

様式 C - 7 - 1

令和2年度科学研究費助成事業（科学研究費補助金）実績報告書（研究実績報告書）

所属研究機関名称		奈良先端科学技術大学院大学	機関番号	14603
研究代表者	部局	先端科学技術研究科		
	職	教授		
	氏名	河合 太郎		

1. 研究種目名 基盤研究(B)(一般) 2. 課題番号 20H034683. 研究課題名 自然免疫受容体を介するPAMPs/DAMPs認識機構と炎症疾患への関与について4. 研究期間 令和2年度～令和4年度 5. 領域番号・区分 -

6. 研究実績の概要

本研究では、CRISPR/Cas9システムによるノックアウトスクリーニングを用いて、自然免疫応答制御に関わる新規因子の同定を試みた。マウスマクロファージRAW264.7細胞でスクリーニングを行った結果、ZAIPと名付けた遺伝子に変異を加えた細胞において、細菌由来のリポ多糖（LPS）刺激後の炎症性サイトカインIL-6の産生量がコントロール細胞と比較して100倍程度と顕著に増加していた。さらにRNA-seqを用いた網羅的解析を行った結果、116を含む多くの炎症性サイトカインやケモカインの発現上昇が観察された。ZAIPは核内に局在するタンパク質であり、興味深いことにENZ-1はヒストン修飾分子複合体の構成要素と相互作用することを見出し、エピジェネティックな制御に関与することが示唆された。また、ZAIPのコンディショナルKOマウスの樹立も行っている。平行して実施している死細胞由来の内在性因子（DAMPs）による自然免疫応答に関する解析において、今回新たに放線菌由来のNigericin刺激に伴い細胞死が誘導されDAMPsの一つIL-33が放出され免疫応答惹起に関与する可能性を見出した。Nigericin刺激により誘導されるCa²⁺流入がIL-33の核内から細胞質への局在変化を引き起こした。さらに、Nigericin刺激によるCaspase-1依存的な細胞死（パイロトーシス）がIL-33の細胞質から細胞外への放出に必要であった。これらのことから、IL-33の放出にはパイロトーシスに加えCa²⁺依存的な経路が重要な役割を果たしていることが示唆された。

7. キーワード

自然免疫 炎症 DAMPs

8. 現在までの進捗状況

区分 (2) おおむね順調に進展している。

理由
ZAIPの機能解析については、RNA-seqによる網羅的解析から標的とされる遺伝子群を明らかにすることができた。それらの中には炎症性サイトカインやケモカインが多く含まれていた。一方、LPS刺激後の転写因子NFκBやMAPキナーゼ群の活性化にはZAIP KO細胞とコントロール細胞間で差はなく、シグナル伝達制御に直接ZAIPが関わっていないことが示唆された。興味深いことにZAIPは核内に局在しており、結合分子の探索からヒストン修飾分子複合体の構成要素と相互作用することが認められた。このことは、ZAIPがエピジェネティックな制御に関与していることを強く示唆している。また、ZAIPの機能をより広範に理解するためZAIPを欠損するガン細胞株も複数樹立をすることができた。一方、Nigericin刺激によりDAMPsの一つIL-33がCa²⁺依存的に放出することを見出した。これは、細胞死に伴い受動的にDAMPsが漏出するとされてきた従来の考え方と異なり、シグナル伝達経路の活性化により能動的にDAMPs放出が制御されていることを示唆するものである。また、ガン細胞由来のIL-33は免疫逃避に寄与することも示唆されていることから、現在IL-33を欠損するガン細胞株を複数樹立している段階である。同時に、Nigericin以外にも様々な抗がん剤や化合物を用いてガン細胞を刺激し、IL-33放出を促すものをスクリーニングしている。これらにより腫瘍免疫応答におけるIL-33の役割ならびに放出機構の詳細を明らかにすることができると期待される。

2 版

9. 今後の研究の推進方策

RNA-seqの結果においてZAIP KO細胞で発現上昇が確認された遺伝子群の上流領域のH3K4me1/H3K4me3比を評価するとともに、H3K4me1の蓄積量を実際にChIP-qPCRを用いた定量を行う。また、ChIP-seq解析を通して、ZAIP KO細胞でLPS刺激後に発現上昇する遺伝子群とH3K4me1領域を比較することで、ENZ-1とヒストン修飾の関係性を明らかにする。また、アクティブエンハンサーのマーカースとしてよく用いられるH3K27acについても同様の実験系で確認を行うことで、ZAIPがエンハンサーの活性制御に関与しているかを評価する。また、ZAIPの機能ドメインを明らかにするため、部位欠損体を作成し、ZAIP KO細胞に発現させることで機能回復をどうか検討を行う。生理的機能を明らかにするため、コンディショナルKOマウスの樹立と解析を進めていく。他方、ガン細胞に発現するIL-33は免疫逃避に寄与することが示唆されていることから、この機構を明らかにすることで抗腫瘍免疫応答の理解と応用に繋がることを期待される。今後、IL-33を高発現するガン細胞の探索や、IL-33放出を促す抗がん剤や化合物等を見つける必要がある。また、IL-33を欠損する細胞株の樹立を行っており、IL-33が抗主要免疫応答に果たす役割についても明らかにしていく。

10. 研究発表（令和2年度の研究成果）

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著論文 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Momota Masatoshi, Nagayama Mizuka, Okude Haruna, Ishii Ken J., Ori Daisuke, Kawasaki Takumi, Kawai Taro	4. 巻 530
2. 論文標題 The Ca ²⁺ -dependent pathway contributes to changes in the subcellular localization and extracellular release of interleukin-33	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 699 ~ 705
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.07.127	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okude Haruna, Ori Daisuke, Kawai Taro	4. 巻 11
2. 論文標題 Signaling Through Nucleic Acid Sensors and Their Roles in Inflammatory Diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.625833	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 百田匡寿、河合太郎	4. 発行年 2020年
2. 出版社 (公社)日本医師会	5. 総ページ数 367
3. 書名 日本医師会雑誌特別号免疫・炎症疾患の基礎知識	

1 1 . 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

計0件（うち出願0件 / うち取得0件）

1 2 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

計0件

1 3 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

-

1 4 . 備考

-