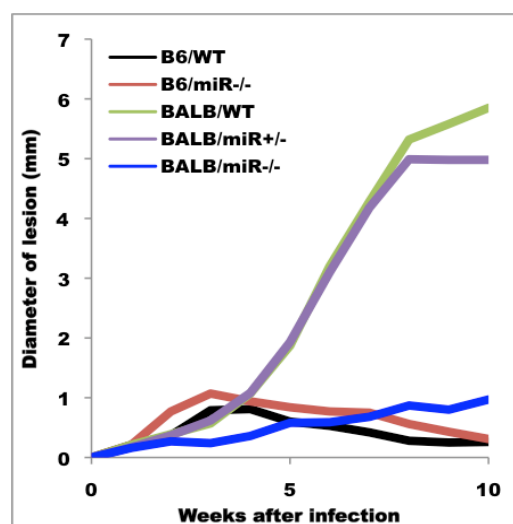


Fig.1 Footpad swelling in response to *L. major* infection. B6/WT, B6/miR^{-/-}, BALB/WT, BALB/miR^{+/-} and BALB/miR^{-/-} mice were infected, and the size of the footpad lesion was monitored during the course of infection.

(2) BALB/WT に比べ、miR^{-/-}マウスの膝蓋リンパ節細胞の *L. major* 抗原に対する Recall 反応による Th1 および Th2 サイトカイン産生量は共に有意に低値であったが (Fig. 2)、phorbol-12-myristate acetate と calcium ionophore A23187 による直接刺激では両群に差は認められなかった。

(3) BALB/WT に比べ、miR^{-/-}マウスは感染

期間を通して抗原特異的 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM 抗体産生が低く、また T 細胞依存性抗原に対する抗体産生もまた著しく低いことが明らかとなった。

(4) BALB/WT に比べ、miR^{-/-}マウスの骨髄細胞から誘導した BMDC および BMMΦ の抗原提示能が有意に低かった (Fig. 3)。miR^{-/-}マウスの BMMΦ は lipopolysaccharide (LPS) や

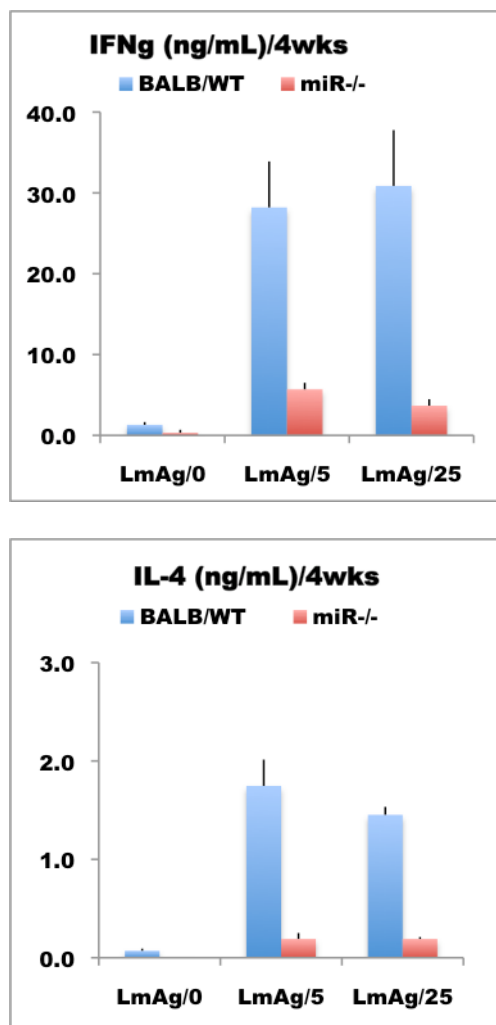


Fig. 2 IFN γ and IL-4 production by popliteal lymph node cells of BALB/WT and miR^{-/-} mice 4 weeks after *L. major* infection. Lymph node cells were stimulated with *L. major* antigen for 72 hours, and culture supernatant were analyzed for the IFN γ and IL-4.

