

令和 元年 6 月 20 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08828

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発生分化制御機構の解明

研究課題名(英文) Research about the mechanism of macrophage development and differentiation 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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：TNFシグナル関連分子TAK1のマクロファージ発生分化制御における関与について調べるため、TNF^{-/-}欠損背景下のマクロファージ特異的TAK1欠損マウスを作製し解析を行なった。その結果、TAK1は個体レベルでTNFシグナル依存的及び非依存的にマクロファージ生存機構を支えることで、組織恒常性維持に寄与することが明らかとなった。これら個体レベルにおける機構を分子レベルで考察するための一例として、TRIF/Caspase8/GSDMDシグナルによるマクロファージの炎症誘発性細胞死機構とそれを負に制御するTAK1の新規の役割を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかとなったTNFシグナル関連分子TAK1によるマクロファージの生存機構と組織恒常性維持における寄与、それを説明するために同定されたTAK1が制御するマクロファージの炎症抑制機構の分子基盤の一例は、これまで予想されなかった興味深い研究成果といえ、学問上の発展に大いに貢献するものである。さらにこの分子基盤の存在は、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が期待される。故に極めて社会的意義の深い研究成果であるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To investigate whether and how TAK1, one of TNF signal-associated molecules, is involved in the regulation of macrophage development and differentiation, I generated and analyzed macrophage-specific TAK1-deficient mice on a TNF^{-/-} deficient background. We found that TAK1 participates in the maintenance of tissue homeostasis by supporting macrophage survival mechanism in a TNF⁻ dependent and -independent manner. As one example to discuss the in vivo mechanism at the molecular level, we identified a proinflammatory cell death machinery in macrophages by TRIF/Caspase8/GSDMD signaling axis and then a novel role for TAK1 to negatively regulate it.

研究分野：免疫学 分子生物学

キーワード：TAK1 マクロファージ 遺伝子欠損マウス 炎症 細胞死

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年のマクロファージ研究の進展から、これまで定説として信じられていたマクロファージ発生分化の骨髄由来説が、実はそうではなく胎児期の卵黄嚢及び胎仔肝臓より発生分化し各臓器に移動し定着するという新概念が定着されつつある。一方で、各臓器に移動、定着しようとするマクロファージが、周囲の環境に依存しつつどのようなプログラムで組織常在性を獲得し、組織恒常性維持や免疫制御機構に関わっているのか等々、未だ解明されていない学術上重要な課題が存在している。

2. 研究の目的

炎症性サイトカイン TNF は炎症反応の惹起、感染防御等、自然免疫応答に必須の因子である。従来、TNF とその受容体 TNFRI を介したシグナル伝達に必須の分子として知られる TAK1 及び Caspase8 が、申請者による予備実験の結果から、TNF シグナル依存的及び非依存的なマクロファージの発生分化制御や組織恒常性維持、そして免疫制御機構に関与する新たな可能性が浮かび上がってきた。そこで、「TNF シグナル関連分子群によるマクロファージ発生分化制御」という作業仮説を立て、その仮説の検証を通じて各種臓器別のマクロファージの発生分化や組織恒常性維持におけるこれらの分子群の役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、主に各種遺伝子欠損マウス及び各種阻害剤を利用して、TAK1 及び Caspase8 のマクロファージの発生分化制御における作用原理について、個体レベルから細胞内シグナル伝達経路内の分子基盤に渡る解析を行った。具体的には、各臓器から細胞を単離し Flow cytometry による免疫細胞集団解析、組織標本を作成し組織病理学的解析、マウスより血液を採取し生化学検査による解析、骨髄由来マクロファージを使用し各種手法に基づく解析(イムノプロットング、ELISA、real-time PCR)を行った。

