

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790317

研究課題名(和文)新規TNF受容体ファミリー分子・DR6の刺激因子の探索およびその機能解析

研究課題名(英文)Identification and functional characterization of a specific ligand for DR6

研究代表者

藤倉 大輔(FUJIKURA, DAISUKE)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・博士研究員

研究者番号：70547794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：末梢リンパ細胞は種々の細胞と共に免疫ネットワークを構成し、病原体や腫瘍に対する防御機構を司り、その破綻は自己免疫疾患発症の誘因となる。Death receptor 6 (DR6)は末梢リンパ細胞の活性化制御因子として働く事が示唆されているが、刺激因子を含めその制御機構は不明である。本研究ではcDNAライブラリースクリーニングによりDR6特異的結合因子(DR6L)を単離・同定した。In vitro解析の結果、抗原提示細胞上のDR6Lの発現は、抗原提示によるT細胞の活性化を、T細胞上のDR6発現依存的に抑制する事が明らかとなり、単離されたDR6LはDR6特異的的刺激因子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Peripheral lymphocytes regulate the activation of immune network for protecting host homeostasis against an infection with several pathogens and tumor progressions, and an abnormality on the regulation causes auto-immunological diseases. Recently, it was demonstrated that Death receptor 6 (DR6) had an important role for a regulation of peripheral lymphocyte activation in response to antigen challenge. However, detail of molecular mechanism on a regulation for DR6's function, such as a specific ligand, remains unclear. We identified a membrane protein specifically binding with DR6 (DR6L). In addition, in vitro binding assay showed that DR6L could specifically interact with DR6 than other members of TNFR family. Importantly, In vitro co-culture assay showed that DR6L expressed on an antigen presenting cell reduced an antigen dependent activation of T lymphocyte. These findings suggest that the identified protein, DR6L should act as a specific stimulator for DR6 in T cell activation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：death receptor 6 DR6 T細胞

1. 研究開始当初の背景

末梢 T リンパ細胞は種々の免疫細胞と免疫ネットワークを形成し、病原体による感染や腫瘍の形成に対する防御機構を担い、その防御機構の破綻は自己免疫疾患発症の誘因となる。末梢 T リンパ細胞の活性化は、主に抗原提示細胞が発現する MHC 分子と抗原との複合体による T 細胞受容体への刺激により惹起され、この活性化シグナルは同じく T 細胞上に発現する刺激補助因子と呼ばれる様々な膜タンパク質により正に、或は、負に制御される。TNF 受容体ファミリー分子である DR6(Death Receptor 6)/TNFRSF21 は末梢 T リンパ細胞の細胞膜上に発現し、未知の刺激因子との結合により抗原刺激時の T 細胞の活性化を抑制的に制御する事が海外の多くの研究グループによる解析結果から示唆されているが、特異的刺激因子を含めその詳細は明らかにされていない。

2. 研究の目的

これまでに明らかにされていない DR6 に特異的に結合し、免疫制御能を有する刺激因子の単離・同定およびその機能解析を行う事により、DR6 を介した新たな免疫制御メカニズムを明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

cDNA 発現ライブラリーを用いた発現クローニング法を用いて DR6 特異的結合因子の探索を行う。更に、得られた候補因子に付いて、抗原提示依存性 T 細胞活性化における機能を解析する。

4. 研究成果

(1)DR6 特異的結合因子の単離

これまでの報告から、TNF 受容体ファミリー分子の細胞外領域とヒト IgG の Fc 領域との融合タンパク質は、その特異的刺激因子との結合親和性を有する事が知られている。そこで、定法に則り DR6 細胞外領域とヒト IgG の Fc 領域とを融合させた組み換えタンパク質 (DR6-Fc) を作製し、これを DR6 特異的刺激因子の検索用プローブとした。次に、種々の免疫細胞様培養細胞と DR6-Fc との結合特異性を Flowcytometry 法により解析し、DR6 特異的結合因子発現細胞の同定を行った。このうち、DR6-Fc 特異的結合能を有する培養細胞株から cDNA 発現ライブラリーを作製し、DR6-Fc 特異的結合能を認められなかった細胞株に形質導入した。得られた形質転換体における DR6-Fc 親和性クローンを複数回のセルソーターによる回収および拡大培養により陽性細胞群の濃縮を行い、ライブラリー特異的プライマーを用いた PCR 法により、挿入された遺伝子を単離し、DNA シーケンス解析により DR6 特異的結合因子候補として DR6L を単離した。

