

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：16201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06454

研究課題名(和文) 形質細胞様樹状細胞におけるインターフェロン産生誘導メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of interferon production in plasmacytoid dendritic cells

研究代表者

財賀 大行 (SAIGA, HIROYUKI)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：40752499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid dendritic cells; pDC)は、ウイルス感染初期に迅速かつ大量にI型IFNを産生分泌することができる。しかしながら、pDCによるI型IFN産生の詳細な分子メカニズムは未だに明らかになっていない。我々は、shRNAライブラリーを用いた網羅的解析から、転写因子であるHS01に注目した。本研究によって転写因子HS01がI型IFN産生を負に制御していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Plasmacytoid dendritic cells (pDC) secrete type I IFNs, which play an important role in antiviral immune responses. However, the molecular mechanisms of type I IFNs production in pDC are still not completely understood. Here we show that transcription factor HS01 regulates the production of type I IFNs in pDC.

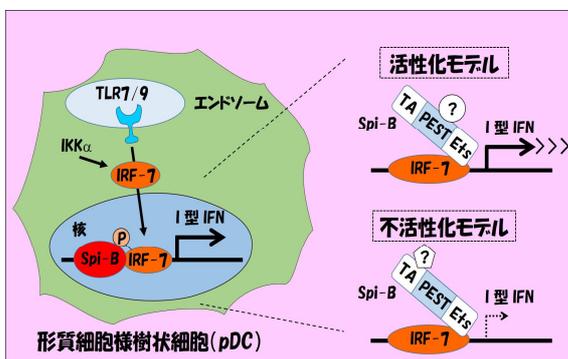
研究分野：免疫学

キーワード：形質細胞様樹状細胞 インターフェロン

1. 研究開始当初の背景

形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cells; pDC) は、迅速かつ極めて大量に I 型 IFN を産生・分泌することができる専門的な細胞として知られている。pDC が産生する I 型 IFN は、ウイルス感染時の生体防御として作用する一方で、全身性エリテマトーデス (SLE) のような自己免疫疾患の病態形成の一因にもなりうる。したがって、pDC による I 型 IFN 産生は生体内で厳密な調節システムによって適度に産生・分泌されるように制御されなければならない。

これまでに pDC の I 型 IFN 産生メカニズムは、多くの研究者により解析され様々な機能分子が明らかにされている。pDC のエンドソームに発現している Toll 様受容体 (Toll-like receptor; TLR) 7 はウイルスなどの一本鎖 RNA を、また TLR9 は非メチル化 CpG DNA を認識することによって IFN 遺伝子を発現誘導している⁽¹⁾。これらの誘導には転写因子として知られる IFN 制御因子 (Interferon regulatory factor; IRF) 7 の活性化が必須であり、IRF-7 の活性化調節にはセリンスレオニンキナーゼである IKK α が関与する⁽²⁾。さらに pDC に高発現している転写因子 Spi-B は、DNA 結合領域である Ets ドメインを介して IRF-7 と会合し、IRF-7 と協調的に I 型 IFN 遺伝子プロモーターの活性化を増強させることが明らかになっている⁽³⁾。興味深いことに、申請者らのグループでは、Spi-B を構成している他のドメインである PEST (プロリン、グルタミン酸、セリン、スレオニン高含有) ドメインを変異させた Spi-B でも IFN- α の産生が顕著に低下すること、また一方で TA ドメインを欠損させた Spi-B では IFN- α の産生が亢進することを示唆させるデータを得ている。このことは Spi-B/IRF-7 複合体をプラットフォームとした、I 型 IFN 遺伝子プロモーターを活性化もしくは不活性化させる新規調節因子の存在を示唆させる (図 1)。



(図 1) I 型 IFN 遺伝子プロモーター活性化モデルおよび不活性化モデル

2. 研究の目的

pDC による I 型 IFN 産生の詳細な分子制御メカニズムは未だ不明な点が多い。そこで本研究では、I 型 IFN 産生を亢進もしくは抑制させる新規調節因子を探索・特定することを目的とし、それらの調節因子の生体外および生体内での役割を明らかにする。さらに遺伝子欠損マウスを用いた生体内での機能解析を可能にするために、CRISPR/Cas9 法を用いた遺伝子ターゲティングマウス作製システムを立ち上げる。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、pDC による I 型 IFN 産生に関与することが知られている転写因子 Spi-B/IRF-7 複合体と相互作用する新規調節因子の同定を目的としている。これまでに、Spi-B と相互作用して転写活性化を促進する分子について、酵母ツーハイブリッド法によりスクリーニングを試みたが、実験の条件設定の確立が困難であったため候補分子の特定には至らなかった。そこで新しい方法として、shRNA ライブラリーを用いて、培養細胞に Spi-B と IRF-7 を共発現させた場合にみられるプロモーター活性化を亢進もしくは抑制する shRNA を網羅的に探索することによって、pDC による I 型 IFN 産生の制御に関わる遺伝子を特定する。また候補分子に関して、どのような刺激によって発現誘導されるかなど in vitro での役割について解析を行う。

(2) 生体内での機能解析を可能にするために、CRISPR/Cas9 法を用いた遺伝子ターゲティングマウス作製システムを立ち上げる。

4. 研究成果

(1) shRNA ライブラリーを用いた網羅的探索

pDC の I 型 IFN 産生に関与する転写因子 Spi-B と相互作用する新規調節因子を同定するために、shRNA ライブラリーを用いて網羅的解析を行なった。shRNA を導入した細胞ラインに、Spi-B 発現ベクターと I 型 IFN 遺伝子プロモーターの下流に GFP 遺伝子を連結させたベクターを同時に導入し、遺伝子導入 24 時間後に FACS 解析によって発光強度を測定した。発光強度がコントロールより 2 倍以上強い分子群 (336 個) と 2 倍以上弱い分子群 (455 個) から、当研究室が作成した各種樹状細胞のマイクロアレイ解析データおよび公的データベース (BioGPS) を用いて候補分子の絞込みを行なった。その結果、pDC の I 型 IFN 遺伝子プロモーターを活性化させる因子の候補として 11 分子が、抑制させる因子の候補が 6 分子見つかった。

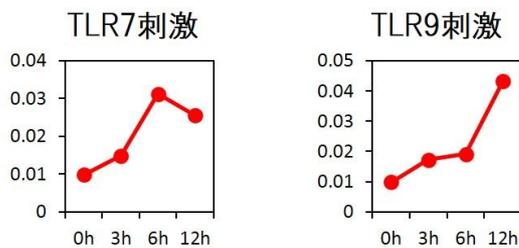
(2) in vitro での機能解析

shRNA ライブラリーによる網羅的解析で I 型 IFN 産生の抑制に関わると思われる分子

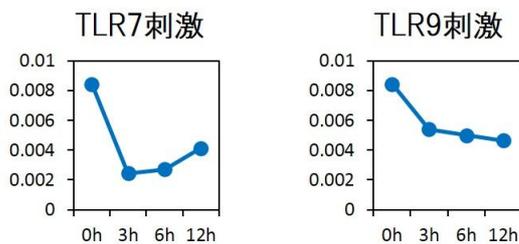
のうち Spi-B 同様に転写因子として知られている HS01 という分子に注目し、その分子の機能解析を行なった。

mRNA の発現誘導

Flt-3L でマウス骨髄を樹状細胞に分化させ、さらにその樹状細胞からソーティングによって pDC を単離した。その pDC を用いて TLR7 (R848) および TLR9 (CpG DNA) リガンドで刺激し、経時的に mRNA の発現について解析した。その結果、TLR 刺激によって転写因子 Spi-B の発現は亢進されるのに対して、転写因子 HS01 の発現は減少していた (図 2, 3)。