4. 研究成果

マクロファージにおける TAK1 の役割を個体レベルで解析するため、マクロファージ特異的 TAK1 欠損マウスを作製したところ、様々な解析の結果からマクロファージ中における TAK1 の欠失が起こっていないことが判明した。この理由として TNF シグナルによる TAK1 欠損マクロファージの細胞死が考えられたため、TNF 欠損背景下のマクロファージ特異的 TAK1 欠損マウス (LysMcre:TAK1xTNF^{-/-} KO マウス、以下 TAK1^{ΔM}xTNF^{-/-} マウスと呼ぶ) を作製したところ、マクロファージ内での高効率な TAK1 欠失が DNA 及びタンパクレベルで確認することができた。よって、TAK1^{ΔM}xTNF^{-/-} マウスを用いて解析を進めることにした。

1) 各種臓器における組織常在マクロファージの集団について解析している過程で、興味深いことに TAK1^{ΔM}xTNF^{-/-} マウスでは組織常在マクロファージの割合あるいは総数の低下とともに臓器炎症を起こしていることが判明した。特にこの所見は肝臓と腹腔において顕著であった。詳述すると、Flow cytometry や組織病理学的解析から肝臓、腹腔共に好中球、単球といった炎症細胞の異常な浸潤が認められ(図1、2)、また血清中の AST、ALT、LDH 及び IL-6 の値が対照マウスと較べて著しく高かったことから、炎症による肝機能障害を誘発していることが考えられ

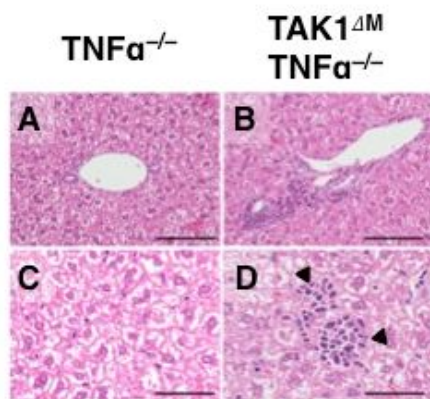


図1 H&E染色による肝臓の組織病理解析
TAK1^{ΔM}xTNF^{α-/-}マウスの肝臓(B & D)では、好中球や単球の浸潤(矢印)が確認できる。

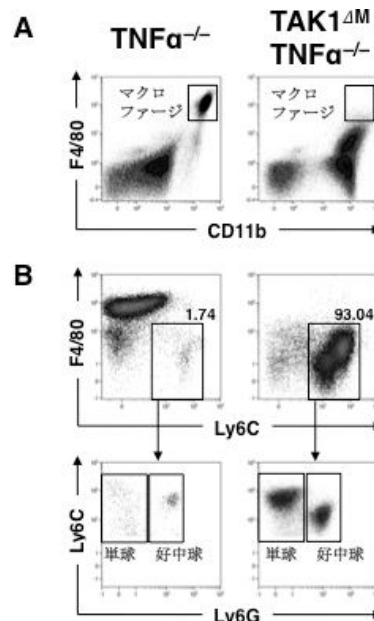


図2 Flow cytometryによる腹腔細胞集団の解析
TAK1^{ΔM}xTNF^{α-/-}マウスはマクロファージが消失し(A)、代わりに単球や好中球の浸潤(B)が確認できる。

た。以上の結果から、マクロファージ中における TAK1 欠損が、autoinflammation(自己炎症)の発症原因となっていることが推察された。

2) 次にこの原因を探るため、細胞培養により骨髓由来マクロファージを単離し、解析を行った。その結果対照マクロファージと異なり、TAK1 欠損マクロファージは各種 TLR リガンドの中でもグラム陰性菌の構成因子であるリポ多糖 (LPS) やウイルス核酸アナログである poly(I:C) 刺激特異的に細胞死が誘導されることを見出した。同様に TNF α によっても細胞死の誘導が確認された。この細胞死の分子機構について詳細な解析を続けたところ、TAK1 欠損マクロファージは上記刺激に伴い、Caspase8/3 の活性化が検出されること、この細胞死が TLR3 及び 4 シグナルにおける特異的なアダプター分子として知られる TRIF 及び下流に位置する Caspase8 に極めて依存した現象であることが判明した。Caspase8/3 の活性化が検出されたことより、当初観察された細胞死がアポトーシスであるものと考察していた。ところがその後の解析により、Caspase8/3 のみならず Caspase1 も活性化されること、Caspase1 の下流で制御される gasdermin D(GSDMD)のタンパク分解が誘導されることを新たに見出した。GSDMD の分解産物は、

近年炎症性細胞死として注目されるパイロプトーシスの直接的誘導因子として機能することが示されてきた。このことから TAK1 欠損マクロファージに見られた細胞死は、実はアポトーシスとパイロプトーシスの混在したこれまでに報告のなかった特異な機構によるものであることが推察された (図 3)。

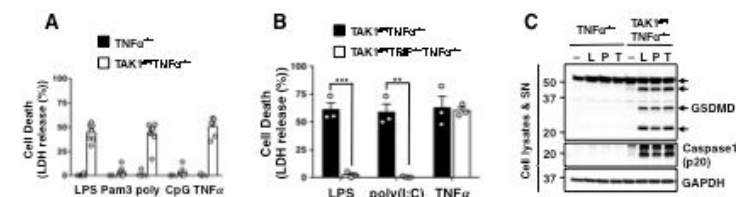


図3 (A & B) TLRリガンドやTNF α 刺激に伴う骨髓由来マクロファージの細胞死の評価。細胞内LDHの培養上清中への漏出を細胞死の指標とした。(C) 骨髓由来マクロファージをLPS(L)、poly(I:C)、TNF α で刺激した後、細胞抽出液を調整し、イムノブロットング法により、GSDMDの分解や活性化型Caspase1の出現について評価した。

以上の結果を総合すると、研究当初 TNF シグナル依存的及び非依存的なマクロファージの発生分化制御に TAK1 が関与する新たな可能性を模索していたが、研究の結果から TNF 依存的なマクロファージ生存維持機構に TAK1 が極めて重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらにマクロファージ内での TAK1 欠損は、個体において TNF 非依存的な組織炎症を導くことから、組織恒常性維持の点でマクロファージにおける TAK1 の重要性が明らかとなった。これら個体レベルで提示された細胞生存や炎症制御機構について、分子レベルで考察するための一例として、マクロファージにおいて TRIF/Caspase8/GSDMD シグナルによる炎症誘発性細胞死に対する負の制御因子として機能する TAK1 の新たな役割が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

1) Sanjo, H., J. Nakayama, T. Yoshizawa, H. J. Fehling, S. Akira, and S. Taki. 2019. TAK1 safeguards macrophages against proinflammatory cell death. *J Immunol* 査読有 In press.

2) Kobayashi, M., T. Kitano, S. Nishiyama, H. Sanjo, K. Onozaki, S. Taki, S. Itoh, and S. Hida. 2019. Staphylococcal superantigen-like 12 activates murine bone marrow derived mast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 査読有 511: 350-355. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.02.052.

3) Okubo, Y., S. Tokumaru, Y. Yamamoto, S. I. Miyagawa, H. Sanjo, and S. Taki. 2019. Generation of a common innate lymphoid cell progenitor requires interferon regulatory factor 2. *Int Immunol*. 査読有 doi: 10.1093/intimm/dxz019.

4) Nagashio, S., K. Ajima, D. Maejima, H. Sanjo, R. Kajihara, M. Hayashi, T. Watanabe-Asaka, M. Kaidoh, Y. Yokoyama, S. Taki, Y. Kawai, and T. Ohhashi. 2019. Water intake increases mesenteric lymph flow and the total flux of albumin, long-chain fatty acids, and IL-22 in rats: new concept of absorption in jejunum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 査読有 316: G155-G165. doi: 10.1152/ajpgi.00325.2018.

〔学会発表〕(計 3 件)

1) 山条秀樹

TAK1 inhibits TLR-driven macrophage cell death by blocking a TRIF-dependent pathway
日本分子生物学会年会 2018

2) 山条秀樹

Loss of TAK1 leads to TLR-driven macrophage cell death and inflammation that occur by a TNF-independent mechanism
日本免疫学会総会 2017

3) 山条秀樹

Loss of TAK1 leads to TLR-driven macrophage cell death and inflammation that occur by a TNF-independent mechanism
International Cytokine and Interferon Society (ICIS2017) 2017

〔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：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。