

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19390477

研究課題名（和文） Toll 様受容体と C-タイプレクチン受容体とのクロストーク

研究課題名（英文） A crosstalk between Toll-like receptor and C-type lectin

研究代表者

柴田 健一郎 (SHIBATA KENICHIRO)

北海道大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：50145265

研究成果の概要（和文）：

生体は微生物の侵入を感知し、貪食し殺滅する。本研究では、微生物の侵入を感知するセンサーからの細胞内シグナルが、貪食に関わるレセプターからのシグナルで抑制されることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Hosts recognize microbial invasion and then kill them intracellularly. In this study, we demonstrated that the signal mediated by a sensor that recognize bacterial invasion was suppressed by that by phagocytic receptor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2008 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：免疫，感染，炎症

## 1. 研究開始当初の背景

樹状細胞 (DC) は体全体に分布しており、微生物の侵入を感知した後、貪食処理し、T 細胞に抗原を提示する重要な細胞である。DC は微生物に存在する分子パターン (PAMPs) を認識する種々のパターン認識受容体 (PRR) である Toll 様受容体 (TLR)、C-タイプレクチン受容体 (CLR)、NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) ファミリー受容体等を発現している。TLR は微生物由来の種々の PAMPs を認識し、DC の成熟ならびに防御免

疫を惹起する受容体として膨大な研究がなされている。一方、CLR は  $Ca^{2+}$  依存的に糖鎖を認識する、2 型の膜貫通受容体であり、自己あるいは非自己抗原の糖鎖を認識し、細胞内に取り込む貪食受容体である。最近、CLR の一つである dectin-1 (natural killer-cell-receptor-like C-type lectin) がカンジダの細胞壁成分であるザイモザンを認識して、単独で細胞内シグナルを惹起できる non-TLR PRR であることが明らかにされつつある (Brown GD. Nature Rev Immunol. 6: 33-,

2006, Gantner et al. J. Exp. Med. 197: 1107, 2003)。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、TLR を介するシグナルと CLR(特に、DC-SIGN : dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin; CD209) を介するシグナルのクロストークを分子レベルで検証することである。

## 3. 研究の方法

(1) TLR のシグナルに及ぼす DC-SIGN の影響

- ①他の TLR 2 リガンド、すなわち結核菌由来リポアラビノマンナン (LAM), 酵母 zymosan、黄色ブドウ球菌リポタイコ酸による NF- $\kappa$ B の転写活性を調べる。
- ②TLR3 あるいは TLR4 を遺伝子導入した HEK293 細胞を用いた NF- $\kappa$ B あるいは IRF3 ルシフェラーゼレポーター系で poly-I:C あるいは LPS をリガンドとして用いて、DC-SIGN 遺伝子を共導入により NF- $\kappa$ B レポーター活性が相乗的に増強されるかを調べる。
- ③Ca イオンの存在下で、DC-SIGN と結合することがわかっている  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  を加えた時に TLR2, TLR3 ならびに TLR4 によるリガンド認識はどうなるのかを NF- $\kappa$ B あるいは IRF3 ルシフェラーゼレポーター活性で調べる。
- ④TLR 下流のシグナル伝達系のどの段階での増強効果なのかを、MyD88, IRAKs, TRAF6, MAPK (p38, JNK, ERK1/2) を標的として、まず、Western blotting 法により検証する。標的分子が決定されれば、RNAi 法によりその分子をノックダウンすることにより確認する。
- ⑤免疫沈降法により DC-SIGN にチロシンキナーゼ Lyn ならびに Syk との会合を調べる。
- ⑥DC-SIGN にリガンドが結合すると MAPK キナーゼ ERK ならびに PI3K が活性化されるかどうかを調べる。

(Caparros e. et al., Blood 107:3950-, 2006)

## 4. 研究成果

はじめに、A/J mouse 由来の樹状細胞である XS106 細胞 (Toledo 大学 Dr. Takashima より分与) を用い、フローサイトメトリー、リアルタイム PCR 法および western blot にて、TLR および DC-SIGN のマウスホモログである SIGNR の発現を調べた。XS106 細胞には機能的な TLR2 および SIGNR が発現していることがわかった (図 1A, B)。さらに、Taq man probe<sup>®</sup> の配列より XS106 に発現しているのは SIGNR ホモログの中で、SIGNR1 であることがわかつ

