

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590483

研究課題名(和文) パターン認識分子による細胞外核酸認識機構

研究課題名(英文) Mechanism of nucleic acid recognition by endosomal Toll-like receptor 3

研究代表者

松本 美佐子 (MATSUMOTO MISAKO)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：30332456

研究成果の概要(和文)：エンドソームに局在する Toll-like receptor 3 (TLR3)はウイルス由来の二重鎖 RNA (dsRNA)を認識し、タイプ I インターフェロンや炎症性サイトカイン産生の誘導、樹状細胞の成熟化を介して抗ウイルス応答を誘起する。しかしながら、どのように細胞外 dsRNA をエンドソームで認識するか不明である。本研究では合成 dsRNA の poly(I:C)による TLR3 活性化機構を解析し、poly(I:C)の取り込みとエンドソーム TLR3 への配送に細胞質タンパク Raftlin が必須であること、Raftlin はクラスリン-AP-2 複合体と協調して dsRNA の取り込みに働くことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The synthetic virus double-stranded RNA analogue, poly(I:C), extracellularly activates both the endosomal Toll-like receptor (TLR) 3 and the cytoplasmic RNA helicase, melanoma differentiation-associated gene 5, leading to the production of type I interferons (IFNs) and inflammatory cytokines, and dendritic cell (DC) maturation. The mechanism by which extracellular poly(I:C) is delivered to TLR3-positive organelles and the cytoplasm remains to be elucidated. In this study, we demonstrate that the cytoplasmic lipid raft protein, Raftlin, is essential for poly(I:C) cellular uptake in human myeloid DCs and epithelial cells. When Raftlin was silenced, poly(I:C) failed to enter cells and induction of IFN- β production was inhibited. Upon poly(I:C) stimulation, Raftlin was translocated from the cytoplasm to the plasma membrane where it colocalized with poly(I:C), and thereafter moved to TLR3-positive endosomes. Raftlin physically associated with clathrin at the plasma membrane in response to poly(I:C). Thus, Raftlin cooperates with the clathrin-AP-2 complex to mediate cell entry of poly(I:C), which is critical for activation of TLR3.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：自然免疫

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：樹状細胞、Toll-like receptor、二重鎖 RNA、タイプ I インターフェロン、ウイルス感染、エンドソーム、エンドサイトーシス、プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞による細胞外核酸認識はエンドソームに局在する 1 型膜タンパク質の Toll-like receptor (TLR) 3, 7, 8, 9 によって担われ、タイプ I インターフェロン (IFN) や炎症性サイトカイン産生、樹状細胞の成熟化が誘導される。TLR3 は維芽細胞や上皮細胞、マクロファージでは細胞表面と初期エンドソームに、骨髄系樹状細胞では初期エンドソームにのみ存在し、ウイルス由来の dsRNA をエンドソームで認識しアダプター分子 TICAM-1 (別名 TRIF) を介してシグナルを伝達する。しかしウイルス感染時、どのようにウイルス dsRNA をエンドソームで認識するかは明らかでない。また、合成 dsRNA の poly(I:C) は細胞外から骨髄系樹状細胞のエンドソーム TLR3 と細胞質 RNA ヘリケースの MDA5 を活性化し強力な免疫応答を誘起するが、細胞内への取り込み機構は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、樹状細胞による細胞外核酸の取り込みと樹状細胞応答を分子レベルで明らかにするため、

(1) 骨髄系樹状細胞における細胞外核酸の取り込み経路を同定する。

(2) 細胞外 dsRNA の取り込みに関与する分子を同定する。

(3) Poly(I:C) の輸送機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト骨髄系樹状細胞における dsRNA の取り込みを TLR7, 8, 9 リガンド、エンドサイトーシス阻害剤、スカベンジャーレセプター阻害剤等を用いて解析した。

