

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590434

研究課題名（和文） 樹状細胞における小胞機能のコントロールによる免疫制御法の開発

研究課題名（英文） Immune regulation by controlling vesicular functions in dendritic cells

研究代表者

門脇 則光 (KADOWAKI NORIMITSU)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：60324620

研究成果の概要（和文）：形質細胞様樹状細胞(pDC)は、核酸を認識して大量のインターフェロン(IFN)- $\alpha$ を産生することにより自己免疫疾患を引き起こす。本研究で、プロテアソーム阻害薬ボルテゾミブとチロシンキナーゼ阻害薬ダサチニブが、それぞれ核酸認識 Toll 様受容体と核酸リガンドの小胞輸送を乱すことにより、pDC の IFN- $\alpha$ 産生を抑制することを見いだした。これにより、pDC の小胞機能を標的とした新しい免疫制御薬の開発に向けた基盤的知見を得た。

研究成果の概要（英文）：Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) trigger autoimmune diseases by producing a large amount of IFN-alpha in response to nucleic acid. We found that the proteasome inhibitor bortezomib and the tyrosine kinase inhibitor dasatinib suppressed the IFN-alpha production by disturbing vesicular transport of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and that of nucleic acid ligands, respectively. We thus obtained fundamental findings to develop novel immunosuppressants targeting vesicular functions in pDCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：自然免疫、樹状細胞、細胞内小胞、免疫制御

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内小胞輸送を中心とした小胞機能は細胞の基本機能であり、疾患発症や治療の標的となる。とりわけ、強力な抗原提示細胞である樹状細胞 (dendritic cells; DC) では、抗原や受容体の細胞内移動の際に、小胞機能の

コントロールがきわめて重要な役割を果たす。

(1) DC 内小胞機能における2つの謎  
DC は抗原プロセッシングの際にダイナミックな細胞内物質輸送を呈することから、DC 内小胞機能は免疫学の重要なテーマである。こ

のテーマに関して、下記の2つの大きな謎が存在する。

- ① DCが微生物のDNA, RNAを認識する際に働く Toll-like receptors (TLR3, 7, 8, 9)は、細胞表面に存在すると自己の核酸にも反応してしまうので、それを避けるべく特異な動態を示す。すなわち、TLR7, 8, 9は、無刺激の状態では小胞体であり、細胞がリガンドの刺激を受けると、シャペロン分子 Unc93B1 とともにエンドソームに移動する。しかし、この移動を惹起する具体的な分子メカニズムは不明である。
- ② TLR9 リガンドである非メチル化 CpG DNA は2つのタイプに分けられる。CpG-Aは凝集体を形成し、形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid DC; pDC)に取り込まれた後に早期エンドソームにとどまることにより、pDCによる大量のIFN- $\alpha$ 産生を誘導する一方、CpG-Bはモノマーとして存在し、後期エンドソームに速やかに移動してTNFを誘導するが、IFN- $\alpha$ を誘導しない。このように、CpG DNAはその立体構造の違いによってエンドソーム内での挙動が異なり、これによって、大量のIFN- $\alpha$ 産生というpDCに特異的な機能が規定される。また、このようなCpGの挙動の違いは骨髄系樹状細胞(myeloid DC; mDC)では見られないことから、pDC特異的なメカニズムがCpG-Aを早期エンドソームに滞留させると考えられる。しかし、「CpG DNAのpDC内移動がなぜ立体構造によって異なるのか」というメカニズムは不明である。

こうした「核酸認識TLRの小胞体からエンドソームへの移動」「CpG DNAの立体構造によるpDC内小胞での挙動の違い」という2つの特異なDC内小胞動態の分子メカニズムを解明することは、小胞機能の基本メカニズムに重要な情報を提供するという生物学的な普遍性を持つとともに、「小胞機能」を標的とした新たなカテゴリーの免疫制御薬の開発に発展する可能性を秘めている。

#### (2) 本研究の着想に至った経緯

研究代表者が、悪性腫瘍に対するDCワクチン療法と分子標的療法の併用を念頭に置いて、分子標的薬が免疫系に及ぼす影響を明らかにするために、多発性骨髄腫に用いられるプロテアソーム阻害薬ボルテゾミブ、慢性骨髄性白血病に用いられるチロシンキナーゼ阻害薬ダサチニブが、ヒトDCサブセットpDC, mDCに及ぼす影響を検討した。そして、ボルテゾミブ、ダサチニブともpDCによるIFN- $\alpha$ の産生を強力に抑制することを見いだした。そのメカニズムを探ると、①ボルテゾミブはTLR9の小胞体からエンドソ