(2)DR6/DR6L 間の結合特異性

DR6 安定発現細胞の、DR6 を含む種々の TNF 受容体ファミリー分子の細胞外領域とヒト IgG の Fc 領域との融合タンパク質に対する結合親和性を Flowcytometry 法により評価したところ、DR6-Fc における検討においてのみ結合性が認められた事から、単離された DR6L は DR6 に対して特異的結合親和性を有する事が示された。

(3) ヒトあるいはマウス遺伝子背景における DR6/DR6L 間結合

DR6 あるいは DR6L のヒトあるいはマウスホモログを単離し、マウス/マウス、ヒト/ヒトあるいはヒト/マウス間結合性を前述の方法により評価したところ、いずれの組み合わせにおいても DR6/DR6L 間結合が確認されたことから、DR6/DR6L 間結合はヒトからマウスにいたる種を超えた保存性を有する事が明らかとなった。

(4) 抗原提示における DR6/DR6L 結合による T 細胞活性化への影響

第 1 項に示す通り、DR6 は抗原提示下における T 細胞の活性化に対して抑制的に働きかけることが示唆されている。そこで、OVA 抗原存在下における抗原提示能を有する A20 細胞と OVA 特異的 T 細胞受容体を発現する D011.10T 細胞ハイブリドーマとの共培養系により抗原提示依存性 T 細胞活性化における DR6L 発現の影響を観察した。その結果、抗原提示細胞としての A20 細胞におけるマウスあるいはヒト DR6L 発現は、D011.10T 細胞ハイブリドーマによる抗原依存的な IL2 産生を顕著に抑制する事が明らかとなった。この結果は、これまでの報告から類推される DR6 結合因子の機能的特徴である T 細胞活性化抑制能を DR6L が有する事を示す。更に、D011.10T 細胞ハイブリドーマにおける RNAi 法による DR6 特異的発現抑制により、前述の DR6L による IL2 産生抑制効果が解除された事から、抗原提示細胞上の DR6L による T 細胞活性化抑制は DR6 に依存する事が明らかとなった。以上の結果により、本研究により単離された DR6L はこれまで未知であった末梢 T 細胞活性化抑制における DR6 特異的結合因子であることが示され、DR6/DR6L 結合は新たな免疫制御薬剤の標的となる可能性が示唆された。

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 6 件)

1. Fukada K, Fujikura D, Nakayama Y, Kondoh M, Shimada T and Miyazaki T Enterococcus faecalis FK-23 affects alveolar-capillary permeability to attenuate leukocyte influx in lung after influenza virus infection.

Springerplus. 2013 Jun 20;2(1):269. Print
2013 Dec. 査読・有

2. **Fujikura D**, Chiba S, Muramatsu D, Kazumata M, Nakayama Y, Kawai T, Akira S, Kida H and Miyazaki T

Type-I interferon is critical for FasL expression on lung cells to determine the severity of influenza.

Plos one. 2013 ; 8(2) : e55321

doi: 10.1371/journal.pone.0055321.

査読・有

3. Muto NA, Sunden Y, Hattori T, **Fujikura D**, Nakayama Y, Miyazaki T, Maruyama M, Kimura T, Sawa H.

Pathological examination of lung tissues in influenza A virus-infected mice.

Jpn J Infect Dis. 2012 Sep;65(5):383-91.

査読・有

4. Muto NA, Yoshida R, Suzuki T, Kobayashi S, Ozaki H, **Fujikura D**, Manzoor R, Muramatsu M, Takada A, Kimura T and Sawa H.

Inhibitory effects of an M2-specific monoclonal antibody on different strains of influenza A virus.

