

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460368

研究課題名(和文) 免疫応答における生体内のPIKfyveの役割の解明

研究課題名(英文) Regulatory role of PIKfyve in vivo

研究代表者

川崎 拓実(kawasaki, takumi)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：60584414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：肺では少なくとも2種類のマクロファージが存在し生体防御に貢献している。特に肺胞マクロファージは、病原体の排除とともに、肺の機能的な恒常性維持に関わる働きをもつ。脂質代謝酵素であるPIKfyveノックアウトマウスにおいて野生型マウスに比べて肺胞マクロファージの割合が減少していることが明らかとなった。詳細な解析によりPIKfyveは、肺胞マクロファージの分化段階でのGM-CSFシグナルを活性化することにより制御していることが明らかとなった。また、PIKfyveノックアウトマウスでは、レチノイン酸産生能の低下によりTreg細胞の減少を引き起こし、過剰炎症を引き起こすことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Alveolar macrophages (AMs) are specialized tissue-resident macrophages that orchestrate the immune responses to inhaled pathogens and maintain organ homeostasis of the lung, and dysregulation of AMs is associated with allergic inflammation and asthma. Here we show that mice with conditionally deleted PIKfyve, a phosphoinositide kinase with a FYVE finger, in macrophages displayed developmental arrest of AMs at the premature stage, and severe lung inflammation accompanied by infiltration of eosinophils and lymphoid cells after exposure to house dust mite extract. PIKfyve-deficient premature AMs had defects in production of retinoic acid, and failed both to support differentiation of Foxp3+ Treg cells and to suppress the Th2-type immune response. GM-CSF-mediated AMs differentiation was abrogated by PIKfyve deficiency, due to decreased AKT activation. These findings suggest that PIKfyve plays a critical role for AM development and maintenance of lung homeostasis.

研究分野：自然免疫

キーワード：自然免疫 脂質代謝 イノシトールリン脂質 PIKfyve 肺胞マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

病原体の感染により、細胞から1型インターフェロンや炎症性サイトカインをはじめとする様々なサイトカインが産生される。サイトカインは引き続きT細胞やB細胞による獲得性免疫の誘導などに重要な役割を果たす。病原体が感染すると、生体は自然免疫受容体を介して病原体の特徴的な構造を認識し、シグナル伝達経路の活性化をへてサイトカインの産生が誘導される。自然免疫受容体からサイトカイン産生までに至るシグナル伝達経路の全容は明らかになりつつあるが、依然として不明な点も多く残されている。TANK Binding kinase 1(TBK1)は、転写因子 Interferon Regulatory Factor(IRF)3 を直接リン酸化するキナーゼであり、ウイルス感染に伴うインターフェロン産生において必須の役割を果たしている。TBK1によりリン酸化されたIRF3は細胞質から核内に移行し、1型インターフェロンをはじめとするサイトカインの発現を誘導する。TBK1によるIRF3のリン酸化が、自然免疫応答に必須であることは、これまでの研究により明らかになったものの、どのようにTBK1-IRF3シグナルの活性化が制御されているかは不明であった。そこで、TBK1-IRF3シグナル活性化メカニズムを明らかにするため、その活性化を制御する因子の探索を行った。その結果、TBK1-IRF3シグナルを調節する因子としてイノシトールリン脂質の一種;ホスファチジルイノシトール5リン酸を同定した。ホスファチジルイノシトール5リン酸はウイルス感染に伴い細胞内での生産量が増大し、その結果IRF3と結合することが判明した。ホスファチジルイノシトール5リン酸が結合したIRF3はTBK1により効率的にリン酸化されるようになり、その結果IRF3が活性化し、サイトカイン遺伝子の発現が誘導されることが明らかになった(Kawasaki T. et.al., 2013)。さらに、私たちはホスファチジルイノシトール5リン酸がリン脂質キナーゼPIKfyveによるホスファチジルイノシトールのリン酸化により産生されることを見出した。しかしながら、PIKfyveのウイルス感染防御等、生体内機能については不明な点が多かった。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子改変マウスの作製、解析を通して免疫応答におけるPIKfyveの役割の解明を行う。これまでの研究で自然免疫応答におけるホスファチジルイノシトール5リン酸の役割を明らかにしてきたことから、とくに自然免疫応答を担う細胞であるマクロファージ及び樹状細胞におけるPIKfyveの機能を中心に解析を行った。

