

「生体と制御」研究領域 領域活動・評価報告書

—平成18年度終了研究課題—

研究総括 竹田 美文

1. 研究領域の概要

本領域は、感染症、アレルギー、免疫疾患などの発症メカニズムを生体機能や病原微生物との関わりに着目して、分子レベル、細胞レベルあるいは個体レベルで解析することにより、これらの疾患の新しい予防法、治療法の基盤を築く研究を対象としている。

具体的には、病原微生物のゲノム解析によって明らかになった情報や、ヒトゲノム計画の進展によって得られたゲノム情報を利用したワクチンの開発や遺伝性疾患の解析、あるいは生体防御反応・免疫応答に関わる分子の生体レベルでの解析による免疫系疾患の病因解明、およびそれらに対する新しい治療方法の探索を目指す研究等が含まれる。

2. 研究課題・研究者名

別紙一覧表参照

3. 選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は「生体と制御」領域に設けた選考委員8名と研究総括で行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
 - ・ 書類選考では1提案につき3名の選考委員が査読評価を行う。
 - ・ 書類選考の査読評価にあたっては、選考委員が応募者と近い関係にある場合には査読担当とならないように配慮する。
 - ・ 面接選考では、書類選考の順位と関係なく、改めて評価を行う。
 - ・ 面接選考において選考委員が候補者と近い関係にある場合には、その候補者の評価は棄権する。
- 3) 選考の基本的な考えは以下の通り
 - ① 「生体と制御」領域の趣旨に合致していること。
 - ② 独創性に富む発想が含まれていること。
 - ③ 独立して研究を進めることができ、活力・統率力に富み、研究グループを構成して研究を推進できる研究者であること。
 - ④ 提案された研究が予算的にも、期間的にも実施可能であること。

4. 選考の経緯

上記選考方針に基づき、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補者を選定した。

選考	書類選考	面接選考	採用者
対象者数	135名	16名	5名

5. 研究実施期間

平成15年10月～平成19年3月

6. 領域の活動状況

研究総括は研究開始に際し、全研究者を訪問し、研究者の所属する部署の長に協力を要請すると共に研究環境の確認を行った。その後、研究期間内に研究者が研究実施場所を移った際には新たな研究実施場所を訪問し、所属長に協力を要請すると共に、研究環境の確認等を行った。

研究期間中は半年に一回ずつ、総計6回の研究発表会(領域会議)を開催し、領域アドバイザーならびに研究分野を異にする研究者同士が討論の中で交流を深め、個々の研究者の視野が広がり、新しい研究の着想が得られるように留意した。また、最終年度には公開の研究報告会を開催し(東京コンファレンスセンター・品川)、3年間の研究

成果を広く公表し、一般の評価を受けた。

7. 評価の手続き

研究総括が研究者からの報告・自己評価を基に、必要に応じて領域アドバイザーの協力を得て行った。
(評価の流れ)

平成 18 年 12 月	研究課題別評価提出
平成 18 年 12 月	研究総括による評価
平成 19 年 1 月	研究報告会開催
平成 19 年 3 月	研究報告書提出

8. 評価項目

- (1) 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、その他公表に至っていない新しい知見の取得等の研究成果の状況
- (2) 得られた研究成果の科学技術への貢献度

9. 研究結果

本領域では感染症、アレルギー、免疫疾患などの発症のメカニズムを生体機能や病原微生物とのかかわりに着目して、分子レベル、細胞レベルあるいは個体レベルで解析することにより、これらの疾患の新しい予防法、治療法の基盤を築くことを目指した。3 期生 5 名は 135 名の応募者の中から厳選された研究者であるが、期間内の研究はほぼ順調に進展し、基盤研究としては極めて質の高い、数多くの優れた成果が得られた。今後はこれらの成果から具体的な疾患の予防・治療法を産み出す努力が望まれる。3 期生は 5 名全員が期間内にキャリアアップを果たし、将来へ向かっての研究基盤を固めたことは誠に喜ばしいことである。なお、研究成果と当初研究目標に対する達成度は以下の個々人の研究成果報告ならびに自己評価および 8 名の領域アドバイザー諸先生方の評価を踏まえた研究総括の見解に示されている通りである。

10. 評価者

研究総括 竹田 美文 株式会社 シネ・サイエンス研究所 所長

領域アドバイザー氏名(五十音順)

笹川 千尋	東京大学医科学研究所 教授
鈴木 守	群馬大学 学長
竹田 泰久	中外製薬(株)がん領域部(戦略マーケティングユニット) 部長
光山 正雄	京都大学大学院医学研究科 教授
湊 長博	京都大学大学院医学研究科 教授
宮村 達男	国立感染症研究所 所長
山西 弘一	独立行政法人医薬基盤研究所 理事長
渡邊 武	理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター ユニットリーダー

(参考)

(1) 外部発表件数

	国内	国際	計
論文	0	36	36
口頭	27	11	38
その他	11	0	11
合計	38	47	85

※平成 18 年 12 月現在

(2) 特許出願件数

国内	国際	計
1	0	1

(3) 受賞等

- 河津 信一郎
日本熱帯医学学会 研究奨励賞(H15 年 10 月)

- ・ 中川 一路
日本細菌学会 黒屋奨学賞(H18年3月)
科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞(H18年4月)
- ・ 福井 宣規
日本免疫学会 学会賞(H15年12月)
- ・ 堀 昌平
科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞(H18年4月)

(4)招待講演

国際 13件

国内 12件

「生体と制御」領域 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職 (応募時所属)	研究費 (百万円)
河津 信一郎 (兼任)	マラリア原虫の酸化ストレス応答メカニズムの解明と新規治療戦略 (帯広畜産大学原虫病研究センター)	帯広畜産大学原虫病研究センター 教授 (国立国際医療センター研究所適正 技術開発・移転研究部 適正技術 開発室 室長)	92
谷内 一郎 (兼任)	リンパ球の分化を制御する転写調節 機構の解明と治療への応用 (理化学研究所免疫・アレルギー科学 総合研究センター)	理化学研究所免疫・アレルギー科 学総合研究センター 免疫転写制 御研究チーム チームリーダー (九州大学生体防御医学研究所 助手)	91
中川 一路 (兼任)	オートファジーによる細胞内侵入性細 菌の排除機構の解析と応用 (東京大学医科学研究所附属感染症 国際研究センター)	東京大学医科学研究所附属感染症 国際研究センター 助教授 (大阪大学大学院歯学研究科口腔 分子感染制御学講座 講師)	105
福井 宣規 (兼任)	宿主応答を司る細胞骨格制御機構の 解明とその応用 (九州大学生体防御医学研究所)	九州大学生体防御医学研究所 教授 (同上研究所 助教授)	100
堀 昌平 (兼任)	免疫制御性 T 細胞の分化メカニズム の解明とその免疫疾患治療への応用 (理化学研究所免疫・アレルギー科学 総合研究センター)	理化学研究所免疫・アレルギー科 学総合研究センター 免疫恒常性 研究ユニット ユニットリーダー (同上研究センター 研究員)	84

研究課題別評価

1 研究課題名: マラリア原虫の酸化ストレス応答メカニズムの解明と新規治療戦略

2 研究者氏名: 河津 信一郎

研究員: 安田 加奈子 (研究期間 H16.1.1~H19.3.31)

研究員: 竹前 等 (研究期間 H16.4.1~H17.7.31)

技術員: 木村 理沙 (研究期間 H16.5.1~H19.3.31)

3 研究のねらい:

熱帯熱マラリアは、ヒトの 4 種類のマラリアのうち最も重篤な感染症で、ヒトはハマダラカの吸血によって熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) に感染する。世界人口の約半数がマラリアのリスクの下に生活しており、年間 200-300 万人がこの感染症によって命を落としている。赤血球内に寄生し、活発な DNA 合成、ヘム代謝の過程で多量の過酸化物を産生するマラリア原虫にとって、細胞内レドックス(酸化・還元)バランスの制御は、宿主内適応、発育および増殖の成否を左右する重要なメカニズムで、その解明はマラリアの新しい制御法開発の起点になると考える。このような観点から、私達の研究グループでは、マラリア原虫細胞で過酸化物の還元主に機能する抗酸化タンパク質、ペルオキシレドキシシン(Prx)の原虫細胞内レドックス制御における役割を、熱帯熱マラリア原虫ならびにローデント(ネズミ)マラリア原虫(*P. berghei*)を用いて解析してきた。本課題では、Prx subfamily を対象に、マラリア原虫の酸化ストレス応答メカニズムを解明し、マラリア原虫寄生適応の生物学に新たな知見を提示するとともに、この機構に係わる分子群を同定し、それらを標的とする新規マラリア治療法の開発につながる基礎的研究を展開することを目的とした。

4 研究成果:

(1) マラリア原虫 Prx の発現プロファイル

マラリア原虫の細胞質には、1-Cys 型と 2-Cys 型の 2 種類の Prx が局在し、1-Cys 型が赤内期のトロホゾイトで特異的に発現するのに対し、2-Cys 型は蚊体内での発育型を含めた全発育環を通じてほぼ構成的に発現した。これら Prx の発現は、mRNA とタンパク質の発現プロファイルが完全に一致することから、遺伝子の転写段階で調節されていると考察される。一方、マラリア原虫のゲノムに見出されたもう一つの 2-Cys 型 Prx、チオレドキシシンペルオキシダーゼ-2 (TPx-2) がミトコンドリアに局在することも確認した。