Jpn J Vet Res. 2012 Aug;60(2-3):71-83.

査読・有

5. Kondoh M, Fukada K, **Fujikura D**, Shimada T, Suzuki Y, Iwai A, Miyazaki T.

Effect of Water-Soluble Fraction from Lysozyme-Treated *Enterococcus faecalis* FK-23 on Mortality Caused by Influenza A Virus in Mice.

Viral Immunol. 2012 Feb;25(1):86-90.

doi: 10.1089/vim.2011.0056.

査読・有

6. **Fujikura D**, Ito M, Chiba S, Harada T, Perez F, Reed JC, Uede T and Miyazaki T*
CLIPR-59 regulates TNF- α induced apoptosis by controlling ubiquitination of RIP1.

Cell death & Disease 2012 Feb 2;3:e264.

doi: 10.1038/cddis.2012.3.

査読・有

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 東 秀明, 大西なおみ, 武藤芽未, **藤倉大輔**, 五十嵐学

"De novo designed molecule to develop structure-based vaccine against Anthrax"

第60回毒素シンポジウム 2013年7月17-19日 (兵庫県)

2. Ohnishi N, Muto M, **Fujikura D**, Igarashi M, Higashi H.

"De novo designed molecule to develop structure-based vaccine against Anthrax"

The 12th Awaji International Forum on infection and Immunity 2013年9月10-13日 (兵庫県)

3. 武藤芽未, 大西なおみ, 五十嵐学, **藤倉大輔**, 東 秀明

"新規抗炭疽ワクチンの開発に向けた人工設計タンパク質の作出"

第7回細菌学若手コロッセウム 2013年8月7-9日 (広島県)

4. Ohnishi Naomi, Memi Muto, Manabu Igarashi, **Daisuke Fujikura**, Hideaki Higashi

"De novo designed molecule to develop structure-based vaccine against"

第86回日本細菌学会総会 2013年3月18-20日 (千葉県)

5. 大西なおみ, 武藤芽美, 五十嵐学, **藤倉大輔**, 東秀明

"炭疽菌毒素の分子立体構造情報に基づいたヒト炭疽予防法の開発"

第86回日本細菌学会総会 2013年3月18-20日 (千葉県)

6. 大西なおみ, 武藤芽美, 五十嵐学, **藤倉大輔**, 東 秀明

"De novo designed molecule to develop structure-based vaccine against Anthrax"

2013年度感染症若手フォーラム 2013年2月28日-3月2日 (北海道)

7. Naomi Ohnishi, **Daisuke Fujikura**, Memi Muto, Manabu Igarashi, Bernard M. Hang'ombe, Hirofumi Sawa and Hideaki Higashi

"Development of de novo designated molecular for structure-based Anthrax vaccine"

Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2013 2013年1月23-24日 (東京都)

8. Ohnishi N, **Fujikura D**, Igarashi M, Muto M, Ogawa H, Orba Y, Sawa H, Higashi H

"De novo designed molecule to develop structure-based vaccine against Anthrax"

The 11th Awaji International Forum on infection and Immunity 2012年9月11日-14日 (兵庫県)

9. 大西なおみ, **藤倉大輔**, 五十嵐学, 大場靖子, 澤洋文, 東 秀明

"炭疽菌毒素タンパク質の分子立体構造情報に基づいた新規炭疽予防法の開発"

感染症若手フォーラム, 2012年2月2日-4日 (長崎県)

〔図書〕(計 2 件)

1. **藤倉大輔**、伊藤誠敏、千葉聖子、上出利光、宮崎忠昭

【Best articles of the year】CLIPR-59 は RIP1 のユビキチン化抑制を介して TNF によるアポトーシスを誘導する。
北海道医学雑誌 2013 88(2・3) p.102 (北海道医学会)

2. **Fujikura D** and Miyazaki T
Caspase-8: Properties, Functions and Regulation
Advances in Genetics Research. 2012 Oct; 9: 135-141 (Nova publishers)

〔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

藤倉 大輔 (FUJIKURA DAISUKE)
北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・博士研究員
研究者番号：70547794