

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591419

研究課題名(和文) 自然免疫系細胞によるプロテアーゼ認識機構の解明

研究課題名(英文) The recognition and signaling pathway of cysteine protease activity in innate immune cells

研究代表者

肥田 重明 (HIDA, Shigeaki)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：10345762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：好塩基球は様々な分子を認識し、IL-4などのサイトカインを産生する。システインプロテアーゼであるパパインはTh2免疫応答を誘導する活性があるがその分子機構は不明である。FcR γ 欠損好塩基球では、パパイン依存的なIL-4産生が誘導されず、このシグナル経路には、FcR γ が関与している。パパインによって誘導されるmRNA遺伝子発現パターンは、IgE-Fc γ RI α 経路とは異なり、IFN-関連分子の発現が特異的に認められた。FcR γ は、IL-4産生のアダプター分子であるが、システインプロテアーゼには他の受容体経路が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Basophils have recently been recognized as an initiator of type 2 immune responses producing interleukin-4 (IL-4) in response to various stimuli. The cysteine protease papain was shown to induce production of IL-4 and other molecules in murine basophils. Papain has been shown to not only trigger IL-4 production but also activate antigen presentation machinery by basophils, thereby initiating Th2 responses. However, the papain receptor and the signaling pathway for IL-4 production induced by the protease remained unclear. Here we show that basophils lacking FcR γ failed to produce IL-4 in response to papain. Retroviral reconstitution experiments showed that the FcR γ -ITAM-Syk signaling pathway was essential in papain-induced IL-4 production. In addition, papain specifically induced the expression of IFN-related genes in bone marrow-derived basophils. These observations indicated that other receptors as well as FcR γ -associated molecules could potentially recognize the protease papain.

研究分野：免疫学

キーワード：シグナル伝達 好塩基球 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

生体外の多彩な抗原に対する的確な獲得免疫応答にはヘルパーT細胞のTh1/Th2/Th17のいずれかへの分化が重要である。その分化の方向性の決定には樹状細胞やマクロファージなどの自然免疫系細胞に発現する病原体センサーに依存したサイトカイン産生が重要な役割を担っている。寄生虫感染やアレルギー性疾患において重要な2型免疫応答に關与する自然免疫細胞集団として好塩基球や樹状細胞、そしてグループ2自然リンパ球(ILC2)など、多くの自然免疫系細胞の關与が報告されてきた。しかし2型免疫応答は、細菌感染などの1型免疫応答(細胞性免疫)に比べて、その解析は遅れている。Th2分化にはIL-4は重要であることは遺伝子欠損マウスでの解析からよく知られている事実であるが、その免疫応答初期のIL-4産生細胞については、未だ不明な点も多い。最近、注目されているILC2細胞群はIL-33、IL-25、TSLPなどのサイトカインに刺激され、IL-13やIL-5を大量に産生することは知られているがIL-4はほとんど産生しない。IL-4産生細胞として、これまでに候補に挙がっているのは、Th2細胞、NKT細胞、マスト細胞、好塩基球などがあり、その中で好塩基球は抗原提示細胞としても機能することが報告されたことから、注目されていた。しかし、その一方でin vivoにおける生理的な役割を明らかにするために、好塩基球を除去した場合のアレルギー反応やTh2分化誘導については様々な報告があり、好塩基球がアレルギーなどの刺激によってTh2分化を誘導する初期のIL-4産生細胞かどうかについては疑問が残っている。また、アレルギー性疾患や寄生虫感染など多彩な2型免疫応答において、好塩基球が単独で必須の役割を果たしているとは考えにくく、体内の多くの自然免疫細胞群との相互作用が重要であると考えられる。

2型免疫応答を惹起する抗原の一つとして、生体内外由来の種々のプロテアーゼなどの分子が關与している可能性が注目されている。寄生虫より分泌されるタンパクや植物の果実内部には多種類のプロテアーゼが存在している。これらの中にはヒトに対してアレルギーの一つとして作用する物質が存在する。さらに内在性のプロテアーゼは生理的活性物質として重要であるばかりでなく、その一方で、ネクロシスや炎症時には細胞外に放出され、2型免疫応答の調節に關与している可能性がある。また、生体内には抑制因子であるシスタチンCなどの内在性プロテアーゼ阻害物質も存在し、プロテアーゼとその阻害物質のバランスが免疫応答を制御し、慢性炎症や自己免疫反応の感受性を決める一つの要因となっていると考えられる。