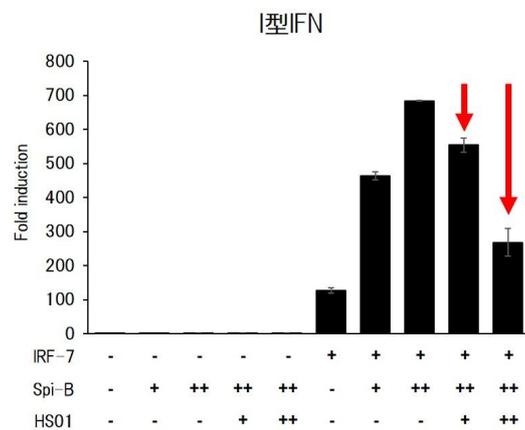
(図 2) TLR 刺激による Spi-B mRNA の発現誘導



(図 3) TLR 刺激による HS01 mRNA の発現誘導

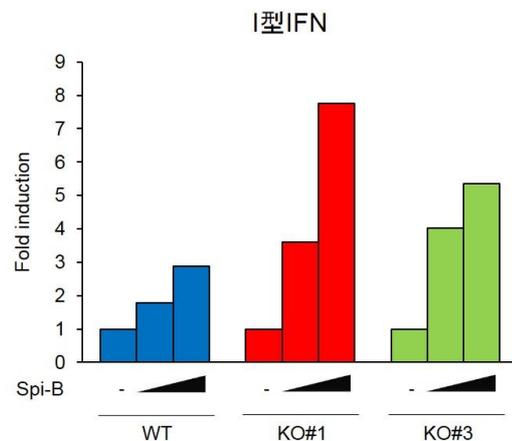
HS01 による I 型 IFN 抑制作用

Luciferase Assay 法を用いて HS01 の I 型 IFN 抑制作用について解析した。遺伝子導入に適したヒト胎児由来腎臓上皮細胞 (293T 細胞) に各発現ベクターおよび I 型 IFN 遺伝子プロモーターの下流に高輝度ルシフェラーゼ遺伝子を連結させたレポーターを同時に導入し、遺伝子導入 24 時間後に細胞を溶解し、発光強度を測定した。その結果、I 型 IFN の転写活性は IRF-7 存在下で Spi-B 濃度依存的に亢進された。一方で、HS01 を加えるとその転写活性は HS01 濃度依存的に減少していた (図 4)。



(図 4) I 型 IFN の転写活性

次に、CRISPR/Cas9 法を用いて HS01 欠損 293T 細胞を作製し、HS01 欠損細胞および野生型細胞を用いて同様に I 型 IFN の転写活性を測定した。その結果、HS01 欠損細胞では野生型細胞に比べて、Spi-B による I 型 IFN 転写活性の増加率が大幅に高くなっていた (図 5)。



(図 5) I 型 IFN の転写活性増加率

(3) 遺伝子ターゲティングマウス作製システムの立ち上げ

近年 CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により様々な生物の狙った遺伝子进行操作する技術が発展しており、マウスにおいても従来の方法に比べて簡便に低予算で効率的に遺伝子欠損マウスを作製することができるため、強力なツールになることが予想される。そこで当研究室でも CRISPR/Cas9 法を用いた遺伝子ターゲティングマウス作製システムを立ち上げ、既にマウス胚操作および受精卵へのマイクロインジェクション技術を確立した。

<引用文献>

(1) Colonna M., et al. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature Immunol.* 2004, 5, 1219-1226.

(2) Hoshino K., et al. I κ B kinase- α is critical for interferon- α production induced by Toll-like receptors 7 and 9. *Nature.* 2006, 440, 949-953.

(3) Sasaki I., et al. Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. *Blood.* 2012, 120, 4733-4743.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者
財賀 大行 (SAIGA HIROYUKI)
香川大学・医学部・助教

研究者番号：40752499

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()