

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06830

研究課題名（和文）炎症性サイトカインIL-1を起点とする新規シグナル軸の解明と線維化・がんとの関連

研究課題名（英文）Novel signaling axis triggered by inflammatory cytokine IL-1 and its relation to fibrosis and cancer

研究代表者

日笠 弘基（Hikasa, Hiroki）

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40596839

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：慢性炎症は線維化・がん化の大きなリスクファクターであるが、その分子機序は不明であり、有用な慢性炎症関連病態モデルマウスは非常に少ない。我々はIL-1に応答して、下流のキナーゼIRAK1が従来のNF- κ B経路だけでなく、線維化やがん化に密接に関与する-カτεニンを活性化し、それがPPPSPモチーフに依存したヒトに特有の現象であることを見出した。さらに、生体内でヒトIRAK1の機能を解析するために、ゲノム内のマウスIrak1をアミノ酸置換したマウス（ヒト化マウス）と、組織特異的ヒトIRAK1発現トランスジェニックマウスの2種のマウスの樹立に成功し、解析を開始した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性炎症が線維化・がん化を惹起することが知られているが、それらの発症過程を反映する病態モデルマウスは少なく、その機序は不明な点が多い。ゆえに引き金となる鍵分子の同定とそれを利用したモデルマウスの樹立は急務である。さらに、近年の研究動向では、がん分野におけるIRAK1研究はますます注目されることが予想される。それゆえ、本研究を今後も進めることで、慢性炎症からの線維化・がん化のメカニズムの一端が解明できれば、先んじてがん生物学や医学の予防・治療戦略に大きく寄与するものになると期待される。

研究成果の概要（英文）：Chronic inflammation is closely related to fibrosis and cancer, but its molecular mechanisms are unknown and there are very few useful mouse models of chronic inflammation-related pathologies. We found that in response to IL-1, the downstream kinase IRAK1 activates not only the conventional NF- κ B pathway but also -catenin, which is closely related to fibrosis and cancer. This activation of -catenin by IRAK1 is in a PPPSP motif-dependent and human-specific manner. Furthermore, in order to analyze the function of human IRAK1 in vivo, we succeeded in establishing two types of mice: mice with amino acid substitutions of mouse Irak1 in the genome (humanized mice) and tissue-specific human IRAK1-expressing transgenic mice, and started analysis.

研究分野：生化学

キーワード：炎症性シグナル Wnt経路 IRAK1 病態モデルマウス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炎症部位に浸潤した炎症細胞から産生される IL-1 や TNF 等の炎症性サイトカインの常態的な刺激は、下流の転写因子 NF- κ B の活性化を介して慢性炎症を引き起こし、肺、肝臓、胃、大腸など種々の組織の線維化やがん化の原因となると考えられているが、その病態発生機序はよくわかっていない。慢性炎症における線維化では、Wnt/ β -カテニン経路による上皮間葉転換も主要因の一つであり、さらにこのシグナルは種々の組織でがん化のドライバーであることも知られている。本研究を開始するまでの先行実験で IL-1 受容体経路の因子である IRAK1 が Wnt/ β -カテニン経路を活性化することが明らかとなり(図1)、ヒト IRAK1 の恒常的活性化が、慢性炎症が惹起する線維化・がん化・悪性化の原因か否かという問いを立て、本研究を始動した。

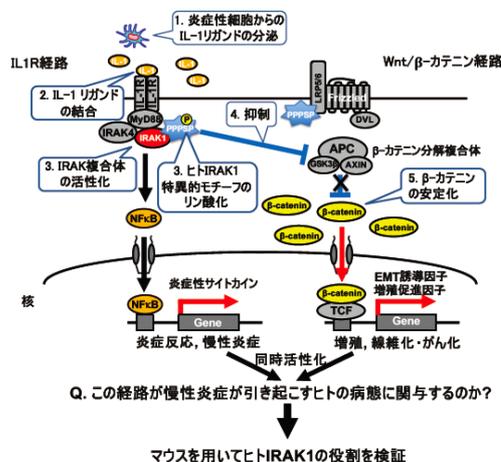


図1 IL-1-IRAK1 経路による NF- κ B と β -カテニンの同時活性化

2. 研究の目的

これまで IL-1 受容体経路が関連する疾患の解析や解釈は NF- κ B 等の免疫応答経路が中心であり、その他のシグナルとのクロストークは十分に検証されてこなかった。本研究では、炎症性シグナルと線維化・発がんシグナルを繋ぐ新シグナル軸の独自の発見に基づいて、その鍵因子候補であるヒト IRAK1 を組織特異的に発現するマウス、およびヒト IRAK1 の機能をマウス Irak1 に付与したヒト化 Irak1 マウスを作製し、その解析を行うことで、慢性炎症が引き起こす線維化・がん化の分子機序の理解と新規病態モデルマウスの開発を目指している。さらに申請者は、腫瘍で見られる種々のヒト IRAK1 の体細胞変異が β -カテニンと NF- κ B の活性化を大きく増強させることを見出し、これまでに一番活性の高い変異を持つヒト IRAK1 を遺伝子ノックインしたマウスも作製に着手しており、これを解析することで新規ドライバー遺伝子変異の発見も期待できる。

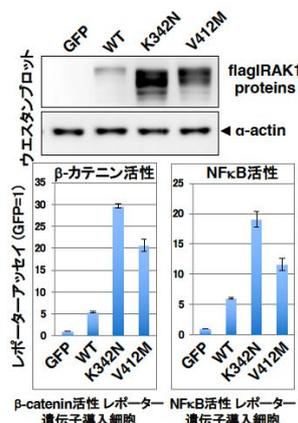


図2 ヒト IRAK1 変異体の発現と活性腫瘍で報告されたヒト IRAK1 の体細胞変異は発現量、 β -カテニン活性、NF- κ B 活性を大幅に上昇させる。

3. 研究の方法

< 課題 1: 腫瘍におけるヒト IRAK1 の体細胞変異の検索とその活性評価 >

先行実験として、これまで報告のあった上気道消化管がんやグリオーマの IRAK1 の体細胞変異 (K342N, V412M) はタンパク質量を増大させ、大幅に β -カテニン活性と NF- κ B 活性を増大させることが明らかとなった(図2)。これにより、IRAK1 の体細胞変異が種々の組織の腫瘍化に関与している可能性が考えられたので、がん関連体細胞変異データベース(COSMIC)で検索したところ、多くの体細胞変異が確認できた(図3)。そして、それらの β -カテニン活性と NF- κ B 活性をレポーター細胞を用いて解析する。その後最も活性が強い変異体をトランスジェニックマウスに導入して、野生型と比較する。

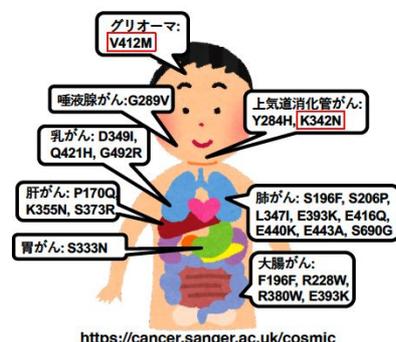


図3 各種腫瘍での IRAK1 の体細胞変異 先行実験により、K342N、412変異は発現量、 β -カテニン活性、NF- κ B 活性が増大することがわかっている。

<課題2:マウスを用いたヒト IRAK1 の役割と病態の解析>

本申請では、ヒト IRAK1 特有である β -カテニンと NF κ B の同時活性化能の病態への影響を、特にヒト IRAK1 が予後不良因子である肺と肝臓に注目して研究を行う。IRAK1 による β -カテニン活性はマウス Irak1 に保存されていないため、本申請では、マウス *Irak1* 遺伝子座の相同領域に2アミノ酸を置換し、PPPSPモチーフを付与した Irak1 を持つマウス(ヒト化 Irak1 マウス)

