

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860368

研究課題名(和文) 自然免疫応答における新規転写因子制御機構の解明

研究課題名(英文) Understanding the novel regulatory mechanism of transcription factors in innate immune responses

研究代表者

藩 龍馬 (BAN, Tatsuma)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：50635357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：自然免疫系は病原体に対する生体防御応答に重要である一方、その制御機構の破綻は自己免疫疾患などの病態発症を引き起こす。本研究では自然免疫応答に重要な転写因子IRF5の活性化機構と抑制機構を解析した。その結果、IRF5はユビキチン化された後にリン酸化されて活性化型となり、IRF5と結合するタンパク質Lynがこれらの翻訳後修飾を抑制することで、IRF5が過剰に活性化しないように調節していることを明らかにした。これらの制御機構を応用することで、全身性エリテマトーデスなどのIRF5が関与する疾患の治療法開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Innate immune system is critical for the host defense against pathogens. However, a failure of its regulatory mechanism triggers the pathogenesis of diseases such as autoimmune disorders. In this study, we investigated the activation and suppression mechanisms of IRF5, a transcription factor important for the innate immune responses. As a result, we found that IRF5 is activated through ubiquitination followed by phosphorylation, and that an IRF5-binding protein Lyn suppresses these post-translational modifications, thereby preventing the hyperactivation of IRF5. Our findings might facilitate the development of new therapeutics for the diseases that target IRF5, such as systemic lupus erythematosus.

研究分野：免疫学

キーワード：自然免疫応答 転写因子 自己免疫疾患 全身性エリテマトーデス 翻訳後修飾 IRF5

1. 研究開始当初の背景

(1) 転写因子 IRF ファミリーについて

自然免疫系は、食食などによる非特異な病原体の排除機構と考えられてきたが、近年の研究により、病原体の構成成分を認識する多様なパターン認識受容体と、その下流のシグナル伝達経路による精緻な分子機構であることが明らかになっている。転写因子 IRF (Interferon Regulatory Factor) ファミリーは、自然免疫応答においてインターフェロン (interferon; IFN) や炎症性サイトカインの遺伝子を誘導することにより、ウイルスの増殖抑制や獲得免疫系の活性化などの生体防御応答を惹起する。IRF は、これら生体防御応答に必須の役割を果たしているのみならず、細胞の増殖・分化、さらにはアポトーシスといった様々なイベントに関与する多機能分子である (Honda & Taniguchi, *Nat Rev. Immunol.* 6: 644-658, 2006; Tamura *et al. Annu. Rev. Immunol.* 26: 535-584, 2008)。

(2) 当研究室における研究内容と課題

当研究室では、IRF の中でも特に IRF8 に着目し、ミエロイド系細胞の細胞系譜について詳細な解析を行ってきた。これまでに、IRF8 が自然免疫細胞であるマクロファージ、あるいは樹状細胞 (DC) への分化に重要な役割を果たしていることなどが、当研究室の田村らによって明らかにされた (Tamura *et al. Immunity* 13: 155-165, 2000, 他多数)。一方で、DC の自然免疫応答における I 型 IFN 誘導のポジティブ・フィードバックや、マクロファージにおいてインターロイキン (interleukin; IL) の一つである IL-12 の誘導といった免疫応答においても、IRF8 が関与するという報告もある (Tailor *et al. Immunity* 27: 228-239, 2007; Scharton-Kersten *et al. J. Exp. Med.* 186: 1523-1534, 1997)。このように、IRF の中でも IRF8 は自然免疫細胞の分化と応答の両方のイベントに関与している。しかしながら、この 2 種類の異なったイベントにおいて、IRF8 がどのようなメカニズムで機能しているのか、詳細は未だ明らかではない。特に免疫応答においては、IRF8 が欠損すると、マクロファージや DC などの免疫細胞の分化に異常が生じることから、これまでの研究では IRF8 による免疫細胞の分化ならびに応答における役割を分けた上で十分な解析はなされていなかった。

当研究室では、IRF8 を発現させることでマクロファージに分化できる、IRF8 欠損ミエロイド前駆細胞株を樹立している。この細胞株と Tet-ON システムを組み合わせ、通常では存在しない IRF8 を欠損したマクロファージを作製し、自然免疫応答を検討した。その結果、IRF8 を欠損したマクロファージにおいて自

然免疫応答が顕著に減弱することが判明した。このことから、IRF8 は自然免疫応答の際にも重要な役割を果たしていることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、IRF8 による分化と免疫応答の制御機構の違いを明らかにし、自然免疫応答に特異的な新規転写因子制御機構を解明することを目的とする。IRF8 による自然免疫細胞の分化制御機構に関しては、当研究室で既に解析が進んでいるため、本研究ではまず IRF8 の免疫応答における転写因子制御機構に着目して解析を行う。

3. 研究の方法

IRF8 の発現をコントロールできるミエロイド細胞株 (Tet-ON システムを使用) を用い、自然免疫応答における IRF8 の役割を検討する。Toll 様受容体 (Toll-like receptor; TLR) リガンドなどで自然免疫刺激し、抗 IRF8 抗体で免疫沈降した後、質量分析法により解析する。これにより、リン酸化など IRF8 の活性化に必要な翻訳後修飾 (PTM) 部位を特定すると同時に、免疫応答時において IRF8 と結合するパートナー転写因子を同定する。また、遺伝子発現解析を行い、IRF8 の発現の有無で比較して IRF8 依存的に免疫応答する際に発現量の変化する遺伝子群を同定する。これらの遺伝子群について、転写因子や、疾患に関連している分子、あるいは PTM に関連する酵素などについて、その免疫応答における機能を解析する。また、ノックアウトマウスを用いた *in vivo* の解析も行う。

4. 研究成果

(1) IRF8 は自然免疫細胞において IRF5 の発現を制御する

前述した IRF8 発現の ON/OFF をコントロールできるミエロイド細胞株を用い解析を行った結果、IRF8 タンパク質の発現により別の IRF ファミリーである IRF5 のタンパク質レベルでの発現が認められた。逆に、IRF8 の発現を消失させた場合、IRF5 の発現も同様に消失した (図 1)。



図 1. IRF8 は IRF5 の発現を制御する

以上の結果から、自然免疫細胞において IRF8 は IRF5 の発現誘導に重要な役割を担っていることが示された。

(2) IRF5 はユビキチン化の後にリン酸化されることで活性化型となる

IRF5 は自然免疫応答に重要な役割を担っている一方で、その遺伝子多型は全身性エリテマトーデス (SLE) などの自己免疫疾患の病態発症と関連することが多数報告されている。IRF5 の制御機構の詳細は不明であるため、これを解明することで SLE をはじめとする自己免疫疾患の治療法開発につながることを期待できる。そこで、本研究では IRF8 から IRF5 に焦点を絞り解析を進めた。

IRF5 の PTM による活性化制御機構を検討するために、活性化に重要であることが知られているユビキチン化部位とリン酸化部位にそれぞれ変異を導入し、これらの PTM が生じない IRF5 変異体を作製した。生化学的解析の結果、ユビキチン化されない IRF5 はリン酸化が顕著に減弱したのに対し、活性化に重要なリン酸化が生じない IRF5 はユビキチン化された。これらの結果から、IRF5 のユビキチン化はリン酸化の上流で生じるイベントであることが示された (図 2)。

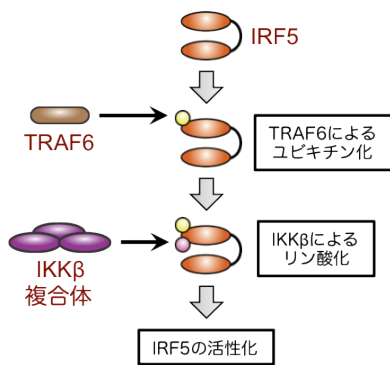


図 2. PTM による IRF5 の活性化モデル

(3) Lyn は IRF5 と結合して PTM を阻害することで、IRF5 の活性化を抑制する

当研究室では、IRF5 結合タンパク質として Src ファミリーキナーゼ Lyn を同定した。Lyn 欠損マウスは SLE 病態を発症することから、IRF5 との関連を解析した。

