

論文内容の要旨

申請者氏名 牛島 直哉

自然免疫は炎症応答の惹起や獲得免疫の成立に必須の免疫機構であり、マクロファージや樹状細胞等の自然免疫細胞に発現する自然免疫受容体が病原体を認識することで発動する。しかしながら、自然免疫受容体を介する炎症応答は病原体排除に働く一方、その破綻は生体にとって有害なものとなることから、様々な機構によって厳密に制御されている。本研究では、RAW264.7(マウスマクロファージ細胞株)の CRISPR/Cas9 システムを利用したノックアウトスクリーニングにより、自然免疫応答調節に関与する新規分子として Zinc finger CCCH domain-containing protein 6 (Zc3h6)を同定した。Zc3h6 は 3 つの Znf-CCCH ドメインとプロリンリッチ領域を有し、核内に局在する。樹立した Zc3h6 変異細胞では、細菌のリポ多糖 (LPS) 刺激後の炎症性サイトカインの一つインターロイキン 6 (IL-6) の発現量に減少が認められた。一方、別の炎症性サイトカイン TNF α の発現に影響を与えなかった。また、LPS を認識する自然免疫受容体 TLR4 の下流シグナル伝達分子や転写因子の活性化にも変化は認められなかった。さらに、Zc3h6 変異細胞に Zc3h6 cDNA を過剰発現させた場合においても、IL-6 の発現量は回復しなかったことから、Zc3h6 変異細胞で見られた表現型は Zc3h6 タンパク質の機能以外による可能性が考えられた。そこで、Zc3h6 遺伝子に由来する環状 RNA (Circular RNA: CircRNA) に着目し解析を行った。CircRNA は、miRNA や核酸結合タンパク質と結合することで遺伝子発現を制御していることが知られている。そこで、Zc3h6 mRNA が CircRNA を形成するか調べた結果、Exon2、Exon2-3、Exon2-4、Exon3 を含む 4 種類の CircRNA を形成することがわかった。続いて、Zc3h6 欠損細胞にそれぞれの CircRNA を発現させ、解析を行ったところ、Exon2-3、Exon2-4 の CircRNA をそれぞれ発現させた場合に IL-6 発現量が回復した。このことから、Zc3h6 変異細胞で見られた IL-6 発現量の減少は、Exon2-3 と Exon2-4 の CircRNA の減少による影響であると考えられた。また、Zc3h6 欠損マウスを樹立したが、このマウスのマクロファージでは LPS 刺激による IL-6 産生の変化は認められなかった。さらに解析すると、このマウス由来のマクロファージでは、Zc3h6 欠損 RAW264.7 細胞の場合とは異なり、Exon2-3、Exon2-4 の CircRNA が野生型細胞と同レベルで発現していた。これがマウスにおいて IL-6 発現に差が認められない要因と考えられた。以上の結果より、Zc3h6 遺伝子の Exon2-3 と Exon2-4 由来の CircRNA が IL-6 発現を制御する可能性が強く示唆された。

やむを得ない事由[図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

論文審査結果の要旨

申請者氏名 牛島 直哉

Toll-like receptor (TLR)ファミリー等の自然免疫受容体を介する炎症応答は病原体排除に必須の役割を果たす一方、その破綻は炎症性疾患に繋がる。申請者は、マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を用いたノックアウトスクリーニングにより、炎症調節に関与する新規分子として Zinc finger CCCH domain-containing protein 6 (Zc3h6)を同定した。Zc3h6 は3つの Znf-CCCH ドメインとプロリンリッチ領域を有する核内因子である。申請者が樹立した Zc3h6 欠損細胞では、TLR4 リガンドである細菌のリポ多糖 (LPS) 刺激後の炎症性サイトカインインターロイキン6 (IL-6) の発現に減少が認められたが、別の炎症性サイトカインである TNF α の発現に影響を与えなかった。また、TLR4 下流のシグナル伝達分子や転写因子の活性化にも変化は認められなかった。一方、Zc3h6 変異細胞に Zc3h6 cDNA を過剰発現させても、LPS 刺激による IL-6 の発現量は回復しなかったことから、Zc3h6 変異細胞で認められた表現型は Zc3h6 タンパク質の機能以外による可能性が考えられた。そこで、申請者は Zc3h6 遺伝子に由来する環状 RNA (Circular RNA: CircRNA) に着目し解析を行った。その結果、Zc3h6 遺伝子の Exon2、Exon2-3、Exon2-4、Exon3 を含む4種類の CircRNA の発現が確認された。次に、それぞれの CircRNA を Zc3h6 欠損細胞に発現させ、LPS 刺激後の遺伝子発現解析を行ったところ、Exon2-3 及び Exon2-4 の CircRNA を発現させた場合に IL-6 発現量の回復が認められた。このことから、Zc3h6 変異細胞で見られた IL-6 発現量の減少は、Exon2-3 と Exon2-4 の CircRNA の減少による可能性が考えられた。また、申請者は Zc3h6 欠損マウスも樹立したが、このマウスのマクロファージでは LPS 刺激による IL-6 産生の変化は認められなかった。さらに解析を行ったところ、本マウス由来のマクロファージでは、Zc3h6 欠損 RAW264.7 細胞とは異なり Exon2-3、Exon2-4 の CircRNA が野生型細胞と同レベルで発現していることが分かった。これらの結果から、Zc3h6 由来の特定の CircRNA が IL-6 発現を制御する可能性強く示唆された。

以上のように、本論文は Zc3h6 遺伝子由来の CircRNA を介した炎症制御機構の詳細を明らかにするもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。

やむを得ない事由[図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】