

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06640

研究課題名(和文) Bach2遺伝子欠損マウスを用いた続発性肺胞蛋白症発症機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of secondary PAP using Bach2-deficient mice

研究代表者

渋谷 里紗 (Shibuya, Risa)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：90778408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：肺胞マクロファージにおけるBach2は、T細胞から分泌されるサイトカインによって発現が誘導され、炎症関連遺伝子や、脾臓赤脾髄マクロファージ特異的な遺伝子に結合し、その発現を抑制することで肺胞マクロファージとしての正常な機能を維持していた。Bach2遺伝子欠損マウスにおいて、CD4陽性T細胞を枯渇させると肺胞蛋白症が治癒することを見出し、T細胞を標的とした治療が肺胞蛋白症の新規治療となりうることを発見した。

Bach1/Bach2二重欠損マウスは、Bach2遺伝子欠損マウスより早期から重篤な肺胞蛋白症を発症することを発見し、これら2つの転写因子が相補的に肺の恒常性を維持していることを報告した。

研究成果の概要(英文)：Using mice lacking Bach2 in specific cell types, we found that the Pulmonary alveolar proteinosis (PAP)-phenotype of Bach2-deficient mice is due to Bach2 deficiency in more than two types of immune cells. Depletion of hyper-activated T cells in Bach2-deficient mice restored normal function of alveolar macrophages (AMs) and ameliorated PAP. Hyperactivated T cells induced gene expression patterns that are specific to other tissue-resident macrophages and dendritic cells in AMs, in which Bach2 then bound to regulatory regions of these genes. We conclude that Bach2 is critical for the maintenance of AM identity in inflammatory environments. The Bach1/Bach2 double-deficient mice showed a more rapid and severe PAP phenotype than Bach2-deficient mice with abnormal AMs, whereas the Bach1-deficient mice did not develop any pulmonary disease. Bach1 and Bach2 work in a complementary manner to maintain the normal function of the AMs and surfactant homeostasis in the lung.

研究分野：呼吸器

キーワード：肺胞蛋白症 肺胞マクロファージ Bach2 Bach1 免疫 炎症

1. 研究開始当初の背景

1) 肺胞蛋白症の病態生理

肺胞蛋白症は、肺胞内に肺胞サーファクタントが異常に貯留する呼吸器疾患である。余剰な肺胞サーファクタントは肺胞マクロファージによって貪食・代謝されることで全体量の調節が行われている。肺胞蛋白症の主な発症機序は、肺胞マクロファージの脂質処理能力の異常である。肺胞マクロファージの脂質処理能が正常に機能するためには、GM-CSF シグナルの下流で転写因子 PU.1 遺伝子の発現が誘導され、さらにその下流で転写因子 Ppar が作用することで分化が完了し、脂質処理関連遺伝子の発現が誘導されることが必要である。肺胞マクロファージの機能異常の背景の1つには、このシグナルの破綻に起因する、肺胞マクロファージの分化障害があることが明らかとなっている。一方で、骨髄異形成症候群などの血液腫瘍などに続発して起こる続発性肺胞蛋白症の原因は明らかとなっていない。

2) 転写因子 Bach2 の多様な機能

Bach (BTB and CNC homology) 因子は、MafK (musculoaponeurotic fibrosarcoma K) などの小 Maf と 2 量体を形成することで MARE (Maf recognition element : Maf 認識配列) に結合し、遺伝子発現を抑制する転写因子である。Bach2 は B 細胞における形質細胞への分化や、クラススイッチ DNA 組み換えによる抗体の多様性獲得の制御、T 細胞におけるエフェクター T 細胞の分化に関わる遺伝子の発現の抑制、Common lymphoid progenitor や造血幹細胞における、白血球分化のバランス制御を行っている。

3) Bach2 遺伝子欠損マウスの肺胞蛋白症

申請者は、Bach2 が肺胞マクロファージで発現していること、Bach2 遺伝子欠損マウスは肺胞蛋白症を発症していることを発見し、転写因子 Bach2 がマウスにおける肺胞蛋白症の発症に関与していることを発見した。Bach2 遺伝子欠損肺胞マクロファージは貪食能と脂質代謝が低下していたが、GM-CSF 経路は正常であった。Bach2 遺伝子欠損マウスの肺胞マクロファージでは、脂質代謝、炎症応答および M2 マクロファージに関わる遺伝子群に大きな変動を認めた。以上より、Bach2 遺伝子欠損マウスの肺胞蛋白症の発症機序は、GM-CSF 経路を介さない、肺胞マクロファージの機能異常が原因であると考えられた。そこで、野生型マウスの骨髄を Bach2 遺伝子欠損マウスに移植したところ、肺胞蛋白症の発症を抑え、発症後でも症状を改善させることに成功した。以上の結果から、Bach2 は肺胞マクロファージの機能的成熟と維持に必要であり、GM-CSF とは別のシステムとして、肺の恒常性を維持していると考えられた。

