

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790470

研究課題名 (和文) I型IFN産生細胞の生体内でのモニタリングと同定

研究課題名 (英文) Monitoring and identification of type I IFN producing cells in vivo.

研究代表者

熊谷 雄太郎 (KUMAGAI YUTARO)

大阪大学・微生物病研究所・特任助教

研究者番号：00528408

研究成果の概要 (和文) : I型IFNは自然免疫応答に重要であるが、その産生細胞は生体内で同定されていなかった。本研究では *Ifnb1* 遺伝子プロモータ制御下に GFP を発現する遺伝子改変マウスを作製し、その GFP 蛍光を観測することによって IFN- $\beta$  産生細胞の同定に成功した。ウイルス感染に対する IFN- $\beta$  産生細胞と、細菌感染に対する細胞とに違いが見られた。種々のシグナル伝達分子の遺伝子欠損マウスと交配することで、細菌感染時における生体内での IFN- $\beta$  産生に関与するシグナル伝達経路を同定した。

研究成果の概要 (英文) : Type I IFN is important for innate immune response. However, cells producing type I IFN have not been fully identified yet. We generated a knock-in mouse strain where GFP is under control of *Ifnb1* gene promoter. Observation of GFP expressing cells on viral or bacterial infection identified IFN- $\beta$ -producing cells in vivo. IFN- $\beta$ -producing cells in response to bacterial infection were different from that in viral infection. By crossing with various knock-out mouse strains for signaling molecules, we have identified signaling pathways essential for IFN- $\beta$  production in response to bacteria in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：自然免疫、I型インターフェロン産生細胞

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ウイルス感染によってI型IFNの産生が誘導される分子機構が明らかとなったが、生体内でのI型IFN産生細胞については未知であった。研究代表者は生体内でI型IFNの産生をモニタリングするために *Ifna6gfp* ノックインマウスを作製した。その解析から、

TLRのシステムとRLRのシステムがそれぞれプラズマサイト様樹状細胞(plasmacytoid dendritic cell, pDC)とコンベンショナル樹状細胞(conventional DC, cDC)によって使われていることを見出した。また、ウイルスの静脈内投与による全身感染と経鼻投与による肺感染においては、最初に応答する細胞群に違いがあることも示した。すなわち、全身感染

においては pDC, cDC およびマクロファージが、肺感染においては肺胞マクロファージ (alveolar macrophage, AM) が I 型 IFN を産生することを示した。また、AM がウイルスの排除を行っていることもあわせて示した。AM は RLR 依存的にウイルスを認識するが、このシグナルが障害される IPS-1 欠損マウスにおいては、野生型では反応しない pDC が I 型 IFN を産生することが示された。すなわち、RLR/AM のシステムが第一線の防御を担い、TLR/pDC がそれを補助しているという描像が得られた。

しかしながら、これらの知見にも関わらず、抗ウイルス免疫応答の全容が明らかになったとは言い難い。いくつかの細胞種が I 型 IFN を産生することが示唆されているが、異なる細胞種でどのように I 型 IFN の誘導が制御されているかは不明であった。

## 2. 研究の目的

I 型 IFN 産生を含む抗ウイルス免疫応答を理解するには IFN-b の挙動を調べることは非常に重要であり、かつ IFN-b はバクテリア感染においても重要な役割を持つことが示唆されている。I 型 IFN のシグナル伝達が抗バクテリア免疫応答において重要な役割を果たしているということを示唆するデータもあり、ウイルスおよびバクテリア感染に対する生体防御反応を理解する上で、IFN-b の挙動を調べることは必須である。

一方、バクテリア感染に対する IFN-b 産生細胞は、*in vitro* においてマクロファージ、cDC、繊維芽細胞などが *Listeria* 感染時に IFN-b を産生することが知られているが、生体内でこれに対応する細胞種、現象は見つかっていない。

研究代表者はこの IFN-b の発現を生体内でモニタリングできるノックインマウスを *Ifna6gfp* マウスと同様の方法で作製し、解析することを目指した。また、この *Ifnb1* ノックインマウスを用いることで、ウイルス感染時およびバクテリア感染時の IFN-b 産生細胞の同定とその役割の解明を目標とした。ウイルス感染に関しては、*Ifna6gfp* マウスの解析と平行して行うことで、IFN-a と IFN-b の挙動の違いを調べることにした。また、MyD88、IPS-1、I 型 IFN 受容体といった種々のシグナル伝達分子の欠損マウスと掛け合わせることで、TLR、RLR および I 型 IFN 受容体による I 型 IFN 産生の制御機構を解明でき、さらに、バクテリア感染時の生体内での IFN-b 産生細胞を同定とこれらのシグナル伝達経路の役割を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

*Ifnb1* 遺伝子座に蛍光タンパク質 GFP をコードする遺伝子を相同組換によって導入する。*Ifnb1* 遺伝子のタンパク質をコードする配列を GFP をコードする配列でマウス胚性幹細胞 (embryonic stem cell, ES 細胞) 中で置き換え、その後ネオマイシン耐性を指標に得られた相同組換体 ES 細胞に Cre リコンビナーゼを導入する、もしくは *germline transmission* を得たキメラマウスと全身に Cre を発現する CAG-Cre マウスと掛け合わせることで、ネオマイシン耐性遺伝子を切り出し、目的の *Ifnb1* ノックイン遺伝子座を得る。

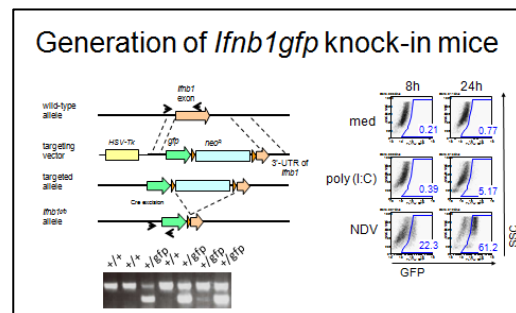
*Ifnb1* 遺伝子のプロモーター制御下で蛍光タンパク質が発現し、その蛍光を指標に IFN-b の産生をモニタリングする。得られた *Ifnb1* ノックインマウスにニューカッスル病ウイルス (Newcastle disease virus) やインフルエンザウイルスといったウイルスを静脈内、または経鼻投与し、脾臓や肺における蛍光タンパク質の発現をフローサイトメトリー (FACS) によって観測する。

また、バクテリア感染に対する IFN-b 産生細胞を同定するために、*Listeria* や B 型溶血性レンサ球菌 (group B streptococci, GBS)、肺炎双球菌を静脈内または経鼻投与し、脾臓、肺、リンパ節などにおける蛍光タンパク質を FACS でモニタリングする。

*Ifnb1* ノックインマウスと TLR のアダプター分子である MyD88, TRIF, RLR のアダプター分子 IPS-1、I 型 IFN 受容体 IFNAR1 といった分子のノックアウトマウスを掛け合わせるにより、ウイルス感染やバクテリア感染時の IFN-b 産生細胞がどのようにして病原体を認識し IFN-b を誘導しているのかを調べる。

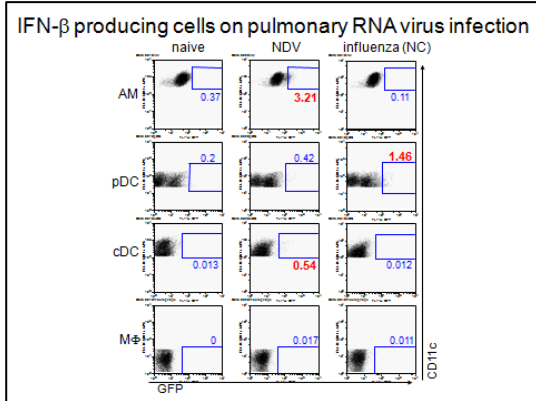
## 4. 研究成果

常法に従い、*Ifnb1gfp* マウスを得た。*Ifnb1gfp* マウスから得た細胞は、*in vitro* でのウイルス感染に対して GFP 発現細胞の割合が増加することから、GFP の発現によって IFN-b の産生がモニタリングできることを示唆した (下図)。

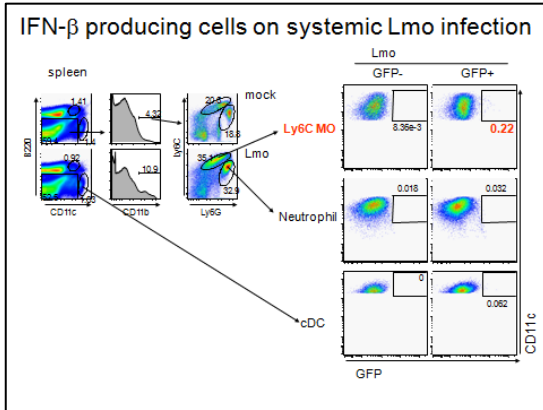


*Ifnb1gfp* マウスに NDV を静脈投与、および経鼻投与し、脾臓および肺における GFP 陽性

細胞を観測したところ、脾臓においては pDC、cDC に、肺においては AM に GFP 陽性細胞が認められた。Ifna6gfp マウスを使った結果との比較から、NDV に対する IFN-a 産生細胞と IFN-b 産生細胞は同一の細胞群であることが示された。一方、インフルエンザウイルスの経鼻投与においては、肺の pDC が GFP 陽性になったことから、ウイルスによって IFN 産生細胞に違いがあることが示唆された(下図)。



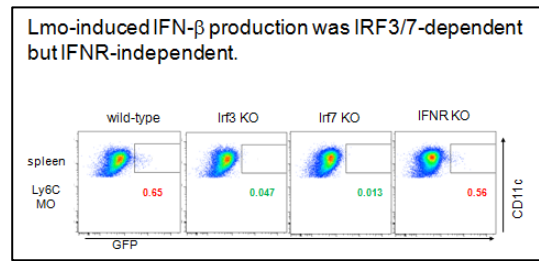
バクテリア感染時の IFN-b 産生細胞を同定するために、Listeria を静脈投与し、脾臓における GFP 陽性細胞を FACS によって観測したところ、DC ではない細胞群に GFP 陽性細胞が見られた。細胞表面抗原の分析から、Ly6ChiCD11b+単球(Ly6Chi MO)が IFN-b 産生細胞であることが示された(下図)。



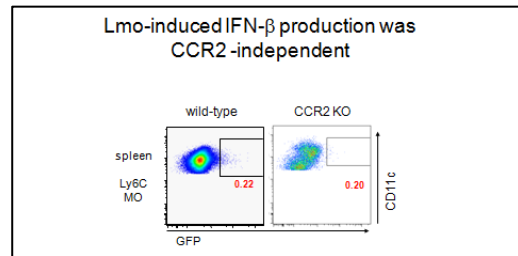
Ifnb1gfp マウスを MyD88, TRIF, IPS-1 といったシグナル伝達分子の遺伝子欠損マウスと交配し、Listeria 感染時における GFP の発現を調べたところ、MyD88-TRIF の経路、IPS-1 の経路は Listeria による IFN-b 産生誘導には関与していないことが示された。また、I 型 IFN 受容体欠損 Ifnb1gfp マウスの懐石から、IFN によるフィードバックは IFN-b の産生に必要なことが示された (Data not shown)。

一方、IRF3 または IRF7 を欠損した Ifnb1gfp マウスにおいては、Listeria による GFP 陽性細胞の誘導が見られなかった。IRF7 欠損細胞を in vitro で Listeria に感染させると IFN-b を

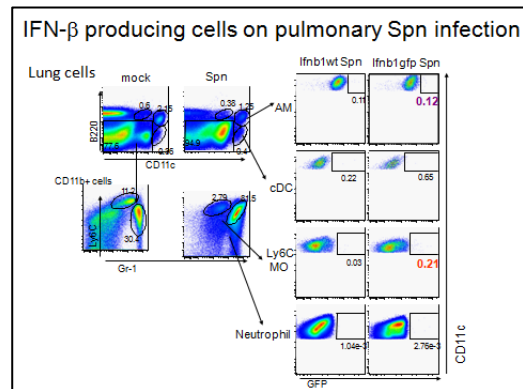
出すことから、in vivo 特有の制御機構が示唆された(下図)。



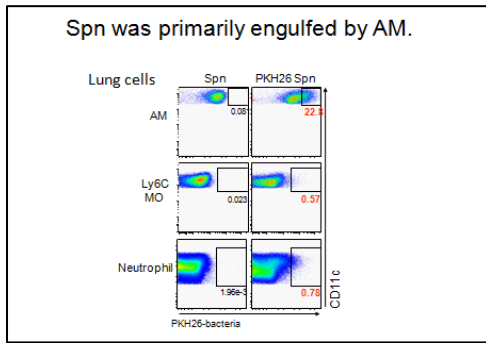
Ly6Chi MO は、Listeria 感染時に CCR2 依存的に脾臓に集積することが報告されている。Ly6Chi MO のトラフィックの IFN-b 産生に及ぼす影響を調べるため、CCR2 欠損 Ifnb1gfp マウスに Listeria を感染させ、脾臓における GFP を観測したところ、絶対数は現象したものの GFP 陽性 Ly6Chi MO を見出した。よって IFN-b 産生には CCR2 による集積は必要ないことが示された(下図)。



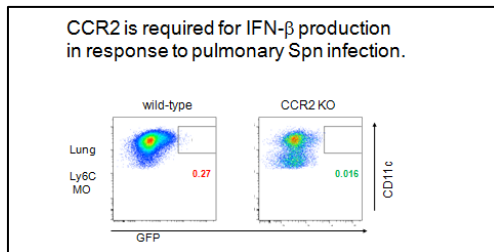
次に、肺炎双球菌の肺感染モデルにおいて IFN-b 産生細胞を同定した。肺炎双球菌を経鼻投与して 24 時間後に肺における GFP 発現を FACS によって観測したところ、Ly6Chi MO が IFN-b を産生することが判明した(下図)。



しかしながら、肺炎双球菌を蛍光色素によって染色し、経鼻投与 24 時間後に肺における蛍光色素の分布を FACS によって解析したところ、蛍光色素は主に AM に取り込まれていることが判明した。すなわち、肺炎双球菌を取り込んでいる主な細胞は AM であることを示唆している(下図)。



Listeriaの場合と違い、IFN- $\beta$ 産生にはCCR2による集積が必須であることが示唆された(下図)。その他のシグナル伝達分子の影響は現在解析を継続している。



## 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)

[学会発表] (計3件)

① Yutaro Kumagai, Shizuo Akira, Identification and Characterization of in vivo IFN- $\beta$  Producing Cells upon Bacterial Infection. Towards Comprehensive Understanding of Immune Dynamism 2011, 2011年3月1日、千里阪急ホテル (大阪)

② Yutaro Kumagai, Shizuo Akira, Identification of in vivo IFN- $\beta$  producing cells in response to bacterial infection. 14th International Congress of Immunology, 2010年8月25日、神戸国際展示場 (神戸)

③ Yutaro Kumagai, Osamu Takeuchi, Shizuo Akira, Identification of in vivo IFN- $\beta$  producing cells in response to bacterial infection. 第39回日本免疫学学会学術集会、2009年12月4日、大阪国際会議場 (大阪)

[その他]

ホームページ等

<http://hostdefense.ifrec.osaka-u.ac.jp/ja/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊谷 雄太郎 (Yutaro Kumagai)