ムへの移動を阻害すること、②ダサチニブはCpG-Aの作用を阻害する一方CpG-Bの作用は阻害しないことを見いだした。CpG-AとBの違いは早期エンドソームにおける滞留時間にあることから、ダサチニブはCpG-Aの早期エンドソームでの作用を何らかの機序で阻害すると考えられる。このように、ボルテゾミブ、ダサチニブがDC内小胞機能に影響を及ぼすことを見だし、この2つの薬剤を材料にして、DC内小胞機能に重要な分子を同定することを着想した。

#### 2. 研究の目的

本研究では、以下の3点を明らかにする。

- (1) ボルテゾミブによるTLR9 trafficの抑制がシャペロン分子Unc93B1の抑制を伴うかどうか。
- (2) ダサチニブがCpG-Aの作用を選択的に阻害することが、本来早期エンドソームに滞留するCpG-Aのtrafficの異常を伴うかどうか。
- (3) ダサチニブがどの蛋白のリン酸化阻害を介してpDCによるIFN- $\alpha$ 産生を抑制するか。

ダサチニブがCpG-Aの作用を選択的に阻害することから、早期エンドソームが作用の標的になっている可能性が最も考えられる。(3)では、ダサチニブの標的となるリン酸化蛋白を、リン酸化プロファイリングとsiRNAにて同定し、「凝集化CpGの早期エンドソーム内での作用」を司る分子の同定、その分子の機能解析、そして創薬ターゲットとしての可能性の検討を行う。

#### 3. 研究の方法

- (1) ボルテゾミブがTLR9の小胞体からエンドソームへの移動を阻害するメカニズム

これまでに、ボルテゾミブが、CpG-A (ODN2216)の刺激を受けたヒトpDCのIFN- $\alpha$ 産生を抑制するデータを得ており、その機序として、ボルテゾミブが、CpG刺激を受けたヒトpDC白血病細胞株CAL-1におけるTLR9の小胞体からエンドソームへの移動を抑制することを共焦点顕微鏡にて見出している。

このTLR9移動の抑制が、シャペロン分子Unc93B1移動の抑制によるものかどうかを調べるために、TLR9を発現するマウスマクロファージ細胞株RAW264.7にUnc93B1-GFP融合遺伝子をレトロウイルスにて導入し、そのCpG±ボルテゾミブ刺激後の動態を共焦点顕微鏡にて調べる。

- (2) ダサチニブがpDCにおけるCpG-Aの早期エンドソームへの滞留に及ぼす影響  
ダサチニブが、CpG-A (ODN2216)刺激を受

けたヒト pDC の IFN- $\alpha$ 、TNF 産生を Src ファミリーキナーゼ非依存的に抑制する一方、CpG-B (ODN2006)の刺激による TNF は抑制しないというデータを得ている。他の ABL キナーゼ阻害薬イマチニブ、ニロチニブにはこのような作用はない。

CpG-A と CpG-B の違いは、前者がポリマーの凝集体、後者がモノマーという立体構造であり、この違いによって、CpG-A は早期エンドソームに滞留し、CpG-B は速やかに後期エンドソーム～リソソームに移動する。したがって、ダサチニブが CpG-A の作用を選択的に阻害するメカニズムとして、CpG-A の早期エンドソームへの滞留を阻害する可能性が考えられる。それを検証するために、FITC 標識した CpG-A の primary pDC および CAL-1 における動態を、ダサチニブの存在下、非存在下で共焦点顕微鏡にて調べる。

なお、ボルテゾミブの標的分子候補はおそらく多数あり、本研究の予算枠内で焦点を絞ることが困難と考えられるため、以下の実験では、ダサチニブの標的同定を中心に据える。

(3) CpG-A による pDC の刺激をダサチニブが抑制する際に標的となるリン酸化蛋白候補のプロテオーム解析による抽出ダサチニブが多数のキナーゼを阻害していることが報告されていることから、ダサチニブによる IFN- $\alpha$  産生の阻害が、何らかの蛋白リン酸化の阻害による可能性が高い。したがって、どの蛋白のリン酸化がダサチニブの標的になっているかを調べる。その材料として、ヒト末梢血 pDC はきわめて少数で、解析に十分な数得るのが難しいこと、pDC 白血病細胞株 CAL-1 が primary pDC と同様の phenotype、CpG 刺激への反応性を示すことから、CAL-1 を用いる。

無刺激の CAL-1、CpG-A と培養した CAL-1、CpG-A およびダサチニブと培養した CAL-1 の 3 者から蛋白を抽出して、リン酸化蛋白の二次元電気泳動、MALDI-TOF/MS による質量分析、マスマップ法によるデータベース検索を行い、CpG-A 刺激で出現し、ダサチニブによって消失するリン酸化蛋白を網羅的に解析する。

(4) siRNA による標的蛋白の機能的同定  
上記の解析によって、CAL-1 の CpG 刺激で誘導され、そのダサチニブ処理によって阻害される既知の蛋白質のリン酸化を同定する。そのような蛋白質が複数同定されると考えられ、このうち TLR シグナルや小胞機能に関係すると推定される蛋白を選択する。その蛋白をコードする cDNA をクローニングし、in vitro transcription によって siRNA カクテルを作製する。これをトランスフェクションした CAL-1 を CpG 刺激し、ダサチニブ処理と同様に IFN- $\alpha$  産生を抑制する siRNA カクテルを見つける。これにより、ダサチニブ

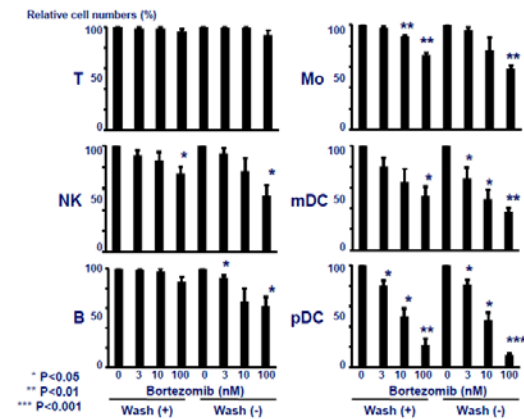
で阻害されるリン酸化の標的蛋白のうち、CpG に対する pDC の反応に必要な蛋白を同定する。

#### 4. 研究成果

(1) プロテアソーム阻害薬ボルテゾミブによる pDC の生存・機能の抑制とその機序

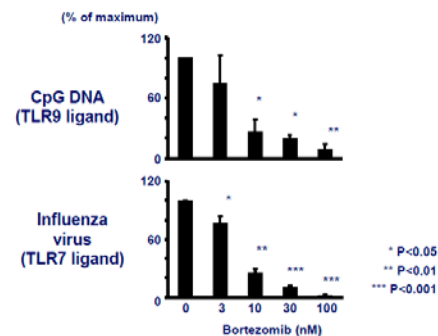
ボルテゾミブは他の免疫担当細胞に比べ、pDC のアポトーシスを強く誘導した(図 1)。

図1 ボルテゾミブはpDCの細胞死を強く誘導する



この作用は、小胞体ストレスを回避する転写因子 XBP-1 の活性化を阻害することによって考えられた。また、ボルテゾミブは、CpG DNA 及びインフルエンザウイルスによる TLR9, TLR7 を介した刺激で誘導される IFN- $\alpha$  の産生を、アポトーシスに依存しない機構で抑制した(図 2)。

図2 ボルテゾミブはpDCによるIFN- $\alpha$ の産生を抑制する

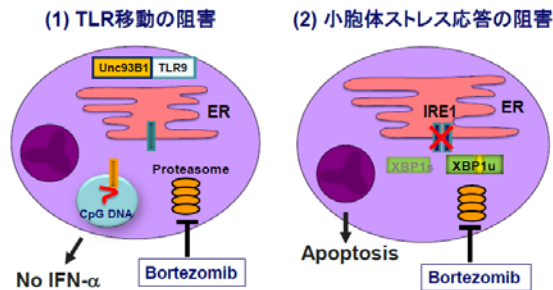


共焦点顕微鏡での観察により、この作用は、TLR9 の小胞体からエンドソームへの移動を抑制することによって考えられた。この移動の際に、小胞体の膜タンパク Unc93B1 が TLR に結合し、これを運搬するが、Unc93B1 の移動はボルテゾミブにより影響を受けなかったことから、ボルテゾミブは TLR9 と Unc93B1 の結合を阻害することが示唆された。

以上より、ボルテゾミブは、①核酸認識 TLR

と Unc93B1 の結合を阻害して、TLR の小胞体からエンドソームへの移動を抑制することにより pDC の機能を阻害し、②小胞体ストレスに対する恒常性維持を阻害することにより pDC のアポトーシスを誘導すると考えられる (図 3)。

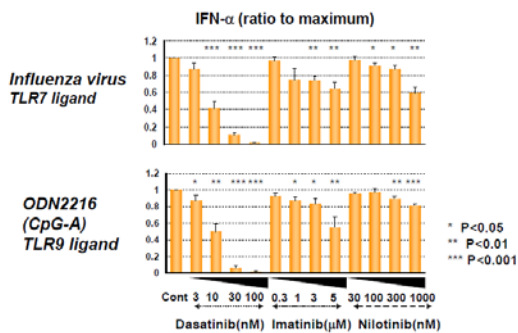
図3 pDCの小胞体を標的とした免疫制御



本研究は、プロテアソーム阻害薬が、pDC 由来の IFN- $\alpha$  が関与する自己免疫性・炎症性疾患の治療薬となる可能性を示す。

(2) チロシンキナーゼ阻害薬ダサチニブによる pDC 機能の抑制とその機序  
ダサチニブは pDC の細胞死を誘導することなく、CpG-A (pDC の早期エンドソームに滞留し IFN- $\alpha$  産生を誘導する CpG DNA) 刺激を受けた pDC による IFN- $\alpha$  産生を抑制した (図 4)。

図4 ダサチニブはpDCによるIFN- $\alpha$ の産生を抑制する

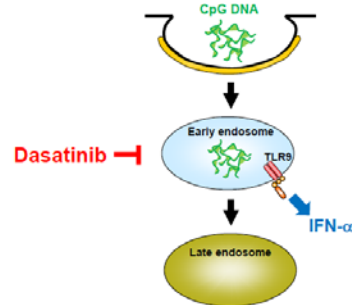


一方、他のチロシンキナーゼ阻害薬であるイマチニブ、ニロチニブにそのような作用は見られなかった。ダサチニブ服用患者の末梢血 pDC における IFN- $\alpha$  産生能が服用開始とともに抑制されたことから、ダサチニブの作用は *in vitro* のみならず *in vivo* でも見られることが明らかになった。また、ダサチニブは CpG-B (pDC の早期エンドソームに滞留せず TNF 産生を誘導する CpG DNA) 刺激を受けた pDC による TNF 産生は抑制しなかった。さらに、CpG DNA を受けた pDC における蛋白のチロシンリン酸化は、TLR9 以下のシグナルを阻害するクロロキンで阻害されなかったが、ダサチニブでは阻害された。以上より、ダサチニブは、CpG-A 刺激を受

けた pDC において、CpG-A が TLR9 に会合する前の上流に作用することにより、IFN- $\alpha$  産生を阻害すると考えられた。

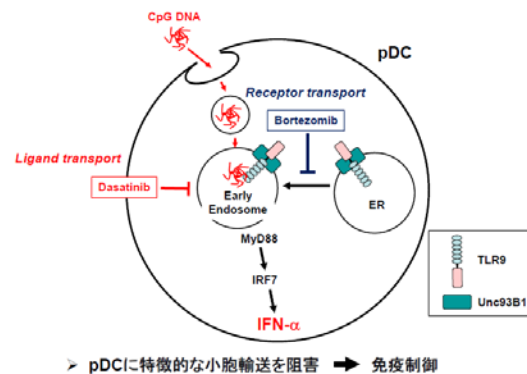
ダサチニブが CpG DNA 刺激を受けた pDC による IFN- $\alpha$  産生を抑制するときの作用点を、共焦点顕微鏡での観察により検討した。その結果、CpG-A の細胞内への取り込みや、CpG-A 刺激により誘発される TLR9 の小胞体からエンドソームへの移動を阻害しなかった。一方、ダサチニブは CpG-A の早期エンドソームへの滞留を阻害した。これに対し、ダサチニブと同様に TLR9 の上流に作用し pDC の IFN- $\alpha$  産生を抑える Src ファミリーキナーゼ阻害剤は、CpG-A の早期エンドソームへの滞留を阻害しなかった。以上より、ダサチニブは、CpG-A の早期エンドソームへの滞留を Src ファミリーキナーゼ非依存性に阻害することにより、pDC による IFN- $\alpha$  産生を阻害すると考えられた (図 5)。

図5 ダサチニブはCpG DNAの早期エンドソームへの滞留を阻害することにより、pDCによるIFN- $\alpha$ の産生を抑制する



(3) 小胞機能を標的とした DC の機能制御 (まとめ) (図 6)

図6 小胞機能を標的とした樹状細胞の機能制御



以上、ボルテゾミブとダサチニブの pDC の生存・機能への影響を解析した研究から、pDC 内小胞における「レセプターの輸送」と「リガンドの輸送」を標的とすることにより、この細胞が関与する炎症性疾患に対する新規薬剤を開発する基盤的知見を得た。今回の研究では達成に至らなかった以下の研究を今後進めてゆく。

- ① DNA を pDC の早期エンドソームに滞留させる責任キナーゼを、キナーゼに対する siRNA ライブラリまたは複数のキナーゼ阻害剤を用いて同定する。
  - ② このキナーゼの基質をリン酸化プロテオーム解析により同定する。
- これらにより、pDC に起因する炎症性疾患の新たな創薬標的を見いだすとともに、小胞輸送に働く新規の分子メカニズムを明らかにし、細胞生物学上の新知見を得ることを目指す。

#### 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 4 件)

- ① 門脇則光：樹状細胞 特集「自己免疫疾患・アレルギー疾患 (前篇) 免疫の基礎、検査、治療」最新医学 68 (3 月増刊号)：502-512, 2013. (査読無)  
<http://www.pieronline.jp/content/issue/0370-8241/68031>
- ② Fujita H, Kitawaki T, Sato T, Maeda T, Kamihira S, Takaori-Kondo A, Kadowaki N. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib suppresses cytokine production by plasmacytoid dendritic cells by targeting endosomal transport of CpG DNA. *Eur J Immunol.* 43: 93-103, 2013. (査読有)  
DOI: 10.1002/eji.201242699.
- ③ 門脇則光、北脇年雄、平井麻起子：ヒト樹状細胞の機能制御による悪性腫瘍および炎症性疾患の治療、第 72 回日本血液学会学術集会 シンポジウム 2 Novel approach toward advanced dendritic cell therapy. *臨床血液* 52：497-504, 2011. (査読無) DOI: <http://dx.doi.org/10.11406/rinketsu.52.497>.
- ④ Hirai M, Kadowaki N, Kitawaki T, Fujita H, Takaori-Kondo A, Fukui R, Miyake K, Maeda T, Kamihira S, Miyachi Y, Uchiyama T. Bortezomib suppresses function and survival of plasmacytoid dendritic cells by targeting intracellular trafficking of Toll-like receptors and endoplasmic reticulum homeostasis. *Blood* 117: 500-509, 2011. (査読有) DOI: 10.1182/blood-2010-05-284737.

[学会発表] (計 9 件)

- ① 門脇則光：小胞機能を標的とした樹状細胞の機能制御。ワークショップ「アジュバント関連の基礎研究の最前線」、第 16

回日本がん免疫学会総会、札幌、2012 年 7 月 26-28 日

- ② 藤田晴之：ABL キナーゼ阻害薬ダサチニブによるヒト形質細胞様樹状細胞の機能抑制。第 40 回日本免疫学会学術集会、千葉、2011 年 11 月 27 日-29 日
- ③ 藤田晴之：Dasatinib potently suppresses immunostimulatory activity of human plasmacytoid dendritic cells. 第 73 回日本血液学会学術集会、名古屋、2011 年 10 月 14 日-16 日
- ④ 藤田晴之：ABL キナーゼ阻害薬ダサチニブによるヒト形質細胞様樹状細胞の機能抑制。第 15 回日本がん免疫学会総会、豊中、2011 年 6 月 30 日-7 月 1 日
- ⑤ Fujita H. Protein kinase inhibitor dasatinib potently suppresses immunostimulatory activity of human plasmacytoid dendritic cells. 52nd Annual Meeting of The American Society of Hematology, Orlando, USA, December 4-7, 2010.
- ⑥ Hirai M. A proteasome inhibitor bortezomib suppresses immunostimulatory activity of human plasmacytoid dendritic cells by targeting intracellular trafficking of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and endoplasmic reticulum homeostasis. 11th International Symposium on Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology, Lugano, Switzerland, September 26-30, 2010.
- ⑦ Kadowaki N. Therapy for leukemia and inflammation through modulating human dendritic cell functions. Symposium 2: Novel approach toward dendritic cell therapy. 第 72 回日本血液学会学術集会、横浜、2010 年 9 月 24-26 日
- ⑧ Hirai M, Kadowaki N, Kitawaki T, Takaori-Kondo A, Fukui R, Miyake K, Maeda T, Kamihira S, Miyachi Y, Uchiyama T. A proteasome inhibitor bortezomib suppresses immunostimulatory activity of human plasmacytoid dendritic cells by targeting intracellular trafficking of Toll-like receptor 9 and endoplasmic reticulum homeostasis. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, August 22-27, 2010.
- ⑨ 藤田晴之：ABL キナーゼ阻害薬ダサチニブによるヒト形質細胞様樹状細胞の機能制御。第 14 回日本がん免疫学会総

会、熊本、2010年7月22,23日

〔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.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~hemonc/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

門脇 則光 (KADOWAKI NORIMITSU)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60324620

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：