

「生体防御のメカニズム」
平成7年度採択研究代表者

審良 静男

(大阪大学微生物病研究所 教授)

「遺伝子改変に基づく生体防御システムの解明」

1. 研究実施の概要

生体防御にかかわる転写因子、シグナル伝達分子、膜レセプター、リガンドの遺伝子欠損マウスを作製することにより、それらの各分子の生体内での役割を調べている。

(1) Toll/IL-1R ファミリーによるシグナル伝達の生体内での役割。

Toll/IL-1R ファミリーは、自然免疫に重要な役割を果たす受容体である。Toll/IL-1R ファミリーやその下流のシグナル伝達分子 (MyD88, I κ B キナーゼ等) のノックアウトマウスを作製することにより、Toll/IL-1R ファミリー・シグナル伝達の免疫反応や感染における役割を検討している。

(2) STAT ファミリーの生体内での役割。

サイトカインの機能発揮に JAK-STAT シグナル伝達が重要な役割を果たしている。ノックアウトマウスを作製することにより STAT3 と STAT6 の生体内における役割を解析している。

(3) C/EBP ファミリーの免疫反応における役割。

C/EBP ファミリーは、bZIP 型の転写因子である。これらのメンバーの生体防御における役割をノックアウトマウスを作製することにより解析している。

(4) DAP キナーゼファミリーの生体内での役割。

DAP キナーゼファミリーは、アポトーシスを誘導するキナーゼである。このキナーゼファミリーによるアポトーシスの分子機構を解明しようとしている。

2. 研究実施内容

(1) 兵庫医科大学生化学(現：大阪大学 微生物病研究所・癌抑制遺伝子研究分野)グループ

- ① マクロファージ特異的 STAT3 ノックアウトマウスを作製し、その解析をおこなった。マクロファージ特異的 STAT3 ノックアウトマウスは、エンドトキシンにきわめて感受性が高いことが判明した。STAT3 を欠損したマクロファージがまったく IL-10 の作用に反応せず、STAT3 が IL-10 シグナル伝達に必須の役割を果た

していることがあきらかとなった。マクロファージ特異的 STAT3 ノックアウトマウスは、Th1 反応優位になっており、生後 12W になると慢性腸炎が発生してきた。

- ② NF-IL6 のターゲット遺伝子の同定：野生型マクロファージと NF-IL6 ノックアウトマウス由来マクロファージ mRNA 間でサブトラクションをおこなった。その結果、新規の C-タイプレクチンが NF-IL6 の直接のターゲット遺伝子であることが判明した。
- ③ MyD88 ノックアウトマウスがまったくエンドトキシンに不応答であることが判明した。MyD88 ノックアウトマウス由来のマクロファージ、B 細胞、胎児線維芽細胞に LPS を処理しても炎症性サイトカインや NO の産生が認められなかった。MyD88 ノックアウトマウスは、多量の LPS を投与してもショックに陥らなかった。
- ④ TLR4 ノックアウトマウスを作製し解析をおこなった。TLR4 ノックアウトマウスもエンドトキシンに不応答であった。TLR4 遺伝子が、LPS 低応答性マウス C3H/HeJ の原因遺伝子である *Lps* 座と連鎖することから、C3H/HeJ 由来の TLR4 と野生型の TLR4 のアミノ酸配列を比較し、C3H/HeJ 由来の TLR4 の細胞質内ドメインに point mutation を同定した。この変異をもつ発現ベクターは NF- κ B を活性化できず、この変異が C3H/HeJ マウスの LPS 低応答性の原因であることがあきらかとなった。
- ⑤ IL-18R(IL-1Rrp)ノックアウトマウスを作製し、その解析をおこなった。IL-18R(IL-1Rrp)ノックアウトマウス由来の T 細胞は、IL-18 を結合することができず、IL-1Rrp が唯一の IL-18 結合受容体であることが判明した。IL-18R(IL-1Rrp)ノックアウトマウスは、IL-18 ノックアウトマウス同様、IFN γ 産生の低下、NK 細胞の活性低下、Th1 反応の障害が認められた。
- ⑥ IKK α ノックアウトマウスを作製し、その解析をおこなった。IKK α 欠損マウスは、四肢、皮膚の発達に障害が認められ、出生直後に致死となった。IKK α は NF- κ B の活性化を通じた四肢、皮膚の発生において必須であることが示された。一方、IL-1, TNF による NF- κ B の活性化は障害されておらず、IKK α はサイトカインによる NF- κ B の活性化には必須ではないことが示された。
- ⑦ 新規 IKK ファミリーメンバーを同定した。マクロファージ細胞株 RAW264.7 の LPS 刺激 (+) と (-) 群との間でサブトラクションを行った。その結果、IKK α , β と相同性のある新規な cDNA を得た。免疫細胞に特異的に発現しており、各種炎症性サイトカイン、LPS によって誘導されることから、免疫反応に特殊な役割を果たす IKK であることが示唆された。
- ⑧ ZIP キナーゼと相同性のある新規なセリン/スレオニンキナーゼを同定した。

(2) 兵庫医科大学免疫学・医動物学グループ

① IL-18R の発現調節とシグナル伝達

ナイーブ T 細胞を抗原と IL-12 あるいは IL-4 で刺激すると、Th1 あるいは Th2 細胞に分極する。IL-18R の発現は Th1 細胞のみで認められ、IL-18 で刺激されると IFN- γ の産生が著明に増強される。IL-18R は Th1 細胞の表面マーカーとして有効である。IL-18 は IL-12 の有する Th1 への分極誘導作用を増強する。

② 好塩基球の活性化

骨髄細胞を IL-3 とともに培養すると IL-18R 陽性の好塩基球が誘導される。そしてこの細胞をさらに IL-18 で刺激すると、この細胞から IL-4 と IL-13 が大量に産生される。これは IL-18 の新たな活性で、IL-18 がアレルギーにも関与することが示唆された。

(3) 兵庫医科大学解剖学第 2 グループ

転写因子 ATF/CREB ファミリーの一員である ATF3 の末梢神経傷害後の知覚神経節および運動ニューロンの細胞体での発現誘導の詳細な時間経過およびヘテロダイマーを形成する AP-1 ファミリーの一員である c-Jun との共存関係について、in situ hybridization および免疫組織化学法で検討した。脊髄知覚神経節ニューロンでは、ATF3 発現ニューロンの約半分で c-Jun 発現が観察され、一方、運動ニューロンではほぼ両者の発現は一致していた。以上の結果は、ATF3 は恒常的な発現はなく、細胞傷害を受けたニューロンではほぼ 100% 発現し細胞応答に関与する遺伝子として、c-Jun にはない特徴を有していることが明らかとなった。

(4) 兵庫医科大学生体防御システム研究部門グループ

① IL-12 と IL-18 による Wasting disease の誘導

IL-12 と IL-18 を投与すると、血中 IFN- γ の上昇、NO の上昇がおり、マウスは体重減少、小腸、大腸の出血性病変、肝の脂肪変性などが起こり、マウスは投与から約 10 日で死亡する。さらに、このような処置で、マウスの胸腺の CD4 陽性 CD8 陽性の T 細胞が、apoptosis で消失することも明らかとなった。

② 赤内型のマラリア原虫を感染させると、血中の IL-18 が上昇し、肝臓ではアポトーシスによる劇症肝炎が認められた。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

○竹田潔、改正恒康、吉田進昭、竹田潤二、岸本忠三、審良静男

Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis : Generation and characterization of T cell-specific

Stat3-deficient mice.

Journal of Immunology, 161, 4652-4660, 1998.

○竹田潔、筒井ひろ子、善本知広、足達治、吉田進昭、岸本忠三、岡村春樹、中西憲司、審良静男

Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice.

Immunity, 8, 383-390, 1998.

○Osamu Adachi, Taro Kawai, Kiyoshi Takeda, Makoto Matsumoto, Hiroko Tsutsui, Masafumi Sakagami, Kenji Nakanishi and Shizuo Akira.

Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1 and IL-18-mediated signalling.

Immunity, 9, 143-150, 1998.

○善本知広、竹田潔、田中貴志、大楠和延、柏村信一郎、岡村春樹、審良静男、中西憲司

IL-12 up-regulates IL-18R expression on T cells, Th1 cells and B cells : synergism with IL-18 for IFN- γ production.

Journal of Immunology, 161, 3400-3407, 1998.

○松本真琴、坂尾宣充、審良静男

Inducible expression of nuclear factor IL-6 increases endogenous gene expression of macrophage inflammatory-1 α , osteopontin, and CD14 in a monocytic leukemia cell line.

International Immunology, 10 (12), 1825-1835, 1998.

○Hiroshi Akaishi, Kiyoshi Takeda, Tsuneyasu Kaisho, Ryuzaburo Shineha, Susumu Satomi, Junji Takeda and Shizuo Akira

Defective IL-2-mediated IL-2 receptor α chain expression in Stat3-deficient T lymphocytes.

International Immunology, 10, 1747-1751, 1998.

○山条秀樹、河合太郎、審良静男

DRAKs, novel serine/threonine kinases related to DAP kinase that trigger apoptosis.

The Journal of Biological Chemistry, 273, 29066-29071, 1998.

○Takashi Tanaka, Tohru Tsujimura, Kiyoshi Takeda, Ayako Sugiura, Akiko Maekawa, Nobuyuki Terada, Nobuaki Yoshida and Shizuo Akira

Targeted disruption of ATF4 discloses its essential role in formation of eye lens secondary fibers.

Genes to Cell, 3, 801-810, 1998.

○坂尾宣充、竹田潔、筒井ひろ子、改正恒康、野村文子、岡村春樹、中西憲司、審良静男

IL-18-deficient mice are resistant to endotoxin-induced liver injury but highly susceptible to endotoxin shock.

International Immunology, 11 (3), 471-480, 1999.

○星野克明、竹内理、河合太郎、山条秀樹、小川知彦、竹田美文、竹田潔、審良静男

TLR4-deficient mice are hyporesponsive to LPS : evidence for TLR4 as the Lps gene product.

The Journal of Immunology, 162 (7), 3749-3752, 1999.

○Kiyoshi Takeda, Bjoern E. Clausen, Tsuneyasu Kaisho, Tohru Tsujimura, Nobuyuki Terada, Irmgard Foerster and Shizuo Akira

Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils.

Immunity, 10, 39-49, 1999.

○河合太郎、山条秀樹、審良静男

Duet is a novel serine/threonine kinases with Dbl-Homology (DH) and Pleckstrin-Homology (PH) domains.

Gene, 227, 249-255, 1999.

○星野克明、筒井ひろ子、河合太郎、竹田潔、中西憲司、竹田美文、審良静男

Generation of IL-18 receptor-deficient mice : evidence for IL-1Rrp as an essential IL-18 binding receptor.

The Journal of Immunology, 162, 5041-5044, 1999.

○Kiyoshi Takeda, Osamu Takeuchi, Tohru Tsujimura, Satoshi Itami, Osamu Adachi, Taro Kawai, Hideki Sanjo, Kunihiko Yoshikawa, Nobuyuki Terada and Shizuo Akira

Limb and skin abnormalities in mice lacking IKK α .

Science, 284, 313-316, 1999.