

平成21年 5月 29日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590502

研究課題名（和文） 形質細胞様樹状細胞特異的膜分子 PDC-TREM の I 型 IFN 産生増幅機構の解明

研究課題名（英文） Mechanisms in the augmentation of type I interferon production by PDC-TREM, a novel plasmacytoid dendritic cell specific receptor

研究代表者

渡会 浩志（WATARAI HIROSHI）

独立行政法人理化学研究所・免疫制御研究グループ・上級研究員

研究者番号：70415339

研究成果の概要：申請者は、活性化 PDC 形質細胞様樹状細胞特異的膜分子である PDC-TREM を発見し、PDC-TREM が Toll 様受容体による核酸成分認識後の IFN 産生調節に重要な役割を担っていること、を明らかにした。PDC-TREM に対する特異的モノクローナル抗体を複数樹立することに成功し、抗体処理による I 型 IFN 産生の著しい産生抑制を見出した。一方、リガンドである Semaphorin を作用させることにより、PDC-TREM 依存的に I 型 IFN が産生されることも見出した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：形質細胞様樹状細胞、インターフェロン、生体防御、ウイルス、Toll 様受容体、プレキシシン、セマフォリン

1. 研究開始当初の背景

形質細胞様樹状細胞（Plasmacytoid Dendritic Cell、以下 PDC）は、I 型インターフェロン（IFN）を早期にかつ大量に産生する能力を有し、特に種々のウイルス感染に対する生体防御反応の発動に重要でその中心的な役割を担う細胞として位置づけられている（Liu Y. J., *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 275 (2005)）。PDC は核酸を認識するレセプタ

ーである TLR9 や TLR7 を発現し、各種のウイルス由来の核酸を認識することにより、自然免疫系を発動する。生体防御反応を考えた場合、感染時の少ない抗原認識情報を増幅することにより生体防御反応として成立させ、逆に過度の情報が伝えられた場合、例えば一度に大量のウイルスに罹患した場合や二次的に感染を起こした場合には、ショックを緩和するために抑制性のシグナルを入れる必要

があり、TLR からの活性化情報を fine tune することが自然免疫系成立に重要であると考えられる。しかし、その詳細な分子メカニズムは明らかでない。

2. 研究の目的

申請者は、樹状細胞の細胞膜を高純度に調製し、細胞表面上に局在する細胞膜蛋白質を網羅的に同定する蛋白化学的手法を確立し、

(Watarai H., *et al.*, *Proteomics* **5**, 4001 (2005))、蛋白質個々の発現量・細胞内局在・翻訳後修飾などを解析できる点で既存の遺伝子発現解析 (DNA マイクロアレイ、QPCR など) よりも優れた手法の確立に成功している。

本手法により申請者は活性化 PDC 特異的に発現が見られる新規膜分子 PDC-TREM の同定に成功した (Watarai H., *et al.*, *PNAS* 2008)。PDC-TREM に対する特異的モノクローナル抗体を樹立し、その発現様式について解析したところ、活性化 PDC 特異的に発現が見られる分子であること、抗体処理により TLR9 リガンドである CpG-A 刺激後の PDC からの IFN- α 産生を著しく抑制することから、PDC-TREM は TLR 刺激後の IFN 産生制御に寄与していることが示唆された。申請者は、PDC-TREM による PDC の IFN 産生制御機構の分子メカニズムを明らかにするために、①PDC-TREM レセプター複合体及びそのリガンドの同定、②アダプター分子の同定とシグナル伝達経路の解明、を明らかにすることを目的として以下に記す研究を実施した。

3. 研究の方法

PDC からの I 型 IFN 産生には TLR からの刺激が必須であるが、PDC が如何にして大量かつ迅速に I 型 IFN を産生できる能力を有するのかわからない点が多い。PDC-TREM は PDC の I 型 IFN 産生に関与する分子である可能性が極めて高い。これらのことから、本分子の I 型 IFN 産生機構への作用機序を以下の手法により詳細に解析する。

- ①PDC-TREM シグナル伝達経路の解明
- ②ウイルス感染に対する生体防御反応における PDC-TREM の役割の解明
- ③DC とエフェクター細胞との相互作用における PDC-TREM の役割の解明
- ④PDC-TREM ノックイン・ノックアウトマウスの作製と解析

