

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860189

研究課題名(和文)多胞体膜リン脂質によるサイトカイン産生制御機構の解明

研究課題名(英文)The regulation of cytokine production by phospholipid on MVB

研究代表者

笹井 美和 (Sasai, Miwa)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：30631551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、リン脂質の合成に必須の酵素であるPIKfyveの特異的阻害剤を用いて、Toll様受容体を介したサイトカイン産生におけるリン脂質の役割について解析を行った。PIKfyveの特異的阻害剤を形質様樹状細胞に処理し、TLR9リガンドであるCpGで刺激を行った際のサイトカイン産生について解析を行った結果、PIKfyve特異的阻害剤は形質様樹状細胞においてI型インターフェロン産生と炎症性サイトカインであるIL-12p40の産生の両方を顕著に阻害するのに対して、骨髄系樹状細胞においては、I型インターフェロン産生のみを阻害し、炎症性サイトカイン産生は阻害されないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Recent studies indicate that signals from these TLRs bifurcate at the level of distinct endosomal compartments to mediate the induction of cytokine and type I interferon (IFN) genes. TLR9 mediates signals for cytokines from VAMP3+ endosome, and induces IFN genes from LAMP2+ endosome. Phosphoinositides mark distinct subcellular membranes and control membrane trafficking. However, their role in TLR trafficking and signaling remains unclear. Here, we examined the role of phosphatidylinositol 3P 5-kinase, PIKfyve, in TLR trafficking and signaling. We demonstrate that inhibition of PIKfyve activity preferentially blocks TLR9 signaling for type I IFN induction in pDCs. By confocal microscopy, we show that trafficking of both TLR9 and CpG to the LAMP1+ compartment is blocked by PIKfyve inhibitor treatment. These data indicate that PIKfyve provides critical phosphoinositides necessary for the formation of endosome from which TLR9 signals to induce type I IFNs.

研究分野：免疫学

キーワード：TLR IFN trafficking

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内小胞の輸送システムは、2013年のノーベル医学生理学の受賞に見られる様に、細胞レベルのみならず生体レベルでの恒常性維持においても非常に重要な機構です。また、生体レベルの恒常性維持という意味においては、免疫機構が非常に重要な役割を担っており、その破綻は自己免疫疾患という自らを攻撃する、難治性疾患を引き起こします。

免疫機構は自然免疫と獲得免疫の二つに大別され、それぞれの機構の重要性や詳細な分子メカニズムが解明されつつあり、疾患治療への応用など、様々な試みが現在行われています。申請者は、本研究を開始する前から病原体感染における生体防御機構について解析を進めており、病原体感染防御に重要な役割を担っている自然免疫系の受容体 - Toll様受容体 (TLRs) - を介したサイトカイン産生において、受容体の細胞内局在がサイトカイン産生と密接に関与している事を明らかにしました。その解析の中で、特定の細胞内小胞において限られたサイトカインの産生のみが誘導される事を見出し、細胞内小胞輸送とサイトカイン産生の密接な関与を示唆する結果を得ていましたが、具体的な制御機構は未解明のままでした。

## 2. 研究の目的

TLR familyの中でもTLR9は非メチル化CpGを認識して、炎症性サイトカインの産生を誘導すると同時に、形質様樹状細胞 (Plasmacytoid dendritic cells, pDCs) では非常に強いI型インターフェロン産生を誘導する事が知られています。申請者は先の研究で、CpG刺激によるTLR9を介したI型インターフェロンの産生には、TLR9がVAMP3陽性小胞からLAMP2陽性小胞へとAdaptor protein (AP)-3依存的に局在を変化させる事が必要である事を証明していましたが、なぜLAMP2陽性小胞への移動がI型インターフ

ェロンの産生に結びついているのか、詳細は不明のままでした。しかし、予備的な解析の結果、LAMP2陽性小胞膜上に濃縮して局在している事が知られているホスファチジルイノシトール-3,5-ビスリン酸 (Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate, PIP(3,5)P<sub>2</sub>) に下流シグナル伝達分子を人工的結合させたところ、AP-3非依存的にTLR9を介したI型インターフェロンの産生を誘導する事ができた事から、小胞膜上に局在するリン脂質、特にPIP(3,5)P<sub>2</sub>がTLR9を介したI型インターフェロン産生に関与している事が強く示唆されたため、その作用機序の解析を本研究の目的としました。

