

令和元年9月4日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15665

研究課題名(和文) 形質細胞様樹状細胞のインターフェロン産生を負に制御するメカニズムの解析

研究課題名(英文) Molecular mechanisms regulating type I interferon induction 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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：形質細胞様樹状細胞(pDC)はウイルス感染初期に大量のI型インターフェロン(IFN-a/IFN-b)を産生分泌することが知られている。これまでpDCによるI型IFN産生誘導メカニズムは解明されているが、IFNを抑制する分子メカニズムは明らかになっていなかった。申請者らは転写因子HS01に注目し、HS01がI型IFN産生に關与するSpiBとIRF7の複合体形成を阻害することによってIFN産生を抑制していることを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりpDCによるI型IFN産生メカニズムの理解が深まれば、pDCを標的としたSLEなどの自己免疫疾患に対する治療薬開発の分子基盤を提供することになり、臨床的応用にも繋げることが可能になる。さらに、HS01を標的として宿主内に侵入・潜伏している病原体の感染戦略の理解や問題提起を促すことにも繋がり、専門分野だけでなく分野外にも波及効果をもたらすことが予想され、その社会的意義は極めて大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Plasmacytoid dendritic cell (pDC) is a unique cell population that produces large amounts of type I interferon (IFN-a/IFN-b) via TLR7/9-mediated recognition of a single-stranded RNA or CpG DNA. We have shown that an Ets family transcription factor SpiB can transactivate IFN-a promoter in synergy with IFN regulatory factor-7 (IRF7), and is required for type I IFN production in pDC. However, how pDC negatively regulates type I IFN induction remains unknown.

In this study, we show that transcription factor HS01 can suppress the induction of IFN-a and IFN-b by interacting with SpiB/IRF7 complex. HS01 mRNA expression decreased in TLR7/9-stimulated pDC and HS01 protein was degraded by the ubiquitin-proteasome system in the early phase. Our findings show a role for HS01 as a negative regulator of type I IFN induction in pDC.

研究分野：免疫学

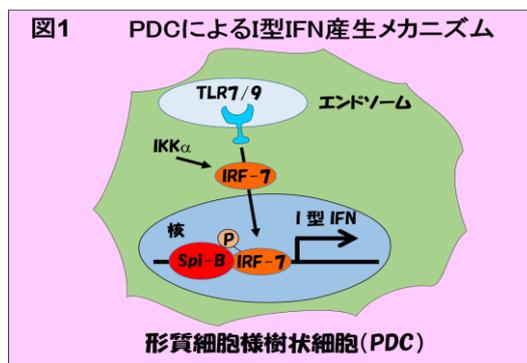
キーワード：形質細胞様樹状細胞 インターフェロン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細菌やウイルス感染に対する宿主防御機構において、感染の早い時期での自然免疫細胞による迅速な免疫応答は病原体の拡散や複製・増殖を食い止めるうえで非常に重要である。I型IFN (IFN $\alpha$ /IFN $\beta$ )は自然免疫における抗ウイルス活性の中心的な役割を担っているサイトカインであり、病原体の侵入によって産生・分泌され、周囲の細胞に働きかけることによってさらに獲得免疫による強力な抗ウイルス活性を引き出すことを可能にする。形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cells; pDC)は、細菌やウイルス感染初期に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、過剰な産生は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事が報告されている<sup>(1)</sup>。従って、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制御されていることが予想される。

これまでにpDCのI型IFN産生誘導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なっている(図1)。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<sup>(2)</sup>。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、IRF7の活性化調節にはセリンスレオニンキナーゼであるIkk $\alpha$ が関与する<sup>(3)</sup>。さらにpDCに高発現している転写因子SpiBは、IRF7と会合し複合体形成することによってpDCによるI型IFN産生を相乗的に誘導していることが明らかになった<sup>(4)</sup>。このようにpDCによるI型IFN産生を正に制御する(アクセル)メカニズムは解明されているが、I型IFN産生を負に制御する(ブレーキ)メカニズムおよびその関連分子についてはこれまで明らかになっていない。



### 2. 研究の目的

pDCにおけるI型IFN産生を負に制御する分子を特定するために、申請者らはこれまでにshRNAライブラリーを用いて網羅的解析を行い、転写因子HS01(仮名)を同定した。この転写因子HS01は、SpiB/IRF7複合体によるIFN $\alpha$ 産生の誘導を抑制した。またHS01とIRF7が会合することが構造解析から予想される。そこで申請者らはpDCのI型IFN遺伝子プロモーター活性化において、IRF7をプラットフォームとしてSpiBがアクセル因子、HS01がブレーキ因子としてpDCによるI型IFN産生誘導を調節する制御モデルを提唱する(図2)。本研究で申請者らは、HS01の細胞レベルでの機能解析、およびHS01欠損マウスを用いた個体レベルでの高次生命機能解析を行うことによって、転写因子HS01によるI型IFN産生制御メカニズムの全貌を明らかにしたいと考えている。



### 3. 研究の方法

これまでの shRNA ライブラリーを用いた網羅的解析から、pDC における I 型 IFN 産生を負に制御する分子として転写因子 HS01 を同定した。本研究では転写因子 HS01 の細胞レベルおよび個体レベルでの解析を行うことによって、転写因子 HS01 が pDC の I 型 IFN 産生をどのように制御しているのかを明らかにする。

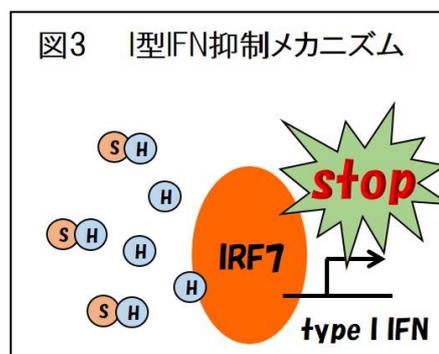
### 4. 研究成果

#### (1) 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。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 IRF7 存在下で SpiB 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た。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、SpiB 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。以上のことから、HS01 が I 型 IFN の転写活性に対して抑制に働いていることが示唆された。

#### (2) I 型 IFN 抑制メカニズムの解析

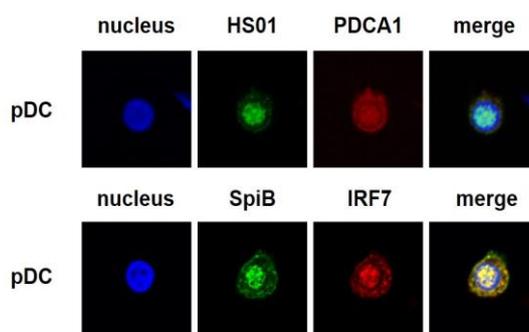
HS01 がどのようにして IFN 産生を抑制しているのかを明らかにするために、SpiB、IRF7、HS01 のタンパク質間相互作用を解析した。その結果、HS01 は SpiB および IRF7 と会合することが明らかになった。また SpiB は Ets ドメインを介して IRF7 と会合することが報告されているが、HS01 もまた SpiB の Ets ドメインを介して会合していることを突き止めた。このことから HS01 は SpiB の Ets ドメインと会合することによって SpiB と IRF7 の複合体形成を阻害していることが明らかになった (図 3)。



#### (3) HS01 の発現および局在

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 SpiB の発現は亢進されるのに対して、転写因子 HS01 の発現は減少した。またマウス脾臓から単離した pDC においても同様の結果が得られた。次に HS01 の発現場所を特定するために単離した pDC を用いて免疫染色を行った。その結果、HS01 は SpiB や IRF7 同様に pDC の核で発現していることが明らかになった (図 4)。

図4 pDCにおけるHS01の局在



#### (4) HS01 タンパク質分解

TLR 刺激により HS01 mRNA の発現が減少することから、申請者は HS01 タンパク質が TLR 刺激後に分解されるのではないかと予想した。HS01 タンパク質の分解を明らかにするために樹状細胞

をTLR7もしくはTLR9刺激0、1、3時間後回収し、抗HS01抗体を用いてウエスタンブロットを行った。その結果、HS01タンパク質の発現量は経時的に減少することが明らかになった。次にどのタンパク質分解系で分解されているのかを明らかにするために、プロテアソーム分解系を阻害するGM132もしくはリソソーム分解系を阻害するクロロキンをを用いて同様に解析した結果、GM132を投与した細胞でHS01タンパク質の分解が解除されていた。以上のことから、HS01タンパク質はTLR刺激の早い段階でプロテアソーム分解系によって分解されることが明らかになった。

#### (5) HS01 遺伝子欠損マウス作製

CRISPR/Cas9法を用いてHS01欠損マウスを作製した。その結果、HS01欠損マウスは胎生致死であった。現在トランスジェニックマウス作製のための準備を行っている。

#### (参考文献)

- (1) Ytterberg SR., et al. Serum interferon levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982, 25, 401-406.
- (2) Colonna M., et al. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature Immunol.* 2004, 5, 1219-1226.
- (3) Hoshino K., et al. I $\kappa$ B kinase- $\alpha$  is critical for interferon- $\alpha$  production induced by Toll-like receptors 7 and 9. *Nature.* 2006, 440, 949-953.
- (4) 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

[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 :

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 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。