2. 研究の目的

続発性肺胞蛋白症は背景となる疾患が多

岐に渡り、その発症機序は不明であった。そのため、原疾患の治療以外に有効な治療法は確立されていない。症状の軽減目的に、全身麻酔下での気管支肺胞洗浄が行われるが、根本的な治療には至らない。続発性肺胞蛋白症の発症機序を解明することにより、非侵襲的な方法で続発性肺胞蛋白症の治療が可能になると期待される。

Bach2 遺伝子欠損マウスは正常に発達するものの、生後 8 週齢頃から肺胞蛋白症を発症する。申請者は、この病態が続発性肺胞蛋白症に類似することを報告した (J. Exp. Med. 2013)。本研究では、Bach2 遺伝子欠損マウスをモデルとして肺胞蛋白症の発症機序を明らかにし、肺胞マクロファージの機能を制御する遺伝子や細胞のネットワークを明らかにすることで、ヒトにおける続発性肺胞蛋白症の病態解明と新たな治療戦略を考案する。

3. 研究の方法

(1) Bach2 遺伝子欠損肺胞マクロファージの遺伝子発現パターンと、ミエロイド系細胞における Bach2 の標的遺伝子を網羅的に解析した。

(2) 細胞特異的 Bach2 遺伝子欠損マウスの表現型を体系的に解析した。

(3) T 細胞を標的とした続発性肺胞蛋白症の新規治療法について検討した。

(4) Bach1/Bach2 二重欠損マウスの表現型及び肺胞マクロファージの遺伝子発現パターンを網羅的に解析した。

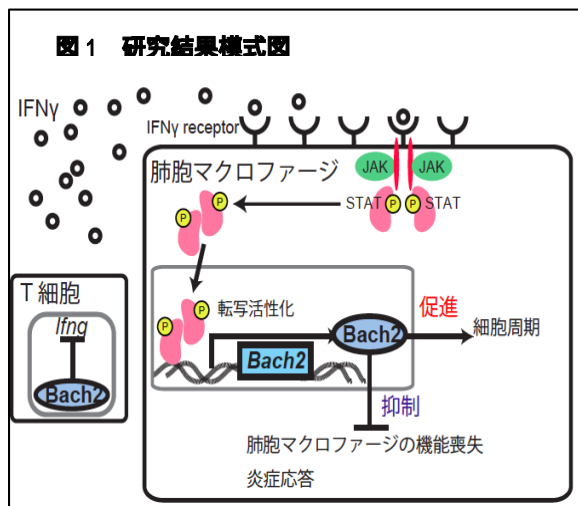
4. 研究成果

(1) 肺胞マクロファージにおける Bach2 の機能の解明

Bach2 遺伝子欠損マウスの肺胞マクロファージの遺伝子発現パターンを、マイクロアレイを用いて網羅的に解析したところ、肺胞マクロファージ特異的な遺伝子発現パターンを失う一方で、脾臓赤脾髄マクロファージや腹腔マクロファージに特異的な遺伝子発現パターンを示していた。このような遺伝子発現変化に伴う機能の喪失が、肺胞蛋白症を発症させていると考えられた。次に、肺胞マクロファージにおける Bach2 の標的遺伝子を明らかにするために、ミエロイド系細胞における Bach2 の結合領域を Chromatin immunoprecipitation sequence (ChIP-seq) によって調べた。その結果、Bach2 は 116 を含む多くの炎症関連遺伝子や、SpiC などを含む脾臓赤脾髄マクロファージ特異的な遺伝子に結合し、その発現を抑制していた。また、これまで Bach2 は転写抑制因子であると考えられていたが、Bach2 は多くのヒストン遺伝子に結合し、それら遺伝子の発現を促進していることも明らかとなった。

(2) 肺胞蛋白症における細胞間相互作用の解明

Bach2 遺伝子欠損マウスの肺胞洗浄液中に、リンパ球の浸潤を認めた。T 細胞において Bach2 は Il4, Il6, Ifng などの炎症性サイトカインの遺伝子発現を抑制している。従って Bach2 遺伝子欠損マウスの肺環境において、Bach2 欠損 T 細胞で分泌されたこれらサイトカインが肺胞マクロファージの性質を変えている可能性が示唆された。そこで、この可能性を検証するために、複数の遺伝子改変マウスの表現型を解析した。まず、リンパ球を持たず Bach2 を欠損した Bach2/Rag2 二重欠損マウスを作成した。このマウスが肺胞蛋白症を発症しなかったことから、次に、B 細胞特異的 Bach2 遺伝子欠損マウスと T 細胞特異的 Bach2 遺伝子欠損マウスを解析したところ、そのどちらでも肺胞蛋白症を発症しなかった。しかし、T 細胞特異的 Bach2 遺伝子欠損マウスの肺では、Bach2 遺伝子欠損マウスと同様の炎症細胞の浸潤を認めた。これらの結果から、肺胞マクロファージで発現している Bach2 が炎症のある環境下で機能し、性質の変化を食い止めている可能性を考えた。さらに、T 細胞特異的 Bach2 遺伝子欠損マウスの肺胞マクロファージにおいて、Bach2 の発現が亢進していること、野生型マウスの肺胞マクロファージをインターフェロン で刺激すると、Bach2 の発現が誘導されることを発見した。Bach2 が、炎症関連遺伝子や脾臓赤脾髄マクロファージ特異的遺伝子の発現を抑制していることから、肺胞マクロファージにおいて、Bach2 は、炎症反応に応答した機能喪失を抑える guardian として機能し、細胞間ネットワークを制御していることが明らかとなった (図 1)。