まず、Lyn は IRF5 による転写活性化を選択的に抑制するが、この抑制に Lyn のキナーゼ活性は必要ではないことが判明した。次に、Lyn は IRF5 と自然免疫刺激依存的に会合することが分かり、この Lyn-IRF5 相互作用には Lyn と IRF5 それぞれ 2 つのドメインが重要であることが示された。そこで、IRF5 と会合できない Lyn の変異体を解析した結果、Lyn による IRF5 の抑制は顕著に減弱した。さらに、Lyn は IRF5 と結合することによって、IRF5 の活性化に重要な PTM であるユビキチン化とリン酸化を抑制した。以上の結果から、Lyn は IRF5 と結合することにより、これらの PTM による IRF5 の活性化を抑制し、その結果 IRF5 による転写活性化を抑制していることが示唆

された (図 3)。

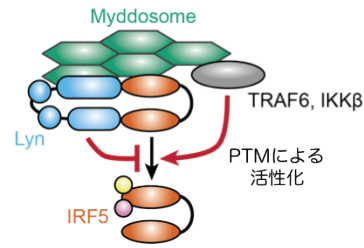


図 3. Lyn による IRF5 の抑制モデル

(4) Lyn 欠損による SLE 様病態発症と IRF5 との関わり

SLE 病態発症に重要な細胞である DC を解析したところ、Lyn 欠損 DC では自然免疫応答が亢進しており、これが Lyn と IRF5 の二重欠損によって顕著に抑制された。SLE 病態を発症している Lyn 欠損マウスでは、DC において IRF5 が活性化 (リン酸化) していることが明らかになった。さらに、Lyn と IRF5 の二重欠損マウスを作製し解析したところ、Lyn 欠損によって生じる SLE 病態が顕著に抑制された。

以上から Lyn は IRF5 を抑制することで自然免疫応答を調節しており、Lyn が欠損すると過剰な免疫応答により SLE 病態発症につながると考えられた (図 4)。

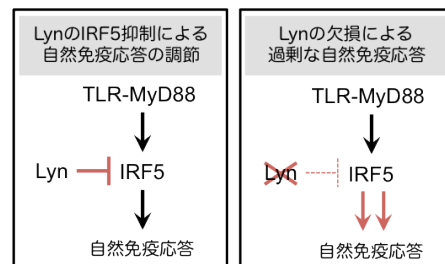


図 4. Lyn による自然免疫応答の調節

本研究により、自然免疫細胞において IRF8 によって IRF5 の発現制御がなされており、IRF5 の PTM による活性化は Src ファミリーキナーゼである Lyn によって抑制されるという、自然免疫応答における新規の転写因子制御機構が明らかになった。Lyn による IRF5 の選択的抑制機構のような、IRF5 の活性化制御法を確立することで、SLE をはじめとする自己免疫疾患の治療法開発につながることを期待できる。

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 1 件)

- ① Kurotaki D, Yamamoto M, Nishiyama A, Uno K, Ban T, Ichino M, Sasaki H, Matsunaga S, Yoshinari M, Ryo A, Nakazawa M, Ozato K, Tamura T. IRF8

inhibits C/EBP α activity to restrain mononuclear phagocyte progenitors from differentiating into neutrophils. *Nat. Commun.*, 5, 4978, 2014, 査読有
DOI: 10.1038/ncomms5978

[学会発表] (計 11 件)