自然免疫細胞の中でも好塩基球やマスト細胞は2型免疫応答に重要なエフェクター細胞としてサイトカインや化学伝達分子を

産生する細胞として認識されている。寄生虫が産生するプロテアーゼや植物由来のプロテアーゼに加えて、炎症や組織傷害時に放出される内因性プロテアーゼやATPなどの低分子によって惹起される炎症応答と2型免疫応答の解析を行うことは、アレルギーなどの慢性疾患の治療に貢献すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究代表者はこれまでIFN制御因子(IRF)ファミリーの免疫調節機構を解析しており、Th1/Th2免疫応答制御、NK細胞分化における機能を明らかにしてきた。特にIRF-2遺伝子欠損マウスで、好塩基球の異常増多に起因する2型免疫応答やTh2シフトについて解析した。この研究から好塩基球が2型免疫応答のIgE依存的なエフェクター細胞としての役割だけではなく、Th1/Th2バランスを監視するという重要な役割を担っていることが明らかになってきた。

アレルギーの一つである寄生虫や植物由来のプロテアーゼは、Th2応答を誘導する性質を持つと考えられるが、その分子機構は明確になっていない。最近、自然免疫系の細胞である好塩基球がシステインプロテアーゼであるパパインに反応してTh2免疫応答を惹起することが報告され(Sokol他、Nat. Immunol. 2008)、好塩基球にシステインプロテアーゼの病原体センサーが存在する可能性が示唆された。また、外来性システインプロテアーゼのみならず、内在性システインプロテアーゼとシスタチンなどの内在性阻害物質とのバランスが生体内の恒常性を決める要因として、免疫応答に影響する可能性がある。細胞性免疫に重要な1型免疫応答やTh1分化については、樹状細胞に発現するToll様受容体(TLR)やIL-12等のサイトカイン産生など自然免疫細胞を中心にした解析が進んでいるが、その一方でアレルギーや寄生虫に關与する2型免疫応答に重要なIL-4産生細胞や自然免疫細胞に発現するセンサー分子については未だに詳細な免疫制御機構は不明のままである。我々はこれまでにFcR欠損マウスの骨髓由来の培養好塩基球(BM-Bs)がパパインに反応しないことに注目し、FcR-Syk経路が重要であることを見出した。

本研究課題では2型免疫応答における好塩基球の役割を明らかにし、さらに好塩基球のIL-4産生に関する新たなFcR分子とサイトカイン受容体シグナル伝達のクロストークに關するこれまでの成果に基づいた新たなプロテアーゼセンサーの分子機構の解析を行う。これまで研究成果を更に発展させることによってシステインプロテアーゼ「センサー」の同定とそのシグナル伝達機構を解明し、抗原の質的特性による免疫応答の変化について新たな知見を得ることを目的とする。將

来的にはアレルゲンによる2型免疫応答の制御とその生理的意義を明らかにし、慢性炎症疾患などに対する新たな治療方針の開発に結びつける。

3. 研究の方法

自然免疫系細胞の一つである好塩基球にはプロテアーゼに応答するセンサー分子が存在し、2型免疫応答に重要なサイトカインや遺伝子発現を誘導する。マウス末梢血には、好塩基球は0.1%程度であり極めて少数しか存在しないため、骨髓細胞をIL-3で培養し、好塩基球を誘導した細胞(骨髓由来好塩基球:BM-Bs)を用いて一連の実験を行った。

(1)骨髓由来の培養好塩基球(BM-Bs)をIL-3で継続的に維持した状態を活性化好塩基球とし、逆にIL-3を枯渇させた好塩基球を休止状態の細胞として、パパインによる刺激を行いIL-4産生の変化を調べた。活性化好塩基球はIgE刺激によってIL-4,IL-6を産生するが、増殖は誘導されない。IL-3刺激では増殖は誘導されるがIL-4,IL-6を産生しない。一方、休止状態の好塩基球はIgEの刺激には殆ど応答せず、IL-3刺激によってのみIL-4,IL-6を産生するようになる。パパインがどちらのパターンでIL-4を産生するか調べた。