セーフハーバー遺伝子座 Rosa26 に、遺伝子組み換え酵素 Cre 依存的、野生型ヒト IRAK1 遺伝子発現カセットを導入したトランスジェニックマウス(以下、ヒト IRAK1-Tg マウス)のゲノム編集マウスを用いて表現型の解析を行う。

4. 研究成果

<課題1:腫瘍におけるヒト IRAK1 の体細胞変異の検索とその活性評価>

これまでの報告と申請者の先行実験により、IRAK1 が多様な組織のがんで高頻度に発現上昇していること、4つのヒト IRAK ファミリーのうち、PPPSPモチーフを持つ IRAK1 のみが β -カテニンを活性化し、かつ肺がん、肝がん、乳がんの予後増悪因子であること(図4) ヒト IRAK1 は β -カテニンと NF κ B の両経路を活性化する作用を持ち(以下 β -カテニン活性、NF κ B 活性) 腫瘍でみられる体細胞変異は両活性を大幅に増強すること(図2)、アミノ酸置換により、マウス *Irak1* に PPPSPモチーフを付与すると、 β -カテニン活性を獲得すること(図5)等が明らかになってきた。

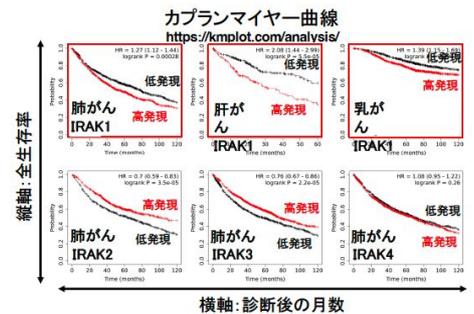


図4 ヒトIRAK1は各種がんの予後不良因子である。IRAK1の高発現は、肺がん、肝がん、乳がんで予後不良となる。 β -カテニン活性を持たないその他のIRAKファミリーは肺がんで予後不良因子とならない。

<課題2:マウスを用いたヒト IRAK1 の役割と病態の解析>

本申請では、ヒト IRAK1 特有である β -カテニンと NF κ B の同時活性化能の病態への影響を、特にヒト IRAK1 が予後不良因子である肺と肝臓に注目して研究を行っている。IRAK1 による β -カテニン活性はマウス *Irak1* に保存されていないため、本研究では、マウス *Irak1* 遺伝子座の相同領域に2アミノ酸を置換し、PPPSPモチーフを付与した Irak1 を持つマウス(ヒト化 Irak1 マウス; 図6左)

セーフハーバー遺伝子座 Rosa26 に、遺伝子組み換え酵素 Cre 依存的、野生型および変異型ヒト IRAK1 遺伝子発現カセットを導入したトランスジェニックマウス(以下、ヒト IRAK1-Tg マウス; 図6右)の2種のゲノム編集マウスの作製に成功し、それらを用いて病態解析を行っている。肺特異的ヒト IRAK1-Tg マウスでは、高濃度のタモキシフェン投与で、肺が充血・肥大し、数日中に死亡することが示された(図7)。現在は、長期に病態の変遷を観察するために、数日以内に致死を起こさない低濃度のタモキシフェン投与の条件を検討している段階である。

