

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07605

研究課題名(和文)リン酸化プロテオーム解析による形質細胞様樹状細胞のIFN産生メカニズムの解明

研究課題名(英文) Phosphoproteomic analysis of IFN production mechanism by plasmacytoid dendritic cells

研究代表者

北脇 年雄 (Kitawaki, Toshio)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50378684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：形質細胞様樹状細胞(pDC)は大量のIFN- $\alpha$ を迅速に産生する特徴を持ち、生体防御や自己免疫疾患・炎症性疾患の病態形成に重要な役割を担っている。本研究ではpDCのIFN- $\alpha$ 産生の基盤となる分子機構を解明するため、我々が独自に樹立したpDC細胞株を用い、IFN- $\alpha$ 産生に抑制的及び非抑制的な2種類の阻害剤の存在下で定量的リン酸化プロテオーム解析を行うことによりpDCのIFN- $\alpha$ 産生に關与するリン酸化蛋白を効率よく同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

形質細胞様樹状細胞(pDC)は大量のIFN- $\alpha$ を迅速に産生し免疫反応の起点となる細胞で、生体防御や自己免疫疾患・炎症性疾患の病態形成に重要な役割を担っている。この研究ではこれまで困難であったpDCのプロテオーム解析の手法を確立することによって、pDCのIFN- $\alpha$ 産生に關与する未知の蛋白を同定した。今後、pDCを特異的に制御する治療を開発することによってワクチンや免疫疾患治療の開発に応用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) are characterized by their ability to rapidly produce large amounts of IFN- $\alpha$  and play an important role in biological defense and the pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases. In this study, to elucidate the molecular mechanisms underlying IFN- $\alpha$  production by pDCs, we used our originally established pDC cell lines and performed quantitative phosphoproteomic analysis under two inhibitors, which are either inhibitory or non-inhibitory for IFN- $\alpha$  production, thereby efficiently identifying phosphorylated proteins involved in IFN- $\alpha$  production in pDC.

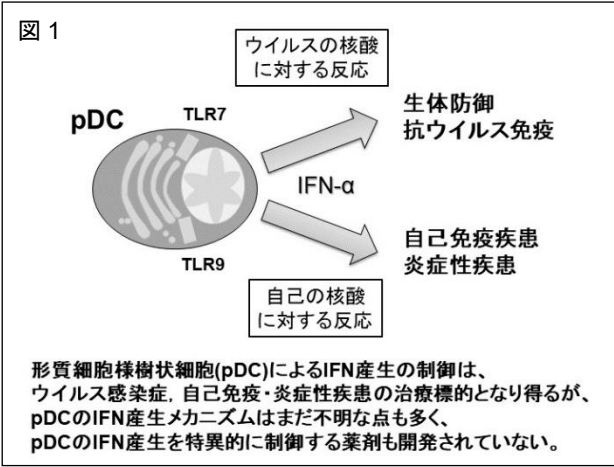
研究分野：免疫学

キーワード：形質細胞様樹状細胞 定量的リン酸化プロテオーム解析 インターフェロン・アルファ チロシンキナーゼ阻害剤 トル様受容体9

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid dendritic cell: pDC)は、ウイルスなどの核酸を Toll-like receptor (TLR) 7 および TLR9 を介して認識し、他の細胞の 1000 倍以上という大量の interferon  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) を迅速に産生することにより、生体防御において極めて重要な役割を果たす細胞である。その一方で、pDC は全身性エリテマトーデスや尋常性乾癬をはじめとする自己免疫疾患及び炎症性疾患において自己の核酸に異常に反応して IFN- $\alpha$  を産生し、病態形成に深く関与していることが報告されている。このような迅速かつ大量に IFN- $\alpha$  を分泌する機能は他の細胞には見られず、pDC 独自の機能であると考えられている。pDC の IFN- $\alpha$  産生に関わる分子機構を明らかにすることは、生体防御メカニズムや自己免疫疾患・炎症性疾患の病態を解明するとともに、これらの知見を基盤とした新規のワクチンや治療薬の開発につながる重要なテーマである。しかし、pDC の IFN- $\alpha$  産生メカニズムにはまだ不明な点が多く、pDC を特異的に制御する治療法は開発されていない (図 1)。



pDC の IFN- $\alpha$  産生は TLR7 または TLR9 の下流で起こることから、TLR7/9 下流のシグナル経路の解析が pDC の IFN- $\alpha$  産生メカニズムを解明する上で重要である。pDC における TLR9 シグナルについては、さまざまなグループの研究により以下のことが知られていた。

TLR9 は、病原体由来 DNA に含まれる非メチル化 CpG モチーフを持つ DNA (CpG DNA) をリガンドとして活性化する。CpG DNA には、IFN- $\alpha$  産生を強力に誘導するクラス A、炎症性サイトカインを強力に誘導するクラス B、およびクラス A とクラス B の性質を併せ持つクラス C の 3 種類がある。

TLR9 は、CpG DNA と結合するとエンドサイトーシスによりエンドソームに取り込まれ、エンドソームを起点として下流のシグナル経路を活性化させる。エンドソームは取り込まれた直後の早期エンドソームから次第に内腔の状態を変化させ、後期エンドソームへと成熟する。エンドソームを起点とする TLR9 シグナルは早期エンドソームと後期エンドソームでは異なり、早期エンドソームでは MyD88-TRAF3- $\text{IKK}\alpha$ -IRF7 (IRF7 経路) を介して IFN- $\alpha$  産生が誘導される一方で、後期エンドソームでは MyD88-TRAF6-NF- $\kappa$ B-IRF5 (IRF5 経路) を介して炎症性サイトカインが誘導される。

クラス A とクラス B の CpG DNA では、pDC のエンドソーム内での動態が異なる。すなわち、クラス A CpG DNA は pDC のエンドソーム内に取り込まれた後、早期エンドソームに長時間滞留する一方で、クラス B はすぐに後期エンドソームに移行する。この動態の違いの結果、クラス A CpG DNA は早期エンドソームを起点とする IRF7 経路を長時間活性化し大量の IFN- $\alpha$  産生を誘導する一方、クラス B CpG DNA は、IRF7 経路はほとんど活性化せず、後期エンドソームで IRF5 経路を活性化して炎症性サイトカインを誘導する (Nature. 434: 1035-40, 2005.)。このようにして、クラス A とクラス B の CpG DNA は pDC から異なる種類のサイトカインの産生を誘導する。

以上のようにクラス A CpG DNA が早期エンドソームに長時間滞留することより IFN- $\alpha$  が大量に産生されることから、この機序を解明することが pDC による大量の IFN- $\alpha$  産生機序を解明するために重要である。クラス A CpG DNA の早期エンドソーム長時間滞留には、これを誘導する何らかのシグナルが働いていることが考えられる。我々はこれまでの研究で、Src/ABL チロシンキナーゼ阻害薬であるダサチニブが pDC における CpG DNA の早期エンドソーム長時間滞留を阻害し、pDC の IFN- $\alpha$  産生を強力に阻害することを見出した (Fujita H, Kitawaki T, et al. Eur J Immunol 2013;43:93-103)。すなわち、TLR9 下流には、MyD88 をアダプター分子とするシグナル経路以外にチロシンキナーゼのシグナル経路が存在し、CpG DNA の早期エンドソーム長時間滞留を誘導していることが考えられた。しかし、ダサチニブが広範囲のオフターゲット効果を持ち、多種のキナーゼを阻害する薬剤であることから、どのキナーゼの阻害が長時間滞留の阻害に重要であるかが不明であった。

近年著しく進歩した定量的リン酸化プロテオーム解析は、細胞内のリン酸化タンパクの状態を網羅的に定量することができる優れた手法である。キナーゼの標的基質を漏れなく解析し、細胞内シグナル伝達経路の解明に役立つことから、pDC の IFN- $\alpha$  産生に必須のシグナル伝達経路を同定するのにも有用である。しかし、定量的リン酸化プロテオーム解析を