た (図 1B)。

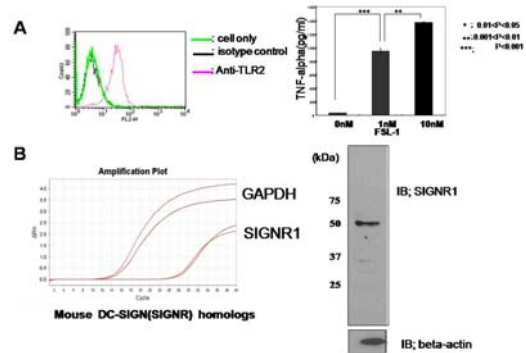


図1 XS106細胞におけるTLR2とSIGNR1の発現

次に XS106 細胞を TLR2 および SIGNR のリガンドで刺激した際の機能的な評価を行うために、サイトカインの産生を調べた。TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ では FSL-1 の濃度依存的に

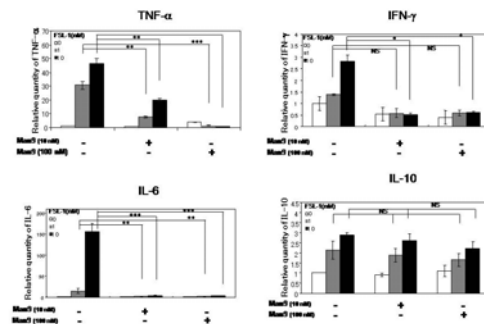


図2A XS106細胞におけるFSL-1,Man9 単独または共刺激によるサイトカインの産生

サイトカインの産生が増強し、FSL-1 刺激で増強したサイトカインの産生は、SIGNR のリガンドである  $\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$  ( $\text{Man}_9$ ) との共刺激によって減弱した (図 2A)。抑制性のサイトカインである IL-10 は、FSL-1 濃度依存的にサイトカインの産生が増強したが SIGNR のリガンドによる共刺激の影響は確認できなかった (図 2A)。

さらに、SIGNR のリガンドを結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) の細胞壁の構成成分であるリポアラビノマンナン ManLAM に変えて同様の実験を行ったところ、TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ では FSL-1 において増強

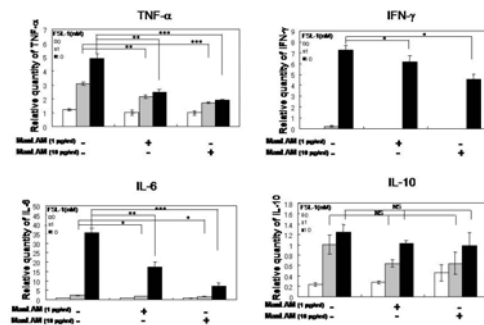


図2B XS106細胞におけるFSL-1,ManLAM 単独または共刺激によるサイトカインの産生

したサイトカインの産生は FSL-1 と ManLAM との共刺激において減弱した (図 2B)。

また、TLR 下流の NF- $\kappa$ B の活性を評価するために luciferase reporter assay を行った。FSL-1 刺激により NF- $\kappa$ B の転写活性が FSL-1 濃度依存的に増強したが、Man9 の刺激によって活性増強は有意に阻害された (図 3)。

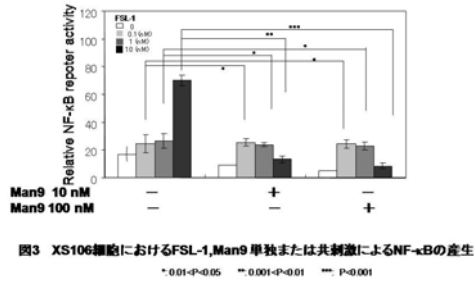


図3 XS106細胞におけるFSL-1,Man9 単独または共刺激によるNF- $\kappa$ Bの産生  
\* 0.01<math>P</math><math>0.05</math> \*\* 0.001<math>P</math><math>0.01</math> \*\*\* <math>P</math><math>0.001</math>

FSL-1 濃度依存的に増強されたサイトカインの阻害が SIGNR 依存的であることを確かめるために、XS106 細胞にて SIGNR の RNAi を行い、SIGNR の knock down を確認した (図 4A)。また、SIGNR の knock down によって、FSL-1 刺激で増強したサイトカインの産生は、SIGNR のリガンドである ManLAM との共刺激における影響が解除された (図 4B, C)。

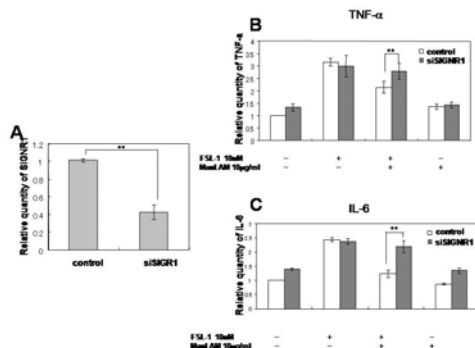


図4 SIGNR1依存的なManLAMによるサイトカインの阻害

TLR2 と SIGNR の下流の MAPK の活性を評価するために XS106 細胞を FSL-1 と Man9 の単独または同時刺激を 1 時間、2 時間、6 時間で行い western blot にてチロシンのリン酸化および p38, JNK, ERK のリン酸化で評価した (図 5)。チロシンのリン酸化は FSL-1 の刺激で増強し、Man9 との同時刺激で減弱した。また、p38, JNK, ERK も FSL-1 の刺激でリン酸化がおり、Man9 との同時刺激で FSL-1 刺激により増強したリン酸化は弱いながらも減弱した (図 5)。このように、MAPK の活性も SIGNR からのシグナルで抑制されることが示唆された。

DC-SIGN と TLR2 との細胞表面での会合状態

を調べるために、ヒト胎児腎臓由来の

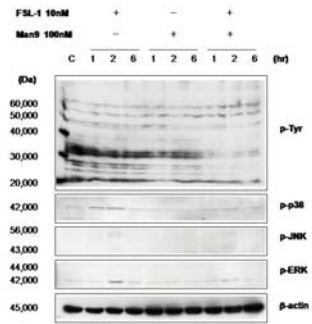


図5 MAPKおよびチロシンのリン酸化

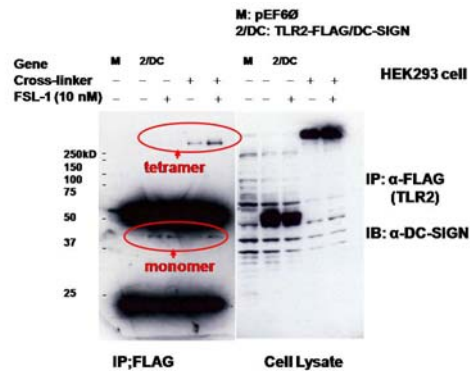


図6 DC-SIGNのオリゴマーとTLR2との会合

HEK293 細胞に TLR2FLAG タグを安定発現させて、DC-SIGN 遺伝子を導入し、免疫沈降法で確認した。FRAG で IP して FRAG で Blot したところ、250kDa 以上のところにバンドが検出された (図 6)。DC-SIGN が約 44kDa で TLR2 が約 100kDa であることから考えて、DC-SIGN はリガンド認識する際に TLR2 と会合しており、テトラマーを形成していることが示唆された。

以上の結果から、TLR2 のシグナルと DC-SIGN のシグナルがクロストークし、TLR2 シグナルによる炎症性サイトカイン産生が減弱したものと推測している

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① HM Shamsul, A Hasebe, M Iyori, M Ohtani, K Kiura, D Zhang, Y Totsuka and K Shibata. The TLR2 ligand FSL-1 is internalized via clathrin-dependent endocytic pathway triggered by CD14 and CD36 but not by TLR2. *Immunology*, 130: 262-272, 2010.
- ② M Iyori, M Ohtani, A Hasebe, Y Totsuka and K Shibata. A role of the  $\text{Ca}^{2+}$  binding site of DC-SIGN in the phagocytosis of *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 377 (2):

- 367-372, 2008.
- ③ M Iyori, H Kataoka, HM Shamsul, K Kiura, T Nakata, A Hasebe, M Yasuda and K Shibata. Resveratrol modulates phagocytosis of bacteria through an NF- $\kappa$ B-dependent gene program. **Antimicrob. Agents. Chemother.** 52(1): 121-127, 2008.
- ④ M Mae, M Iyori, M Yasuda, HM Shamsul, H Kataoka, A Hasebe, K Kiura, Y Totsuka, K Shibata. The diacylated lipopeptide FSL-1 enhances phagocytosis of bacteria by macrophages through Toll-like receptor 2-mediated signaling pathway. **FEMS. Immunol. Med. Microbiol.** 49: 398-409, 2007.

[学会発表] (計9件)

- ① 柴田 健一郎. マイコプラズマ由来リポタンパク質ーリポペプチドのユニークな生物活性. 2009年6月5日. 札幌. 日本マイコプラズマ学会第36回学術集会講演要旨集: 27.
- ② MS Haque, A Hasebe, M Iyori, K Kiura, M Ohtani and K. Shibata. How is the diacylated lipopeptide FSL-1 processed after recognition by TLR2? The 96th Annual Meeting of The American Association of Immunologists. 2009年5月11日. Seattle, Washington, USA.
- ③ K Shibata, K Kiura, A Hasebe, M Iyori, MS Haque and M Ohtani. Anti- and pro-tumor activities of the TLR2 ligand FSL-1. The 96th Annual Meeting of The American Association of Immunologists. 2009年5月9日. Seattle, Washington, USA.
- ④ M Ohtani, A Hasebe, M Iyori, MS Haque, Y Totsuka and K Shibata. Downregulation of the TLR2-mediated signal by the DC-SIGN ligand Man-LAM. The 96th Annual Meeting of The American Association of Immunologists. 2009年5月11日. Seattle, Washington, USA.
- ⑤ Shibata K. Kiura K. "Anti- and pro-tumor activities of the mycoplasmal lipopeptide FSL-1 as a TLR2 ligand. Innate Immunity Symposium " Regulation in Innate Immunity - from Recognition Molecules to Antimicrobial Peptides. 2008年10月28日. Shionogi Innovation Center for drug discovery, Hokkaido University.
- ⑥ 木浦 和人, 長谷部 晃, 柴田 健一郎. ジアシルリポペプチド FSL-1 による制御性 T 細胞の増殖と腫瘍免疫応答の抑制. 日本マイコプラズマ学会第35回学術集会. 2008年5月31日. 東京.
- ⑦ 大谷 誠, 伊従 光洋, 長谷部 晃,

木浦 和人, 戸塚 靖則, 柴田 健一郎. Toll-like receptor 2 と DC-SIGN シグナルのクロストーク. 日本マイコプラズマ学会第35回学術集会. 2008年5月30日. 東京.

- ⑧ 大谷 誠, 伊従 光洋, 長谷部 晃, 木浦 和人, 戸塚 靖則, 柴田 健一郎. Toll-like receptor 2 シグナルに及ぼす DC-SIGN シグナルの影響 (優秀ポスター賞受賞). 第50回歯科基礎医学会学術大会. 2008年9月24日. 東京.
- ⑨ 木浦 和人, 柴田 健一郎. 腫瘍の増殖に及ぼすジアシルリポペプチド FSL-1 の影響.. 自然免疫の最前線 -3 学会合同大会 2008- 第73回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会・第19回日本生体防御学会学術総会・第45回補体シンポジウム. 2008年7月10日. 札幌 (北海道大学・学術交流会館)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.den.hokudai.ac.jp/saikin/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 健一郎 (SHIBATA KENICHIRO)  
北海道大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号: 50145265

(2) 研究分担者

長谷部 晃 (HASEBE AKIRA)  
北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：90281815

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：