(3) 肺胞蛋白症の新規治療法の発見

Bach2 遺伝子欠損マウスにおいて、抗体を用いて CD4 陽性 T 細胞を枯渇させたところ、肺胞蛋白症が治癒することを見出し、T 細胞を標的とした治療が肺胞蛋白症の新規治療となりうることを発見した。

(4) Bach1/Bach2 の相補的機能の解明

Bach2 が血液細胞特異的に発現するのに対し、Bach1 は様々な細胞や組織で発現する転写抑制因子である。申請者は、Bach1 遺伝子欠損マウスは肺胞蛋白症を発症しないにも関わらず、Bach1/Bach2 二重欠損マウスは、Bach2 遺伝子欠損マウスと比較してより早期から重篤な肺胞蛋白症を発症することを発見し、これら 2 つの転写因子が互いに相補的機能を持って肺の恒常性を維持していることを報告した。

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 2件 全て査読あり)

Risa Ebina-Shibuya, Miki Watanabe-Matsui, Mitsuyo Matsumoto, Ari Itoh-Nakadai, Ryo Funayama, Keiko Nakayama, Akihiko Muto, Kazuhiko Igarashi. The double knockout of Bach1 and Bach2 in mice reveals shared compensatory mechanisms in regulating alveolar macrophage function and lung surfactant homeostasis.

J Biochem. Dec;160(6):333-344, 2016 (selected as a Featured Article by Editor-in-Chief, a prize for the best paper 2017)

DOI: 10.1093/jb/mvw041

Risa Ebina-Shibuya, Mitsuyo Matsumoto, Makoto Kuwahara, Kyoung-Jin Jang, Manabu Sugai, Yoshiaki Ito, Ryo Funayama, Keiko Nakayama, Yuki Sato, Naoto Ishii, Yasunobu Okamura, Kengo Kinoshita, Kohei Kometani, Tomohiro Kurosaki, Akihiko Muto, Masakazu Ichinose, Masakatsu Yamashita, Kazuhiko Igarashi.

Inflammatory responses induce an identity crisis of alveolar macrophages leading to pulmonary alveolar proteinases.

J Biol Chem. Nov 3;292(44):18098-18112, 2017

DOI: 10.1074/jbc.M117.808535

[学会発表](計 3件)

Risa Ebina-Shibuya, Makoto Kuwahara, Mitsuyo Matsumoto, Masakatsu Yamashita, Kyoung-Jin Jang, Manabu Sugai, Yoshiaki Ito, Ryo Funayama, Keiko Nakayama, Kohei Kometani, Tomohiro Kurosaki, Akihiko Muto, Kazuhiko Igarashi

Bach2 keeps homeostasis in lung by regulating inflammatory response and maintaining function of alveolar macrophage. (Poster)

The 24th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages

(2016)

Risa Ebina-Shibuya, Mitsuyo Matsumoto, Yuki Sato, Keiko Nakayama, Naoto Ishii, Kengo Kinoshita, Tomohiro Kurosaki, Akihiko Muto, Masakazu Ichinose, Masakatsu Yamashita, Kazuhiko Igarashi
Bach2 maintains homeostasis in the lung by modulationg the inflammatory interaction between macrophages and T cells (Poster)
The 19th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience (2017)

Risa Ebina-Shibuya, Mitsuyo Matsumoto, Makoto Kuwahara, Kyoung-Jin Jang, Manabu Sugai, Yoshiaki Ito, Ryo Funayama, Keiko Nakayama, Yuki Sato, Naoto Ishii, Yasunobu Okamura, Kengo Kinoshita, Kohei Kometani, Tomohiro Kurosaki, Akihiko Muto, Masakazu Ichinose, Masakatsu Yamashita, Kazuhiko Igarashi
Bach2 keeps homeostasis in lung by maintaining the function of alveolar macrophages in inflammatory environment (Poster)
The 2017 Japan-NIH joint Symposium (2017)

〔図書〕(計 0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

なし

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)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渋谷 里紗 (SHIBUYA Risa)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号: 90778408

(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

()