

## 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

(東北医科薬科大学)

対応者：高井 俊行

(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費25万円

### [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。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および加齢医学研究所の共通機器利用料および動物飼育費として使用した。尚、旅費は計上しなかった。

### [3] 研究経過

#### (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- $\alpha$ 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- $\alpha$ 組換えタンパク質との相互作用が確認された。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- $\alpha$ 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1)。これらの結果より、Sortilinは細胞内でI型IFNと相互作用をし、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- $\alpha$ 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 $\beta$ との結合は認められなかったが、IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-10、IL-12及びIL-17との相互作用が認められた (表1)。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明らかになった。

#### 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 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。Sortilin mRNA の 3'UTR 領域においては C-rich domain が存在していることから、代表的な Poly-C 結合タンパク質であり、様々な分子の翻訳および翻訳後調節に関与する PCBP1 に注目した。RNA 免疫沈降を行ったところ、PCBP1 に Sortilin の 3'UTR 配列が結合することが判明した。PCBP1 は、細胞内で亜鉛(Zinc)のセンサーとして働いていることが判明している。TLR 刺激は Zinc シグナルを導入することから、Zinc をキレートすることで Sortilin RNA 発現に影響を与えるかどうか検討したところ、CpG 刺激後に Sortilin の mRNA が上昇していた(図2)。これらの結果から、PCBP は TLR 刺激後に流入する Zinc を感知し、Sortilin の発現を抑制することでサイトカイン分泌の制御を行っていることが明らかになった。

図1 : Sortilin と IFN- $\alpha$  の共結合解析

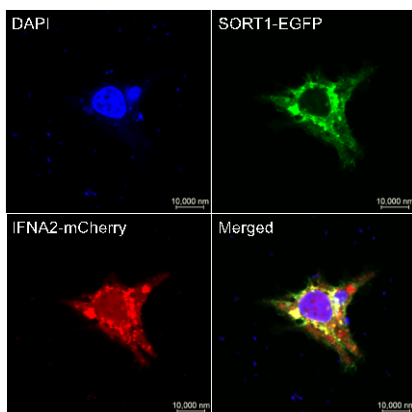
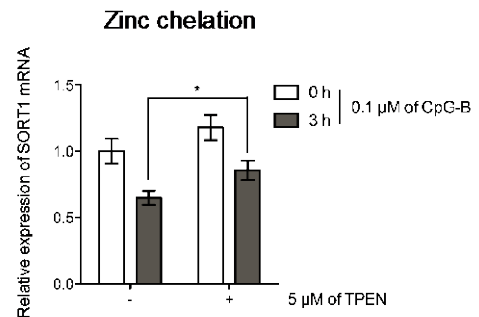


表 1 : Sortilin とサイトカインとの親和性

Cytokines	$K_d$ ( $\mu$ M)
IFN- $\alpha$	0.505
IFN- $\gamma$	2.6
IL-1 $\beta$	N.D.
IL-6	17.0
IL-10	0.291
IL-12	0.012

図3 : 亜鉛キレートによる Sortilin mRNA の発現



### (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を期待される。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。本研究は Scientific reports 誌に掲載された。

### [4] 成果資料

(1) Yabe-Wada T, Matsuba S, Takeda K, Sato T, Suyama M, Ohkawa Y, Takai T, Shi H, Philpott CC, Nakamura A. TLR signals posttranscriptionally regulate the cytokine trafficking mediator sortilin. *Scientific Reports* 6: 26566, 2016

(2) 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

(3) T.Yabe-Wada, S.Matsuba, K.Takeda, T.Sato, M.Suyama, Y.Ohkawa, H.Shi, C.C.Philpott, A.Nakamura. TLR signals posttranscriptionally regulate the cytokine trafficking mediator sortilin. Gordon Research Conference on Protein Processing, Trafficking and Secretion, 20160726, Colby-Sawyer College, New London, NH, United States

(4) 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: Functional analysis of Sortilin in plasmacytoid dendritic cells. 日本免疫学会, 札幌, 2015, 11月19日