L. major 感染に対する反応性が有意に低下し

ており、これらの変化が miR^{-/-} マウスの免疫反応低応答性に関与していることが推定された。

(5) 骨髄移植実験から、骨髄造血系細胞がこの miR^{-/-} マウスの *L. major* 感染抵抗性に関与している可能性が示唆された。しかし、miR^{-/-}マウスの骨髄細胞から誘導した BMDC、BMMΦ、あるいは肥満細胞 (BMMC) の WT マウスへの移入では感染抵抗性を付与することは

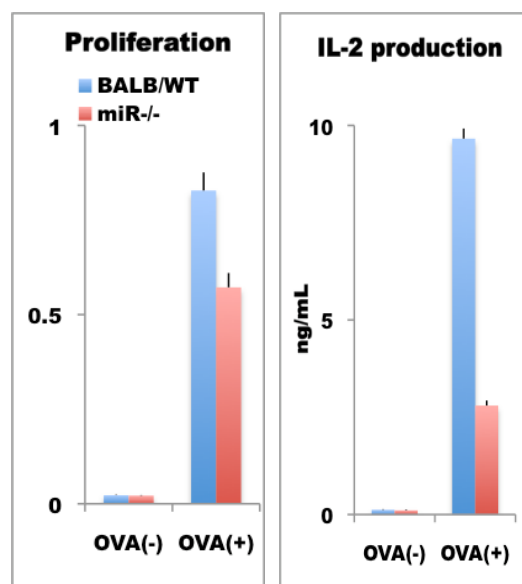


Fig. 3 Proliferation and IL-2 production by ovalbumin T cell receptor transgenic cells (DO11.10) cultured with LPS-matured, bone marrow-derived DCs from BALB/WT or miR^{-/-} mice in the presence of cognate ovalbumin protein.

できなかったことから、どの細胞が責任細胞であるかを特定することは出来なかった。

(6) BALB/WT と miR^{-/-} マウスから誘導した成熟 DC の網羅的遺伝子発現解析で、発現量に著しい違いがみられた遺伝子について GO 解析を行ったところ、その多くが membrane、membrane-related、membrane-regulation に関わる遺伝子であり、抗原提示に関与していることが示唆された。さらに cumulative curve および sylamer 解析から、この microRNA に

特異的なシード配列を持つ遺伝子発現が miR-/- マウス で上昇しており、これらがこの microRNA の標的遺伝子である可能性が示唆されたが、どの遺伝子がこの microRNA の主要な標的であるかを特定することは出来なかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 田邊將信、木村徳宏、嘉陽啓之、下田耕治、氣賀恒太郎、竹内勤、深尾太郎。

Leishmania major 感染に対する宿主免疫反応における microRNA システムの機能解析

(II). 第80回日本寄生虫学会大会、2011年7月17日、東京都港区.

- ② Hedlund S., Winnewisser J., Fukuda Y., Kayo H., Tanabe M., Vigorito E., Fukao T. Kinetics of microRNA action in innate immune cells during early inflammatory response 14th International Congress of Immunology 2010年8月25日、兵庫県神戸市.

- ③ Frietsch M., Kayo H., Fukuda Y., Tanabe M., Fukao T. The role of microRNAs in dendritic cells. 14th International Congress of Immunology, 2010年8月25日、兵庫県神戸市.

- ④ 田邊將信、木村徳宏、嘉陽啓之、下田耕治、竹内勤、深尾太郎。 *Leishmania major* 感染に対する宿主免疫反応における microRNA システムの機能解析。 第79回日本寄生虫学会大会、2010年5月20日、北海道旭川市.

[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 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者:

田邊 將信 (TANABE MASANOBU)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号: 80051928

(2)研究分担者:

下田 耕治 (SHIMODA KOJI)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号: 00129470

木村 徳宏 (KIMURA TOKUHIRO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 40445200

(3)連携研究者:

なし

(4)研究協力者:

深尾 太郎 (FUKAO TARO)

Max-Planck-Institute of Immunobiology,

Freiburg, GERMANY 主任研究員

研究者番号: 20401127