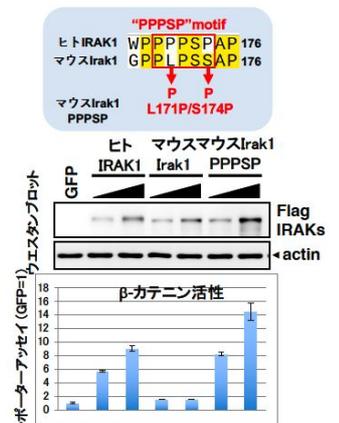


図5 PPPSPモチーフの作用
マウスIrak1にはPPPSPが保存されていないが、アミノ酸置換で付与すると β -カテニン活性が復活する。

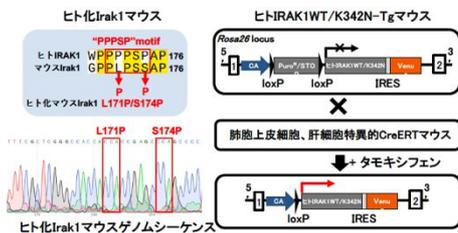


図6 ヒト化Irak1マウスと野生型および変異型ヒトIRAK1-TGマウス
ヒト化Irak1マウスは、ゲノム編集による2アミノ酸置換により、PPPSPモチーフを獲得している(左)。ヒトIRAK1-TGとCreERTマウスを掛け合わせたマウスにタモキシフェンを投与することで、適時にヒトIRAK1遺伝子を発現させることができる(右)。



図7 肺特異的ヒトIRAK1WT発現マウスの肺の形態
高濃度のタモキシフェンを投与すると(4 mg x 5回)、肺が充血・肥大し、数日以内に死亡する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shiraishi Y, Maehama T, Nishio M, Otani J, Hikasa H, Mak TW, Sasaki T, Honma T, Kondoh Y, Osada H, Yoshida M, Fujisawa M, Suzuki A.	4. 巻 27(10)
2. 論文標題 N-(3,4-dimethoxyphenethyl)-6-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine inhibits bladder cancer progression by suppressing YAP1/TAZ	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 602-612
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12979.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakatani K, Maehama T, Nishio M, Otani J, Yamaguchi K, Fukumoto M, Hikasa H, Hagiwara S, Nishina H, Mak TW, Honma T, Kondoh Y, Osada H, Yoshida M, Suzuki A.	4. 巻 112
2. 論文標題 Alantolactone is a natural product that potently inhibits YAP1/TAZ through promotion of reactive oxygen species accumulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Sci .	6. 最初と最後の頁 4303-4316
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15079.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 日笠弘基*, 三村恭弘, 乾 雅子, 大坪孝平, 平良真規
2. 発表標題 IL-1受容体経路因子であるヒトIRAK1の -カテニン活性化能は、ヒト特異的モチーフに依存する。
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三村 恭弘*, 大坪 孝平, 平良 真規, 日笠 弘基
2. 発表標題 TLR/IL-1R経路構成因子ヒトIRAK1のマウス肺特異的過剰発現の解析
3. 学会等名 第96回生化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yasuhiro Mimura, Masako Inui, Kohei Otsubo, Masanori Taira, Hiroki Hikasa*
2. 発表標題 Human interleukin-1 receptor-associated kinase1, a component of TLR/IL-1R pathways, activates b-catenin via its human-specific PPPSP motif.
3. 学会等名 EMBO Workshop: Wnt 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日笠弘基*, 三村恭弘、乾 雅子、大坪孝平、平良眞規
2. 発表標題 IL-1受容体経路因子であるヒトIRAK1は、そのヒト特異的モチーフを介して、IL-1による β -カテニン経路の活性化に寄与する。
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日笠弘基*, 三村恭弘、乾 雅子、大坪孝平、平良眞規
2. 発表標題 IL-1受容体経路因子であるヒトIRAK1はNF κ B経路と β -カテニン経路の同時活性化に 関与する。
3. 学会等名 第94回生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三村恭弘、乾雅子、平良眞規、大坪孝平、日笠弘基*
2. 発表標題 多様な腫瘍で過剰発現するIL-1受容体-NF κ B経路構成因子IRAK1は、Wnt/b-cateninシグナル経路を活性化する。
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 がん遺伝子産物YAP1/TAZ機能調節剤	発明者 日笠弘基、乾雅子、 上野光	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-218926	取得年 2022年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

産業医科大学 生化学 https://www.uoeh-u.ac.jp/medicine/seika.html

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	マウント・サイナイ・アイカーン医科大学		