

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19077

研究課題名(和文)代謝関連分子により制御される炎症性サイトカイン産生誘導の新規分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the novel molecular mechanisms of proinflammatory cytokine production regulated by metabolism-related molecules

研究代表者

佐々木 泉(Sasaki, Izumi)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・助教

研究者番号：80611037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：コレラ毒素(CT)は免疫アジュバントとしてTh17応答などを誘導するが、その作用機構は不明である。我々は、CTとリポ多糖(LPS)の刺激により、炎症性サイトカインIL-1 β の産生が相乗的に誘導されることを見出した。本研究では、この分子機構の解明を目指す。網羅的遺伝子発現解析(トランスクリプトーム)と網羅的代謝産物解析(メタボローム)の統合解析により、CT刺激によりアルギニン代謝経路が活性化し、CTとLPSの刺激によりヒスタミン合成経路が活性化していた。今回、IL-1 β 産生誘導における、これらの代謝経路の機能的意義を明らかにしたのでここに発表する。

研究成果の概要(英文)：Cholera toxin (CT) is strong immune adjuvant, which can induce Th17 responses. However, the mechanisms remain unclear. We have found that CT plus lipopolysaccharides (LPS) can synergistically induce IL-1 β production. Our aim is to elucidate the mechanism of this IL-1 β production. Integrated analysis of transcriptome and metabolome revealed that CT and CT plus LPS activated arginine metabolic pathway and histamine synthetic pathway, respectively. In this research, we have showed that the physiological role of these metabolic pathway in CT plus LPS-induced IL-1 β production.

研究分野：免疫学

キーワード：コレラ毒素

1. 研究開始当初の背景

コレラ毒素 (Cholera toxin:CT) は、免疫アジュバントとして Th1 や Th17 型免疫応答、免疫グロブリン産生、炎症性サイトカイン産生などを誘導することが知られており、ヒトにも臨床応用されている (N. Lycke, *Nat. Rev. Immunol.*, 2012;12:592-605)。CT は 1 個の A サブユニット (CTA) と 5 個の B サブユニット (CTB) から構成されるタンパク複合体 (ホロトキシン) である。CTA、CTB 単独と比較して、ホロトキシンである CT は強力な免疫アジュバント作用を発揮する。CTA は細胞内 cAMP レベルを上昇させること、そして、小胞体内ストレスセンサー IRE1 α を介して、炎症性サイトカイン IL-6 の遺伝子発現を誘導することが知られている (Cho et al. *Cell Host Microbe*, 2013;13:558-569)。一方、CTB は、リポ多糖 (LPS) と相乗的に炎症性サイトカイン IL-1 β の産生を誘導することが知られているが、この誘導には、CTB と結合し、CTB を介して細胞内に侵入した LPS によるタンパク切断酵素カスパーゼ 11 の活性化が必須であること (Kayagaki et al. *Science*, 2013;341:1246-1249) が明らかになっており、CTB 自身に活性が認められるかどうかについてはわかっていない。CT の作用は、CTA、CTB が相乗的な作用を基盤としていと考えられるが、その分子機構に関してはほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

我々は、まず、マクロファージ細胞株 RAW264.7 (以下 RAW 細胞) を用いて、CT による炎症性サイトカイン産生誘導能を検討した。RAW 細胞において、CT 単独刺激では炎症性サイトカイン IL-1 β の産生は認められなかったが、LPS 刺激により若干の IL-1 β 産生誘導が認められた。また、LPS 刺激後に CT で刺激すると、顕著に IL-1 β の産生誘導が認められた (図 1)。この IL-1 β 産生誘導は、CTB に結合しない LPS でも認められ、また、小胞体内ストレスセンサー IRE1 α 欠損や全カスパーゼ阻害剤存在下でも認められた (未発表)。これらの結果から、CT はカスパーゼ非依存性のユニークな経路を介して IL-1 β 産生を誘導していることが示唆された。本研究では、我々が見出した、CT による IL-1 β 産生誘導機構に焦点を当て、その分子機構の解明を目指す。

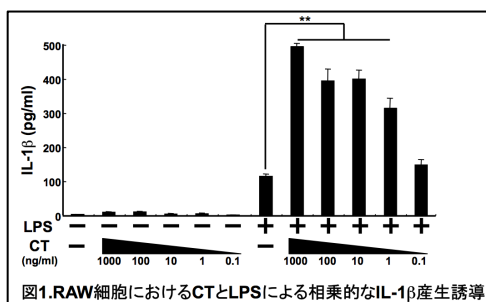


図1.RAW細胞におけるCTとLPSによる相乗的なIL-1 β 産生誘導

3. 研究の方法

CT による IL-1 β 産生誘導機構を明らかにするため、まず、網羅的遺伝子発現解析 (トランスクリプトーム解析) と網羅的代謝産物解析 (メタボローム解析) の統合解析 (オミックス解析) を行う。そのために、RAW 細胞を、無刺激、CT 単独刺激、LPS 単独刺激、あるいは LPS+CT 刺激した後に細胞を回収し、全 RNA と細胞抽出物 (ライセート) を調製し、それぞれトランスクリプトーム解析、メタボローム解析に使用する。

オミックス解析の結果、候補となった代謝経路について、IL-1 β 産生誘導における機能的意義を明らかにするため、代謝酵素の阻害剤や siRNA によるノックダウン、遺伝子欠損マウスを用いて検討を行う。

4. 研究成果

(1) アルギニン代謝経路の機能的意義に関する解析

トランスクリプトーム解析の結果、CT 刺激した RAW 細胞において、アルギナーゼ-1 (Arginase 1 : Arg1) の遺伝子発現が無刺激と比べ 1000 倍以上増加していた (図 2A)。アルギニンは、Arg1 の作用により加水分解され、オルニチンに変換される (図 2B)。また、メタボローム解析により、CT 刺激した RAW 細胞において、アルギニンの減少およびオルニチンの増加が認められた (図 2C)。このことから、CT 刺激によりアルギニン代謝経路が活性化されていることが明らかとなった。

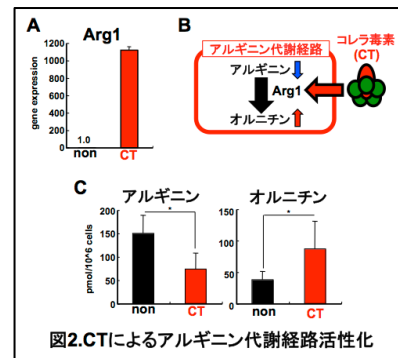


図2.CTによるアルギニン代謝経路活性化

アルギニン代謝経路が CT による IL-1 β 産生誘導に関与するかどうか明らかにするため、まず、アルギナーゼ-1 の阻害剤である S-2 ボロノエチル L システイン (S-(2-boronoethyl)-L-cysteine:BEC) を用いて検討した。RAW 細胞において、LPS+CT 刺激による IL-1 β 産生誘導は、BEC の濃度依存的に阻害された (図 3A)。次に、siRNA を用いた Arg1 のノックダウンの検討を行った。LPS+CT 刺激による IL-1 β 産生誘導は、Arg1 の siRNA により阻害された (図 3B)。これらの結果から、RAW 細胞における LPS+CT 刺激による IL-1 β 産生誘導に、アルギニン代謝経路が関与することが示唆された。

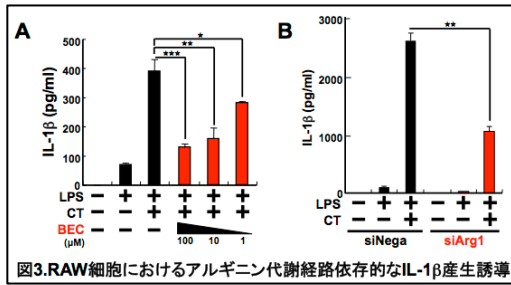


図3.RAW細胞におけるアルギニン代謝経路依存的なIL-1β産生誘導

RAW細胞で認められたアルギニン代謝経路依存的なIL-1β産生誘導機構が、マウスの生体内でも同様に認められるかどうか、Arg1欠損マウスを用いて検討した。Arg1欠損マウス由来の骨髄マクロファージにおいて、LPS単独刺激またはLPS+CT刺激によるIL-1β産生誘導は正常に認められた(図4)。これらの結果から、骨髄マクロファージにおけるLPS+CT刺激によるIL-1β産生誘導は、Arg1非依存性であることが明らかになった。

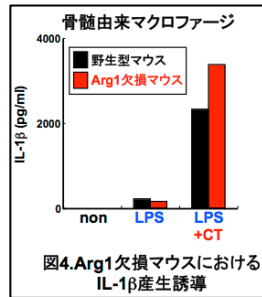


図4.Arg1欠損マウスにおけるIL-1β産生誘導

(2) ヒスタミン合成経路の機能的意義に関する解析

トランスクリプトーム解析の結果、CT単独刺激したRAW細胞ではヒスチジン脱炭酸酵素(Histidine decarboxylase: Hdc)の遺伝子発現誘導は認められなかったが、LPS単独刺激したRAW細胞では発現が認められた。また、LPS刺激後にCTで刺激すると、Hdcの顕著な遺伝子発現誘導が認められた(図5A)。Hdcはヒスチジンからヒスタミンを合成する酵素である(図5B)。メタボローム解析の結果、CT単独刺激したRAW細胞ではヒスタミンの合成は認められなかったが、LPS単独刺激したRAW細胞ではヒスタミンの合成が認められた。また、LPS刺激後にCTで刺激すると、ヒスタミンの合成が顕著に認められた(図5C)。このことから、LPS+CT刺激によりヒスタミン合成経路が活性化されていることが明らかとなった。

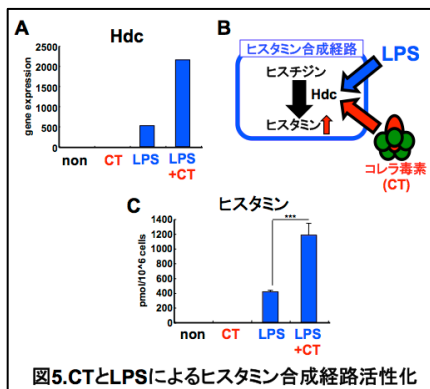


図5.CTとLPSによるヒスタミン合成経路活性化

ヒスタミン合成経路がCTによるIL-1β産生誘導に関与するかどうか明らかにするため、Hdc欠損マウスを用いて検討した。Hdc欠損マウス由来骨髄マクロファージにおいて、LPS単独刺激またはLPS+CT刺激によるIL-1β産生誘導は野生型マウス由来のマクロファージと同程度に認められた(図6)。これらの結果から、骨髄マクロファージにおけるLPS+CT刺激によるIL-1β産生誘導はHdc非依存性であることが明らかになった。

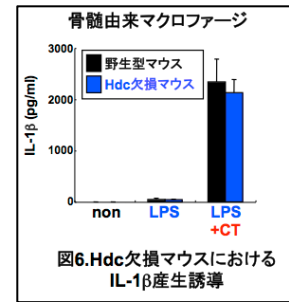


図6.Hdc欠損マウスにおけるIL-1β産生誘導

骨髄マクロファージにおけるLPS+CT刺激によるIL-1β産生誘導は、全カスパーゼ阻害剤Z-VAD FMK存在下では完全に消失した(図7)。よって骨髄マクロファージにおけるIL-1β産生誘導はカスパーゼ依存性であり、RAW細胞とは異なっている。そのため、RAW細胞で認められた代謝経路依存的なIL-1β産生誘導が骨髄マクロファージでは認められなかったと考えられる。

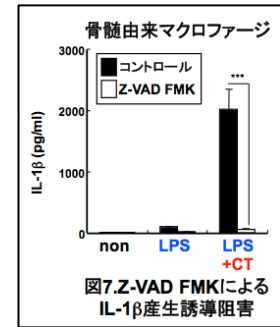


図7.Z-VAD FMKによるIL-1β産生誘導阻害

生体内のマクロファージは、局在する組織や誘導方法の違いにより、多くの種類が存在する。RAW細胞で認められた、カスパーゼ非依存性かつ代謝経路依存的なIL-1β産生誘導機構を持つ生体マクロファージを同定するため、今後は骨髄以外のマクロファージを検討する必要があると考えられる。

本稿を締めくくるにあたり、オミックス解析について、慶応義塾大学先端生命科学研究所の福田真嗣先生に多大なるご協力をいただき、心より感謝申し上げます。また、Hdc遺伝子欠損マウスをご恵与下さいました東北大学大学院工学研究科の天津浩先生に深く感謝いたします。

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 2 件)

1. 原著論文 (2 件) (全て査読有)

① Ohta T, Sugiyama M, Hemmi H, Yamazaki C, Okura S, Sasaki I, Fukuda Y, Orimo T, Ishii KJ, Hoshino K, Ginhoux F, Kaisho T. Critical roles of XCR1-expressing dendritic cells and the XCR1-XCL1 chemokine axis in intestinal immune homeostasis. *Sci Rep*. 2016 Mar 23;6:23505 doi: 10.1038/srep23505.

② Sasaki H, Kurotaki D, Osato N, Sato H, Sasaki I, Koizumi S, Wang H, Kaneda C, Nishiyama A, Kaisho T, Aburatani H, Morse HC 3rd, Ozato K, Tamura T. Transcription factor IRF8 plays a critical role in the development of murine basophils and mast cells. *Blood*. 2015 Jan 8;125(2):358-69. doi: 10.1182/blood-2014-02-557983.

[学会発表] (計 5 件)

① 木村章彦、石田裕子、野坂みずほ、佐々木泉、山本寛貴、國中由美、加藤喬、福田有里、改正恒康、近藤稔和、Spi-B は圧負荷による心不全の病態形成において炎症と繊維化を抑制して保護的に機能する、第 38 回日本炎症・再生医学会 2017 年 7 月 18-19 日、大阪国際会議場 (発表予定)

② 山下友祐、田村志宣、岩橋吉史、佐々木泉、西川彰則、金澤伸雄、邊見弘明、村田晋一、改正恒康、大島孝一、今留謙一、吉浦孝一朗、園木孝志、治療抵抗性 EB ウイルス関連血球貪食性リンパ組織球症を発症した X 連鎖性知的障害例における新規 CCDC22 遺伝子変異の同定、第 10 回 日本免疫不全症研究会 2017 年 1 月 21 日、ステーションコンファレンス東京

③ SASAKI Izumi, FUKUDA Shinji, ORIMO Takashi, HEMMI Hiroaki, FUKUDA Yuri, OHTA Tomokazu, KAISHO Tsuneyasu, Metabolic basis for cholera toxin-induced IL-1beta production in synergy with lipopolysaccharides. 第 45 回日本免疫学会学術集会 2016 年 12 月 5-7 日、沖縄コンベンションセンター、ラグナガーデンホテル

④ OHTA Tomokazu, HEMMI Hioaki, FUKUDA Yuri, SASAKI Izumi, ORIMO Takashi, KAISHO Tsuneyasu, Crosstalk between XCR1-expressing dendritic cells and intestinal T cells keeps intestinal homeostasis through the XCR1-XCL1

chemokine axis. 第 45 回日本免疫学会学術集会 2016 年 12 月 5-7 日、沖縄コンベンションセンター、ラグナガーデンホテル

⑤ Orimo Takashi, SASAKI Izumi, FUKUDA Shinji, HEMMI Hiroaki, FUKUDA Yuri, KAISHO Tsuneyasu. Role of polyamine pathway in Cholera toxin-induced production of proinflammatory cytokines. 第 44 回日本免疫学会学術集会 2015 年 11 月 18-20 日、札幌コンベンションセンター

[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
和歌山県立医科大学先端医学研究所 生体調節機構研究部 HP
<http://www.wakayama-med.ac.jp/med/seitai/index.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
佐々木 泉 (SASAKI IZUMI)
和歌山県立医科大学・先端医学研究所・助教
研究者番号：80611037

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし