

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「細胞外微粒子に起因する生命現象の解
明とその制御に向けた基盤技術の創出」
研究課題「細胞外核酸の免疫学的評価法確立と生
理学的意義の解明」

研究終了報告書

研究期間 2018年10月～2024年03月

研究代表者:石井 健
(東京大学 医科学研究所 教授)

§ 1 研究実施の概要

(1)実施概要

本研究は、細胞外の核酸を含む微粒子およびその放出を誘導する分子に着目し、応答機構と生理的意義を探究するとともに、計測技術や制御法の開発を目指します。

まず我々は典型的な DNA の細胞外放出機構である NETs(neutrophil extracellular traps)に着目し、イメージサイトメトリーで定性、定量化することに成功しました(Lelliott PM et al, 2019)。令和元年度にはその技術を応用しつつ、細胞外核酸を放出する新たな原因分子を同定するとともに(Lelliott PM et al, 2019)、NETsのDNA放出や細胞死に必須な遺伝子 ZBP1 の遺伝子欠損マウスを用いて生理的重要性を解明しました(Momota et.al.2020)。一方で、核酸に結合するタンパクであり、NETs と関連の深い IL-33 が、インフルエンザウイルスに対する免疫応答の活性化に寄与することも明らかにしました(Kobari S et.al.2020)。令和 2 年度は、IL-33 の放出メカニズムの詳細について解明するとともに(Momota M et.al.2020)、RNA 受容体である TLR7 を介した免疫応答を活性化する粒子を開発しました (Jin, Vu, Hioki et al. 2020)。また、核酸と関わりの深い乾癬の病態に関わる新たな知見を得ました (Rizaldy et al. 2021)。令和 3 年度は細胞外核酸が引き起こす応答の制御機構、核酸の応用や解析技術の開発に関する成果を得ました。まず機構解明に関する成果として、様々な核酸受容体の下流でシグナル制御に中心的な役割を果たす TBK1 の抗体産生における重要性を解明し(Lee et al. 2022)、さらに核酸によって誘導される典型的なサイトカインの 1 つである IL-6 の転写制御機構の一端を解明しました(Lian et al 2022)。また、抗腫瘍免疫応答を活性化する新たな非メチル化 DNA オリゴヌクレオチドを開発し(Nakagawa T et al. 2021) 、一方で、細胞の分泌応答をリアルタイムで解析する解析系の開発にも成功しました(Yamagishi M et al. 2022)。さらに令和 4 年度以降の成果として、本研究で構築した微粒子の解析系から得た微粒子パラメーターを用いて、アジュバントのスクリーニングをアシストする予測システムを開発しました(Hioki et al. 2022)。また、新たな核酸微粒子アジュバント等を開発し、また、機構解明を行いました(Nakagawa et al. 2022)、(Yamada et al. 2022) (Temizoz et al. 2022) (Yoshioka et al. 2023)。一方で、内在する核酸を含めた自己由来分子に関して、新たな DAMPs の同定に成功しました (Guang et al. 2022)。一方で、肺で微粒子に応答する肺胞マクロファージについて、新たな活性化機構を明らかにしました(Takumi et al. 2022)。

さらに、投稿中または準備中の成果として、細胞外核酸を放出させる様々な薬剤を同定し、核酸の放出機構、取り込み機構と生理的重要性の解明を進めています(Negishi et. al.準備中 2 件) (Okude et al. submitted)。また、BD Influxを用いた細胞外核酸のマルチカラー解析の系を確立しました(Hayashi et al. under revision)。さらに、核酸を含めたアジュバント粒子の混合物である結核菌熱水抽出物(Z100)について、新たな効能を発見し、機構を解明しました(Temizoz et al. under revision)。その他、核酸粒子への応答を阻害する薬剤を単離し(Temizoz et al. under revision)、IL-6 に関する続報として詳細機構を解明しました(Kano et al. submitted)。

総じて、BD Influx の機器改良による微粒子分解能の向上と、微粒子の多色染色、解析方法の確立を基軸として、細胞外微粒子の解析/単離技術の開発を行い、その技術を使用しつつ、細胞外核酸粒子やそれらを誘導する分子/薬剤の単離と機構解明、生理的重要性の検証を推進しました。

(2)顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 細胞外核酸の放出機構の発見と機構解明

概要:

細胞外核酸を放出させる物質として、様々な薬剤を同定した。それぞれ機序は異なるが、細胞への様々な影響が細胞外に核酸を放出するトリガーとなることが明らかとなった。

(Lelliott PM et al. 2019)(Momota et al.2020) (Guang et al. 2022) (Negishi et al. 準備中 2 件)

2. 細胞外核酸に対する応答機構の解明

概要: 細胞外核酸や細胞外核酸を含む微粒子が免疫応答を活性化する機構とその生理的重要性を解明した。いずれの細胞外核酸も免疫応答を活性化する強い作用を有しており、強力なアジュバントになり得る一方で、内在性の細胞外核酸は疾患増悪への関与も示唆される。

(Negishi et.al 2019)(Momota et.al.2020) (Jin, Vu, Hioki et.al.2020) (Lee et al 2022) (Nakagawa et al. 2022)、(Yamada et. al. 2022) (Temizoz et. al. 2022) (Yoshioka et. al.2023) (Tomoya et. al. under revision) (Temizoz et. al. under revision)

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. BD Influx による細胞外核酸の解析および単離方法の開発

概要: 微粒子サイトメトリー技術(微粒子のマルチカラー解析と単離技術)を開発した。特許出願も完了し、論文投稿中である。侵襲性のない疾患診断方法として開発も予定しており、開発協力企業を募っている。微粒子のマルチカラー解析によって得られる膨大な情報を新たなパラメーターとして疾患の診断に活かす部分に診断方法としての革新性がある。さらに、単離技術は、病態に関連する微粒子の解析を可能とし、疾患発症や増悪の原因解明を加速させる。

(Hayashi et. al. under revision)

2. 核酸粒子アジュバントの開発

概要: 免疫応答を活性化する新たな核酸粒子または核酸を含む混合物等のアジュバントを開発した。これらのアジュバントは新たなワクチン成分や病原体に対する治療または予防薬としての開発が期待される。

(Nakagawa T et al 2021) (Hioki et al 2022) (Nakagawa et al. 2022)、(Yamada et. al. 2022) (Temizoz et. al. 2022) (Yoshioka et. al.2023) (Temizoz et.al. Under revision)

< 代表的な論文 >

1. Single nanoparticle mapping and sorting in biological fluids and breath samples

Cell, under revision

概要: DB Influx を用いた微粒子サイトメトリー技術(機器改良による微粒子分解能の向上と、微粒子の多色染色、解析方法)を開発し、細胞外小胞やウイルス粒子、マラリア原虫、ミトコンドリア、非膜性の核酸粒子など、サンプルに含まれる多様な粒子の包括的マッピングを可能とした。臨床サンプルの解析から、ある種の疾患の予後予測が可能であることを明らかにした。1 件は特許出願済み、別 1 件も今年度中に出願予定である。

(Hayashi et al. under revision)

2. B cell-intrinsic TBK1 is essential for germinal center formation during infection and vaccination in mice, J Exp Med. 2022 Feb 7;219(2):e20211336.

概要: 様々な核酸受容体の下流でシグナルを制御する TBK1 の抗体産生での重要性を解明した。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

4 つのグループで研究を推進した。各グループはそれぞれ別々のミッションを持ちつつも、共同で検討を進めており、週に 1 回、定期的に合同 meeting を行い、5 年間の概算で 100 回以上の meeting を行った。そのようなチーム内の連携の強さが我々の特色であり、チームメンバー内で最新の未発表データを共有し、お互いに強みのある検討を補完し合うことで、効果的に共同研究を推進してきた。一例として、白崎グループ編入後、LCI-S は Coban グループの P2 研究室内に設置し、石井グループで毎週免疫細胞を用意、測定時は白崎グループが来所または遠隔で支援できるシステムを構築し、データの解析は白崎グループの主導で石井グループと共に行うというルーチン確立した。このルーチンの中に Coban グループや領域内の共同研究を組み込

んだことで、高度に特殊化された LCI-S の実験系をチーム内に浸透させることに成功した。

①石井グループ

石井 健 (東京大学 医科学研究所 教授)
小檜山康司 (東京大学 医科学研究所 准教授)
根岸英雄 (東京大学 定量生命科学研究所 特任講師)
Burcu Temizo (東京大学 医科学研究所 助教)
林智哉 (東京大学 医科学研究所 特任助教)
日置仰 (東京大学 医科学研究所 大学院生)
清水俊太郎 (東京大学 医科学研究所 学部生)
Ozdemir Sahin (ペンシルバニア州立大学 教授)
Min-Han Lew (東京大学 医科学研究所 研究員)

研究項目

・細胞外核酸の免疫学的解析と生理学的意義の解明

②Coban グループ

Cevayir Coban (東京大学 医科学研究所 教授)
Lee Michelle (東京大学 医科学研究所 特任助教)
松尾樹里亜 (東京大学 医科学研究所 大学院生)
立石祐樹 (東京大学 医科学研究所 大学院生)
Rashmi Dash (東京大学 医科学研究所 大学院生)
山内桃加 (東京大学 医科学研究所 特任専門職員)
友野糸子 (東京大学 医科学研究所 特任専門職員)
山本 俊 (大阪大学 基礎工学部 教授)

研究項目

・細胞外核酸の物理化学的特性と細胞イメージング

③河合グループ

河合太郎 (奈良先端大学 先端科学技術研究科 教授)
川崎拓実 (奈良先端大学 先端科学技術研究科 助教)
織大祐 (奈良先端大学 先端科学技術研究科 助教)
加納規資 (奈良先端大学 先端科学技術研究科 研究員)

研究項目

・細胞外核酸の放出機構および細胞外核酸により惹起される免疫応答シグナルの解析

④白崎グループ

白崎善隆 (東京大学 先端科学技術研究センター 特任助教)
楊倬皓 (東京大学 薬学系研究科 研究員)
島田紗也華 (東京大学 薬学系研究科 学部生)

研究項目

・内因性微粒子の放出と細胞間伝播を可視化する技術の細胞外核酸微粒子への応用

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

上記の研究成果に記載した研究期間内に行った研究の中で、チーム外、領域外の研究者との共同で行った研究を 50 以上の原著論文として報告している。また企業との連携についても、研究期間内に、5 社以上の製薬企業等と共同研究を進めており、さらに別の数社と連携に関する定期的な協議を行っている。このようなネットワークにより、それぞれの強みを駆使した有機的な連携を生み出し、研究を推進した。今後もこのようなネットワークを維持し、出口を見据えた開発研究に繋げていく。