(2)これまでにレトロウイルスベクターを用いて培養好塩基球に種々の遺伝子を導入する系は確立している。FcR欠損好塩基球を用いて、FcR分子の野生型、点変異型分子を再構築し、パパイン受容体との結合に重要なドメインやアミノ酸配列を確認する。FcR分子は、細胞質内にITAM(immunoreceptor tyrosine - based activation motifs)と呼ばれるモチーフを持ち、この領域を介してSykが結合し、下流へのシグナル伝達が伝わる。これまでIgE-FcRIを介したFcR(ITAM)-Syk経路については、マスト細胞において検証されてきたが、好塩基球のパパイン受容体-FcR依存的なIL-4産生誘導についてITAM変異体やSykの変異体を発現させ、パパイン依存的なシグナル伝達経路がIgEと同様のFcRシグナル経路か、パパイン特異的なシグナル経路か確認した。

(3)パパインのシステインプロテアーゼ活性がシグナル伝達に必要などうか調べるために阻害剤を加えてIL-4産生について調べた。また好塩基球、リンパ球などの細胞表面上の分子がパパインによって切断されるかどうかについて、フローサイトメトリーを用いて経時的に確認した。

(4)好塩基球をパパインで刺激し、得られたtotal RNAを用いて、シグナル伝達分子や転

写因子など、サイトカイン発現に関連するmRNAの発現量を、定量的RCRを用いて解析し、サイトカイン産生に重要な分子の解析を行った。

4. 研究成果

(1)好塩基球では、IgE受容体(FcRI)刺激時、IL-4,IL-6,IL-13などの2型免疫サイトカインは、SykやMAPKを介して遺伝子の発現が誘導される。また、これらの遺伝子発現はIL-3による活性好塩基球でより顕著に促進された。システインプロテアーゼアレルゲンであるパパインにおいても、同様にIL-4,IL-6,IL-13産生が誘導され、さらにIL-3存在下で顕著に増多し、逆に休止好塩基球では微量のIL-4しか産生されなかった。これらの結果から、IgE-FcRIと同様のシグナル伝達経路が使用されていることが明らかになった。

(2)FcR欠損好塩基球を用いて、FcR分子の野生型を再構築したところ、パパインによるIL-4産生が回復した。また、FcRの21番目のロイシン点変異型分子を再構築した場合、FcRIなどの受容体の発現も、パパインによるIL-4産生も全く回復しなかった。これはパパイン受容体もFcRIなどの受容体と同様にFcRとの結合に21番目のロイシンが重要なアミノ酸であることを示している。また、逆にIL-3受容体-FcRとは異なる結合様式であることを示した結果である。シグナル伝達分子についても同様に調べたところ、FcRのITAMの変異体やSykの変異体をレトロウイルスベクターで発現させた場合も同様に、パパインによってIL-4は産生されなかった。これらの結果からパパインの受容体は、FcRIなどの受容体と類似の構造を持ち、同じシグナル伝達経路を使用している可能性が示唆された。

(3)システインプロテアーゼ阻害剤存在下で好塩基球を刺激した場合は、IL-4やIL-6産生は、完全に抑制されたことから、パパインに関しては、そのプロテアーゼ活性が必須の役割を果たしていると考えられる。リンパ球を用いた結果から、CD8aはパパイン感受性であることが明らかになった。そこでCD8a/FcRの融合タンパクを作成し、FcR欠損好塩基球に発現させた好塩基球をパパインで刺激したところ、興味深いことに微量であるがIL-4の発現が誘導され、この結果からもプロテアーゼによる受容体の切断が重要である可能性が示唆された。好塩基球やマスト細胞特異的な分子であるFcRIに注目したが、フローサイトメトリー解析やタンパク質プロットではパパインによる切断は確認できなかったことから、他のFcR結合分子の可能性が示唆された。プロテアーゼによる受容体の切断が、プロテアーゼによって生成され

たペプチドが受容体に結合するかについての分子機構については、不明な点もあり、質量分析も用いてさらに詳細な解析を行っている。

(4)遺伝子発現パターンを IgE の架橋とパパイニン刺激で比較したところ、IL-4 などのサイトカインは、両方の刺激で観察できた。しかしながらパパイニンでは IFN を含め IFN 関連分子の mRNA 発現が特異的に観察された。また、これらの遺伝子発現誘導にはプロテアーゼ活性や FcR 分子は必須ではなかった。病原体センサーの免疫アダプター分子である ASC などの関与について、shRNA や遺伝子欠損マウス由来好塩基球を用いた予備的な観察では、IL-4 産生は 60%程度に減弱した。これらの結果は、パパイニンには FcR 以外の受容体を介したシグナル伝達経路が重要であることを示している。IL-4 産生にのみ注目すると、タンパク合成阻害剤存在下でのパパイニン刺激でも、IL-4 mRNA の発現は減弱しないことから、タンパク合成を介した間接的な IL-4 産生誘導ではないことが示された。タンパク合成阻害剤存在下で好塩基球をパパイニンで刺激した場合は、逆に IL-4 mRNA 発現誘導は 8 倍以上増加した。この結果は FcR 依存的な IL-4 産生を抑制する分子が関与していることを示している。活性化好塩基球のマイクロアレイ解析では、シグナル伝達関連分子の発現に変化があった分子が多数得られ、その中で Bcl-6 は休止好塩基球で高発現しており、逆に SOCS1, Cish が活性化好塩基球で高発現していることが確認された。これらの遺伝子は IL-4 産生に關する FcR シグナルの抑制に關与している可能性があると考えられる。また、樹状細胞やマクロファージでは、パパイニン刺激によって、IFN 関連分子などの遺伝子発現は認められたが、IL-4 のサイトカイン産生は認められなかったことから、好塩基球特異的な分子機序であることが示唆された。寄生虫感染では、寄生虫由来のプロテアーゼが 2 型免疫応答の惹起に關与すると考えられている。FcR 遺伝子欠損マウスに、寄生虫 *Trichinella spiralis* を感染させたところ、所属リンパ節で IL-5 や IL-13 の減少は確認できたが、血清 IgE 量や筋肉シスト内の寄生虫数には変化はほとんど認められなかった。これらの結果から、寄生虫感染防御においては FcR のみではなく、種々の自然免疫細胞やセンサー分子が複合的に作用し、2 型免疫反応を制御していると考えられる。

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 5 件)

Zhang Y, Hashimoto S, Fujii C, Hida S,

Ito K, Matsumura T, Sakaizawa T, Morikawa M, Masuki S, Nose H, Higuchi K, Nakajima K, Taniguchi S; NF B2 gene as a novel candidate that epigenetically responds to interval walking training; *International Journal of Sports Medicine*. 2015 in press. DOI: 10.1055/s-0035-1547221(査読有)

Shimane T, Kobayashi H, Takeoka M, Kitazawa M, Matsumura T, Hida S, Xiao T, Koike T, Taniguchi S, Kurita H; Clinical significance of apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain in oral squamous cell carcinoma.; *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013, 115(6):799-809. DOI: 10.1016/j.oooo.2013.03.013(査読有)

Usui F, Shirasuna K, Kimura H, Tatsumi K, Kawashima A, Karasawa T, Hida S, Sagara J, Taniguchi S, Takahashi M; Critical role of caspase-1 in vascular inflammation and development of atherosclerosis in Western diet-fed apolipoprotein E-deficient mice.; *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 2013 425: 162-168 DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.07.058. (査読有)

Imamura T, Ishizuka O, Lei Z, Hida S, Sudha GS, Kato H, Nishizawa O; Bone marrow-derived cells implanted into radiation-injured urinary bladders reconstruct functional bladder tissues in rats.; *Tissue Eng. Part A*. 2012, 18: 1698-1709. DOI: 10.1089/ten.TEA.2012.0061. (査読有)

Notake T, Horisawa S, Sanjo H, Miyagawa S, Hida S, Taki S; Differential requirements for IFN regulatory factor-2 in generation of CD1d-independent T cells bearing NK cell receptors.; *J. Immunol*. 2012, 188: 4838-4845. DOI: 10.4049/jimmunol.1200210. (査読有)

[学会発表](計 13 件)

Taniguchi S, Shimatani Y, Matsumura T, Hida S, Okabe M, Mishima T, 固形がんの低酸素環境を標的とする抗がん活性物質の選択的/持続的産生, 化学療法基盤支援活動第 3 回シンポジウム, 平成 26 年 11 月 12 日, 名護市万国津梁館

藤井千文, 松村富雄, 肥田重明, 谷口俊一郎, ASC によるがん細胞転移能の制御機構の解析, 第 23 回日本がん転移学会学術集会・総会, 平成 26 年 7 月 10 日, 金沢市文化ホール

Fujii C, Matsumura T, Sakaizawa T, Hida S, Taniguchi S, The roles of ASC in cancer cell metastasis, 15th International Biennial Congress of the Metastasis Research Society, 平成 26 年 6 月 29 日, Heidelberg

松村富穂、藤井千文、谷口俊一郎、肥田重明, Actin binding protein fascin1 regulates innate immune responses in tumor cells, 日本免疫学会総会・学術集会, 平成 25 年 12 月 11 日, 千葉市幕張メッセ

藤井千文、松村富穂、伊藤賢祐、肥田重明、谷口俊一郎, がん細胞での ASC 発現低下は細胞運動能を亢進させる, 第 72 回日本癌学会学術総会, 平成 25 年 10 月 3 日, 横浜市パシフィコ横浜

伊藤賢祐、北沢将人、藤井千文、肥田重明、谷口俊一郎, 細胞間相互作用を介した ASC 依存的な腫瘍抑制機能, 第 72 回日本癌学会学術総会, 平成 25 年 10 月 3 日, 横浜市パシフィコ横浜

藤井千文、肥田重明、谷口俊一郎, ASC によるがん細胞運動制御機構の解析, 第 22 回日本がん転移学会学術集会・総会, 平成 25 年 7 月 11 日, 松本市ホテルブエナビスタ

肥田重明、藤井千文、北沢将人、松村富穂、岡田なぎさ、谷口俊一郎, ASC による生体の恒常性維持と腫瘍増殖抑制機構の解析, 第 22 回日本がん転移学会学術集会・総会, 平成 25 年 7 月 11 日, 松本ホテルブエナビスタ

松村富穂、藤井千文、肥田重明、谷口俊一郎, がん細胞における fascin1 の RIG-I シグナル抑制機構の解析, 第 22 回日本がん転移学会学術集会・総会, 平成 25 年 7 月 11 日, 松本ホテルブエナビスタ

藤井千文、松村富穂、伊藤賢祐、北沢将人、肥田重明、谷口俊一郎, がん細胞における ASC と細胞運動能の相関性の解析, 第 85 回日本生化学会大会, 平成 24 年 12 月 15 日, 福岡市福岡国際会議場

松村富穂、藤井千文、谷口俊一郎、肥田重明, Involvement of fascin in immune responses through inflammasome activation, 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会, 平成 24 年 12 月 6 日, 神戸市神戸国際会議場

伊藤賢祐、北沢将人、藤井千文、肥田重明、谷口俊一郎, がん細胞における ASC の新規腫瘍抑制機能, 第 71 回日本癌学会学術総会 平成 24 年 9 月 21 日, 札幌市ロイト

ン札幌

Chifumi Fujii, Shigeaki Hida, Masato Kitazawa, Kensuke Ito, and Shun'ichiro Taniguchi, Potential involvement of ASC in cancer progression and metastasis, 14th International Biennial Congress of the Metastasis Research Society, 平成 24 年 9 月 4 日, Brisbane

〔その他〕

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/department/doctor/grdkarei/i-bunshishuyo/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者

肥田 重明 (HIDA Shigeaki)
信州大学・学術研究院医学系・准教授
研究者番号: 10345762