

令和 3 年度 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究		
研究課題名		Malt1 欠損マウスを用いた慢性炎症病態の解析		
新規・継続の別		新規 ・ <u>継続</u>		
研究代表者	所属	大阪大学免疫学フロンティア研究センター自然免疫 学分野	40 歳 以下○	35 歳 以下○
	職名・氏名	教授・審良 静男		
研究分担者 (適宜行を追加し て下さい)	所属	大阪大学免疫学フロンティア研究センター自然免疫 学分野		
	職名・氏名	特任助教・田中 宏樹		
	所属			
	職名・氏名			
受け入れ教員	職名・氏名	教授・村上正晃		
概要 (100～150 字程度)		慢性炎症は多様な疾患との関連性が認められる。本共同研究において、慢性炎症モデルや癌モデル、及び、Malt1 欠損マウスを用いて自然免疫系細胞、T 細胞、及び、非免疫系細胞の機能に着目した解析を進め、多様な疾患の発症・悪性化の免疫病態の解明を進めている。		
研究目的 (300 字程度)		慢性炎症は、さまざまな疾患との関連性が認められることから、より詳細な分子機構の解明が多く病気に対する新規治療法に繋がると考えられる。当研究室は遺伝子改変マウスの作製に長けており、自然免疫に関連する分子の生理的機能を数多く明らかにしてきた。これまで我々が作製した Regnase1 A/A ノックインマウスや DC ノックインマウスなどを遺伝子病制御研究所に導入し、村上教授らと共に、Regnase1 が非免疫系細胞でリン酸化を受け、炎症応答を制御していることを明らかにした(J Exp Med. 216(6):1431-1449, 2019)。本研究は、これまでの自然免疫に関連する分子の遺伝子改変マウスを用いた T 細胞の機能解析を継続すると共に、我々が CD4 陽性 T 細胞において Regnase-1 の切断を介して mRNA の安定性を制御している Malt1 分子の T 細胞における機能についても詳細な解析を行い、論文化を目指す。		
研究内容・成果 (1000 字程度・Web 会議の回数 も記載)		当研究室で作製した遺伝子改変マウスを遺伝子改変動物実験施設に導入し、分子神経免疫学分野で多発性硬化症などの慢性炎症モデルや癌モデルを誘導し、炎症状態についての表現型解析をマクロファージなどの機器も利用して、我々が精通している自然免疫系細胞と共に、分子神経免疫学分野が得意とする非免疫系細胞及び T 細胞の炎症の慢性化に関わる免疫病態変化の解析を進めている。共同研究期		

	間中に、これまで進めてきた共同研究の成果を論文として発表した。Rhodobacter の lipopolysaccharides (LPSs)は TLR4 アンタゴニストであることが報告されている。また、Rhodobacter azotoformans (RAP99) の抽出物は、生体内の免疫反応を調節するために、日本ではヒトや動物の健康補助食品として使用されている。これまでに RAP99 の LPS 構造 (RAP99-LPS) は、大腸菌の LPS とは異なるが、TLR4 の拮抗剤として知られる Rhodobacter sphaeroides (RSLA) 由来の Lipid A と類似し、両者は C14 脂肪アシル基 3 個、C10 脂肪アシル基 2 個、リン酸 2 個を持っていることが明らかになっている。本共同研究において、RAP99-LPS が免疫賦活活性を持ち、TLR4 アゴニストとして作用することを新たに見出した。RAP99-LPS を前処理すると大腸菌 LPS による体重減少が抑制されたことから、Rhodobacter から分離した他の LPS と同様に大腸菌 LPS に対するアンタゴニストであることが示唆された。しかし、RAP99-LPS 処理により、C57BL/6 マウスでは脾臓肥大と免疫細胞数の増加が見られたが、TLR4 シグナルの機能を欠損した C3H/HeJ マウスでは見られなかったことから、RAP99-LPS は TLR4 を介して免疫細胞を刺激していることを見出した。さらに、RAP99-LPS は B16F1 腫瘍細胞の肺転移を抑制し、TLR3 を介したケモカインの発現を亢進させた。これらの実験事実から、RAP99-LPS が TLR4 アゴニストであり、免疫系の活性化状態を高め、in vivo での抗ウイルスおよび抗腫瘍活性を促進することが示唆された(Front Immunol. 12:675909, 2021)。 我々は、これまでに T 細胞受容体の下流においてパラカスパーゼ活性の存在が指摘されていた Malt1 に着目し、Malt1 による Regnase1 の分解が阻害されるマウスの作出に成功し、本マウス由来の T 細胞は顕著な機能低下を示すことを EAE 実験により明らかにした(Cell 2013 153(5):1036-1049, 2013)。本共同研究において、Malt1 による Regnase1 分解抑制がなぜ T 細胞機能を抑制するかについて詳細な分子機構を解明するとともに、本マウスでの非免疫細胞の機能についても解析を進めている。
成果	【学会報告】 参加者名、講演タイトル、学会名、開催場所、開催日時入力のこと
	【論文発表】 著者、論文名、掲載誌名、号・年・ページ等、IF 入力のこと Lee MSJ, Inoue T, Ise W, Matsuo-Dapaah J, Wing JB, Temizoz B, Kobiyama K, Hayashi T, Patil A, Sakaguchi S, Simon AK, Bezbradica JS, Nagatoishi S, Tsumoto K, Inoue JI, Akira S, Kurosaki T, Ishii KJ,

	Coban C. B cell-intrinsic TBK1 is essential for germinal center formation during infection and vaccination in mice. <i>J Exp Med.</i> 2022 219(2):e20211336. IF 14.307 Kawasaki T, Sugihara F, Fukushima K, Matsuki T, Nabeshima H, Machida T, Mitsui Y, Fujimura S, Sagawa R, Gaheun L, Kuniyoshi K, Tanaka H, Narazaki M, Kumanogoh A, Akira S, Satoh T. Loss of FCHSD1 leads to amelioration of chronic obstructive pulmonary disease. <i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i> 2021 118(26):e2019167118. IF 11.205 Fukushima K, Akira S. Novel insights into the pathogenesis of lung fibrosis: the RBM7-NEAT1-CXCL12-SatM axis at fibrosis onset. <i>Int Immunol.</i> 2021 33(12):659-663. IF 4.823 Murakami K, Kamimura D, Hasebe R, Uchida M, Abe N, Yamamoto R, Jiang JJ, Hidaka Y, Nakanishi Y, Fujita S, Toda Y, Toda N, Tanaka H, Akira S, Tanaka Y, Murakami M. <i>Rhodobacter azotoformans</i> LPS (RAP99-LPS) Is a TLR4 Agonist That Inhibits Lung Metastasis and Enhances TLR3-Mediated Chemokine Expression. <i>Front Immunol.</i> 2021 12:675909. IF 7.561 【新聞報道】
--	---

Rhodobacter azotoformans LPS (RAP99-LPS) Is a TLR4 Agonist That Inhibits Lung Metastasis and Enhances TLR3-Mediated Chemokine Expression

Kaoru Murakami 1, Daisuke Kamimura 1, Rie Hasebe 1, Mona Uchida 1, Nobuya Abe 1, Reiji Yamamoto 1, Jing-Jing Jiang 1 2, Yasuhiro Hidaka 3, Yuko Nakanishi 3, Shuzo Fujita 3, Yuki Toda 3, Nobuhiro Toda 3, Hiroki Tanaka 4, Shizuo Akira 4, Yuki Tanaka 1, Masaaki Murakami 1

Abstract

The lipopolysaccharides (LPSs) of *Rhodobacter* are reported to be TLR4 antagonists. Accordingly, the extract of *Rhodobacter azotoformans* (RAP99) is used as a health supplement for humans and animals in Japan to regulate immune responses *in vivo*. We previously analyzed the LPS structure of RAP99 (RAP99-LPS) and found it is different from that of *E. coli*-LPS but similar to lipid A from *Rhodobacter sphaeroides* (RSLA), a known antagonist of TLR4, with both having three C14 fatty acyl groups, two C10 fatty acyl groups, and two phosphates. Here we show that RAP99-LPS has an immune stimulatory activity and acts as a TLR4 agonist. Pretreatment of RAP99-LPS suppressed *E. coli*-LPS-mediated weight loss, suggesting it is an antagonist against *E. coli*-LPS like other LPS isolated from *Rhodobacter*. However, injections of RAP99-LPS caused splenomegaly and increased immune cell numbers in C57BL/6 mice but not in C3H/HeJ mice, suggesting that RAP99-LPS stimulates immune cells via TLR4. Consistently, RAP99-LPS suppressed the lung metastasis of B16F1 tumor cells and enhanced the expression of TLR3-mediated chemokines. These results suggest that RAP99-LPS is a TLR4 agonist that enhances the activation status of the immune system to promote anti-viral and anti-tumor activity *in vivo*.