(2) ① Poly(I:C) 結合活性を有するヒト細胞株 (HEK293 細胞、Raji 細胞) の可溶化物を大量に調製し、poly(I:C) 結合タンパク質を polyU-, poly(I:C)-Sepharose を用いてそれぞれアフィニティー精製した。PolyU-Sepharose, poly(I:C)-Sepharose からの溶出蛋白を SDS-PAGE で分離後、バンドの切り出し、ゲル内トリプシン消化を行なって differential Ms/Ms 解析を行い、poly(I:C) に特異的に結合する膜蛋白質あるいは膜結合活性を有するタンパク質を選別した。Ms 解析は、北海道大学大学院先端生命科学研究所小布施教授に依頼した。

② 機能査定のため候補タンパク質を siRNA でノックダウンし、poly(I:C) 刺激による IFN- β 産生誘導への関与を TLR3 発現 HEK293 細胞を用いたレポーターアッセイ、HeLa 細胞とヒト骨髄系樹状細胞における IFN- β mRNA 量の測

定で判定した。更に Texas Red 標識 poly(I:C) を用い、取り込みへの関与を共焦点レーザー顕微鏡で調べた。

③ 同定したタンパクの生理的役割を明らかにするため、Raftlin ノックアウトマウスの骨髄系樹状細胞を用いて poly(I:C) 刺激による IFN- β 産生を測定した。ノックアウトマウスは慶応大学吉村教授から供与された。

(3) 抗 Raftlin 抗体を用いて、Raftlin の細胞内局在、poly(I:C) 刺激後の細胞内動態、TLR3 やオルガネラマーカ分子との共局在など共焦点レーザー顕微鏡で解析した。また、共免疫沈降実験でクラスリンとの相互作用を調べた。

4. 研究成果

(1) 種々のエンドサイトーシス阻害剤と TLR 核酸リガンドを用いた実験より、以下の事が明らかになった。① ヒト骨髄系樹状細胞は合成 dsRNA の poly(I:C) を効率よく取り込むが、in vitro transcribed dsRNA は取り込まず、この違いは 5' 末端のリン酸基の有無に依存しない ② poly(I:C) はクラスリン依存的エンドサイトーシスで取り込まれる ③ poly(I:C) の取り込みは TLR9 リガンドの B-, C-type oligodeoxynucleotide (ODN) や control ODN の取り込みと拮抗する ④ 取り込まれた poly(I:C) や B-type ODN は初期エンドソームに局在する TLR3 と共局在する。以上より、ヒト骨髄系樹状細胞では細胞外核酸を選択的に取り込む機構が存在し、poly(I:C) と B-, C-type ODN は共通のレセプターを介して取り込まれエンドソームへ運搬されることが明らかとなった (Itoh et al., J. Immunol. 2008)。

(2) 細胞外核酸の取り込みに関与する分子、Raftlin を同定した。

① 質量分析で同定された 127 個のタンパクの中から、膜タンパクあるいは膜結合活性を有するタンパクを選び、siRNA によるノックダウンと TLR3 発現 HEK293 細胞を用いたレポーターアッセイ、および HeLa 細胞における IFN- β mRNA 発現解析を行った結果、lipid raft protein として報告されていた Raftlin が poly(I:C) 刺激による TLR3 を介した IFN- β 産生に重要であることが明らかとなった (図 1)。ヒト単球由来樹状細胞の Raftlin をノックダウンすると、poly(I:C) 刺激による IFN- β 産生が著しく低下し、Raftlin が上皮系細胞および骨髄系樹状細胞において poly(I:C) 刺激による IFN- β 産生に必要であ

ることが判明した (図2)。

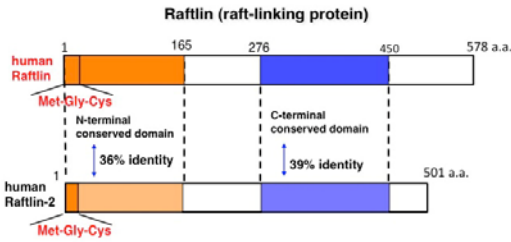


図1. Raftlin と Raftlin-2 の構造

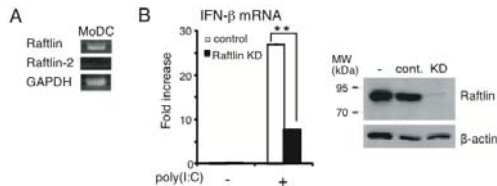


図2. A. ヒト単球由来樹状細胞における Raftlin と Raftlin-2 の mRNA 発現. B. Poly(I:C) 刺激による IFN-β mRNA の発現. □ control 樹状細胞、■ Raftlin ノックダウン樹状細胞

② Poly(I:C) 取り込みへの Raftlin の関与

Poly(I:C) を Texas Red で標識し、HeLa 細胞内への取り込みを経時的に共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。Control 細胞では細胞膜に線状に結合した poly(I:C) は 3 7 度 5 分で点状に集積し、1 5 分ですべて細胞内に取り込まれ、3 0 分でエンドソーム TLR3 と共局在したが、Raftlin ノックダウン細胞では、細胞膜上で点状に集積したままで全く取り込まれなかった。poly(I:C) 同様クラスリン依存的エンドサイトーシスで取り込まれるトランスフェリンの取り込みは、Raftlin をノックダウンしても影響がなかった (図3)。

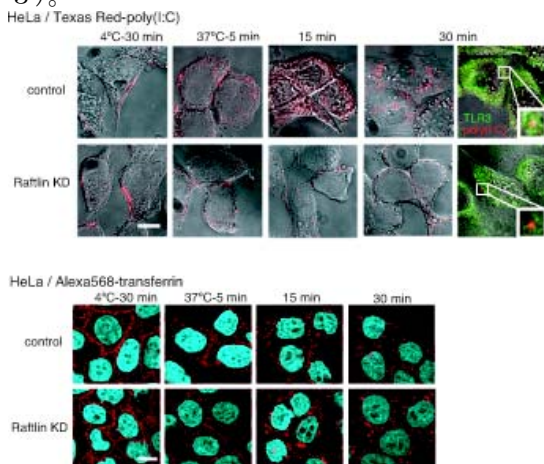


図3. Poly(I:C) 取り込みへの Raftlin の関与
A. Texas Red 標識 poly(I:C) の取り込み.
B. Alexa568 標識トランスフェリンの取り込み.

上段、control HeLa 細胞; 下段、Raftlin ノックダウン HeLa 細胞

一方、poly(I:C) と取り込みレセプターを共有する B/C-type ODN は、Raftlin をノックダウンすると取り込まれなかったことより、Raftlin は poly(I:C) や ODN などの非自己核酸の取り込みに重要な分子と考えられた。更に、骨髄系樹状細胞において poly(I:C) の取り込みは Raftlin ノックダウンで阻害され、Raftlin は poly(I:C) の細胞内取り込みに必須の分子であることが明らかとなった (図4)。

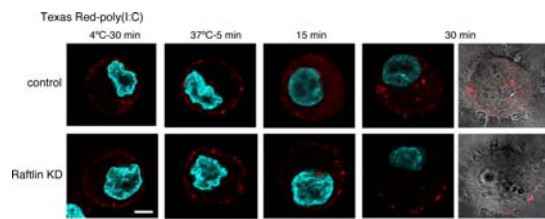


図4. 単球由来樹状細胞における poly(I:C) の取り込みへの Raftlin の関与.

Texas Red 標識 poly(I:C) の取り込みの時間的経過. 上段、control 樹状細胞; 下段、Raftlin ノックダウン樹状細胞

③ Poly(I:C) 取り込みへの mouse Raftlin の関与

Raftlin の生理的機能を明らかにするため、Raftlin 欠損マウスの BMDC で poly(I:C) 刺激による IFN-β 産生と poly(I:C) の取り込みを調べた結果、wild-type マウスと同様に IFN-β 産生と取り込みが見られた。ヒト骨髄系樹状細胞と異なり、マウス BMDC はファミリー分子の Raftlin-2 を発現しているため、Raftlin-2 shRNA-expressing lentivirus を感染させて Raftlin-2 をノックダウンしたところ、poly(I:C) による IFN-β 産生が減弱し、poly(I:C) の取り込みが起きなかった。従って、マウス BMDC では Raftlin と Raftlin-2 が poly(I:C) の取り込みに関与していると考えられた。

(3) Poly(I:C) 輸送機構

Raftlin は HeLa 細胞では細胞質に、ヒト骨髄系樹状細胞では細胞膜と細胞質に局在しており、細胞表面に結合した poly(I:C) が点状に集積するに伴い細胞質から細胞膜に移動し poly(I:C) と共局在した。その後、poly(I:C) の細胞内への取り込みとともに細胞膜からエンドソームへ移行し、TLR3 および初期エンドソームマーカーの Rab5 と共局在した。Raftlin は定常状態ではクラスリンと相互作用しないが、poly(I:C) 刺激で細胞膜

にリクルートされた時クラスリンと相互作用し、エンドソームに達すると相互作用しないことから、Raftlin の機能は、細胞膜でクラスリン-AP-2 複合体と協調して poly(I:C) 取り込みレセプターの選別と TLR3 エンドソームへの配送を行うと考えられた (Watanabe et al., J Biol. Chem. 2011) (図 5)。

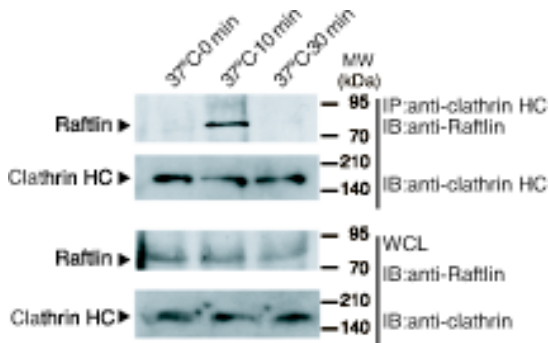


図 5. Poly(I:C) 刺激による Raftlin とクラスリンの結合

【今後の展望】

本研究で、ヒト骨髄系樹状細胞や上皮系細胞における poly(I:C) の取り込みおよび poly(I:C) が誘起する細胞応答に Raftlin が必須であることが判明した。Raftlin は B cell や T cell では lipid raft に存在し、BCR, TCR シグナルを modulate することがすでに報告されているが、骨髄系樹状細胞では lipid raft marker と部分的にしか共局在しておらず、lipid raft を破壊しても poly(I:C) の取り込みは正常であることから、細胞により局在や機能が異なると考えられる。しかし、いずれの細胞においても非自己認識に関わるレセプターの下流で機能する点が非常に興味深い。Raftlin は、上皮系細胞や骨髄系樹状細胞ではクラスリン-AP-2 複合体と相互作用し、poly(I:C) 取り込みレセプターの選別と配送に関与する。Poly(I:C) は骨髄系樹状細胞の TLR3 を活性化し NK 細胞や CTL を誘導することから次世代アジュバントとして有望視されており、本研究はアジュバント取り込みの分子機構の解明に重要な知見を与えた。今後、取り込みレセプターの同定やクラスリン依存的エンドサイトーシスにおける Raftlin の機能についての解析を行い、細胞外核酸取り込みの全体像を明らかにする。

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 45 件)
英語論文 (すべて査読有)

1. Watanabe, A. M. Tatematsu, K. Saeki, S. Shibata, H. Shime, A. Yoshimura, C. Obuse, T. Seya, and M. Matsumoto. 2011. Raftlin is involved in the nucleocapture complex to induce poly(I:C)-mediated TLR3 activation. *J. Biol. Chem.* 286: 10702-10711.
2. Matsumoto, M., H. Oshiumi, and T. Seya. 2011. Antiviral responses induced by the TLR3 pathway. *Rev. Med. Virol.* 21: 67-77.
3. Oshiumi, H. M. Miyashita, N. Inoue, M. Okabe, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection. *Cell Host & Microbe* 8: 496-509.
4. Ebihara, T., M. Azuma, H. Oshiumi, J. Kasamatsu, K. Iwabuchi, K. Matsumoto, H. Saito, T. Taniguchi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Identification of a poly I:C-inducible membrane protein that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *J. Exp. Med.* 207:267 5-2687.
5. Tatematsu M., A. Ishii, H. Oshiumi, M. Horiuchi, F. Inagaki, T. Seya, and M. Matsumoto. 2010. A molecular mechanism for Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1-mediated IRF-3 activation. *J. Biol. Chem.* 285:20128-20136.
6. Oshiumi, H., K. Sakai, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase binds the RIG-I adaptor IPS-1 to up-regulate IFN- β inducing potential. *Eur. J. Immunol.* 40: 940-948.
7. Seya, T., H. Shime, T. Ebihara, H. Oshiumi, and M. Matsumoto. 2010. Pattern recognition receptors of innate immunity and their application to tumor immunotherapy. *Cancer Sci.* 101: 313-320. (review).
8. Seya, T., and M. Matsumoto. 2009. The extrinsic RNA-sensing pathway for adjuvant immunotherapy of cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 58:1175-1184. (review).
9. Iwakiri, D., L. Zhou, M. Samanta, M. Matsumoto, T. Ebihara, T. Seya, S. Imai, M. Fujieda, K. Kawa, and K. Takada. 2009. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from toll-like receptor 3. *J. Exp. Med.* 206: 2091-2099.
10. Seya, T., M. Matsumoto, T. Ebihara, and H. Oshiumi. 2009. Functional evolution of the TICAM-1 pathway for extrinsic RNA sensing. *Immunol. Reviews* 227: 44-53 (review).
11. Oshiumi, H., M. Matsumoto, S. Hatakeyama, and T. Seya. 2009. Riplet/RNF135, a RING-finger protein, ubiquitinates RIG-I to

- promote interferon- β induction during the early phase of viral infection. *J. Biol. Chem.* 284: 807-817.
12. Itoh, K., A. Watanabe, K. Funami, T. Seya, and M. Matsumoto. 2008. The clathrin-mediated endocytic pathway participates in dsRNA-induced IFN- β production. *J. Immunol.* 181:5522-5529.
 13. Fukuda, K., T. Watanabe, T. Tokisue, T. Tsujita, S. Nishikawa, T. Hasegawa, T. Seya and M. Matsumoto. 2008. Modulation of double-stranded RNA recognition by the N-terminal histidine-rich region of the human Toll-like Receptor 3. *J. Biol. Chem.* 283: 22784-22794.
 14. Funami, K., M. Sasai, H. Oshiumi, T. Seya, and M. Matsumoto. 2008. Homo-oligomerization is essential for Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1 mediated NF- κ B and IRF-3 activation. *J. Biol. Chem.* 283: 18283-18291.
 15. Nakamura, M., K. Funami, A. Komori, T. Yokoyama, Y. Aiba, A. Araki, Y. Takii, M. Ito, M. Matsuyama, H. Yatsuhashi, M. Matsumoto, H. Ishibashi, and T. Seya. 2008. Increased expression of Toll-like receptor 3 in intrahepatic biliary epithelial cells at sites of ductular reaction in diseased livers. *Hepatology Int.* 2: 222-230.
 16. Matsumoto M., and T. Seya. 2008. TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv. Drug Del. Rev.* 60: 805-812. (review)
 17. Ebihara, T., M. Shingai, M. Matsumoto, T. Wakita, and T. Seya. 2008. Hepatitis C virus (HCV)-infected apoptotic cells extrinsically modulate dendritic cell function to activate T cells and NK cells. *Hepatology*. 48: 48-58.
 18. Bas, S., L. Neff, M. Vuillet, U. Spenato, T. Seya, M. Matsumoto, and C. Gabay. 2008. The proinflammatory cytokine response to *Chlamydia trachomatis* elementary bodies in human macrophages is partly mediated by a lipoprotein, the macrophage infectivity potentiator, through TLR2/TLR1/TLR6 and CD14. *J. Immunol.* 180: 1158-1168. 他 21 編邦文 (査読無し)
1. 瀬谷 司、松本美佐子、樹状細胞パターン認識と関連分子のガンワクチンへの応用、最新医学 61(11): 2378-2385, 2009.
 2. 瀬谷司、志馬寛明、松本美佐子、アジュバントによる樹状細胞制御の分子機構と抗腫瘍免疫 実験医学 2009 Vol. 27 No. 14 (9月号) p. 2194-2200.
 3. 志馬寛明、井上徳光、松本美佐子、瀬谷司 TLR 刺激による Th17 細胞の増加 臨床免疫 51 (5): 479-486, 2009.
 4. 松本美佐子、瀬谷司、Toll 様受容体の機能 生化学 Vol.81 No. 3, pp.156-164, 2009.
 5. 舟見健児、松本美佐子、瀬谷司、2 重鎖 RNA 刺激に伴う TICAM-1 / TRIF の細胞内動態 臨床免疫 50 (2): 141-146, 2008.
 6. 海老原敬、松本美佐子、瀬谷司 HCV と自然免疫 ウイルス 58 (1) : 19-26, 2008
- [学会発表] (計 19 件)
1. Matsumoto M., Watanabe A., Seya T.: Raftlin is essential for poly(I:C) cellular uptake in human myeloid dendritic cells. **Keystone symposia**, (Santa Fe) 2011. 2.13-16. (Workshop)
 2. Seya T., Shime H., Azuma M., Matsumoto M. RNA adjuvants that induce multiple effectors by dendritic cells for facilitating antitumor immunity. **Keystone symposia**, (Santa Fe) 2011. 2.13-16.
 3. Watanabe A., Seya T., Matsumoto M.: Identification of a novel protein that participates in poly(I:C) cellular uptake. **14th International Congress of Immunology**. (Kobe) 2010.8.22-27. (Workshop)
 4. Tatematsu M., Seya T., Matsumoto M.: Identification of Leu194 as a key residue of Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1-mediated IRF-3 activation. **14th International Congress of Immunology**. (Kobe) 2010.8.22-27.
 5. 渡部綾子、瀬谷司、松本美佐子: Analysis of the uptake protein for double-stranded RNA、第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪)、2009.12.2-4 (口頭)
 6. Tatematsu M., Watanabe A., Oshiumi H., Seya T., Matsumoto M.: Structural and functional analysis of TICAM-1, (同上)、(口頭)
 7. Azuma M., Ebihara T., Kubota N., Matsumoto M., and Seya T.: Regulation of crosspresentation through the TLR3/TICAM-1 pathway in mDC, (同上)
 8. 海老原敬、松本美佐子、瀬谷司: HCV 感染による TLR3 経路の活性化と NK 細胞の誘導、第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (東京)、2009.10.25-27 (ワークショップ)
 9. Matsumoto M., Itoh H, and Seya T.: The TIR domain determines cellular localization of human Toll-like receptor 8, (Osaka) Immune Regulation: Present and Future, 2009.5.25-27
 10. 東 正大、海老原敬、久保田信彦、赤澤隆、松本美佐子、瀬谷 司: 樹状細胞にお