(2) マラリア原虫 Prx の機能解析

細胞質に局在する 1-Cys 型、2-Cys 型 Prx について、リバースジェネティクス的手法を用いて、原虫細胞の発育・増殖に関連した機能を推定した。1-Cys 型 Prx を過剰発現した熱帯熱マラリア

原虫では、クロロキン(ヘム代謝阻害薬)に対する感受性が低下した。組換え体タンパク質を用いた生化学的検討から、1-Cys型Prxは、哺乳動物の赤血球内で無性的に増殖するマラリア原虫のヘム代謝に関連して機能する抗酸化タンパク質であることが示唆された。一方、2-Cys型Prxを欠損するローデントマラリア原虫では、ガメトサイト(生殖母体)形成、スポロゾイト(感染型原虫)形成、ならびにその哺乳類宿主への感染性に関連した表現型が観察され、同分子がマラリア原虫の有性生殖から蚊体内の発育、哺乳動物への伝播にかけてのステージで機能する抗酸化タンパク質であることが示唆された。

(3) マラリア原虫 Prx 遺伝子転写調節メカニズムの解析

Prx 遺伝子 5' にプロモーター(enhancer)領域を同定した。1-Cys型Prx 遺伝子の発育期特異的な転写調節に、(1)プロモーター領域上の *cis*-element(enhancer)および、その配列特異的に結合する転写因子(*trans*-acting factor)が関与すること、また(2)トロホゾイト期特異的な転写活性化には、ヒストンアセチル基転移酵素 PfGCN5 を介したプロモーター領域周囲のヒストンアセチル化(epigenetic な制御機構)が関与することが示唆された。

(4) マラリア原虫チオレドキシン(Trx)相互作用分子の同定

Prx をはじめ様々なタンパク質の s-s 結合への電子供与体として、チオレドキシンシステムの中で機能する生体チオール、チオレドキシン(Trx)について、同分子と原虫細胞質内で相互作用する分子種の同定を試みた。Trx の標的分子還元機構を応用したアフィニティークロマトグラフィーを用いて、トロホゾイトの細胞質に Trx と相互作用し還元される分子が約 100 存在することを見出し、LC/MS/MS 解析を用いてこれらのうち 20 種を同定した。

5 自己評価:

マラリア原虫のゲノムにはカタラーゼとグルタチオンペルオキシダーゼが存在せず、同原虫細胞内での過酸化物は主に Prx によって還元されると考えられている。このことから、私達は Prx subfamily を対象に、どのような刺激のもとにどのような因子が働いてこれら分子の発現を調節し、細胞内でのレドックスバランスを制御し、原虫の生理にどう作用するのかを明らかにすることを目的として、今回のさきがけ研究を提案した。

一連の研究から、これまでに殆ど解っていなかった、マラリア原虫細胞での抗酸化系(細胞内レドックスバランス制御)の生理的な意義、また、同原虫での遺伝子発現メカニズムに関連して、幾つかの新たな知見を提示することが出来たと考える。

リバーシジェネティクス的手法を用いておこなった Prx 生理機能の解析では、当初の予想に反し、Prx 欠損原虫に赤血球寄生期での致死あるいは増殖障害などの表現型を見ることができなかった。一方、同欠損原虫のライフサイクルを通じた観察からは、ガメトサイトの形成不全や蚊体内での発育障害など興味ある表現型を見出すことが出来たが、これら表現型を説明する分子メカニズムの解明にまでは至らなかった。ガメトサイト、スポロゾイトは原虫ライフサイクル維持の要点とな

るステージで、その形成阻害はマラリアコントロールの有効な作用点になると考える。また、細胞の分化・増殖過程に Prx が関連して機能するとの知見は、マラリア原虫細胞でのレドックスシグナルの意義を示唆するものであり、他生物種で先行する同分野の研究にも基礎的な知見を提供することが出来ると考える。これらのことから、今回得られた表現型の分子メカニズムについてさらに解析を進め、目的の達成に向けて、この研究を発展させていきたいと考えている。

Prx 発現調節メカニズムの解析では、同遺伝子の発現(この発現プロファイルが同分子の機能を規定する一つの要素と考えている)に、5' のプロモーター(enhancer)領域と、その領域に結合する転写因子(*trans*-acting factor)、および epigenetic な制御機構が関与することが強く示唆されたが、このメカニズム解明の中心となる転写因子を同定することが出来なかった。マラリア原虫では、そのゲノム構造の特殊性から転写因子の同定に至る独自の戦略が必要で、その構築に予想以上に手間取ったのが主な原因であった。今後は、当初の目標に従い、(1)同因子の単離・同定を進め、(2)同定した転写因子の活性化のメカニズムからマラリア原虫細胞内でのレドックスバランス制御(酸化ストレス応答)の仕組みを解明し、さらに、(3)リバースジェネティクスの手法を用いて同因子の下流で制御を受ける遺伝子群を同定する方向で、この研究を発展させていきたいと考えている。

マラリア原虫 Trx と相互作用するタンパク質には、これまでの他生物種での研究からも報告のない数種類の分子(解糖系酵素、RNA ヘリカーゼ等)が含まれていた。今後、原虫細胞内のレドックスバランスと、これら分子の活性調節との関連を解析し、マラリア原虫での細胞内レドックスバランス制御(酸化ストレス応答)の特性を見出したいと考えている。

マラリア原虫では、熱帯熱マラリア原虫、ローデントマラリア原虫と幾つかのゲノムプロジェクトが終了しているが、遺伝子の転写制御メカニズム、抗酸化システム(レドックス制御メカニズム)等の、全ての細胞に備わる極めて基盤的メカニズムの解明が他生物種と比較して著しく遅れている。私たちは、マラリア原虫の酸化ストレス応答とそれに付随した遺伝子発現メカニズムを詳細に調べることで、このような生命現象の根幹に係わる機構のうち、何が他生物種と同じで何がマラリア原虫にユニークなのかを明らかにし、ゲノム情報に立脚した新規マラリア制御法の開発研究に貢献していきたいと考えている。

6 研究総括の見解:

マラリア原虫にとって、細胞内レドックス(酸化・還元)バランスの制御は、宿主内適応、発育および増殖の成否を決める重要なメカニズムである。本研究では、熱帯熱マラリア原虫とネズミマラリア原虫における細胞内レドックスバランスの制御の生理的意義と同原虫の遺伝子発現のメカニズムについて、新たな知見を見出し、今後の新規マラリア制御法開発研究の基盤を提供した。

7 主要な論文等

論文

1. Yano K., Komaki-Yasuda K., Tsuboi T., Torii M, Kano S. and Kawazu S. 2-Cys peroxiredoxin TPx-1 is involved in gametocyte development in *Plasmodium berghei*. *Mol. Biochem.*

Parasitol. 148:44-51,2006

2. Kawazu S., Ikenoue N., Takemae H., Komaki-Yasuda K. and Kano S. Roles of 1-Cys peroxiredoxin in heme detoxification in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *FEBS J.* 272:1784-1791, 2005
3. Yano K., Komaki-Yasuda K., Kobayashi T., Takemae T., Kita K., Kano S. and Kawazu S. Expression of mRNAs and proteins for peroxiredoxins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in the blood stage. *Parasitol. Int.* 54:35-41, 2005

総説

1. 河津信一郎:マラリア原虫のゲノムと病原遺伝子. 細胞工学 22:1164-1167,2003
2. 駒木-安田加奈子, 河津信一郎:寄生性原虫の転写制御:“七変化早替わり”を支える分子メカニズム. 細胞工学 25:806-810,2006

特許

なし

受賞

日本熱帯医学会:第13回研究奨励賞. 2003年10月10日

招待講演等

1. 河津信一郎:「寄生虫側からの適応」:酸化ストレスに対する適応の分子メカニズム. 第15回日本生体防御学会学術総会(シンポジウム), 2004年7月8日, 長崎
2. Kawazu S., Ikenoue N., Takemae H., Komaki-Yasuda K. and Kano S.: Roles of 1-Cys peroxiredoxin in heme detoxification in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. 11th Korea-Japan Parasitologists' Seminar 'Forum Cheju 11' (Symposium), 2005.6.4. Seoul
3. 河津信一郎:マラリア原虫の宿主寄生戦略:酸化ストレスへの適応の分子メカニズム. 第74回日本寄生虫学会大会(シンポジウム), 2005年4月8日, 米子

研究課題別評価

1 研究課題名:

リンパ球の分化を制御する転写調節機構の解明と治療への応用

2 研究者氏名: 谷内 一郎

技術員: 室井 佐和子(研究期間 H.15.12.1~H.19.3.31)

秋山 かおり(研究期間 H.17.4.1~H.19.3.31)

3 研究のねらい:

生物の発生・分化プログラムの根幹をなすのは、ゲノム情報から適切な情報を適切な時期に発現させる事であり、遺伝子発現(転写調節)制御機構の解明は広く生物学の重要な課題と言える。本研究課題では、リンパ球分化を研究題材として、高等生物における分化や高次機能制御において、クロマチン構造の修飾を介した遺伝子発現パターンの確立と維持が果たす役割とその分子機構の解明を明らかにすることを一つの目標とした。

また、リンパ球の分化制御における Runx ファミリーの機能解明をもうひとつの目標として研究を行った。Runx ファミリーは核内転写因子ファミリーであり、多くの発生・分化過程に重要な役割を果たすことが知られており、またがんや自己免疫疾患といったヒト疾患の発症との関連が指摘されている核内転写因子ファミリーである。Runx ファミリーは広く血球系細胞に発現しているが、免疫系の分化・機能制御における役割は良く解っていない。本研究課題では、主に遺伝学的なアプローチを用いて、Runxファミリーの免疫系での機能を解明し、その機能不全に起因するリンパ球分化異常や免疫疾患の発症機序を解明し、免疫疾患の新たな制御法の開発につながる成果を得ることを目標に研究を行った。

4 研究成果:

A. Runx ファミリー変異マウスの作製

Runx ファミリーは DNA 結合活性を持つ Runt ドメインを保有する α ユニットが β ユニットとヘテロ二量体形成を形成することで特定の DNA 配列(Runx モチーフ、5'-ACCRCA-3')に結合し、標的遺伝子の発現を正或は負に制御する核内転写調節因子である。哺乳類では α ユニットのコードする遺伝子として Runx1、Runx2、Runx3 の 3 つの遺伝子、 β ユニットのコードする遺伝子として Cbf β 遺伝子が単離されている。いずれの α ユニットも遠位プロモーター(P1)と近位プロモーター(P2)から転写されることで、N 末端に異なるアミノ酸配列を持つアイソフォームタンパクが産生される。Cbf β 遺伝子からは異なるスプライシングドナーシグナルを用いてエクソン 5 からエクソン 6 へ RNA スプライシングすることにより、Cbf β 1 と Cbf β 2 という 2 つのアイソフォームタンパクが産生される。また、Runx1 タンパクは特定のセリン残基にリン酸化修飾を受けることが知られている。更に、Runx ファミリーのヌル変異マウスはいずれも胎生期や生後直後

に死亡する為、免疫系の機能解析を行う為には Cre-loxP の系を用いたいわゆる conditional KO マウスが有用である。これらの背景から、さきがけ研究により以下の Runx ファミリー変異マウスを作製した。

Runx1P1Neo 変異マウス (Runx1P1 プロモーターとエクソン 1 を Neo 耐性遺伝子と置換したマウス)

Runx1P1R 変異マウス (Runx1P1 プロモーター下のエクソン 1 に P2 プロモーター特異的な N 末配列を挿入し、P1 プロモーターからも P2 プロモーター特異的な Runx1P2 が産生される変異マウス)

Runx1 リン酸化部位変異マウス (リン酸化を受けることが知られているセリンをアラニンに置換したもの)

Cbf β flox 変異マウス

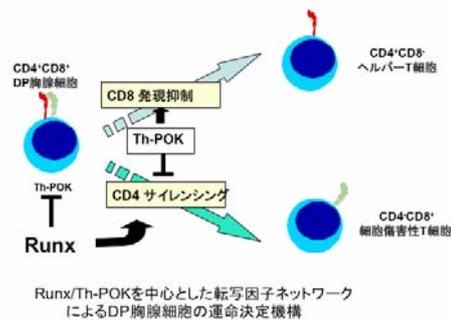
Cbf β 1 特異的 KO マウスと Cbf β 2 特異的 KO マウス

B. Runx ファミリー変異マウスの表現系解析

A で述べた変異マウスや以前に作製した Runx1flox マウス、Runx3flox マウス、供与を受けた Runx1-VWRPY マウス等を用い、免疫系における Runx ファミリー機能不全の表現系解析を行い、以下に述べる Runx ファミリーの新たな機能を同定した。

B-1. CD4+CD8+DP 胸腺細胞の運命決定における Th-POK 遺伝子の発現抑制

CD4+CD8+DP 胸腺細胞で Runx1, Runx3 を共に欠損するマウスや Cbf β を欠損するマウスでは T ヘルパー細胞分化を誘導するマスター遺伝子である Th-POK の発現が脱抑制しており、その結果本来ならば細胞障害性 T 細胞に分化するはずのクラス I 拘束性の TCR を発現している細胞もヘルパー系列に分化していた。これらの結果から、Runx 複合体を介した Th-POK の発現抑制が細胞障害性 T 細胞への分化誘導に必須であることを明らかにした。また、Th-POK 遺伝子は Runx を介した CD4 サイレンシングに対して拮抗的に働き、CD8 遺伝子座に直接結合することで CD8 の発現を負に制御することで、ヘルパー T 細胞の CD4+CD8- の表現型に寄与することを明らかにした。



B-2. CD4+CD8+DP 胸腺細胞の正の選択における Runx 複合体の機能

Runx 変異マウスでは成熟胸腺細胞が著しく低下し、CD69 陽性の分画が激減することから、CD4+CD8+DP 胸腺細胞の正の選択には Runx 複合体の機能が重要であることが明らかとなった。また、Runx 変異マウスでは正の選択後の胸腺細胞の成熟過程も障害されており、IL7R の発現低下が一因と考えられた。

B-3. Runx 複合体の IL4 サイレンサーを介した IL4 発現抑制と喘息様疾患の発症

Cbf β 2 特異的 KO マウスや T 細胞特異的に Cbf β や Runx3 を欠損するマウスでは血清 IgE の上昇とリンパ球と好酸球の肺への細胞浸潤といったヒトの喘息と良く似た症状を自然発症することを見出した。これらマウス由来の T 細胞では、IL4 産生亢進と喘息を初めとするアレルギー疾患の発症に関与する 2 型 T ヘルパー細胞(Th2)の分化促進がみられた。Runx 複合体が IL4 の産生を抑制する IL4 サイレンサーに直接結合することが確認され、Runx 複合体の機能不全により本来ならば IL4 は産生しない 1 型 T ヘルパー細胞(Th1)からも IL4 が産生されると考えられ、Runx 複合体の機能不全による IL4 サイレンサーの機能不全が疾患発症の一因と考えられた。

B-4. Runx 複合体機能不全と炎症性腸疾患の発症

Cbf β 2 特異的 KO マウスでは血清 IgA の上昇が観察された。一方、 $\alpha\beta$ T 細胞を欠損する Cbf β 2 特異的 KO マウスでは少なくとも血清 IgA の上昇は見られず、また T 細胞特異的に Cbf β を欠損するマウスでも IgA の上昇が認められたことから、血清 IgA の上昇には T 細胞での Runx 複合体機能不全が関与するが考えられた。興味深いことに Cbf β 2 特異的 KO マウスでは幼少期から大腸を中心に広範囲に IgA 陽性の形質細胞様細胞の浸潤が見られ、炎症性腸疾患の病態を呈した。このように、Cbf β 2 特異的 KO マウスは B-3 で述べた喘息様疾患に加え炎症性腸疾患も発症することより、Runx 複合体機能不全に起因する免疫疾患の有用なモデルマウスとなると考えられ、特許申請を行なった。

B-5.リンパ組織形成における Runx 複合体の機能

Cbf β 2 特異的 KO マウスや Runx1P1Neo 変異マウスでは、パイエル板の欠損または数的減少、ソケイ部リンパ節を初めとする末梢リンパ節の形成不全が認められた。これらマウスの胎生期ではリンパ組織形成に重要な役割を果たす LTi(lymphoid tissue inducer)細胞の減少が見られたことより、Runx 複合体の機能不全によりLTi細胞の分化が障害され、リンパ組織形成に異常を来すと考えられた。

C. CD4 サイレンサーを介したエピジェネティックサイレンシングの分子機序

CD4 サイレンサーを介した CD4 遺伝子発現抑制機構に関して、以下の新たな知見を得た。

C-1.不完全なサイレンシング状態は維持されず、オンかオフの状態に収束される

従来、エピジェネティックな機構により特異なクロマチン構造が維持されることでサイレンシング状態は維持されると考えられてきた。ところが、CD4 サイレンサー機能不全によって不完全なサイレンシング状態にあるCD4 遺伝子座は細胞分裂の際、不完全な状態のままでは維持されず、オンかオフのいずれかの状態に収束された。この知見は、エピジェネティックな機構はサイレンシングに関与するすべてのクロマチン構造を維持するものではないことを示すものであり、新たな概念につながるものと考えられる。

C-2. $\gamma\delta$ T 細胞でのエピジェネティック CD4 サイレncing

これまではCD4 サイレンサーを介したエピジェネティックCD4 サイレncingは分化段階特異的であり、成熟CD8⁺T細胞でのみ観察されていた。本研究でCD4 サイレンサー変異マウスを詳細に解析することにより、DN胸腺細胞から分化する $\gamma\delta$ T細胞でもエピジェネティックCD4 サイレncingが起こっていることを見出した。この結果は、サイレンサーの機能が分化段階特異的にエピジェネティックサイレンシングを確立するのではない事を示しており、サイレンシングの確立の分子機序の解明につながる成果といえる。

5 自己評価:

Runx ファミリーを介したリンパ球分化制御における転写調節機構に関しては、当初の計画通りに幾つもの遺伝子改変マウスを作製することが出来た。また、それらマウスの解析により、DP 胸腺細胞の運命決定に際して、Runx ファミリーと Th-POK とのネットワーク形成とそのバランスによる制御機構を明らかに出来たのは、今後の発展につながる大きな成果と言って良いと感じている。また、Runx 機能不全マウスでみられる免疫疾患の発症機序に関して、モデルマウスの作製と分子機序に迫る成果(例えば Runx を介した IL4 遺伝子の発現抑制)を明らかに出来たことは、新たな治療法の開発につながる成果と言える。

一方で、エピジェネティックな遺伝子発現制御機構に関しては、当初想定していたよりもクロマチン構造の修飾が多様であったこと、小グループで二つのプロジェクトをする難しさもあり、到底分子機序に迫るには及ばず、現象論に過ぎない成果に留まったのは大いに反省すべき

点と言える。

これらの成果、特に遺伝子改変マウスの作製と解析には技術員の参加が不可欠であった。言い換えれば、ポスドク参加型でなければ、研究課題の遂行は困難であった。

また、研究成果の発表・発信という意味で、論文発表までの時間を短縮するよう務めるべきであった。

6 研究総括の見解:

本研究は、高等生物における分化や高次機能制御において、クロマチン構造の修飾を介した遺伝子発現パターンの確立と維持が果たす役割とその分子機構の解明、およびリンパ球の分化制御における Runx ファミリーの機能解明を目的として行われた。後者の課題については複数の遺伝子改変マウスを作製し、その解析により、Runx 複合体が関与する喘息様疾患や炎症性腸疾患の新たな治療法の開発につながる研究成果を挙げた。しかし前者の課題については、研究が緒に就いたばかりであった。

7 主な論文等:

論文

1. Fukushima-Nakase Y, Naoe Y, **Taniuchi I**, Hosoi H, Sugimoto T, and Okuda T. (2005) Shared and distinct roles mediated through C-terminal subdomains of Acute Myeloid Leukemia/Runt-related Transcription Factor molecules in murine development. **Blood** 105: 4298-4307.
2. Egawa T, Eberl G, **Taniuchi I**, Benlagha K, Geissmann F, Hennighausen L, Bendelac A and Littman D.R. (2005) Genetic Evidence supporting selection of the Va14i NKT cell lineage from double positive thymocyte precursors. **Immunity** 22: 705-716.
3. Wang X, Blagden C, Fan J, Nowak S, **Taniuchi I**, Littman D.R and Burden S.J. (2005) Runx1 prevents wasting, myofibrillar disorganization, and autophagy of skeletal muscle. **Genes & Dev.** 19: 1715-1722.
4. Grueter B, Petter M, Egawa T, Laule-Kilian K, Aldrian C.J, Wuerch A, Ludwig Y, Fukuyama H, Wardemann H, Waldschuetz R, Moroy T, **Taniuchi I**, Steimle V, Littman D.R and Ehlers M. (2005) Runx3 Regulates Integrin E/CD103 and CD4 Expression during Development of CD4-/CD8+ T Cells. **J. Immunol.** 175:1694-1705.
5. Kramer I, Sigrist M, de Nooij J.C, **Taniuchi I**, Jessell T.M and Arber S. (2006) A role for Runx transcriptional factor signaling in dorsal root ganglion sensory neuron

diversification. **Neuron**, 49:379–393.

特許

免疫疾患モデルマウスとしての Cbf2 アイソフォーム欠損マウスの作製
(出願番号 2006-008654)

学会発表

国内 10 回、国際 6 回

研究課題別評価

1 研究課題名:

オートファジーによる細胞内侵入性細菌の排除機構の解析と応用

2 研究者氏名: 中川 一路

研究員: 桜井 敦朗 (研究期間 H.16.4.1~H.18.3.31)

技術員: 時森 綾 (研究期間 H.15.10.1~H.18.3.31)

3 研究のねらい:

生体内に侵入した病原性細菌は、通常貪食細胞によって捕捉され、生体内より排除される。このような貪食細胞は、取り込んだ病原性細菌をファゴソーム内に取り込み、その後リソソームとの融合を経て消化することにより、病原性細菌の生体からの排除を行っている。ところが近年、多くの病原性細菌で、非貪食系の上皮細胞などの細胞内に侵入していることが明らかにされてきた。通常好中球などの貪食細胞に補食された病原細菌は、食胞(ファゴソーム)に取り込まれ、やがてリソソームとの融合によって消化される。それでは、非貪食系細胞の細胞質内に脱出した菌はどのように消化・排出されているのであろうか？細胞には、異物の排除機構としてファゴソームーリソソーム系以外に、通常細胞内小器官を分解するために利用される自食胞(オートファゴソーム)というメカニズム(オートファジー)が存在していることが知られている。本研究では、このオートファジーが細胞質内に侵入した病原性細菌の排除機構として機能しているのかどうか、またどのようなメカニズムで菌を認識して排除しているのかについて明らかとし、感染防御機構におけるオートファジーの役割を明らかにすることを目的とする。

4 研究成果:

(1) A 群レンサ球菌に対するオートファジーによる感染防御機構について

A 群レンサ球菌感染症の発症には本菌の宿主への付着・定着因子が重要であることが示されているが、宿主細胞への付着・侵入には、菌体表層にある M タンパクや、フィブロネクチン結合タンパクなどの複数のタンパク成分や、ヒアルロン酸で構成される夾膜が関与していることが報告されている。ところが、A 群レンサ球菌は、細胞内に高頻度で侵入することが報告されているものの、他の細胞内寄生性細菌の様に細胞内で増殖するという報告は為されていない。そこで、A 群レンサ球菌を用いて、細胞内での動態とオートファジーの関与について解析を行った。HeLa 細胞に GAS を感染させたところ、感染後1時間から、オートファゴソームの膜マーカーである LC3 陽性の膜構造に覆われ、経時的に連鎖している菌を包む様に巨大化した。同時に、オートファゴソーム形成に量が比例することが知られている LC3-II の経時的な増加が認められた。また、感染後4時間で菌体を含む LC3 陽性膜構造のほぼ全てがリソソームマーカーである LAMP1 陽性となり、リソソーム酵素阻害剤であるロイペプチンの添加により細胞内の菌数の減少が抑制された。さらに、オートファゴソーム形成に必要な Atg5 遺

伝子を欠失させた ES 細胞に GAS を感染させたところ、このような LC3 に囲まれる菌は全く観察されず、かつ Apg5 正常細胞に比較して菌の分解が著しく抑制され約 80 倍の菌が回収された。これらの結果は、細胞内に侵入した GAS の多くがオートファゴソーム様構造に取り込まれ、その後その構造とリソソームの融合によって分解されていることを示唆している。

また、オートファジーは細胞質内の分解機構であることから、A 群レンサ球菌が細胞質内に脱出しているのか否かについて検討を加えた。A 群レンサ球菌は、リステリア菌の細胞質内への脱出に必須な溶血毒素リステリオリシン O のホモログであるストレプトリシン O (SLO) が存在する。リステリア菌ではリステリオリシン O による貪食細胞での貪食胞からの脱出が知られている。そこで、A 群レンサ球菌でストレプトリシン O の遺伝子破壊株を作製し、細胞質への脱出とオートファジーによる捕獲について検討を加えた。SLO 遺伝子破壊株では、感染後 3 時間を経過した時点でもエンドソーム内に留まっているのに対して、親株では速やかに細胞質への移行およびオートファジーによる捕獲が認められた。これらの結果は、A 群レンサ球菌の細胞質への脱出には SLO が必須であり、細胞質に SLO を用いて脱出した菌が選択的にオートファジーにより取り込まれることが明らかとなった。

(2) 黄色ブドウ球菌に対するオートファジーによる認識について

A 群以外のレンサ球菌、およびブドウ球菌属の菌を用いて細胞内侵入性およびオートファゴソームによる分解が起こりえるのか否かについて検討した。レンサ球菌属では、B 群レンサ球菌、口腔内レンサ球菌に属する血清型の異なる 20 株について検討を加えたが、いずれの菌も上皮細胞には侵入性をほとんど示さず、オートファジーの誘導は認められなかった。次にグラム陽性菌の代表菌株である、ブドウ球菌属について同様の解析を行った。ブドウ球菌は、主に *S. aureus* (黄色ブドウ球菌)、*S. epidermidis* (表皮ブドウ球菌)、*S. saprophyticus* (腐性ブドウ球菌) に大別される。このうち、*S. epidermidis* (20 株)、*S. saprophyticus* (5 株) では、細胞内侵入性が認められなかった。しかし、今回供試した黄色ブドウ球菌 12 株全てで細胞内侵入性が認められ、いずれも巨大なオートファゴソーム内に菌が捕獲されていた。黄色ブドウ球菌は、ヒトや動物の皮膚、消化管内などの体表面に常在し、通常は無害であるが、皮膚の切創や刺創などに伴う化膿症や膿痂疹、毛囊炎、セツ、癰、蜂巣炎など種々の皮膚軟部組織感染症から、肺炎、腹膜炎、敗血症、髄膜炎などに至るまで様々な重症感染症の原因となる。今回用いた 12 株の黄色ブドウ球菌は、全て分離場所および発症疾患が異なるものを用いているため、黄色ブドウ球菌も細胞内に侵入し、オートファジーのターゲットとなることを示していると考えられる。

(3) オートファジーにより認識される細菌成分と細胞因子について

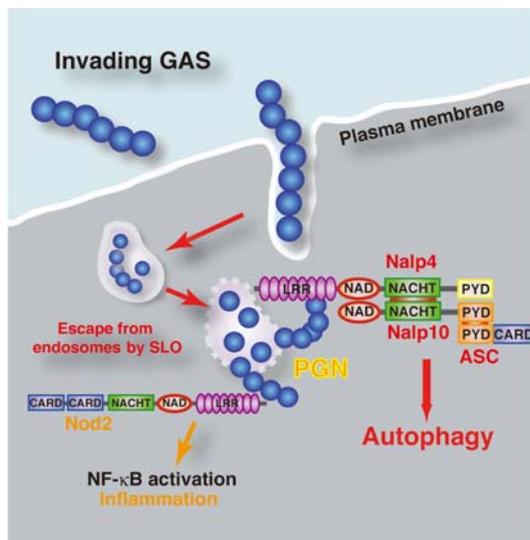


図 1. Nalp4, Nalp10 は細胞質内の A 群レンサ球菌の細胞壁成分を認識して、ASC を介した complex を形成することでオート

ファジーによる認識が著しく阻害されることが明らかとなった。そこで、さらに、この菌体成分を認識してオートファジーを誘導する細胞成分を明らかにするために、細胞質内の菌体成分認識分子である Nod-LRR ファミリー分子に着目してその関与の解析を行った。Nod-LRR ファミリー分子に網羅的に miR-RNAi によるノックダウン系を確立した。その結果、Nalp4、Nalp10 分子のノックダウンにより効果的にオートファジーの誘導の抑制、および菌の分解の抑制が認められたことから、細胞内では菌体の細胞壁成分を認識してオートファジーが選択的に誘導されていることが明らかとなった(図 1)。

A 群レンサ球菌と黄色ブドウ球菌が細胞内に侵入した後にオートファジーにより捕獲されたが、なぜ“非特異的”な細胞質の分解システムであるオートファジーが“特異的”にこれらの菌を認識して捕獲することができるのかについてさらに検討を加えた。その結果、A 群レンサ球菌の菌体表層の細胞壁成分がオートファジーにより認識されていた。A 群レンサ球菌のトランスポゾンを用いたランダム変異株を作製したところ、細胞壁合成酵素である MurD、MurE のプロモーター領域変異株でオートファジーによる認識が著しく阻害されることが明らかとなった。そこで、さらに、この菌体成分を認識してオートファジーを誘導する細胞成分を明らかにす

5 自己評価:

本研究期間内に、A 群レンサ球菌、黄色ブドウ球菌といったグラム陽性菌の代表的な株が細胞質内に侵入してオートファジーという本来は生理的に重要な分解システムを利用して効率的に分解されていることを明らかにできた。しかし、当初の目標では、曖昧ながら菌体表層の何らかのタンパク質成分が関与していると考えていたため、研究中期から後期にかけてその分離に時間を費やしてしまったことが悔やまれる。

その後に、細胞壁成分の関与が示唆されたために、その細菌側、細胞側双方からのアプローチを開始したが、予想外に細菌側の細胞壁成分が認識されていることが明らかとなってきた。残念ながら、細菌の細胞壁成分は、その構成成分や構成単位が明らかとなっているものの、本研究ではオートファジーに認識される最小成分の同定には至っていない。これは、細菌の細胞壁成分の高次構造が非常に複雑な構造のために、人工合成物が MDP 単位までしか可能とはなっていないことに由来するが、この点については、さらに種々の変異株を用い

て明らかにしたいと考えている。

また、オートファジーの誘導に關与する細胞側のファクターとして、現在注目を集めている自然免疫系のレセプター群の關与が明らかになってきたのは研究の新たな展開として期待できると考えている。特に、Nalp の遺伝子群は、ヒト細胞では 20 種類近くがゲノム解析の結果から報告されているものの、その機能は現時点でもほとんどと言って良いほど明らかとされていない。これらのレセプター群がなぜ多種細胞内に存在するのか、菌体成分の認識により宿主反応をどのように制御しているのか今後さらに研究を続けていきたいと考えている。

6 研究総括の見解:

生体内に侵入した病原細菌が生体内より排除される機構として、従来知られている貪食細胞による排除機構とは別に、オートファジーと称する機構が存在することが最近明らかになってきた。本研究では、A 群レンサ球菌と黄色ブドウ球菌に対するオートファジーによる感染防御機構について、極めて独創的な重要な新知見を見出し、感染防御機構においてオートファジーが重要な役割を担っていることを明らかにした。

7 主な論文等:

発表論文

1. Kato, T., Kawai, S., Nakano, K., Inaba, H., Kuboniwa, M., Nakagawa, I., Tsuda, K., Omori, H., Ooshima, T., Yoshimori, T., Amano, A. (2006) Virulence of *Porphyromonas gingivalis* is altered by substitution of fimbria gene with different genotype. *Cell. Microbiol.* In press.
2. Amano, A., Nakagawa I., Yoshimori, T. (2006). Autophagy in innate immunity against intracellular Bacteria. *J. Biochem (Tokyo)*, 140: 161–166.
3. Nakagawa I., Inaba H, Yamamura T, Kato T, Kawai S, Ooshima T, Amano A. (2006) Invasion of epithelial cells and proteolysis of cellular focal adhesion components by distinct types of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Infect. Immun.* **74**: 3773–3782.
4. Takemura A, Nakagawa I., Kawai S, Inaba H, Kato T, Hamada S, Amano A. (2006) Inhibitory effects of tumor necrosis factor- α on migration of human periodontal ligament cells. *J. Periodontol.* **77**: 883–890.
5. Yamasaki E, Wada A, Kumatori A, Nakagawa I., Funao J, Nakayama M, Hisatsune J, Kimura M, Moss J, Hirayama T. (2006) Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin induces activation of the proapoptotic proteins Bax and Bak, leading to cytochrome c release and cell death, independent of vacuolation. *J. Biol. Chem.* **281**: 11250–11259.
6. Inaba H, Kawai S., Kato T., Nakagawa I., Amano A. (2006) Association between epithelial cell death and invasion by microspheres conjugated to *Porphyromonas gingivalis* vesicles with different types of fimbriae. *Infect. Immun.* **74**: 734–739.
7. Tsuda K, Amano A, Umebayashi K, Inaba H, Nakagawa I., Nakanishi Y, Yoshimori T. (2005)

- Molecular dissection of internalization of *Porphyromonas gingivalis* by cells using fluorescent beads coated with bacterial membrane vesicle. *Cell Struct Funct.* **30**: 81–91.
8. Nakano, K., Nomura, R., Nakagawa, I., Hamada, S. and Ooshima, T. (2005) Role of glucose side chains with serotype-specific polysaccharide in the cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* **39**: 262–268.
 9. Tamura, K., Nakano, K., Nomura, R., Miyake, S., Nakagawa, I., Amano, A., Ooshima, T. Distribution of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes in Japanese children and adolescents. *J. Periodontol.* **76**: 674–679.
 10. Nakagawa, I., Amano, A., Inaba, H., Kawai, S., Hamada, S. Inhibitory effects of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae on interactions between extracellular matrix proteins and cellular integrins. (2005) *Microbes Infect.* **7**: 157–63.
 11. Nakano, K., Nomura, R., Shimizu, N., Nakagawa, I., Hamada, S., Ooshima, T. Development of a PCR method for rapid identification of new *Streptococcus mutans* serotype k strains. (2004) *J Clin Microbiol.* **42**:4925–30.
 12. Nakano, K., Nomura, R., Shimizu, N., Nakagawa, I., Hamada, S., Ooshima, T. Development of a PCR method for rapid identification of new *Streptococcus mutans* serotype k strains. (2004) *J Clin Microbiol.* **42**:4925–30.
 13. Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A., Funao J, Nakata M, Tsuda K, Hamada S, Yoshimori T. (2004) Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science.* 2004 **306**: 1037–40.
 14. Nakagawa, I., Nakata, M., Kawabata, S., Hamada, S. Transcriptome analysis and gene expression profiles of early apoptosis-related genes in *Streptococcus pyogenes*-infected epithelial cells. (2004) *Cell Microbiol.* **6**:939–52.
 15. Okahashi, N., Inaba, H., Nakagawa, I., Yamamura, T., Kuboniwa, M., Nakayama, K., Hamada, S., Amano, A. *Porphyromonas gingivalis* induces receptor activator of NF- κ B ligand expression in osteoblasts through the activator protein 1 pathway. (2004) *Infect Immun.* **72**:1706–14.

総説など

1. 中川一路、吉森保 オートファジーによる感染防御機構 蛋白質・核酸・酵素 Vol.51(10 Suppl.), 1507–14, 2006
2. 中川一路 オートファジー(自食作用)による感染防御 Annual Review 免疫2006 p54–64
3. 中川一路 オートファジーによる防御システム:細胞内の細菌排除機構日本細菌学雑誌 Vol.60(3), 485–9, 2005
4. 中川一路 オートファジーは細胞内侵入性細菌から細胞を防御する実験医学 Vol.23(5), 734–7, 2005

受賞

平成18年度日本細菌学会黒屋奨学賞

平成18年度科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞

学会発表 国際2件 国内6件

招待講演 国際2件 国内シンポジウム4件

研究課題別評価

1 研究課題名: 宿主応答を司る細胞骨格制御機構の解明とその応用

2 研究者氏名: 福井 宣規

技術員: 稲吉 あゆみ (研究期間 H.15.11.1~H.19.3.31)

技術員: 野田 繭子 (研究期間 H.15.11.1~H.18.6.30)

3 研究のねらい:

免疫応答の根幹をなす種々の細胞高次機能は、いずれも低分子量 G 蛋白質を介した細胞骨格の再構築により巧妙に制御されている。しかしながら、免疫細胞 (例えばリンパ球は大部分が核で、細胞生物学的解析に不向きであるため、その制御機構の分子レベルでの理解は進んでいない。CDM ファミリーは線虫から哺乳類に至るまで保存された分子群で、低分子量 GTP 結合蛋白質の上流で機能することで細胞骨格の制御に関わっている。研究者はこれまでに、免疫系特異的に発現する CDM ファミリー分子として DOCK2 を同定し、この分子がケモカイン受容体や T 細胞抗原受容体の下流で機能する Rac 活性化のマスター分子であり、リンパ球遊走や免疫シナプス形成に不可欠であることを明らかにしてきた。

本研究では、DOCK2 を含む CDM ファミリー分子に焦点をあて、各種受容体刺激から細胞骨格再構築に至るシグナル伝達機構を解明し、その免疫系の発生・分化・恒常性維持や免疫応答における役割を個体レベルで明らかにすると共に、その理解に立脚して、移植片拒絶や自己免疫疾患といった免疫難病の新しい治療法、予防法の開発に資する基礎研究を展開することを目的とした。

4 研究成果:

① DOCK2 によるリンパ球ホーミングの制御機構

DOCK2 欠損 B 細胞では、ケモカイン刺激によるインテグリン活性化が著しく障害されており、その結果生体内で血管内皮細胞に接着する B 細胞の数が著減することを見いだした。これまでに辺縁帯 B 細胞の脾臓での局在に、インテグリン活性化が重要であることが報告されている。DOCK2 欠損マウスではこの辺縁帯 B 細胞が著減しており、この表現型は恐らく DOCK2 欠損 B 細胞におけるインテグリン活性化の異常に起因するものと考えられる。このように B 細胞においては、DOCK2 はインテグリン活性化を介してリンパ球ホーミングを制御していることが明らかとなった。一方、DOCK2 欠損 T 細胞をケモカインで刺激した場合、ICAM-1、VCAM-1 に対する接着性は全く正常であった。そこで、DOCK2 の T 細胞ホーミングにおける役割を明らかにするため、血管内皮細胞と T 細胞との相互作用をタイムラプスを用いて解析した。この結果、DOCK2 は血管内皮細胞への接着や細胞間隙への侵入には必須ではないが、血管内皮細胞上での運動(lateral motility)に必要であることを明らかとなった。以上より、同じリンパ球でも T 細胞と B 細胞では、ホーミング

の制御機構が異なる可能性が示唆された。

②NKT 細胞の発生における DOCK2 の役割

多様性に特徴づけられるリンパ球の中で、NKT 細胞は極めて限られた抗原受容体を発現するという点で特殊な存在である。DOCK2 欠損マウスでは、胸腺、脾臓、肝臓のいずれにおいても NKT 細胞が著減しており、そのリガンドである α GalCer を投与してもサイトカイン産生はほとんど認められず、ConA 誘導性肝炎に対しても抵抗性を示した。骨髄キメラマウスを用いた解析から、DOCK2 が T 前駆細胞に発現していることが、NKT 細胞の分化・発生に必要であることが明らかになった。以上より、DOCK2 は胸腺内分化過程において、TCR の抗原認識を介して NKT 細胞の分化を制御していると考えられた。

③創薬の分子標的としての DOCK2 の有用性

免疫系は生体にとって感染に対する必須の防御機構であるが、一方免疫応答したための病態、例えば自己免疫疾患、移植片拒絶は、現代医学が解決すべき問題としてクローズアップされている。自己免疫疾患や移植片拒絶はその成因こそ異なるが、いずれも標的組織にリンパ球が浸潤し活性化されることによって惹起される病態であり、これらのリンパ球機能は、Rac 活性化を介した細胞骨格の再構築を必要とする。そこで、DOCK2 欠損がこれらの病態にどのように影響するのか、疾患モデルを用いて解析した。野生型マウスにアロ心臓を移植すると、激しい細胞浸潤を伴い全例が8日以内に拒絶されたが、DOCK2 欠損マウスをレシピエントとした場合は、100日以上の上着例も含め、グラフトの長期生着が可能となった。詳細な解析から、DOCK2 を欠損したレシピエントでは、アロ反応性 T 細胞のプライミングおよび移動が障害されていることが明らかとなった。また、自己免疫性糖尿病を自然発症する NOD マウスにおいても、DOCK2 を欠損することで疾患発症を完全に阻止できた。以上より、DOCK2 は新規免疫抑制剤開発の分子標的となる可能性が示唆された。

④DOCK2-GFP ノックインマウスの開発

DOCK2 の発見以降、その細胞内動態は国内外の多くの細胞生物学者や免疫学者が関心を寄せているテーマであった。この重要な問題を解決すべく、DOCK2 遺伝子の最終エクソン直下に GFP をコードする遺伝子を挿入したノックインマウスを作製した。このマウスを用いることで、極めて生理的な条件下で DOCK2 動態のダイナミズムを可視化できるのみならず(後述)、DOCK2 会合分子の網羅的解析が可能になった。

⑤DOCK2 による好中球遊走の制御機構

好中球は極めて運動性の高い、生体防御システムの最前線で機能する白血球である。これまでノックアウトマウスを用いた解析より、好中球の遊走や活性酸素産生において、Rac が重要な役割を演じることが明らかにされているが、Rac 活性化に関わる分子は不明であった。DOCK2 欠損

好中球では、fMLP刺激によるRac活性化が障害されており、その結果leading edgeにおけるFアクチン及びPIP₃の集積が消失することを見いだした。さらに、GFPノックインマウスを用いて、DOCK2がPIP₃と会合し、PI3K依存的に細胞膜移行することを明らかにした。興味深いことに、DOCK2によるRac活性化は、持続したPIP₃の集積やAktのリン酸化には重要であったが、PIP₃の産生そのものには全く影響しなかった。以上より、DOCK2は好中球の遊走において、RacとPIP₃間の正のフィードバックループで機能するRac活性化分子であるが、そのフィードバック機構はPI3Kの触媒活性を介したものではないことが明らかとなった。

⑥その他

ヘルパーT細胞分化や自然免疫系におけるDOCK2の新しい機能とその分子機構を解明した。また、DOCK2以外の数種類のCDMファミリー分子を対象に、ノックアウトマウスを新たに作製し、その生理的機能の一端を明らかにした。

5 自己評価:

本研究課題の開始に際して、1) DOCK2シグナル伝達機構、2) 細胞運動の分子基盤、3) 免疫シナプス形成の分子機構とその意義、4) DOCK2を標的とした宿主応答制御法の開発、5) 他のCDMファミリー分子の機能とシグナル伝達機構という5つの柱のもと、13のテーマを設定したが、未発表のデータも含めると、概ね計画通りに進行したと言える。このように、多くの遺伝子改変マウスの作製と解析を可能にしたのは、技術員の人的サポートによるところが大きい。今後は、未発表の成果をきちんとした形でまとめること、及び本研究で得られたシーズを大きく発展させることに力を注いでいきたいと考えている。唯一反省すべきは、ウイルス感染とDOCK2という当初予定したテーマに関して、きちんとした研究が出来なかった点であろう。興味深いことに最近、HIV感染T細胞において、DOCK2がHIV Nefと複合体を形成することが報告された。それ故、DOCK2シグナルはAIDS発症にも関与している可能性があり、この点は今後の検討課題としたい。

6 研究総括の見解:

免疫系に特異的に発現するDOCK2がケモカイン受容体やT細胞受容体の下流で機能するマスター分子で、リンパ球遊走や免疫シナプス形成に不可欠の分子であるという、本研究者自身の従来研究成果を踏まえて、本研究では、DOCK2によるリンパ球ホーミングの制御機構、NKT細胞の発生におけるDOCK2の役割、DOCK2による好中球遊走の制御機構などの研究課題において極めて重要な研究成果を挙げ、この分野の研究に大きい貢献をした。

7 主な論文等:

原著論文

1. Handa Y, Suzuki M, Ohya K, Iwai H, Ishijima N, Koleske AJ, Fukui Y, Sasakawa C: *Shigella* IpgB1 promotes bacterial entry via ELMO–Dock180 machinery. **Nature Cell Biol.**, 2006 in press

2. Kunisaki Y, Nishikimi A, Tanaka Y, Takii R, Noda M, Inayoshi A, Watanabe K, Sanematsu F, Sasazuki T, Sasaki T, Fukui Y: DOCK2 is a Rac activator that regulates motility and polarity during neutrophil chemotaxis. **J. Cell Biol.**, 174: 647–652, 2006
3. Shulman Z, Pasvolsky R, Woolf E, Grabovsky V, Feigelson SW, Erez N, Fukui Y, Alon R: DOCK2 regulates chemokine-triggered lateral lymphocyte motility but not transendothelial migration. **Blood**, 108: 2150–2158, 2006
4. Kunisaki Y, Tanaka Y, Sanui T, Inayoshi A, Noda M, Nakayama T, Harada M, Taniguchi M, Sasazuki T, Fukui Y: DOCK2 is required in T cell precursors for development of V α 14 natural killer T (NKT) cells. **J. Immunol.** 176: 4640–4645, 2006
5. García-Bernal D, Sotillo-Mallo E, Nombela-Arrieta C, Samaniego R, Fukui Y, Stein JV, Teixidó J: DOCK2 is required for chemokine-promoted human T lymphocyte adhesion under shear stress mediated by the integrin α 4 β 1 **J. Immunol.**, 177: 5215–5225, 2006
6. Jiang H, Pan F, Erickson LM, Jang MS, Sanui T, Kunisaki Y, Sasazuki T, Kobayasi M, Fukui Y: Deletion of DOCK2, a regulator of the actin cytoskeleton in lymphocytes, suppresses cardiac allograft rejection. **J. Exp. Med.**, 22: 1121–1130, 2005
7. Nombela-Arrieta C, Lacalle RA, Montoya MC, Kunisaki Y, Megías D, Marqués M, Carrera AC, Mañes S, Fukui Y, Martínez-A C, Stein JV: Differential requirements for DOCK2 and phosphoinositide-3-kinase γ during T and B lymphocyte homing. **Immunity**, 21: 429–441, 2004
8. Kunisaki Y, Masuko S, Noda M, Inayoshi A, Sanui T, Harada M, Sasazuki T, Fukui Y: Defective fetal liver erythropoiesis and T-lymphopoiesis in mice lacking phosphatidylserine receptor. **Blood**, 103: 3362–3364, 2004

総説

1. 福井宣規: 好中球遊走を制御する Rac 活性化分子 DOCK2、実験医学、2006 印刷中
2. 福井宣規: リンパ球の運動性を制御する分子 DOCK2、医学のあゆみ、213:2915–2920、2005
3. 福井宣規: 免疫シナプス形成を制御する CDM ファミリー分子 DOCK2、Molecular Medicine 増刊「免疫 2005」41: 75–83、2004
4. 福井宣規: MHC による免疫システムの構築、ゲノム医学、4: 331–336、2004

受賞

平成15年度日本免疫学会賞 2003.12.9

招待講演

Fukui Y, Kunisaki Y, Nishikimi A:

DOCK2 is a Rac activator critical for neutrophil chemotaxis

The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2006 年 12 月 11-13 日、Osaka, Japan

Fukui Y:

Remodeling of the actin cytoskeleton in lymphocytes: from molecular mechanism to its clinical application.

The 8th FIMSA / IIS Advanced Immunology Course: Focus on Clinical Immunology, 2006 年 3 月 1-5 日、New Delhi, India

Fukui Y:

DOCK2, a regulator of the actin cytoskeleton in lymphocytes, is a novel molecular target for controlling allo-graft rejection and autoimmune diseases.

The 4th International Symposium of Kyoto T Cell Conference, 2005 年 4 月 8-10 日、kyoto, Japan

Fukui Y:

Remodeling of the actin cytoskeleton by the CDM family protein DOCK2: its critical role in migration and function of lymphocytes.

The 33th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2003 年 12 月 18-10 日、Fukuoka, Japan

Fukui Y:

Signaling and function of DOCK2, a regulator of the actin cytoskeleton in lymphocytes、German-Japan Immunology Meeting、2003 年 12 月 4-6 日、Nagasaki, Japan

その他 国内招待講演 6件

研究課題別評価

1 研究課題名:免疫制御性T細胞の分化メカニズムの解明とその免疫疾患治療への応用

2 研究者氏名:堀 昌平

研究員:西川 毅 (研究期間 H.16.4.1~H.19.3.31)

技術員:高山 あい子 (研究期間 H.16.9.1~H.19.3.31)

3 研究のねらい:

免疫系は「自己」・「非自己」を識別し、「非自己」を排除する一方で「自己」に対する寛容性を確立・維持している。近年の研究により、健常個体の免疫系には制御性T細胞(regulatory T cells, T_{reg})と呼ばれるCD4 T細胞サブセットが存在し、自己反応性T細胞を抑制的に制御することで自己免疫寛容の確立・維持に重要な機能を担うことが明らかにされてきた。さらに、 T_{reg} は自己免疫のみならず、炎症、感染免疫、アレルギー、移植免疫、腫瘍免疫などのさまざまな免疫応答を抑制的に制御し得ることが明らかにされ、免疫恒常性の維持に極めて重要であることが示唆されてきた。従って、 T_{reg} の発生・分化、抑制機能の分子基盤を明らかにすることは、基礎免疫学的にも本質的な課題であるのみならず、上記のさまざまな免疫関連疾患を克服するためにも極めて重要である。

我々は、マウスおよびヒトの致死性自己免疫疾患IPEXの原因遺伝子として同定された転写因子Foxp3に着目し、これが T_{reg} 特異的に発現する分子マーカーであり、その発生・分化と機能を制御するマスター遺伝子として機能することを明らかにしてきた。本研究は、① T_{reg} の免疫制御系における生理的意義を確立し、②どのような分子メカニズムでFoxp3 が誘導され、③Foxp3 がどのように T_{reg} の発生・分化と抑制機能を制御するのかを解明することを目的とした。

4 研究成果:

(1) 制御性T細胞の自己免疫寛容における生理的意義(堀)

機能的Foxp3を発現できない自然変異マウスである*scurfy*マウスにおいては T_{reg} が発生・分化しないことから、*scurfy*マウスは T_{reg} 欠損のために致死性自己免疫疾患を発症すると考えられている。一方、*scurfy*マウスの骨髄細胞を致死量の放射線をあてた野生型マウスに移植して免疫細胞を*scurfy*ドナー由来の細胞に置換した骨髄キメラマウスは致死性自己免疫疾患を発症しないことから、この自己免疫疾患は T_{reg} の発生・分化異常によるのではなく、むしろ非血球系細胞、特にT細胞の分化・選択を担う胸腺上皮細胞側の異常により発症するとの仮説が提唱されてきた。我々はこれらの2つの仮説を検証する目的で、まず上記骨髄キメラマウスを作製・解析し、実際にこのキメラマウスが自己免疫疾患を発症しないことを確認した。しかしながら、このキメラマウスにおいては宿主由来の放射線抵抗性Foxp3 陽性 T_{reg} が選択的に残存しており、これらが自己免疫疾患の発症を抑制していることが明らかになった。一方、非血球系細胞側のFoxp3 遺伝子異常の

病態への関与を明らかにする目的で、RAG遺伝子欠損 *scurfy* マウスを作製し、これを宿主として野生型骨髄細胞を移植した骨髄キメラを作製した。その結果、これらキメラマウスは自己免疫疾患を発症せず健常であることから、*scurfy* マウスに発症する自己免疫疾患は非血球系細胞側の異常によるのではなく、 T_{reg} の欠損によることが明確に示された。従って、 $Foxp3^+ T_{reg}$ は自己免疫寛容の確立・維持において極めて本質的な役割を担っていることが明らかになった (Komatsu and Hori論文投稿準備中)。

(2) $Foxp3^{ires-hCD2/52}$ ノックインマウスの作製 (高山、堀)

$Foxp3^+ T_{reg}$ の免疫制御における生理的意義及び様々な疾患における機能を明らかにするためには、これを特異的に除去するシステムが必要不可欠である。また、 $Foxp3$ を誘導する上流シグナルを解析する上で、 $Foxp3$ 発現を単一生細胞レベルで検出、解析することが必要である。これら2つの問題に取り組む目的で、 $Foxp3$ 遺伝子座にレポーター遺伝子 $Thy1.1$ あるいは $hCD2/52$ キメラ蛋白をノックインしたマウスモデルを作製した。これら細胞表面抗原に対しては、特異的な depleting 抗体が利用可能であり、抗体投与により $Foxp3^+ T_{reg}$ を特異的に除去できると考えられる。まず $Thy1.1$ ノックインマウスを得たが、レポーター発現が認められなかったため、次に $hCD2/52$ ノックインマウスを B6 ES細胞を用いて作製した。キメラマウスからターゲティングした遺伝子座を受け継いだ F1 マウスがなかなか得られなかったが、最近ようやく1匹 F1 マウスを得て、この末梢血を解析したところレポーターの発現が認められた。今後、様々な組織、細胞種におけるレポーター発現を詳細に検討し、抗 $hCD52$ 抗体投与によって $Foxp3^+ T_{reg}$ の特異的除去が可能であるか検討する予定である。

(3) $Foxp3$ の構造活性相関解析 (西川)

$Foxp3$ がどのような分子メカニズムによって T_{reg} の発生・分化と機能を制御するのかを明らかにする目的で、まず $Foxp3$ の機能発現に必要な機能ドメインの同定を行った。 $Foxp3$ は既知の機能ドメインを持たない N 末端領域、leucine-zipper、zinc finger、forkheadドメインからなるが、これらを欠いた欠損変異体を作製し、レトロウィルスを用いてナイーブ ($CD25^{-/-} 45RB^{hi}$) $CD4^+ T$ 細胞に導入することで T_{reg} と同様の性質と機能を与えるか検討した。その結果、 $Foxp3$ の機能発現には forkheadドメインを解した DNA 結合、leucine-zipper を解した homodimer 化、NFドメインを解した他の核内因子との相互作用が必要であることが示唆された (Nishikawa, Takayama and Hori論文投稿準備中)。

(4) IPEX 型 $Foxp3$ 遺伝子変異の T_{reg} 発生・分化と機能に与える影響 (堀、高山、西川)

次に、ヒト IPEX 患者に発症する自己免疫疾患が T_{reg} の発生・分化、機能異常によるのかを明らかにするために、IPEX 患者で同定・報告されている $Foxp3$ 変異の T_{reg} 分化と機能に与える影響を解析した。このために IPEX 患者で同定されている $Foxp3$ 変異体を7種作製し、レトロウィルスを用いてナイーブ $CD4^+ T$ 細胞に導入することで T_{reg} と同様の性質と機能を与えるか検討した。その結果、変異体を導入した T細胞は *in vitro* において通常の T細胞の増殖応答を抑制する機能、及び *in vivo* において SCID マウスにナイーブ T細胞を移入することによって誘導される炎症性腸炎の発症を抑制する機能を示すことができなかった。また、ほとんどの変異体は抑制機能のみならず $CD25$,

GITR, CTLA-4 など T_{reg} に発現するマーカー分子群も正常に誘導できなかったことから、これら変異により T_{reg} の発生・分化が障害されることが明らかになった。一方、非常に興味深いことに、これらのうち一つの変異体は T_{reg} マーカー分子群を正常に誘導したことから、この変異によって T_{reg} の分化ではなく機能が選択的に障害される可能性が考えられた。以上の結果は、IPEX患者においては T_{reg} の発生・分化あるいは機能が障害されており、このためにIPEXが発症するという可能性を強く示唆している(Hori, Takayama and Nishikawa論文投稿準備中)。

(5) 免疫抑制機能に関わるFoxp3の標的遺伝子の探索(高山、堀)

T_{reg} の抑制機能に選択的に障害を与えるIPEX型変異体が存在するという上記の知見は、この変異により抑制機能に関わる抑制機能分子が選択的に誘導されなくなるために免疫抑制活性を示すことができないという可能性を示唆している。この作業仮説を検証する目的で、DNAマイクロアレイ法により野生型Foxp3を導入したT細胞群とこの変異体を導入したT細胞群のあいだで遺伝子発現プロファイルを比較した。その結果、これら2種類のT細胞群は極めて類似した遺伝子発現パターンを示すこと、しかしながら、少数の遺伝子群の発現がこの変異により影響されることを見出した。発現解析により、これらのうちの一つの遺伝子(ここではFit1: Foxp3-induced transcript 1と呼ぶ)が T_{reg} の機能的活性化に伴って誘導される遺伝子であることを見出し、抑制機能に関わる重要な遺伝子であると考えられた。そして、T細胞特異的にFit1を発現するトランスジェニックマウスを作製し、これをscurfyマウスと交配させることでscurfyマウスに見られるT細胞の異常増殖が部分的に是正されたことからFit1はFoxp3の機能を担う重要な標的遺伝子であることが示唆された。現在、Fit1をT細胞特異的に欠損するノックアウトマウスを作製・解析してその T_{reg} における機能を解析している。

(6) 今後の展望

本研究により、制御性T細胞の発生・分化あるいは機能の異常がIPEXという重篤な自己免疫疾患の発症に直結することが明らかにされ、制御性T細胞が自己免疫寛容の確立・維持に必須の役割を担っていることが明らかになった。さらに、IPEX型Foxp3変異体の解析を通して、抑制機能に関わると考えられる候補遺伝子を同定することができた。本研究期間内にこれら遺伝子の制御性T細胞における機能を明らかにすることはできなかったが、今後の研究を通して制御性T細胞による免疫抑制機構の分子メカニズムが解明されることを期待している。そして、最終的には、免疫抑制機構の分子メカニズムを解明することで制御性T細胞の機能を人為的に制御することが可能になり、自己免疫疾患、炎症性疾患、アレルギー、慢性感染症、がんなどの様々な免疫関連疾患の新たな治療法の開発に貢献したいと考えている。

5 自己評価:

本研究は当初、① T_{reg} による免疫制御機構の生理的意義、②Foxp3の誘導メカニズム、③Foxp3の標的遺伝子の同定と転写制御機構の解明、という3つの大きな目標を掲げていた。①および②に関しては、まずFoxp3発現細胞を単一生細胞レベルで検出・同定し、これを特異的に除去することを可能にする実験ツールとしてFoxp3^{hCD2/52}ノックインマウスを確立することでこれらの問題にア

アプローチする戦略をとったが、ノックインマウスの作製が当初の計画通り円滑には進まず多大な時間と労力を費やした。苦勞の甲斐あって最終年次後半になってようやくマウスを得ることができたが、本研究期間内にこのマウスをツールとして当初目標としたこれら2つの問題に取り組むことがほとんどできなかった。しかしながら、①に関しては *scurfy* マウスを用いた骨髓キメラマウスを作製することにより、*scurfy* マウスに発症する自己免疫疾患が古くから提唱されていたような胸腺環境の異常ではなく T_{reg} の欠損によることを初めて明確に証明することができ、一定の成果を得ることができた。この結果は、 T_{reg} が自己免疫寛容の確立・維持において必須の役割を担っているという概念を確立するものであり、その意味で大きな成果であると考えている。

一方、本研究では③の問題に集中して取り組み、未だ不明である T_{reg} による免疫抑制の分子メカニズムを解明する上で大きな手がかりを得ることができたと考えている。この問題にアプローチするために、まずヒトIPEX患者に見つかっている *Foxp3* 遺伝子の変異の T_{reg} の発生・分化と機能に与える影響を解析することから始めたが、その研究のなかから T_{reg} の機能に選択的に障害を与える変異体を同定するというセレンディピティーに恵まれた。そして、この変異によって発現が影響を受ける遺伝子を網羅的にスクリーニングすることで、 T_{reg} の抑制機能と強く相関して発現する遺伝子を絞りこむことに成功した。しかしながら、本研究期間内にこれら候補遺伝子の T_{reg} の機能における役割を明確に示すことができず、今後の課題として残っている。

本研究において私は、 T_{reg} の発生・分化と機能の分子メカニズムを解明する上で *Foxp3* の次のブレークスルーとなるような大きな研究を目指してきた。本研究期間内にはその目標を明確なことにすることはできなかったが、大きな手がかりを得ることができたのではないかと考えているし、また実際論文文化できるストーリーを複数作ることができた。一方で、得られた結果を論文としてまとめて具体的な成果を挙げるという点がおろそかになりがちであり、この点は大きな反省点、今後の課題として残っている。

6 研究総括の見解:

致死的自己免疫疾患である IPEX の原因遺伝子である転写因子 *Foxp3* は、制御性 T 細胞特異的に発現する分子であり、その発生・分化と機能を制御するマスター遺伝子として機能するということを明らかにした本研究者の実績を踏まえて、本研究は、制御性 T 細胞の免疫制御系における生理的意義の確立、*Foxp3* が誘導される分子メカニズム、*Foxp3* による制御 T 細胞の発生・分化と抑制機構の制御メカニズムの解明を目的とし、重要な成果を挙げた。特に第 3 の目的に関しては、制御性 T 細胞による免疫抑制の分子メカニズムを解明する上で大きな手がかりとなる成果を挙げ、今後の発展に大きい期待を寄せることができる。

7 主な論文等:

論文

1. Wang, Y.M., Zhang, G.Y., Wang, Y., Hu, M., Wu, H., Watson, D., Hori, S., Alexander I.E., Harris, D.C., Alexander, S.I. (2006) *Foxp3*-transduced polyclonal regulatory T cells protect

- against chronic renal injury from adriamycin. *Journal of American Society of Nephrology* **17**: 697-706
2. Chai, J.G., Xue, S.A., Coe, D., Addey, C., Bartok, I., Scott, D., Simpson, E., Stauss, H.J., Hori, S., Sakaguchi, S., Dyson, J. (2005) Regulatory T cells, derived from naive CD4+CD25- T cells by in vitro Foxp3 gene transfer, can induce transplantation tolerance. *Transplantation* **79**: 1310-1316
 3. Hori, S. and Sakaguchi, S. (2004) Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes and Infection* **6**: 745-751

受賞

平成 18 年度科学技術分野の文部科学大臣表彰:若手科学者賞(平成 18 年 4 月)

招待講演

1. Workshop “The contribution of Immunology to general concepts in biology: past and future”. November 20-23, 2006. Arrabida, Portugal
2. RCAI-JST International Symposium on Immunology 2006. June 16-18, 2006. Yokohama.
3. The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. December 1-3, 2004. Sapporo.
4. The 30th Annual Meeting of the Portuguese Society of Immunology. September 30-October 2, 2004. Oeiras, Portugal.
5. Workshop “Regulating Autoimmunity”. June 14-16, 2004. Storforsen, Sweden.