

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893051

研究課題名(和文)好中球とマクロファージの細胞間相互作用による自然免疫制御とその生物学的意義の解明

研究課題名(英文) The analysis of the mechanism and the biological significance of the newly discovered mechanism of innate immune activation due to cell-cell adhesion between neutrophils and macrophages

研究代表者

小林 弘(Kobayashi, Hiroshi)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：30381487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000 円

研究成果の概要(和文)：自然免疫系は、生体防御機構や恒常性維持に重要な役割を果たし、その破綻は免疫炎症疾患病態を来すこと示されてきた。新たに発見した好中球とマクロファージの細胞間接着による自然免疫活性化機構の解明を行った。caspase6活性化に伴うマクロファージ抑制因子IRAK-Mの切断によるNF-κB活性化によって、TNFなどの炎症性サイトカインの他に、RANTESやMIP1などのケモカイン産生を誘導することが判明した。今後、本分子機構ならびにその生物学的意義の更なる解析によって、免疫炎症病態の解明に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The innate immune system plays an important role in host defense and maintenance of homeostasis of the body, and its failure has been shown to cause immune-inflammatory disease. Recently, we further elucidated the newly discovered mechanism of innate immune activation due to cell-cell adhesion between neutrophils and macrophages. The NF-κB activation by cleavage of macrophage inhibitory factor IRAK-M due to caspase6 activation is important in this pathway. We clarified chemokine production, such as RANTES and MIP1 via cell-cell adhesion in addition to inflammatory cytokines such as TNF. In the future, the further analysis of the molecular mechanisms and their biological significance of this innate immune activation mechanism are expected to contribute to the elucidation of immune-inflammatory disease.

研究分野：臨床免疫

キーワード：自然免疫 マクロファージ 好中球 細胞接着 自己免疫疾患 IRAK caspase NF-κB

## 1. 研究開始当初の背景

自然免疫は感染防御機構の一つであり、近年その分子機構の解明が大きく進展した。好中球とマクロファージ(M)は、自然免疫を担う主要な細胞であり、Toll様受容体(TLR)などの病原体センサーを発現している。これらが病原体分子パターンを認識すると細胞内シグナル伝達経路を介して、好中球やMの活性化が誘導される。活性化したMは、局所微小環境シグナル依存性に感染防御に関与するM(M1)や創傷治癒に関与するM(M2)などへの分化がエピジェネティックに制御されている。そして病原体排除から組織恒常性維持まで炎症の多段階において各々役割を担っている(Murray JP. *Nat Rev Immunol* 2011)。最近、液性因子や活性酸素などのメディエーターや細胞貪食による活性化制御機構など、好中球とマクロファージ(M)が相互作用によってより合目的に免疫系を制御していることも報告された(Mantovani A. *Nat Rev Immunol* 2011)。しかし、好中球とMの細胞間接触自体の免疫応答修飾(Orabona, C. *Nat Immunol* 2004)や細胞内病原体制御(Venuprasad K. *J Immunol*. 2002)における重要性は示唆されているものの、その詳細な分子機構や病態における意義は不明であった。申請者の所属研究室では、肺胞Mと好中球が細胞間接触することにより、NF-κB活性化を介してMに潜伏HIVの再活性化や変異を誘導することを報告した(Hoshino Y. et al., *J. Exp. Med.* 2002 & *J. Inf. Dis.* 2007)。そこで申請者は、自然免疫における肺胞Mと好中球との接触意義をより詳細に究明し、病態成立における役割を解明することを試みた。まず、好中球とMの細胞接触に伴うM活性化機構のシグナル伝達経路に関して、細胞間接触依存性に活性化されたCaspase-6(CASP6)がToll様受容体シグナル(TLR)の抑制因子であるIRAK-Mを切断してNF-κBを活性化することを発見した。すなわち、自然免疫系の新規活性化経路とともに新規NF-κB活性化経路を見いだした(Kobayashi H. et al., *J. Immunol.*, 2011)。また、M由来液性因子のパネル解析では、TNFの他多くの液性因子の産生が確認された。以上の発見は、好中球とMの細胞間接触に伴うMの活性化が肺における免疫制御において多彩な役割を有することを示唆すると共に、かかる相互作用を標的とした疾患治療法創成の可能性を想起させる。すなわち、申請者が見出した機構が、肺感染症や自己免疫疾患に見られる肺合併症などの病態形成に関わっている可能性がある。そこで、今回、以上の申請者の研究をさらに発展させ、かかる細胞接触に始まる自然免疫系活性化の分子機構を解明するとともに、その様々な病態における意義を明確にして新規疾患バイオマーカーや治療法の確立へ貢献することをめざすものである。

## 2. 研究の目的

自然免疫とその疾患病態との関連が急速に明らかになりつつある。その担い手である好中球やマクロファージ(M)は、Toll様受容体などの病原体センサーとその細胞内シグナル伝達機構の他、多彩な分子機構により自然免疫系を制御している。活性化Mは、機能的に異なるサブセットへ分化し、病原体排除から組織恒常性維持まで炎症の多段階において各々役割を担っている。このような自然免疫制御機構は感染防御のほか自己免疫性疾患など広く疾患病態に関与している。申請者らは、最近、好中球とMの細胞間接触による新規自然免疫制御機構をその分子機構とともに発見した。すなわち、好中球との接触依存性にMにおいてcaspase-6活性化IRAK-M限定分解NF-κB活性化がおこり、肺などの免疫炎症病態の制御に関与している可能性を示した。そこで、そのメカニズムと感染症や自己免疫疾患などの病態との関連を含めた生物学的意義についてさらに探究し、新たな疾患バイオマーカーや治療法確立に展開させることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 好中球とMの細胞間接触相互作用の分子メカニズム解明

好中球およびMの細胞表面で接触に介在する分子の同定

<M上の介在分子同定> M上の候補分子としてCD80、CD40、ICAM-1を示唆する成績を得ていた。そこで、各分子の抗体などで架橋し、CAPS6活性化IRAK-M切断NF-κB活性化経路を誘導する分子およびその組合せを検討した。また、各分子をsiRNAノックダウンしたMに対して、好中球との共培養によりCAPS6活性化IRAK-M切断NF-κB活性化経路が抑制されるかを検討した。

<好中球上の介在分子同定> 次に同定したM上の介在分子を基盤とし、好中球上の介在分子を同定を試みた。M上の介在分子のFc融合蛋白と好中球との反応性をフローサイトメトリー等で確認したのち、抽出した好中球細胞蛋白溶解液や膜分画を用いて、M上の介在分子のFc融合蛋白と共沈降する蛋白を電気泳動および質量分析により解析した。さらに同定された分子をsiRNAでノックダウンすることにより、好中球-M共培養によりCAPS6活性化IRAK-M切断NF-κB活性化経路が抑制されるかを検討した。以上の実験結果からM上の介在分子と会合する好中球上の分子が同定を試みた。

### Mにおける細胞内シグナル伝達機構の解明

IRAK-M切断におけるCASP6特異性の検証  
IRAK-Mの切断部位に関して：好中球とM接

触後の細胞溶解液中の IRAK-M を抗 IRAK-M 抗体、タグ標識した IRAK-M を遺伝子導入した THP-1 細胞を用いた場合はタグに対する抗体により免疫沈降を行い、沈降物を質量分析することにより切断部位の確認やリン酸化などの蛋白修飾についても分析を試みた。IRAK-M 切断から NF- $\kappa$ B 活性化までの機構の解明。CASP6 により切断された IRAK-M のフラグメント自体が NF- $\kappa$ B 活性シグナルに関与している可能性も考えて下記の実験を行った。IRAK-M 切断フラグメントの細胞内局在の解析：標識した IRAK-M 全長および切断フラグメントを発現する発現ベクターを構築し、M に遺伝子導入し細胞内局在を免疫組織化学的に検討した。IRAK-M 全長および切断フラグメントへの会合分子同定：タグ標識した IRAK-M 切断フラグメントを発現するプラスミドベクターを構築して M に導入し、全長および切断フラグメントと共沈降してくる分子を質量分析により同定を試みた。

#### (2) 好中球と M の細胞間接触による相互作用の生物学的意義の解明

M の種類による特異性の検証  
各臓器固有の M として、ヒト肺胞 M の他に、ヒト樹状細胞 (NHDC)、ヒト破骨前駆細胞 (OCP) が分化した破骨細胞、末梢血単核球から M-CSF または GM-CSF で分化させた細胞など入手可能な M 細胞を用いて好中球との共培養を行い、CASP6 活性化、IRAK-M 切断、NF- $\kappa$ B 活性化経路が同様に伝達されるかを検討した。

細胞接触後の M 活性化状態の検討  
好中球 - 肺胞 M の細胞接触有無により、M1 マクロファージ (Marco, Socs3, Nos2, Il12b, Ptgs2, Il23, Ido1)、M2 マクロファージ (Relma, Socs2, Ilf4, Chi3l1, Chi3l2, Chi3l3, Cxcl13, Ccl12, Ccl24, Ilf4) の遺伝子群の発現について定量的 RT-PCR により検討した。また培養上清中に発現するサイトカインおよびケモカインなどの液性因子に関しては Luminex Screening Assay、ELISA などにより検討した。

#### (3) リウマチ膠原病の肺病変における臨床的意義の解明

肺感染症、呼吸器合併症を有する関節リウマチや膠原病など自己免疫疾患の症例において、文書による説明と同意が得られた場合に、原病の治療前後に気管支鏡を実施し、気管支肺泡洗浄 (BAL) および経気管支鏡的肺生検を行った症例について、BAL 余剰検体より肺胞マクロファージを回収し、その CASP6 の発現量、活性化、IRAK-M の発現について、すでに記載した方法により検討した。BAL 中の白血球分画や臨床経過および検査データをもとに解析し、申請者が発見した経路の臨

床的意義を検討した。

#### 4. 研究成果

新たに発見した好中球とマクロファージの細胞間接触による自然免疫活性化機構の解明を行った。caspase6 活性化に伴うマクロファージ抑制因子 IRAK-M の切断による NF- $\kappa$ B 活性化によって、TNF などの炎症性サイトカインの他に、RANTES や MIP1 などのケモカイン産生を誘導する結果が得られた。その他の検討についても、解析途中にあり、さらに検討を進めていく。今後、本分子機構ならびにその生物学的意義の更なる解析によって、免疫炎症病態の解明に寄与することが期待される。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

小林弘、リウマチ膠原病肺への応用に向けた新規肺胞マクロファージ活性化機構の解明、第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2014 年 4 月 21 日～26 日 (品川)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小林 弘 (Kobayashi Hiroshi) 東京大学・医科学研究所・アレルギー免疫科・助教  
研究者番号：30381487

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：