3. 研究の方法

PIKfyveはホスファチジルイノシトール5リン酸の産生だけでなく、ホスファチジルイノ

シトール3リン酸をリン酸化することでホスファチジルイノシトール3,5リン酸の産生を制御している。しかし、生体内におけるPIKfyveの役割については解明されていない。特にマクロファージは、自然免疫応答の中心を担う細胞でサイトカインの産生を含めウイルス感染した細胞の除去、抗原提示などの重要な役割をもつ。まず、マクロファージでのPIKfyveの役割を明らかにする。マクロファージ特異的にPIKfyveをノックアウトするため、既に私たちが樹立しているPIKfyveコンディショナルマウスをLysM-creノックインマウスと掛け合わせるにより、目的のマウスを得た。

4. 研究成果

PIKfyveコンディショナルマウスをLysM-creノックインマウスと掛け合わせるにより、マクロファージを含むミエロイド系細胞特異的なノックアウトマウスを作製した。マクロファージは各組織において特異的な機能をもち、生体防御や恒常性の維持を担っていることが知られている。そこで、各組織におけるマクロファージの割合を細胞表面マーカーであるCD11bとF4/80を利用して検討した。その結果、脾臓、骨髄、肝臓、腹腔内においては、野生型マウスとPIKfyveノックアウトマウスの間で、マクロファージの割合に変化はなかった。一方、肺においては少なくとも2種類のマクロファージが存在し生体防御に貢献していることが知られており、特に肺胞マクロファージ(alveolar macrophage)は、病原体の排除とともに、肺の機能的な恒常性維持に関わる働きをもつ。はじめに肺胞マクロファージの肺での割合を調べるため、特異的な細胞表面マーカーであるCD11cとSiglec-Fを用いて検討した。その結果、PIKfyveノックアウトマウスにおいて野生型マウスに比べて肺胞マクロファージの割合が減少していることが明らかとなった。また、肺では、肺胞マクロファージ以外にもミエロイド系細胞として、好中球、好酸球、CD11b+樹状細胞、CD103+樹状細胞、間質マクロファージ、Ly-6C+単球、Ly-6C-単球等が知られている。そこで、これら細胞の肺組織での割合を、FACSによって調べた結果、肺胞マクロファージ以外の細胞種の割合には変化がなかった。

PIKfyveの欠損が、肺胞マクロファージに何らかの異常を伴うことが明らかとなったため、次にPIKfyveの欠損が肺胞マクロファージにどの発生段階で影響を与えているか解析を行った。肺胞マクロファージは胎生期に肺組織に移入した単球もしくは未分化マクロファージが、成長に従い分化、成熟することが知られている。そのため、出生後直後、3日後、3週間後、6週間後のマウスより肺を提出し、肺胞マクロファージの発生分化を

表面マーカーを用いて調べた。肺泡マクロファージは、分化の成熟にともない CD11c と Siglec-F の発現が徐々に上昇し、出生後直後では CD11c と Siglec-F の発現は低いが、3日後には発現が徐々に上昇し、3週間後、6週間後には最も高い発現状態になる。PIKfyve ノックアウトマウスでは出生後直後、3日後は野生型と差はなかったが、Siglec-F の発現が野生型に比べ低くことが明らかになった。以上のことから、PIKfyve は、肺泡マクロファージの発生段階において機能していることが明らかとなった。

次に PIKfyve の欠損によりどのようなメカニズムで肺泡マクロファージの分化発生が阻害されているかを検討した。肺泡マクロファージはその他の組織常在性マクロファージと異なり増殖因子である顆粒球単球コロニー刺激因子(GM-CSF)により制御を受けており、GM-CSF による恒常的な刺激が肺泡マクロファージの維持に必須である。そこで、PIKfyve が GM-CSF シグナル伝達を制御しているかどうかを、シグナル伝達分子のリン酸化レベルを WB で調べることで検討した。そこで、骨髄より M-CSF マクロファージを誘導し、GM-CSF 刺激後の、AKT、STAT5、MAPK、NF- κ B のリン酸化レベルを検討した結果、PIKfyve ノックアウトマウス由来 M-CSF マクロファージでは GM-CSF 依存的な AKT のリン酸化レベルが低下していた。これらの結果と一致して、出生後5日のマウスの未熟な肺泡マクロファージの AKT のリン酸化レベルを FACS で調べたところ、PIKfyve ノックアウトマウス由来細胞ではリン酸化レベルが野生型に比べ低下していた。また、マイクロアレイを用いて野生型及び、PIKfyve ノックアウトマウス由来肺泡マクロファージの遺伝子発現を比較した結果、PIKfyve ノックアウトマウス由来肺泡マクロファージでは肺泡マクロファージの特徴的な遺伝子発現が低下しており、またマクロファージ、樹状細胞の分化に関わる転写因子群 Interferon Regulatory Factor (IRF) ファミリーの発現が顕著に低下していることが明らかとなった。