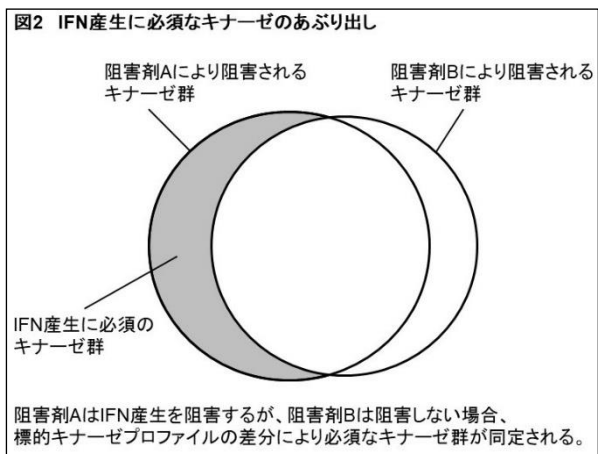
行うには大量の細胞が必要であることから、生体内で末梢血単核球の1%以下しか存在しないpDCを用いて定量的リン酸化プロテオーム解析を行うことは極めて困難であった。我々は、pDC由来の白血病を発症した患者の白血病細胞から、ヒトプライマリ細胞と同等のIFN- $\alpha$ 産生能を持ち、pDCに特異的なIFN- $\alpha$ 産生機序を保持していると考えられる細胞株を独自に樹立することに成功した。この細胞株を用いて定量的リン酸化プロテオーム解析を行うことにより、pDCにおけるIFN- $\alpha$ 産生に必須のシグナル伝達経路を同定することが期待された。

## 2. 研究の目的

pDCによる大量のIFN- $\alpha$ 産生に関わる分子機構を明らかにすることは、生体防御メカニズムや自己免疫疾患・炎症性疾患の病態を解明するとともに、これらの知見を基盤とした新規のワクチンや治療薬の開発につながる重要なテーマである。本研究では、Src/ABLチロシンキナーゼ阻害薬であるダサチニブがpDCのIFN- $\alpha$ 産生を強力に阻害することに基づき、ダサチニブが阻害する多種のキナーゼのうち、どのキナーゼの阻害がpDCによるIFN- $\alpha$ 産生の阻害に必須であるかを、我々が独自に樹立したpDC細胞株を用いた定量的リン酸化プロテオーム解析により明らかし、それに基づいてpDCを特異的に制御する標的分子を同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

pDCのIFN- $\alpha$ 産生において重要な役割を果たすキナーゼを同定するため、我々が独自に樹立したpDC細胞株を用いて定量的リン酸化プロテオーム解析を行った。定量的リン酸化プロテオーム解析はiTRAQ法を用いた。この解析手法は、細胞内のタンパク質全体のリン酸化をバイアスなく網羅的に解析することができ、未知のシグナル伝達系の同定に有用である。ただし、単純にリン酸化プロテオーム解析を行うだけではどのシグナル伝達系が重要か分からないため、本研究では次のような戦略をとった。すなわち、pDCのIFN- $\alpha$ 産生を抑制する阻害剤と抑制しない阻害剤のそれぞれを用いてリン酸化プロテオーム解析を行い、両者の阻害剤が抑制するシグナル伝達系の差分を解析することにより、pDCのIFN- $\alpha$ 産生に重要なシグナル伝達系を効率的にあぶり出すこととした(図2)。



この戦略においては、組み合わせる阻害剤の標的プロファイルが類似している方が、差分として抽出されるキナーゼの範囲が狭まり、効果的に重要なシグナル伝達系を同定できることになる。我々はそれぞれの阻害剤が抑制するキナーゼの標的プロファイルは類似するがpDCのIFN- $\alpha$ 産生に対する作用は対照的で、一方は抑制活性を持つが一方は抑制活性を持たない阻害剤の組み合わせを見つけ出すため、多種類の阻害剤を用いてpDCのIFN- $\alpha$ 産生に対する阻害作用を検討した。

上記の方法で選択した2種類の阻害剤の存在下においてリン酸化シグナルの変動を定量的リン酸化プロテオーム解析により網羅的に測定し、阻害剤により異なるリン酸化シグナルの変動パターンを示す蛋白を抽出した。このようにして絞り込まれた候補の蛋白についてshRNAを用いたノックダウン実験を行い、その蛋白がpDCによるIFN- $\alpha$ 産生に必須の役割を果たしているかを確認した。

## 4. 研究成果

我々の樹立したpDC細胞株は既報のpDC細胞株と比較し、より高いIFN- $\alpha$ 産生能を示した。(表1)

定量的リン酸化プロテオーム解析で比較する阻害剤

のペアを検討するため、本細胞株を用い、クラスA CpG DNA刺激によるIFN- $\alpha$ 産生を阻害する阻害剤について多数の阻害剤を用いて検討した。その結果、慢性骨髄性白血病の治療に用いられるABLチロシンキナーゼ阻害薬イマチニブ、ニロチニブ、ダサチニブ、ボスチニブのうち、ダサチニブはpDCのIFN- $\alpha$ 産生を強力に阻害するが、その他の阻害薬はpDCのIFN- $\alpha$ 産生を阻害しないことを見出した。これらのうち、特にダサチニブとボスチニブはキナーゼの阻害プロファイルが類似していることから、比較する阻害剤のペアとして適していると判断し、定量的リン酸化プロテオーム解析で用いることとした。

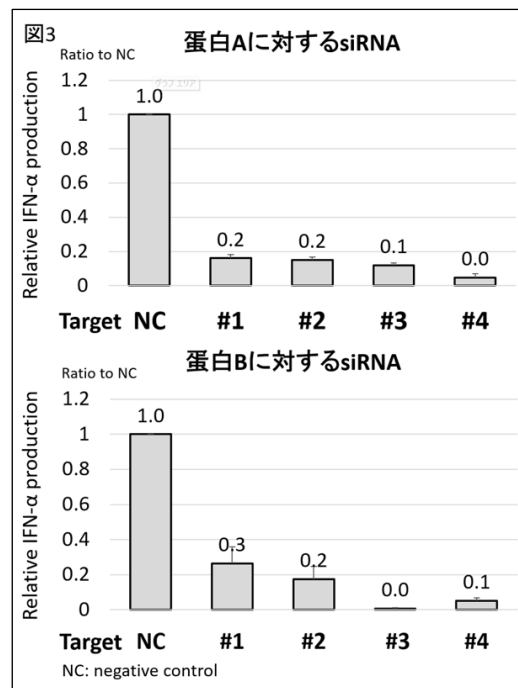
表1 pDC細胞株によるIFN- $\alpha$ 産生

	他グループのpDC細胞株			当細胞株
	CAL-1	GEN2.2	PMDC05	
IFN- $\alpha$ 産生量	15 pg/mL	1800 IU/mL	10 pg/mL	> 50,000 pg/mL

刺激時間や阻害剤の至適濃度など詳細な条件を検討した後、pDC 細胞株を用いた定量的リン酸化プロテオーム解析を行った。定量的リン酸化プロテオーム解析では、合計 3,313 種類のリン酸化ペプチドが同定された。これらのうちダサチニブではリン酸化が抑制されるがボスチニブでは抑制されないペプチドとして 39 種類のペプチドを同定した。これらのペプチドには、エンドサイトーシスや細胞内輸送に関わる蛋白、mTOR 経路や NF- $\kappa$ B 経路の制御に関わる蛋白、オートファジーの制御に関わる蛋白などに由来するものが濃縮されていた。

これらの蛋白のうち pDC における発現量が多く、他臓器の細胞での発現量が少ないものを抽出し、そのなかから特にアクチン重合に関わる蛋白 A 及びオートファジーの制御に関わる蛋白 B を標的分子の候補として選択した。これらの蛋白が pDC の IFN- $\alpha$  産生に関与しているかを確認するため siRNA を用いたノックダウン実験を行ったところ、これらの蛋白をコードする mRNA のノックダウンによりクラス A CpG DNA 刺激下の pDC による IFN- $\alpha$  産生が強く阻害された (図 3)。

以上のように、本研究では 2 種類の阻害剤を用いて定量的リン酸化プロテオーム解析を行い、その結果の差分を取ることで、pDC における IFN- $\alpha$  産生に関与する新規分子を同定することができた。今後、これらの分子がどのようなメカニズムで CpG DNA を取り込んだエンドソームの動態制御に関与しているかを解析し、pDC を特異的に制御する治療の開発を目指す。



これらの分子がどのようなメカニズムで CpG DNA を取り込んだエンドソームの動態制御に関与しているかを解析し、pDC を特異的に制御する治療の開発を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------