

TLR 刺激後のサイトカイン輸送制御機構の解明

[1] 組織

代表者：中村 晃

(金沢医科大学)

対応者：高井 俊行

(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 30 万円

[2] 研究経過

[研究目的]

TLR 刺激後に産生されるサイトカイン輸送の制御機構の解明

ウイルスや細菌などの外来性抗原に対する生体の防御システムである免疫機構は、前感作なしに反応する自然免疫と、リンパ球を主体とする抗原特異的な応答を行う獲得免疫の2つ大別される。この自然免疫と獲得免疫の橋渡しをする免疫細胞が、抗原を貪食し、T細胞に抗原を提示する樹状細胞 (dendritic cell: DC)である。このDCには、抗原提示を行う通常型と呼ばれるDCとplasmacytoid DC (pDC)の2分画が存在している。pDCは、ウイルスや細菌に多く含まれる非メチル化CpG-DNA配列を認識する受容体Toll-like receptor (TLR) 9や一本鎖RNAを認識するTLR7を高発現し、細胞内に取り込まれたリガンドをすぐに分解せず、TLRと共にエンドソーム内に長く留まらせることでI型IFN (Interferon)を大量に産生するという特徴を有している。これまで申請者は、免疫制御受容体Paired immunoglobulin-like receptor (PIR)-Bが、TLR刺激後のpDCのI型IFN産生を制御することを明らかにしている。この研究過程で、PIR-B欠損pDCと野生型pDCにおいてDNAマイクロアレイを行い、siRNAノックダウン実験によるスクリーニングを行った。その結果、Sortilinのノックダウンにより、TLR9リガンドであるCpG-DNA刺激後に、I型IFN分泌が低下することを見いだした(図1A, B)。Sortilinは、神経系に高発現し、神経成長因子や受容体などの蛋白質の細胞外への輸送を制御する膜型蛋白質として知られている。これらのことから、SortilinはTLR刺激後のサイトカイン輸送・分泌に関与していると考えられる。これまでTLR刺激後のサイトカイン産生に至るシグナル伝達機構について詳細な解析がなされている。しかしながら、

TLR刺激後のサイトカインの輸送制御については不明な点が多く残されている。そこで本研究では、SortilinによるTLR刺激後のサイトカインの輸送制御機構を明らかにすることを目的とする。

[研究活動状況]

遺伝子導入研究分野から導入した遺伝子欠損マウスを用いて実験を行った。研究費はすべて物件費として使用した。主として研究に必要な抗体費用(細胞分離用磁気ビーズ抗体など)として使用した。高井教授との研究打ち合わせは行ったが、旅費は計上しなかった。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本共同研究では分与を受けた各種遺伝子欠損マウスを交配・維持すると共に、骨髄より誘導したpDCおよび従来型DC及び、腹腔より採取したマクロファージを用い、Sortilinの生理作用について検討を行った。

1) Sortilinと相互作用するサイトカイン分子の探索

これまで代表者らはpDCにおいて、Sortilinの発現低下に伴ってI型IFNの細胞外への分泌が抑制されることを見出している。そこでSortilinのI型IFN産生との関わりを調べるため、SortilinとIFN- α が直接相互作用するかを検討した。表面プラズモン共鳴によるタンパク質間相互作用解析(Biacore)を行ったところ、Sortilinの組換えタンパク質とIFN- α 組換えタンパク質との相互作用が確認された(図1C)。次に細胞内での相互作用を確認するため、蛍光遺伝子を組み込んだSortilin及びIFN- α を細胞に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡での観察を行ったところ、両者が共局在していることが確認された(図1D)。これらの結果より、Sortilinは細胞内でI型IFNと物理的な相互作用をし、細胞外へ輸送するキャリアとして機能することが示唆された。

次に、SortilinがIFN- α に加えて他のサイトカインの輸送に関与するかを検討するため、Biacoreを用いて行った。IL-1 β との結合は認められなかったが、IFN- γ 、IL-6、IL-10、IL-12及びIL-17との相互作用が確認された(データ割愛)。以上の結果より、Sortilinは様々なサイトカインの細胞外への輸送を担うサイトカインキャリア分子として機能することが強く示

唆された。今後は相互作用が確認されたサイトカインについて、IFN- α と同様に細胞内での相互作用の検討を行う予定である。

2) Sortilin の発現制御機構の解析

Sortilin のノックダウンによりサイトカイン産生が低下することから、Sortilin の発現制御機構について検討を行った。その結果、TLR 刺激に依存して発現が抑制されることが判明した (図 2 A, B)。アクチノマイシン D で転写阻害した細胞においても、TLR 刺激に依存して Sortilin の mRNA の分解が観察されることから、(データ割愛) TLR 下流での転写後制御による Sortilin の発現制御機構の存在が示唆された。現在、Sortilin の発現制御に関与する分子の探索と機能解析を行っている。

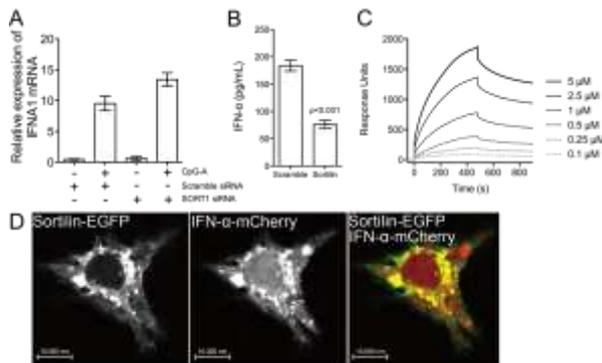


図 1 : Sortilin は IFN- α を細胞外へ輸送する

A, B) siRNA による Sortilin ノックダウン pDC における CpG-DNA 刺激後の定量的 PCR 法による IFN- α mRNA 発現および ELISA による IFN- α 産生の解析 C) Biacore による Sortilin と IFN- α の親和性測定 ($K_d=505\text{nM}$) D) 共焦顕微鏡による Sortilin-EGFP と IFN- α -mCherry の局在解析。

Sortilin のノックダウンによって、TLR シグナル依存的な IFN- α の転写活性には影響ないが (A)、IFN- α の分泌が抑制された (B)。Sortilin と IFN- α が結合しており、細胞内で共局在していた (C, D)。



図 2 : Sortilin は TLR シグナル依存的に分解される A) CpG-DNA 刺激後のウェスタンブロット法による Sortilin の発現解析 B) 定量的 PCR 法による Sortilin の mRNA 発現解析。TLR 刺激後において Sortilin の著しい分解がタンパク質および mRNA レベルで観察された。

(3-2) 波及効果と発展性など

Sortilin の機能解析を通して、新規のサイトカイン分泌機構の解明へと繋がることが期待される。また、Sortilin とサイトカインの相互作用に関する知見は、自己免疫疾患など過剰なサイトカイン産生が起因する疾患の新たな治療薬の開発に寄与することも期待される。

[4] 成果資料

(1) Mitsuhashi Y, Nakamura A, Endo S, Takeda K, Yabe-Wada T, Nukiwa T, Takai T: Regulation of plasmacytoid dendritic cell responses by PIR-B. *Blood* 120: 3256-3259, 2012

(2) 和田俊樹, 武田和也, 松葉慎太郎, 佐藤哲也, 大川恭行, 須山幹太, 高井俊行, 中村晃: 免疫担当細胞におけるサイトカイン産生制御機構の解析. シンポジウム「分子から生命へ」, 京都大学益川ホール, 京都府, 2014, 7