これまで PIKfyve ノックアウトマウスでは、肺泡マクロファージの異常がみられることが明らかとなった。次に、PIKfyve が生体防御及び恒常性維持にどのように関与するかを検討した。肺組織中の上皮細胞から産生されるサーファクタントは肺の肺胞内の張力を緩和する界面活性剤の機能を有しており、肺泡マクロファージはサーファクタントを除去することによって恒常性維持に貢献している。例えば肺泡マクロファージの欠損マウスは、サーファクタントが除去されず、週令がたつにつれてサーファクタントが過剰に肺組織中にたまり肺胞蛋白症(PAP)になることが知られている。しかし、PIKfyve ノ

ックアウトマウスの組織切片を作製し H E 染色をしたものの、8ヶ月令のマウスにおいても肺胞蛋白症を罹患してはいないことが明らかとなった。

肺泡マクロファージは肺の恒常性維持と共に肺における感染等における生体防御にも関わることが知られている。そこで、ダニ由来抗原を用いたアレルギーモデルを作製し、どのような影響があるかを検討した。その結果、野生型に比べ PIKfyve ノックアウトマウスでは過剰なアレルギー炎症が誘導されていることが明らかとなった。アレルギー炎症の際には CD4+T 細胞が過剰に活性化することが原因の一つと考えられているが、PIKfyve ノックアウトマウスではその CD4+T 細胞を抑制する制御性 T 細胞(Treg) が減少していることが明らかとなった。制御性 T 細胞の誘導はレチノイン酸と TGF β によっていることが知られている。PIKfyve のノックアウト由来の肺泡マクロファージではレチノイン酸産生に関わる遺伝子の減少がみられ、レチノイン酸の添加により in vivo 及び in vitro の実験条件下において Treg 細胞の割合が相補されたことから、PIKfyve 由来肺泡マクロファージでは、レチノイン酸産生能の低下により Treg 細胞の減少を引き起こし、結果として過剰炎症を引き起こすことが明らかとなった。

以上のことから、脂質代謝酵素である PIKfyve は肺泡マクロファージの分化段階を GM-CSF シグナルを活性化すること制御している。また、肺泡マクロファージ由来のレチノイン酸産生を制御することによりアレルギー炎症の抑制に関わることが示された。脂質代謝の制御による炎症応答の制御を目指すことで、新たな視点で炎症抑制剤の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)

川崎拓実、伊藤康祐、宮田治彦、審良静男、河合太郎

Deletion of PIKfyve alters alveolar macrophage populations and exacerbates allergic inflammation in mice 査読有り The EMBO Journal 印刷中 doi: 10.15252/embj.201695528.

[学会発表](計 6 件)

川崎拓実 ウイルス感染防御におけるインシトールリン脂質の役割 ウイルス感染現象における宿主細胞コンピテンシーの分子基盤 第9領域会議 2017年2月5

日～6日 九州大学病院キャンパスコラ
ボステーションI視聴覚ホール（福岡
県福岡市）

川崎拓実 河合太郎 PIKfyve regulates
development and function of alveolar
macrophage 第45回日本免疫学会 2016
年10月5日～7日 沖縄コンベンション
センター（沖縄県宜野湾）

川崎拓実 ウイルス感染防御におけるイ
ノシトールリン脂質の役割 感染コンピ
テンシ研究班第7回領域会議 2015年12
月15日～16日 筑波大学東京キャンパス
文京校舎（東京都文京区）

川崎拓実 生体内由来の新しい免疫賦活
化剤 イノベーションジャパン 2015年8
月27日～28日 東京ビックサイト（東
京都江東区）

川崎拓実、河合太郎 Role of the lipid
kinase PIKFyve in alveolar
macrophage 第44回日本免疫学 2015
年11月18日～20日 札幌コンベンシ
ョンセンター（北海道札幌市）

川崎拓実、田中里佳、伊藤康祐、審良静
男、河合太郎 Physiological role of
the lipid kinase PIKfyve in innate
immune responses 第43回日本免疫学
会 2014年12月10日～12日 国立京都
国際会館（京都府京都市）

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://bsw3.naist.jp/kawai/>
6. 研究組織
(1) 研究代表者
川崎 拓実（KAWASAKI, takumi）
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・助教
研究者番号：60584414

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者
()

〔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：