4. 研究成果

PDC-TREM は細胞膜上で PlexinA1 と会合し DAP12 をアダプター分子としてシグナル

を伝えていること、PlexinA1 に対するリガンドとして知られる Sema6D が PDC-TREM レセプター複合体のリガンドとなり得ることを明らかとした。次に DAP12 を介した PDC-TREM 依存的な IFN 産生制御について明らかにするために、DAP12 ノックアウトマウス由来の PDC における IFN 産生について詳細に解析した。その結果、WT においては low dose の CpG 刺激時に Sema6D 依存的な IFN 産生増強が観察されるのに対して、DAP12 ノックアウト PDC においては、産生増強能力を失っていた。この結果は、PDC-TREM が TLR 認識後の IFN 産生増強に寄与していることを示唆している。

一方、high dose の CpG 刺激時には DAP12 ノックアウトにおいて WT に比して PDC からの IFN 産生が増強されるという知見 (Blasius, A.L., *et al.* *Blood* 2006) を鑑みると、TLR 刺激の強弱及び TLR 刺激後の時間に依存して DAP12 を介した fine tuning が行われているものと考えられる。

PDC-TREM は形質細胞様樹状細胞の I 型 IFN 産生増強に重要な分子であることが明らかとなった。今年度は研究実施計画に則り、下流のシグナル伝達分子と I 型 IFN 産生との関連について焦点をあてて詳細な検討を行い、Phosphoinositide 3-Kinase 並びに Extracellular signal-regulated kinase1/2 が PDC-TREM 依存的にリン酸化されることを見出し、さらに各々の特異的リン酸化阻害剤を作用させることにより、I 型 IFN 産生が抑制されることも見出した。

現在、PDC-TREM ノックイン・ノックアウトマウスの作製に成功し、生体内におけるウイルス感染に対する防御反応について、PDC-TREM の役割を詳細に解析している。

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 11 件)

- ① Tashiro T, Nakagawa R, Hirokawa T, Inoue S, Watarai H, Taniguchi M, Mori K. RCAI-56, a carbocyclic analogue of KRN7000: its synthesis and potent activity for natural killer (NK) T cell to preferentially produce interferon- γ . *Tetrahedron Lett.* 48:3343-3347 (2007). 査読有
- ② Hijikata A, Kitamura H, Kimura Y, Yokoyama R, Aiba Y, Bao Y, Fujita S, Hase K, Hori S, Ishii Y, Kanagawa O, Kawamoto H, Kawano K, Koseki H, Kubo M, Kurita-Miki A, Kurosaki T, Masuda K, Nakata M, Oboki K, Ohno