- ① 藩 龍馬, 佐藤 豪, 西山 晃, 田村 智彦. Src ファミリーキナーゼ Lyn による転写因子 IRF5 の抑制と全身性エリテマトーデス (SLE) 様病態発症との関わり. 第 17 回 神奈川血液・免疫フォーラム, 小田急ホテルセンチュリー相模大野 (神奈川県相模原市), 2015 年 11 月 27 日
- ② 藩 龍馬, 佐藤 豪, 西山 晃, 松永 智子, 梁 明秀, 木村 鮎子, 木村 弥生, 平野 久, 宮下 定一, 黒光 淳郎, 塚原 克平, 吉松 賢太郎, 田村 智彦. 免疫系転写因子の翻訳後修飾と機能解析を基盤とした自己免疫疾患およびがんの病態解明と治療法開発. イノベーションシステム整備事業「翻訳後修飾プロテオミクス医療研究拠点の形成」第 6 回シンポジウム, 横浜市立大学 (神奈川県横浜市), 2015 年 10 月 19 日
- ③ Kurotaki D, Yamamoto M, Nishiyama A, Uno K, Ban T, Ichino M, Sasaki H, Matsunaga S, Yoshinari M, Ryo A, Nakazawa M, Ozato K, Tamura T. IRF8 inhibits the activity of C/EBP α to restrain mononuclear phagocyte progenitors from differentiating into neutrophils. *International Society for Experimental Hematology 44th Annual Scientific Meeting*, 国立京都国際会館 (京都府京都市), 2015 年 9 月 17 日
- ④ 西山 晃, 藩 龍馬, 中林 潤, 田村智彦. 単球分化における転写因子 IRF8 による Klf4 遺伝子誘導をモデルとした遠位エンハンサーと遺伝子間の段階的で双方向性の活性化についての解析. 冬の若手ワークショップ 2015, ホテル松本楼 (群馬県渋川市), 2015 年 2 月 6 日
- ⑤ 黒滝大翼, 山本道雄, 西山 晃, 宇野和宏, 藩 龍馬, 市野素英, 佐々木 悠, 松永智子, 吉成正裕, 梁 明秀, 中澤正年, Keiko Ozato, 田村智彦. 転写因子 IRF8 による C/EBP α の機能阻害が単核貪食細胞前駆細胞において好中球分化能の喪失をもたらす. 第 19 回造血器腫瘍研究会, グランデはがくれ (佐賀県佐賀市), 2015 年 1 月 23 日
- ⑥ Ban T, Sato GR, Nishiyama A, Takasuna M, Suzuki S, Ichino M, Yanai H, Ryo A, Taniguchi T, Tamura T. Suppression of the TLR-MyD88-IRF5 pathway by the non-receptor type tyrosine kinase Lyn: A critical link to the pathogenesis of SLE. 第 43 回日本免疫学会学術集会, 国立京都国際会館 (京都府京都市), 2014 年 12 月 12 日
- ⑦ Nishiyama A, Ban T, Tamura T. Stepwise and bidirectional activation of the Klf4 distal enhancer and the Klf4 gene by the transcription factor IRF8 during monocyte differentiation. 第 37 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 2014 年 11 月 25 日
- ⑧ 西山 晃, 黒滝大翼, 山本道雄, 宇野和宏, 藩 龍馬, 市野素英, 佐々木 悠, 松永智子, 吉成正裕, 梁 明秀, 中澤正年, Keiko Ozato, 田村智彦. Stepwise and bidirectional activation of the Klf4 distal enhancer and the Klf4 gene by the transcription factor IRF8 during monocyte differentiation. 新学術領域「転写サイクル」班会議, 慶山 (山梨県笛吹市), 2014 年 8 月 5 日
- ⑨ Kurotaki D, Yamamoto M, Nishiyama A, Uno K, Ichino M, Sasaki H, Ban T, Yoshinari M, Nakazawa M, Ozato K, and Tamura T. IRF8 inhibits the activity of C/EBP α to restrain the neutrophil differentiation program in monocyte-dendritic cell progenitors. 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸ポートピアホテル (兵庫県神戸市), 2013 年 12 月 3 日
- ⑩ Kurotaki D, Osato N, Nishiyama A, Yamamoto M, Ban T, Sato H, Nakabayashi J, Umehara M, Nakazawa M, Miyake N, Matsumoto N, Ozato K, Tamura T. The IRF8-KLF4 transcription factor cascade is essential for the development of monocytes. 2013 Inaugural Meeting of the International Cytokine and Interferon Society, San Francisco (USA), 2013 年 10 月 1 日
- ⑪ Kurotaki D, Osato N, Nishiyama A, Yamamoto M, Ban T, Sato H, Nakabayashi J, Umehara M, Nakazawa M, Miyake N, Matsumoto N, Ozato K, Tamura T. The IRF8-KLF4 transcription factor cascade critically regulates the development of inflammatory monocytes. The Joint International Meeting of the 78th Meeting of the Japanese Society of Interferon and Cytokine Research and the 21st International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages

2013, 都市センターホテル (東京都千代田区), 2013年5月20日

[その他]

研究室ホームページ

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~immunol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藩 龍馬 (BAN, Tatsuma)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号: 50635357

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし