

令和元年6月5日現在

機関番号：16101

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2014～2018

課題番号：26110008

研究課題名(和文)細胞死制御異常によるヒト遺伝性疾患の病態解明

研究課題名(英文)Dysregulated cell death-associated human disorders

研究代表者

安友 康二(YASUTOMO, Koji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授

研究者番号：30333511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 71,000,000円

研究成果の概要(和文)：家族性寒冷蕁麻疹の原因遺伝子としてNLRC4変異を同定し、NLRC4変異により過剰なパイロプトーシスとサイトカイン放出が病気の原因であることを発見した。小腸に存在する上皮間リンパ球はNotchシグナルを受容することでAtp8a2の発現を調節していることを見出した。Notchシグナルが欠損するとflippase活性が低下し、マクロファージからの貪食が亢進することでTCR⁺CD8⁺T cells数が著減することを見出した。肺線維症の原因遺伝子を同定し同変異を持つマウスを樹立した。マウスモデルの解析から2型肺上皮細胞の細胞死の亢進が初期病態であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞死の機能異常が関わる遺伝性疾患の原因遺伝子を同定することに成功し、その解析から各種の細胞死の機能異常が重篤な炎症病態を引き起こしうるということが明らかになった。その成果から、重篤な炎症性疾患の治療標的として細胞死の分子経路が該当すると考えられ、今回の研究成果は創薬開発にとって極めて重要な知見をもたらしたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have identified the mutation in NLRC4 as the causative mutation of familial cold autoinflammatory syndrom. The mutation increased the pyroptosis of cells, which is associated with the increased cytokine secretion leading to the inflammation. We also identified the causative gene of familial pulmonary fibrosis and the mutation increased the cell death of type 2 alveolar epithelial cells. The Notch signaling controls the expression of Atp8a2 that has flippase activity. The Notch-mediated expression of Atp8a2 helps the escape of intraepithelial lymphocytes in the small intestine from the engulfment of macrophages.

研究分野：免疫学

キーワード：慢性炎症 遺伝学 肺線維症 蕁麻疹 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

生体の恒常性を維持するためには、多様な刺激に依存した細胞死が誘導されることが必要であり、その一方で細胞死に陥った細胞を効率的に排除する機構も存在しなくてはならない。また、最近の研究により、細胞死に陥った細胞そのものあるいは死細胞から放出される因子が、免疫・炎症応答などの各種生体応答に関与している事が明らかになっている。しかし、死細胞によって誘導される生体応答がヒト疾患の発症や進展にどのように寄与しているかについての詳細は不明である。

我々はこれまで、ヒト疾患の発症および進展に決定的に寄与する分子機構を解明するために、遺伝性免疫疾患の原因遺伝子を同定し、その遺伝子産物の機能を明らかにする研究を実施してきた。最近の研究で、細胞死関連分子を遺伝性免疫疾患の原因遺伝子として同定し、細胞死異常とヒト免疫疾患との因果関係を示唆する新たな知見を得た。以上の研究背景から、細胞死が病態発症に寄与する遺伝性免疫疾患の原因遺伝子機能を明らかにし、細胞死の制御異常がどのようにヒト疾患の病態に関与するかについての分子機構を解明する事が重要であると考えられた。

2. 研究の目的

目標1. 細胞死応答がヒト免疫疾患の病態を形成する分子機構解明

研究代表者は、家族性免疫・炎症性疾患の原因遺伝子同定研究から、DNase1, PSMB8を含む各種のヒト免疫疾患を誘導する単一遺伝子変異を同定してきた。その原因遺伝子の機能解析の結果、遺伝子変異により細胞死が亢進し、偏向した免疫応答が誘導されることが病態形成に関与しているという知見を得ている。例を挙げると、家族性肺線維症および新規の自己炎症性疾患の原因遺伝子として同定された遺伝子変異を持つ細胞では細胞死の亢進が組織炎症に関与することを明らかにしている(未発表)。以上の成果を基盤として、本研究ではヒト疾病の原因遺伝子変異によって細胞死が誘導されるメカニズムと、細胞死によって引き起こされる免疫応答の分子基盤を明らかにすることを目的とする。本研究により、細胞死のヒト疾病形成における役割に加えて、細胞死の質的あるいは量的違いがヒト免疫応答の恒常性維持に対してどのような役割を持つかについて明らかにすることを旨とする。

目標2. 細胞死に関わる分子群の機能異常と免疫系との関連

細胞死の種類によって、その後引き起こされる免疫応答や炎症応答は異なることが知られている。本研究では、各種の細胞死に関わる分子の機能異常がどのようにその後の免疫応答の差異に関係するかについて明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

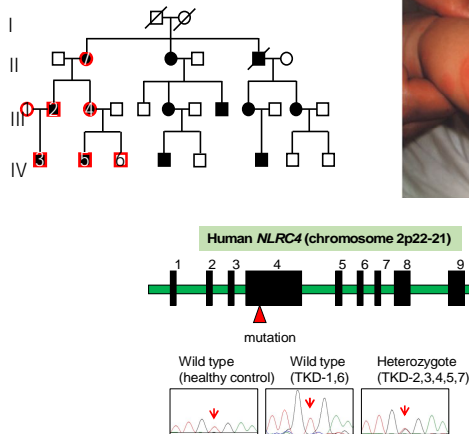
- (1) ヒト遺伝学の手法を用いて家族性炎症性疾患の原因遺伝子を同定する。具体的には、エクソーム解析、連鎖解析、ホモ接合体マッピングなどの手法を用いて原因変異を同定する。
- (2) (1)の研究によって得られた原因遺伝子についてはその変異が分子機能にどのように影響を与えるかについて生化学的に検討する。
- (3) (1)の研究によって得られた同変異を持つマウスを樹立して、変異が病態に与える影響を個体レベルで検証する。
- (4) 各種の遺伝子改変マウスを用いて細胞死に関わる分子群の機能異常と免疫系との関係性について検証する。

4 . 研究成果

(1) 家族性寒冷蕁麻疹の原因遺伝子の同定研究

家族性寒冷蕁麻疹は寒冷刺激に反応して蕁麻疹様発疹と発熱などを示す疾患群である。日本人の一家系のゲノム解析から、家族性寒冷蕁麻疹の原因遺伝子として NLRC4 変異を同定することに成功した。NLRC4 変異により過剰なパイロプトシスとサイトカイン放出

家族性寒冷蕁麻疹 (FCAS)



が引き起こされ、それが病気の原因になっていることを解明した。また、NLRC4 変異をもつモデルマウスを作成し、IL-18 が NLRC4 変異によって引き起こされる炎症病態の鍵分子であることを同定した。

さらに、NLRC4 変異マウスの足に寒冷刺激を与えると、炎症反応の増強が認め

られたことから、寒冷刺激に反応する炎症についてもこのマウスでは再現できていると考えられた。以上から、NLRC4 の過剰な活性化はパイロプトシスの増強を介して、ヒト疾患の発症に関わることが証明された。

(2) 家族性肺線維症の原因遺伝子の同定とその機能解析

肺線維症の原因遺伝子を同定して、同変異を持つマウスを樹立した。モデルマウスでも肺線維症を自然発症し、マウスモデルの解析から 2 型肺胞上皮細胞の細胞死の亢進が初期病態であることを見出した。

(3) 細胞死に関わる分子群の免疫系における役割の検証

小腸に存在する上皮間リンパ球の $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD}8\alpha\alpha^+$ T cells は Notch シグナルを受容することで $\text{Atp}8\text{a}2$ の発現を調節していることを見出した。Notch シグナルが欠損すると flippase 活性が低下し、マクロファージからの貪食が亢進することで $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD}8\alpha\alpha^+$ T cells 数が著減することを見出した。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)以下すべて査読有り

1. Yasutomo K. Dysregulation of immunoproteasomes in autoinflammatory syndromes. *Int Immunol* (2019) in press doi: 10.1093/intimm/dxy059
2. Ishifune C, Tsukumo SI, Maekawa Y, Hozumi K, Chung DH, Motozono C, Yamasaki S, Nakano H, Yasutomo K. Regulation of membrane phospholipid asymmetry by Notch-mediated flippase expression controls the number of intraepithelial $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD}8\alpha\alpha^+$ T cells. *PLoS Biol*

17(5):e3000262 (2019) doi: 10.1371/journal.pbio.3000262

3. Ikeda K, Kinoshita M, Kayama H, Nagamori S, Kongpracha P, Umemoto E, Okumura R, Kurakawa T, Murakami M, Mikami N, Shintani Y, Ueno S, Andou A, Ito M, Tsumura H, Yasutomo K, Ozono K, Takashima S, Sakaguchi S, Kanai Y, Takeda K. Slc3a2 mediates branched-chain amino-acid-dependent maintenance of regulatory T cells. *Cell Rep* 21:1824-1838 (2017) doi: 10.1016/j.celrep.2017.10.082
4. Saito Y, Respatika D, Komori S, Washio K, Nishimura T, Kotani T, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H, Kaneko Y, Yui K, Yasutomo K, Nishigori C, Nojima Y, Matozaki T. SIRP α ⁺ dendritic cells regulate homeostasis of fibroblastic reticular cells via TNF receptor ligands in the adult spleen. *Proc Natl Acad Sci USA* 114:E10151-E10160 (2017) doi: 10.1073/pnas.1711345114
5. Zaman TS, Arimochi H, Maruyama S, Ishifune C, Tsukumo SI, Kitamura A, Yasutomo K. Notch balances Th17 and induced regulatory T cell functions in dendritic cells by regulating *Aldh1a2* expression. *J Immunol* 199:1989-1997 (2017) doi: 10.4049/jimmunol.1700645
6. Niki M, Nakajima K, Ishikawa D, Nishida J, Ishifune C, Tsukumo SI, Shimada M, Nagahiro S, Mitamura Y, Yasutomo K. MicroRNA-449a deficiency promotes colon carcinogenesis. *Sci Rep* 7:10696 (2017) doi: 10.1038/s41598-017-10500-0
7. Okamura K, Kitamura A, Sasaki Y, Chung DH, Kagami S, Iwai K, Yasutomo K. Survival of mature T cells depends on signaling through HOIP. *Sci Rep* 6:36135 (2016) doi: 10.1038/srep36135
8. Furukawa T, Ishifune C, Tsukumo SI, Hozumi K, Maekawa Y, Matsui N, Kaji R, Yasutomo K. Transmission of survival signals through Delta-like 1 on activated CD4⁺ T cells. *Sci Rep* 6:33692 (2016) doi: 10.1038/srep33692
9. Gamrekelashvili J, Giagnorio R, Jussofie J, Soehnlein O, Duchene J, Briseño CG, Ramasamy SK, Krishnasamy K, Limbourg A, Kapanadze T, Ishifune C, Hinkel R, Radtke F, Strobl LJ, Zimmer-Strobl U, Napp LC, Bauersachs J, Haller H, Yasutomo K, Kupatt C, Murphy KM, Adams RH, Weber C, Limbourg FP. Regulation of monocyte cell fate by blood vessels mediated by Notch signaling. *Nat Commun* 7:12597 (2016) doi: 10.1038/ncomms12597
10. Arimochi H, Sasaki Y, Kitamura A, Yasutomo K. Differentiation of preadipocytes and mature adipocytes requires PSMB8. *Sci Rep* 6: 26791 (2016) doi: 10.1038/srep26791
11. Maekawa Y, Ishifune C, Tsukumo SI, Hozumi K, Yagita H, Yasutomo K. Notch controls the survival of memory CD4⁺ T cells by regulating glucose uptake. *Nat Med* 21:55-61 (2015) doi: 10.1038/nm.3758
12. Oh SJ, Ahn S, Jin YH, Ishifune C, Kim JH, Yasutomo K, and Chung DH. Notch 1 and Notch 2 synergistically regulate the differentiation and function of invariant NKT cells. *J Leukoc Biol* 98:781-789 (2015) doi: 10.1189/jlb.1A0914-459RR
13. Kitamura A, Sasaki Y, Abe T, Kano H, Yasutomo K. An inherited mutation in *NLRC4* causes autoinflammation in human and mice. *J Exp Med* 211:2385-2396 (2014) doi: 10.1084/jem.20141091

[学会発表](計 12件)

1. Koji Yasutomo :

- Genetic dissection of chronic inflammatory disorders,
ICIS 2017, Oct. 2017.
2. 安友 康二 :
炎症性病態をゲノムから紐解く,
第 26 回 日本 Cell death 学会, 2017 年 7 月
 3. 安友 康二 :
ゲノム機能学からみた炎症・免疫,
第 38 回日本炎症・再生医学会, 2017 年 7 月
 4. 安友 康二 :
細胞死機能異常と炎症病態,
日本 Cell Death 学会, 2016 年 9 月
 5. 安友 康二 :
遺伝解析から慢性炎症病態を紐解く,
第 44 回日本臨床免疫学会総会, 2016 年 9 月
 6. 安友 康二 :
慢性炎症のモデル動物,
第 9 回 In vivo 実験医学シンポジウム, 2015 年 12 月
 7. 安友 康二 :
慢性炎症のゲノム解析,
Wako ワークショップ, 2015 年 11 月
 8. Koji Yasutomo :
Dysregulated cell death and inflammatory disorders,
WEHI/Dying code symposium, Oct. 2015.
 9. Chieko Ishifune and Koji Yasutomo :
Notch-STAT5b signaling regulates the TCRalpha beta+ CD8alpha alpha+ intraepithelial
lymphocytes in the small intestine,
17th International Congress of Mucosal Immunology, Berlin, Jul. 2015.
 10. Koji Yasutomo :
Genetic analysis of autoinflammatory syndrome,
The 10th IMS-JSI International Symposium on Immunology, Jun. 2015.
 11. Koji Yasutomo :
Notch regulates CD4 T cell memory T cells,
Annual Meeting of Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology, May 2015.
 12. 安友 康二 :
生体を制御するセンサー群,
第 87 回 日本生化学会大会シンポジウム, 2014 年 10 月.

〔図書〕(計 1 件)

Koji Yasutomo :
Notch Signaling,
Springer, Aug. 104 ページ(2017).

〔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

<http://immunology.hosp.med.tokushima-u.ac.jp/immunology/system/top/>

6．研究組織

(1)研究分担者

該当無し

(2)研究協力者

該当無し

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。