- H, Okamoto M, Okayama Y, O-Wang J, Saito H, Saito T, Sakuma M, Sato K, Sato K, Seino K, Setoguchi R, Tamura Y, Tanaka M, Taniguchi M, Taniuchi I, Teng A, Watanabe T, Watarai H, Yamasaki S, Ohara O. Construction of an open-access database that integrates cross-reference information from the transcriptome and proteome of immune cells. *Bioinformatics*. 23:2934-2941 (2007). 査読有
- ③ Shinohara H, Maeda S, Watarai H, Kurosaki T. IkappaB kinase beta-induced phosphorylation of CARMA1 contributes to CARMA1 Bcl10 MALT1 complex formation in B cells. *J Exp Med*. 204:3285-3293 (2007). 査読有
- ④ Watarai H, Nakagawa R, Omori-Miyake M, Dashtsoodol N, Taniguchi M. Methods for detection, isolation and culture of mouse and human invariant NKT cells. *Nat Protoc*. 3:70-78 (2008). 査読有
- ⑤ Watarai H, Sekine E, Inoue S, Nakagawa R, Kaisho T, Taniguchi M. PDC-TREM, a plasmacytoid dendritic cell-specific receptor, is responsible for augmented production of type I interferon. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:2993-2998 (2008). 査読有
- ⑥ Hossain MB, Hosokawa H, Hasegawa A, Watarai H, Taniguchi M, Yamashita M, Nakayama T. Lymphoid enhancer factor interacts with GATA-3 and controls its function in T helper type 2 cells. *Immunology*. 125: 377-386 (2008). 査読有
- ⑦ Tashiro T, Hongo N, Nakagawa R, Seino KI, Watarai H, Ishii Y, Taniguchi M, Mori K. RCI-17, 22, 24-26, 29, 31, 34-36, 38-40, and 88, the analogs of KRN7000 with a sulfonamide linkage: Their synthesis and bioactivity for mouse natural killer T cells to produce Th2-biased cytokines. *Bioorg Med Chem*. 16:8896-8906 (2008). 査読有
- ⑧ Tashiro T, Nakagawa R, Inoue S, Shiozaki M, Watarai H, Taniguchi M, Mori K. RCI-61, the 6'-methylated analog of KRN7000: its synthesis and potent activity for mouse lymphocytes to produce interferon- γ in vivo. *Tetrahedron Lett*. 49: 6827-6830 (2008). 査読有
- ⑨ Nyambayar D, Watarai H, Sakata S, Taniguchi M. Identification of CD4-CD8- double-negative natural killer T cell precursors in the thymus. *PLoS ONE* 3(11):e3688 査読有
- ⑩ Terashima A, Watarai H, Inoue S, Sekine E, Nakagawa R, Hase K, Iwamura C, Nakajima H, Nakayama T, Taniguchi M. A novel subset of mouse NKT cells bearing the IL-17 receptor B responds to IL-25 and contributes to airway hyperreactivity. *J Exp Med*. 205:2727-2733 (2008). 査読有
- ⑪ Watarai H, Rybouchkin A, Nagata Y, Nyambayar D, Hongo N, Sakata S, Sekine E, Kakimoto K, Fujii S, Shimizu K, Kawamoto H, Koseki H, Taniguchi M. Identification of progenitors differentiating into mature NKT cells in the culture of NKT cell cloned ES cells. *Blood* in press (2009). 査読有
- [学会発表] (計 5 件)
- ① Watarai H et al, A novel plasmacytoid dendritic cell-specific receptor, PDC-TREM, is responsible for augmented production of type I interferon. 第 37 回日本免疫学会総会、Dec 2007、大阪
- ② Watarai H et al, A novel plasmacytoid dendritic cell-specific receptor, PDC-TREM, is responsible for augmented production of type I interferon. *Keystone Symposia: Innate Immunity: Signaling Mechanisms*, Feb 2008, Keystone USA
- ③ Watarai H et al, A novel plasmacytoid dendritic cell-specific receptor, PDC-TREM, is responsible for augmented production of type I interferon. 10th International Symposium on Dendritic Cells, Oct 2008, 神戸
- ④ Watarai H et al, A novel plasmacytoid dendritic cell-specific receptor, PDC-TREM, is responsible for augmented production of type I interferon. 第 38 回日本免疫学会総会、Dec 2008、京都
- ⑤ Watarai H et al, A novel subset of mouse NKT cells bearing the IL-17 receptor B responds to IL-25 and contributes to airway hyperreactivity. *Keystone Symposia: Allergy and Asthma/Fibrosis*, Feb 2009, Keystone USA
- [図書] (計 3 件)

- ① 渡会浩志、オーム社、ウイルス感染を防御する α 型インターフェロン産生を増強するしくみ、*MedicalBio* 5:14-15 (2008).
- ② 渡会浩志、共立出版、田代卓哉、千葉朋希、谷口克、CD1dによる糖脂質抗原提示と免疫調節機構、蛋白質核酸酵素、53:1584-1589(2008).
- ③ 渡会浩志、日本農芸化学会、ウイルス感染に対する生体防御反応におけるPDC-TREMの役割:創薬ターゲットとしての可能性、化学と生物、46:750-752(2008).

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

名称: IL-17RB 陽性 NKT 細胞を用いたアレルギー性気道炎症及び/又は気道過敏症の治療薬のスクリーニング法

発明者: 渡会浩志他

権利者: 独立行政法人理化学研究所

番号: 2007-307981

出願年月日: 2007/11/28

国内外の別: 国内

名称: B 細胞由来 iPS 細胞およびそれ由来の B 細胞

発明者: 渡会浩志他

権利者: 独立行政法人理化学研究所

番号: 2008-227325

出願年月日: 2008/9/4

国内外の別: 国内

名称: NKT 細胞由来 iPS 細胞およびそれ由来の NKT 細胞

発明者: 渡会浩志他

権利者: 独立行政法人理化学研究所

番号: 2008-230932

出願年月日: 2008/9/4

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ

<http://web.rcai.riken.jp/en/labo/regulation/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡会 浩志 (WATARAI HIROSHI)

独立行政法人理化学研究所・免疫制御研究グループ・上級研究員