## 3. 研究の方法

I型インターフェロン産生特異的小胞にリン脂質成分の1つであるPIP(3,5)P<sub>2</sub>が関与している予備的結果を得ていた事から、まずPIP(3,5)P<sub>2</sub>の特異的合成酵素として報告されているPIKfyveに着目し、解析を行いました。リン脂質合成経路はホスファチジルイノシトール-3-リン酸を元に様々な酵素が関与する事により、種々のリン脂質が合成される事が知られていますが、PIP(3,5)P<sub>2</sub>の合成にはPIKfyveが唯一関与している事が報告されており、ごく最近PIKfyveに非常に特異性の高い阻害剤が合成されました (YM201636)。そこで本研究ではPIKfyve特異的阻害剤を用いて、TLR7/TLR9を介したサイトカイン産生 (特にI型インターフェロン産生)へのPIP(3,5)P<sub>2</sub>の関与について、マウス骨髄由来Flt3L誘導性形質様樹状細胞 (Flt3L-pDCs)を用いて、ELISA法ならびに定量的PCR法を用いて解析を行い、また、TLRの局在に関しては、マウスマクロファージ培養細胞であるRAW264.7細胞に、HAタグを付加またはGFPを融合させたTLR9を恒常的に発現させ、TLR9リガンドで刺激を行った際のTLR9の局在変化等について共焦点レーザー顕微鏡

を用いて解析を行いました。

#### 4. 研究成果

マウス骨髄細胞を Flt3L の存在下で培養する事により得た細胞を TLR9 リガンドである CpG-A で刺激をした際に産生される IFN-alpha ならびに IL-12p40 に対する PIKfyve 特異的阻害剤「YM201636」の影響について、ELISA 法を用いて解析を行った結果、CpG-A 刺激によって誘導される IFN-alpha の産生は YM201636 処理により顕著にその産生が抑制されていたのに対して、炎症性サイトカインである IL-12p40 ならびに TNF-alpha の産生量はどちらの刺激においても YM201636 処理の影響をほとんど受けませんでした。そこで、YM201636 によるサイトカイン産生量の減少が転写レベルでもなされているかを調べるため、Flt3L で培養した樹状細胞を CpG-A で刺激した際に誘導される IFN-alpha と IL-12p40 の mRNA 量について定量 PCR 法を用いて解析を行いました。その結果、YM201636 処理は mRNA レベルで CpG-A 刺激による IFN-alpha 産生を抑制している事が明らかとなり、IL-12p40 においては刺激後早期に誘導される mRNA は YM201636 により阻害されていたが、CpG 刺激 12 時間後においてはその mRNA 量は YM201636 未処理群と同レベルにまで回復していました。

先の研究で、TLR9 は pDCs で CpG 刺激を受けると VAMP3 陽性小胞か LAMP2 陽性小胞へと Adaptor protein (AP)-3 依存的に局在を変化させている事を申請者は明らかとしていましたが、Flt3L で培養した樹状細胞には pDCs の中に conventional dendritic cells (cDCs) も含まれており、IL-12p40 の産生は特にどちらの細胞からも強く産生され、mRNA 産生の回復は別の細胞の影響を受けている可能性があります。そこで、Flt3L で培養した細胞群での pDCs と cDCs

のシグナル機構を明確に把握するため、Flt3L 培養細胞を細胞表面マーカーによりセルソーターを用いて分離し、pDCs ならびに cDCs における YM201636 のサイトカイン産生への影響を検討しました。その結果、pDCs では YM201636 処理によって IFN-alpha ならびに IL-12p40 の産生の両方が阻害されていたのに対して、cDCs では IFN-alpha 産生のみ阻害されていた。AP-3 欠損マウス由来の Flt3L 培養細胞においても、pDCs と cDCs をセルソーターで分離し、CpG 刺激による IFN-alpha と IL-12p40 の産生について検討した結果、YM201636 処理とは異なり、AP-3 欠損マウス由来の pDCs と cDCs では IFN-alpha 産生のみが欠損しており、IL12-p40 の産生は影響を受けていませんでした。

また、TLR9 を介したシグナル伝達機構における PIKfyve の役割を解明するために、HA タグまたは GFP タグを付加した TLR9 を用いてその局在について検討した所、YM201636 処理を行うと TLR9 は I 型インターフェロン産生特異的小胞の指標と考えられる LAMP2 との共局在が激減し、また TLR9 と AP-3 の共局在も減少する結果が得られました。これらの結果から、AP-3 はどの細胞種であっても I 型インターフェロン産生に特異的に関与しているのに対して、リン脂質成分の 1 つである PIP(3, 5)P<sub>2</sub> は細胞種によって影響が異なっており、これはリン脂質成分の制御機構が細胞種によって異なり、この違いによっても産生されるサイトカインの量が制御されている可能性を暗示しています。