ける TLR3/TICAM-1 経路を介したクロス
プレゼンテーションの制御第 38 回日本
免疫学会総会・学術集会（京都）、
2008.12.1-3

11. 海老原敬、松本美佐子、瀬谷 司：樹状細胞における新規 NK 活性化分子の解析、（同上）
12. 松本美佐子：TLR3-TICAM-1 による dsRNA 認識とシグナル伝達、Workshop（同上）
他 7 件

〔図書〕（計 1 件）

1. 松本美佐子、他、メジカルビュー社、補体への招待、2011、231.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

名称：アジュバント活性を有する新規核酸
およびその利用

発明者：松本美佐子、瀬谷司

権利者：北海道大学

種類：特許

番号：特願 2010-169407

出願年月日：平成 22 年 7 月 28 日

国内外の別：国内

名称：I 型インターフェロンの発現調節剤

発明者：瀬谷司、松本美佐子、押海裕之

権利者：北海道大学

種類：特許

番号：PCT/JP2008/001648

出願年月日：2008 年 6 月 25 日

国内外の別：国際

○取得状況（計 1 件）

名称：M161Ag からなるサイトカイン誘発剤

発明者：松本美佐子、瀬谷司

権利者：北海道大学

種類：特許

番号：2,320,656

取得年月日：2009 年 8 月 4 日

国内外の別：カナダ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 美佐子 (MATSUMOTO MISAKO)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：30332456

(3) 連携研究者

瀬谷 司 (SEYA TSUKASA)

北海道大学・大学院医学研究科・教授