

マクロファージの skewing に重要な分子の解明

審良 静男 (大阪大学免疫学フロンティア研究センター)

“The Jmjd3-*Irf4* axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection”
(Nature Immunology, Published online 22 August 2010)

IFReC の審良 静男 拠点長らの研究グループはエピジェネティクスに關与する脱メチル化である Jmjd3 が M2 マクロファージの skewing に必要不可欠であることを解明しました。

(1)はじめに

自然免疫担当細胞であるマクロファージは Pattern-recognition receptor (PRR)を介して感染をいち早く察知し、免疫系の活性化を惹起します。中でも、TLRファミリーは PRR の代表的な受容体であり、これらを介してバクテリア、ウイルス、原虫や真菌類を認識すると、マクロファージ自身は活性化し、炎症性サイトカインや I 型インターフェロン等を産生して、感染に対応します。

マクロファージは機能的に M1 型と M2 型との 2 種類存在している事が現在知られており、前者の M1 マクロファージはバクテリア、ウイルスや真菌類の感染時に活性化し、それらの病原体の排除に重要な TNF や NO を産生します。一方で、ある種のマクロファージは寄生虫感染、アレルギー応答、脂肪代謝、創傷治癒、癌転移等に寄与しており、これらのマクロファージは M2 マクロファージと呼称され、Arginase1、Ym1、Fizz1 等の遺伝子を M2 マクロファージマーカーとして発現します(Figure 1)。本研究では、寄生虫感染の際の M2 マクロファージへの skewing のメカニズムとエピジェネティックな遺伝子制御の関係性に焦点をあて、研究を行いました。

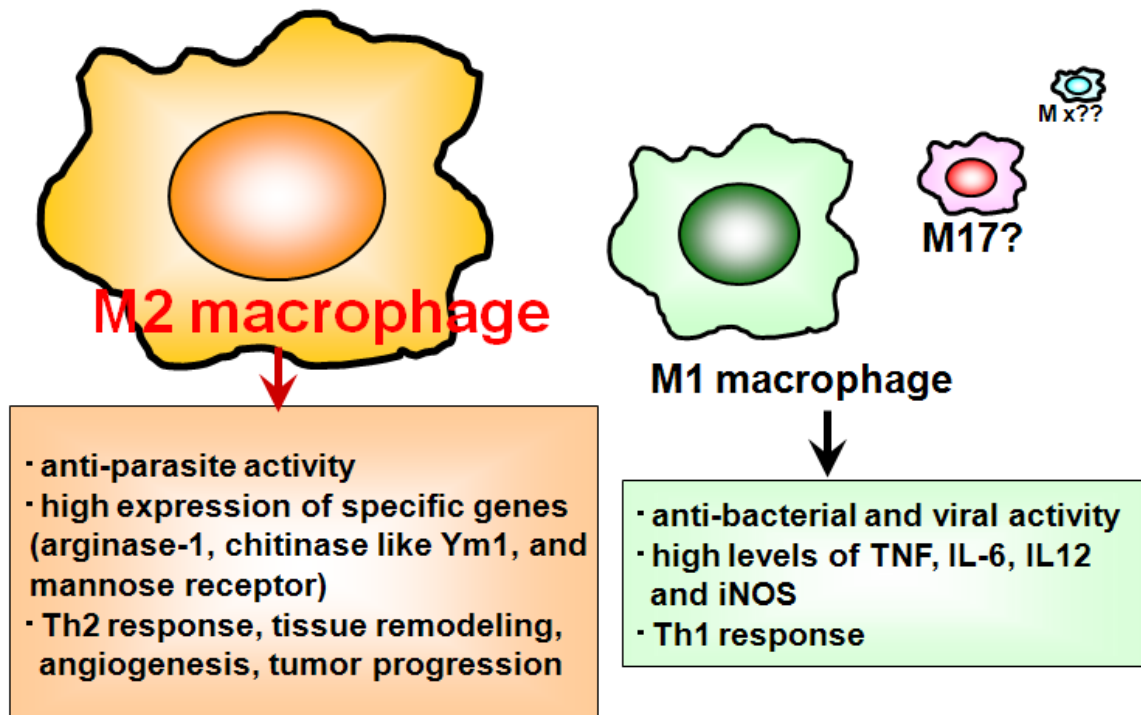


Figure 1: The concept of the macrophage subtype

(2)研究概略

我々は複数のDNAマイクロアレイの結果から、マクロファージの活性化に関与していると推測されるJmjd3を同定し、機能解析を行うためにこの遺伝子欠損マウスを作製いたしました。

この遺伝子欠損マウスは、肺の欠陥により生後直後に死亡します。そこで我々は、胎児由来の血球系の細胞を正常なマウスに移植したマウスを用いて免疫学的な解析を行いました。

Jmjd3 ノックアウトマウスは TLR リガンド刺激やバクテリア感染に対しては、野生型と同等のサイトカインの産生を認め、遊走してくる細胞集団にも差が確認されませんでした。以上のことから、jmd3 ノックアウトマウス由来の M1 マクロファージは正常である事がわかりました。

Chitin は天然に豊富に存在している化合物であり、アレルギー応答を誘導する原因物質の一つとして報告されています。我々はこの Chitin を jmd3 ノックアウトマウスに投与することにより、アレルギー反応を調べました。Jmjd3 ノックアウトマウスは Chitin 投与に対して、野生型と比較して M2 マクロファージマーカーの発現が顕著に減少しており、更には好酸球の遊走が全く起こりませんでした。続いて、寄生虫の感染実験を行った所、Chitin 投与の際と同様に、感染後に M2 マクロファージマーカーが減少しており、更には肺門リンパ節への CD4 陽性 IL-4 産生細胞の集積が見られませんでした。感染後期になると、野生型では肺への好酸球の遊走や泡沫化マクロファージが確認されたものの、jmd3 ノックアウトマウスではそれらの細胞の遊走は見られず、泡沫化マクロファージも確認されませんでした (Figure 2)。以上のことから、jmd3 ノックアウトマウスは M2 マクロファージの skewing に必要不可欠である事が明らかと成りました。

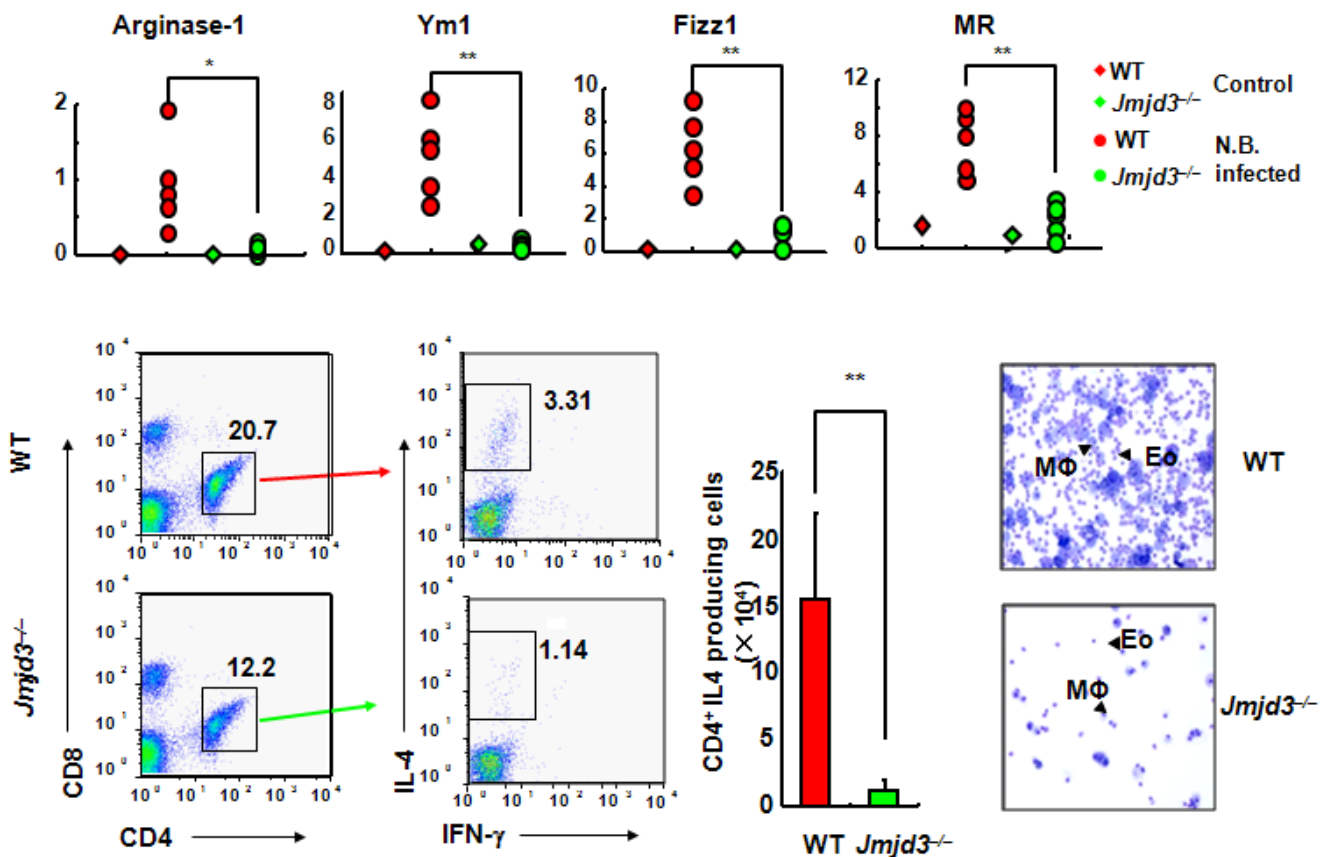


Figure 2

Jmjd3 は Histone3 Lys27me3 を脱メチル化するというエピジェネティックな遺伝子制御を行う機能を所持しています。Jmjd3 による H3K27me3 のメチル化は、遺伝子発現を抑制し、逆に脱メチル化は遺伝子発現を促進する事が報告されています。

我々は、Jmjd3 によって直接制御されている target 遺伝子を同定する目的で、Chromatin immuno-precipitation on sequencing (ChIP-seq)解析を行いました。ChIP-seq 解析とは、ある種の抗体を用いて免疫沈降で回収した DNA 断片からサンプル調整を施し、次世代シーケンサーを用いて超高速シーケンシングを行う解析であり、ヒストンメチル化などクロマチン構造変化のエピジェネティックな修飾や転写調節因子(DNA 結合タンパク質)のゲノム上での結合部位を、ゲノムワイドかつ網羅的に解析することができます。我々は、Jmjd3 ノックアウトマウスは脱メチル化がおこらず、jmjd3 によって直接的に制御されている遺伝子のプロモーター領域は、H3K27me3 のままになっているという仮定のもと、この抗 H3K27me3 抗体を用いて免疫沈降を行ったサンプルを使用し、ChIP-seq 解析を行いました。

その結果、M2 マクロファージマーカーのプロモーター領域における H3K27 のメチル化レベルは WT と KO とでは同程度確認され、更に jmjd3 によって制御されていると報告されていたいくつかの HOX 系の遺伝子のメチル化レベルも差異は認められませんでした。これらの遺伝子は mRNA の発現量には差があることから、jmjd3 はこれらの遺伝子を直接的ではなく、間接的に制御しているという事が判明しました。

Jmjd3 の直接的なターゲットを同定するために、プロモーター領域のメチル化レベルが、WT では減少しているものの、KO ではメチル化されたままになっている遺伝子群に着目して解析を行った結果、我々は、IRF4 のプロモーター領域に WT/KO 間で顕著に差異があることを確認しました (Figure 3)。そこで、IRF4 遺伝子欠損マウスに Chitin を投与して解析を行った結果、jmjd3 と同様に M2 マクロファージマーカーの発現は落ち、更には好酸球の遊走は見られませんでした。以上の事から、IRF4 が Jmjd3 の直接的なターゲットであることを発見しました。

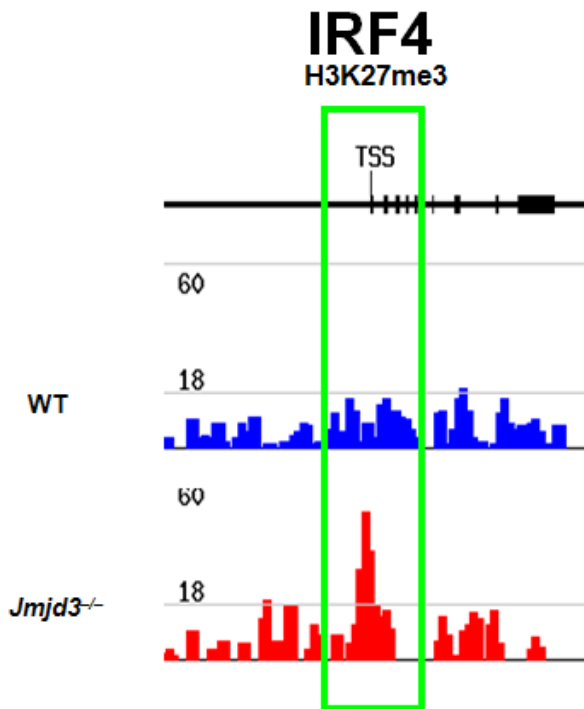
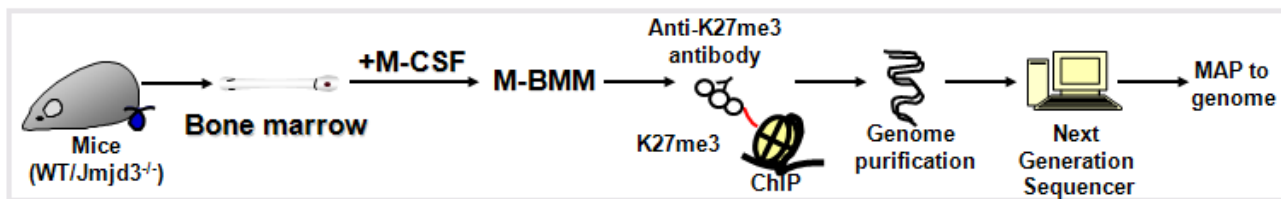
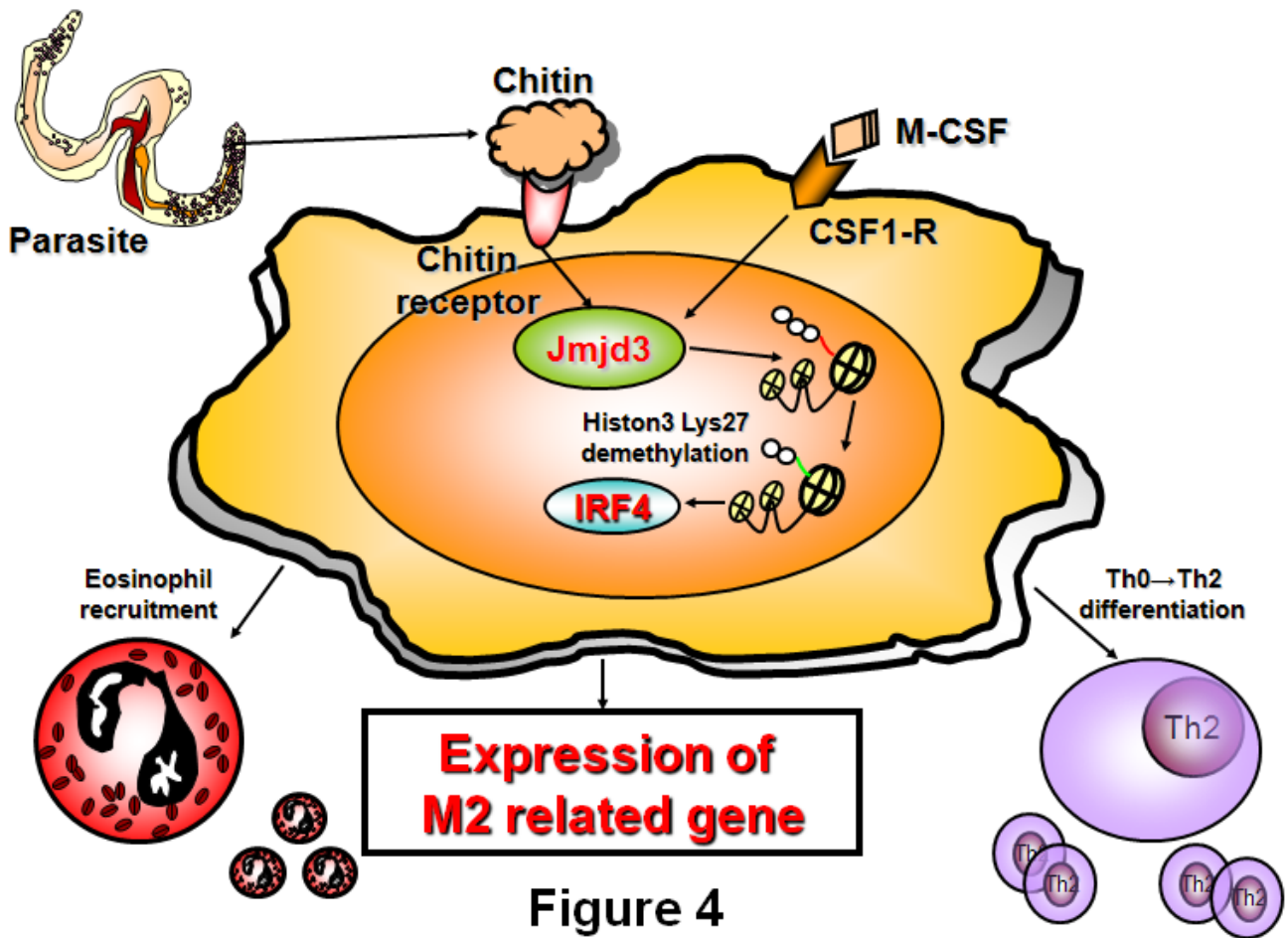


Figure 3

(3)結語

本研究では、Histone3 Lys27 の脱メチル化酵素である Jmjd3 が、M2 マクロファージへの skewing に寄与しており、次世代シーケンサーを用いた ChIP-Seq の技術を応用することにより、IRF4 が Jmjd3 の直接のターゲットであり、マクロファージの skewing に必要不可欠であることを突き止めました(Figure 4)。



(補足)

“Skewing”とは、この場合、M1 および M2 マクロファージのバランスを M2 主導に傾かせることをいう。

<連絡先>

審良 静男(あきら しずお)

大阪大学免疫学フロンティア研究センター (WPI-IFReC)

自然免疫学研究室

E-mail: sakira@biken.osaka-u.ac.jp