#### 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 5 件)

1. Lee Y, Sasai M, Ma JS, Sakaguchi N, Ohshima J, Bando H, Saitoh T, Akira S, Yamamoto M. 「p62 Plays a Specific Role in Interferon- $\gamma$ -Induced Presentation of a Toxoplasma Vacuolar Antigen」 Cell Rep. 査読有、13;13(2) 2015 :223-33. doi: 10.1016/j.celrep. 2015.09.005.
2. Ohshima J, Sasai M, Liu J, Yamashita K, Ma JS, Lee Y, Bando H, Howard JC, Ebisu S, Hayashi M, Takeda K, Standley DM, Frickel EM, Yamamoto M. 「RabGDI $\alpha$  is a negative regulator of interferon- $\gamma$ -inducible GTPase-dependent cell-autonomous immunity to Toxoplasma gondii.」 Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有、112(33) 2015 :E4581-90. doi: 10.1073/ pnas.1510031112.
3. Hayashi K\*, Sasai M\*, Iwasaki A. 「Toll-like receptor 9 trafficking and signaling for type I interferons requires PIKfyve activity」 Int Immunol 査読有、(9) 2015 :435-45. doi: 10.1093/intimm/dxv021. \*Contributed equality is work.
4. Ma JS\*, Sasai M\*, Ohshima J, Lee Y, Bando H, Takeda K, Yamamoto M. 「Selective and strain-specific NFAT4 activation by the Toxoplasma gondii polymorphic dense granule protein GRA6.」 J Exp Med. 査読有、211(10) 2014 :2013-32. doi: 10.1084/ jem.20131272. \*Contributed equality is work.
5. Ohshima J, Lee Y, Sasai M, Saitoh T, Su Ma J, Kamiyama N, Matsuura Y, Pann-Ghill S, Hayashi M, Ebisu S, Takeda K, Akira S, Yamamoto M. 「Role of mouse and human autophagy proteins in IFN- $\gamma$ -induced cell-autonomous responses against Toxoplasma gondii.」 J Immunol. 査読有、192(7) 2014 :3328-35. doi: 10.4049/jimmunol.1302822.
1. 山本雅裕、李英愛、笹井美和、馬知秀、伴戸博徳、坂口直哉「オートファジーアダプター分子p62はインターフェロン $\gamma$ 誘導性のトキソプラズマの寄生胞抗原の提示に特異的に関与する」第85回日本寄生虫学会大会 2016年3月19-20日 日本/宮崎
2. 伴戸寛徳、笹井美和、馬知秀、李英愛、坂口直哉、山本雅裕「ヒト細胞におけるIFN $\gamma$ 依存的な抗トキソプラズマ応答にはIDO2ではなくIDO1が重要な役割を果たす」第85回日本寄生虫学会大会 2016年3月19-20日 日本/宮崎
3. Youngae Lee, Miwa Sasai, Ji Su Ma, Naoya Sakaguchi, Jun Ohshima, Hironori Bando, Tatsuya Saitoh, Shizuo Akira, and Masahiro Yamamoto 「p62 plays a specific role in IFN-g-induced presentation of a Toxoplasma vacuolar antigen」 The 44th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology 2015年11月18-20日日本/札幌
4. 笹井美和、李英愛、MAJISU、山本雅裕、大嶋淳、竹田潔「RabGDI $\alpha$  is a negative regulator of interferon- $\gamma$ -inducible GTPase-dependent cell-autonomous immunity to Toxoplasma gondii」第44回日本免疫学会学術集会 2015年11月18-20日 日本/札幌
5. Youngae Lee, Miwa Sasai, Ji Su Ma, Naoya Sakaguchi, Jun Ohshima, Hironori Bando, Tatsuya Saitoh, Shizuo Akira, and Masahiro Yamamoto 「p62 plays a specific role in IFN-g-induced presentation of a Toxoplasma vacuolar antigen」 Forum Cheju17 2015年11月13-14日日本/大阪
6. Ji Su Ma, Miwa Sasai, Jun Ohshima, Youngae Lee, Hironori Bando, Kiyoshi Takeda, and Masahiro Yamamoto 「Selective and strain-specific NFAT4 activation by the Toxoplasma gondii polymorphic dense granule protein GRA6」 Forum Cheju17

- 2015年11月13-14日日本/大阪
7. 伴戸寛徳、笹井美、馬知秀、大嶋淳、李英愛、山本雅裕 「肝臓期マラリア原虫を標的とした新規抗マラリア薬の開発」第84回日本寄生虫学会大会 2015年3月21-22日 日本/東京
  8. 馬知秀、笹井美和、大嶋淳、李英愛、伴戸寛徳、竹田潔、山本雅裕 「トキソプラズマ原虫の多型濃縮顆粒タンパク質 GRA6による選択的 NFAT4 の活性化について」第84回日本寄生虫学会大会 2015年3月21-22日 日本/東京
  9. Miwa Sasai, Ji Su Ma, Jun Ohshima, Youngae Lee, Kiyoshi Takeda, Masahiro Yamamoto. 「Toxoplasma gondii GRA6 selectively activates NFAT4 to induce chemokine CXCL2 and CCL2」The 43th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology 2014年12月10-12日日本/京都
  10. Jun Ohshima, Miwa Sasai, Ji Su Ma, Youngae Lee, Kiyoshi Takeda, Masahiro Yamamoto. 「Role of mouse autophagy proteins in IFN- $\gamma$ -mediated cell-autonomous responses against Toxoplasma gondii.」The 43th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology 2014年12月10-12日日本/京都

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/lab/imp/ara/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

笹井 美和 (SASAI, Miwa)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号:30631551

### (2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし