

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790535

研究課題名(和文) 形質細胞様樹状細胞のエンドソーム時空間的制御に関する新規分子の網羅的探索と同定

研究課題名(英文) Comprehensive screening and identification of novel molecules involved in the spatio-temporal regulation of endosomes in plasmacytoid dendritic cells

研究代表者

北脇 年雄 (Kitawaki, Toshio)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・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、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：形質細胞様樹状細胞(pDC)は、核酸に反応してI型インターフェロン(IFN)を迅速かつ大量に産生する免疫細胞であり、病原体由来の核酸に反応してI型IFNを産生した場合は生体防御に重要な役割を果たす一方で、自己細胞由来の核酸に異常に反応した場合は全身性エリテマトーデスや尋常性乾癬などの免疫疾患の病態形成に関与する。本研究では我々が樹立したヒトpDCの細胞株を用い、二重レポーターシステムによってエンドソームの活性化動態を可視化することによりpDCのI型IFN産生メカニズムを明らかにすることを目的に研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Plasmacytoid dendritic cells (pDC) rapidly produce vast amounts of type I interferon in response to nucleic acids. They play an important role in host defense by responding to pathogen-derived nucleic acids. However, they are also involved in the pathogenesis of immune disorders by responding to self-cell-derived nucleic acids. In this project, we performed our research to clarify mechanisms of type I interferon production by pDC, using a human pDC cell line established in our laboratory, by introducing a dual reporter system that visualize activation dynamics of endosomes.

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：自然免疫 形質細胞様樹状細胞 I型インターフェロン 二重レポーターシステム エンドソーム

## 1. 研究開始当初の背景

形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell: pDC) は、病原微生物由来の核酸を Toll 様受容体 (Toll-like receptor: TLR) 7, および TLR9 を介して認識し、大量の IFN- $\gamma$  を産生することにより生体制御に重要な役割を果たしている。しかし、pDC は自己由来の核酸によっても活性化し、全身性エリテマトーデスや尋常性乾癬などの免疫疾患を引き起こす。このような自己由来の核酸への異常な免疫反応を防ぐため、pDC の IFN- $\gamma$  産生は複雑なメカニズムにより厳密に制御されている。このメカニズムを明らかにすることは、pDC による生体防御機構、および免疫疾患の病態を解明し、感染症や免疫疾患の治療標的を同定するために重要である。

形質細胞様樹状細胞による IFN- $\gamma$  産生の誘導刺激として TLR9 リガンドである非メチル化 CpG モチーフを含む DNA (CpG DNA) が重要である。CpG DNA には 2 つのタイプがあり、pDC から大量の IFN- $\gamma$  産生を誘導する CpG-A と、IFN- $\gamma$  の産生は誘導しないが、TNF- $\alpha$  の産生や pDC の成熟を誘導する CpG-B がある。

研究開始時には次のことが明らかになっていた。

(1) CpG-A はエンドサイトーシスにより pDC に取り込まれた後、初期エンドソームに長時間滞留し、そこで転写因子 IRF7 を持続的に活性化する。IRF7 の持続的活性化が大量の IFN- $\gamma$  産生誘導に必須である。

(2) CpG-B は pDC に取り込まれた後、後期エンドソームまで速やかに移動し、そこで NF- $\kappa$ B を活性化する。

(3) CpG-A と CpG-B によるエンドソーム輸送の違いは、これらの CpG DNA の立体構造に依存する。すなわち、CpG-A が凝集体を形成するのに対し、CpG-B がモノマーとして存在するという立体構造の違いが、エンドソームの動態を規定する (Nature 434: 1035, 2005)。

## 2. 研究の目的

以上のように、CpG DNA の立体構造によって CpG DNA をエンドサイトーシスにより取り込んだ後の pDC 内におけるエンドソームの動態が異なり、大量の IFN- $\gamma$  産生という pDC に特異的な機能が規定される。このようなエンドソーム制御は他の樹状細胞では見られないことから、pDC に特異的な分子メカニズムの存在が考えられる。しかし、この pDC における CpG DNA 立体構造識別の分子メカニズムは不明であり、pDC の機能解析において注目される最大の謎の 1 つである。本研究は、このメカニズムに関与する未知の分子を、以下に記す方法で網羅的に探索・同定し、このメカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験に用いる細胞

ヒトとマウスでは TLR9 の免疫細胞における発現分布が異なるなど、IFN- $\gamma$  産生の分子メ

カニズムに相違のあることが想定される。したがって、臨床応用への発展を考慮すると、ヒトの細胞を使った研究が重要である。ヒトにおいて、pDC が末梢白血球中に占める割合は 0.5% 前後と非常に低く、分子生物学的な解析のために必要な細胞数の pDC を入手するのが困難である。我々はこの点を克服するため、芽球形形質細胞様樹状細胞腫瘍患者の腫瘍細胞からヒト pDC 由来の細胞株の樹立を試み、ヒト pDC 細胞株を独自に樹立することに成功した。この細胞株は高レベルの IFN- $\gamma$  産生能を有しており、正常の pDC が持つ IFN- $\gamma$  産生メカニズムを保持しているものと考えられる。この細胞を用いて以下の実験系の構築を試みた。

### (2) 二重レポーターシステムの作製

形質細胞様樹状細胞の TLR9 シグナル経路の下流には、初期エンドソームを起点とする IRF7 経路と、後期エンドソームを起点とする NF- $\kappa$ B 経路の 2 つの異なるシグナル経路が存在する。この 2 つのシグナル経路の活性化の状態を、フローサイトメトリーを用いて簡単に検出することができるようにするため、2 つの異なる蛍光色素蛋白 (EGFP, DsRed) をそれぞれレポーター遺伝子とする NF- $\kappa$ B および IRF7 のレポーターシステムを作製し、我々の樹立したヒト pDC 細胞株に、2 つのレポーターシステムを二重に導入すること試みた。

このようにして二重レポーターシステムを導入した pDC 細胞株は、IRF7 経路、NF- $\kappa$ B 経路の活性化状態を、それぞれの色素の蛍光強度として同時に検出できることにより、両方の経路が活性化している細胞と、どちらか一方のみが活性化している細胞をフローサイトメトリーにて解析し、さらにセルソーターを用いて分取することができる。

### (3) レトロウイルス挿入変異による遺伝子変異の導入と変異細胞クローンの作製

上記のようにして作製した二重レポーターシステム導入 pDC 細胞株にレトロウイルス挿入変異により遺伝子変異を導入した後、CpG DNA の刺激下で、レポーター遺伝子の発現の差を指標に TLR9 シグナル経路の活性化様式に異常がある細胞をセルソーターにて分離し、変異細胞のクローンを作製する。これらの変異細胞クローンには、TLR9 シグナルに関与する遺伝子に変異が入っていることが想定される。特に CpG-A 刺激により NF- $\kappa$ B 経路の活性化は見られるが、IRF7 経路の活性化が見られない変異細胞クローンにおいては、CpG-A の初期エンドソームへの滞留が障害されていることが想定され、CpG-A と CpG-B の立体構造の違いの認識に関与している遺伝子に変異が入っている可能性がある。このような変異細胞クローンを特に重点的に解析する。

### (4) 変異クローンにおける TLR9 シグナル異常の責任遺伝子の同定

上記のように作製した変異細胞クローンにおいて TLR9 シグナル異常の原因となっている責任遺伝子をレトロウイルスの挿入部位を指標にして同定する。以上のような方法によってヒト pDC において TLR9 シグナルに關与する遺伝子をゲノムワイドに網羅的に探索し、同定することができると期待される。

(5) 上記の計画が順調に進まなかったときの代替案

上記の研究計画において計画遂行の障害となる可能性があるステップは、IRF7 のレポーターシステムの作製のステップである。NF- $\kappa$ B のレポーターシステムはすでに報告があるが、IRF7 のレポーターシステムについてはまだ報告がない。そのため、IRF7 のレポーターシステムの作製が上手く行かず、計画遂行の支障となる可能性が想定された。

そのような状況になったときの代替案として、我々が樹立したヒト pDC 細胞株の継代培養中に作製することができた IFN- $\alpha$  産生能を持たないサブクローンを利用し、IFN- $\alpha$  産生能を持つ親クローンとの遺伝子発現の差を、DNA マイクロアレイを用いて比較し、さらにパスウェイ解析などを行うことにより、ヒト pDC において TLR9 シグナルに關与している未知のシグナル経路を探索することを計画した。

#### 4. 研究成果

(1) ヒト pDC 細胞株の培養条件の設定

我々は、芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍患者の腫瘍細胞より、非常に高い IFN- $\alpha$  産生能を有するヒト pDC 由来の細胞株を樹立することに成功し、この細胞株を P716 と命名した。ヒト pDC 由来の細胞株は、これまでいくつかの細胞株が報告されているが、いずれも IFN- $\alpha$  産生能が低く、IFN- $\alpha$  産生機構を構成している分子に何らかの異常を来していることが想定される。我々が樹立したヒト pDC 細胞株である P716 は大量の IFN- $\alpha$  を産生することから、正常の IFN- $\alpha$  産生機構を保持していると想定され、ヒト pDC による IFN- $\alpha$  産生機構の解析に用いるのに適している。ただし、この P716 は継代培養を繰り返す間に IFN- $\alpha$  産生能を徐々に失っていくことが明らかになった。そのため、我々は IFN- $\alpha$  産生能を保持できるような培養条件を検討し、ストローマ細胞 MS-5 との共培養により高レベルの IFN- $\alpha$  産生能を保持し、また、一度失った IFN- $\alpha$  産生能も回復させられることを見出した。(図 1)

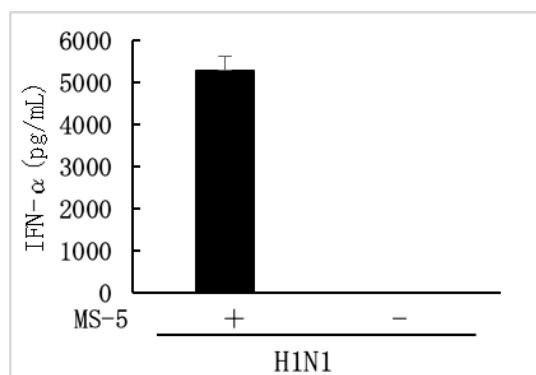


図 1 ストローマ細胞 MS-5 の存在、および非存在下におけるヒトインフルエンザ H1N1 刺激による P716 からの IFN- $\alpha$  産生

(2) 二重レポーターシステムの作製

NF- $\kappa$ B 結合配列を EGFP レポーターベクターに組み込むことにより、EGFP をレポーター遺伝子とする NF- $\kappa$ B レポーターシステムを作製し、エレクトロポレーション法によってヒト pDC 細胞株 P716 に安定導入することに成功した。(図 2)

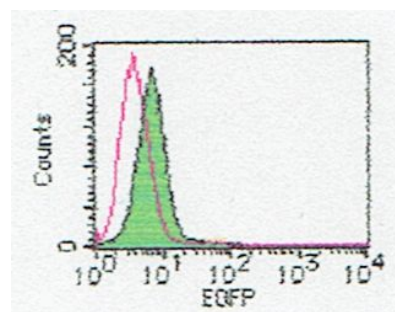


図 2 NF- $\kappa$ B レポーターシステムを安定導入した P716 における ODN2006 刺激による EGFP の発現(緑のヒストグラム)。赤線は無刺激のコントロールを示す。

さらに DsRed をレポーター遺伝子とする IRF7 レポーターシステムの構築を目指し、IRF7 結合領域の存在する IFN- $\alpha$ 7 遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、DsRed ベクターに組み込むことを行った。しかし、数種類のベクターを使用してクローニングを繰り返し、試行錯誤を行ったが、DsRed の十分な発現量を得ることが非常に困難で、計画していた、あとの実験ステップに有用な IRF7 のレポーターシステムを構築することに期間内には成功しなかった。

(3) DNA マイクロアレイによる pDC における TLR9 シグナル経路の解析

以上のように二重レポーターシステムの作製が困難であったことから研究計画の代替案を採用した。すなわち、継代培養中に作製された IFN- $\alpha$  産生を失った P716 と、IFN- $\alpha$  産生能を保持している元の P716 を用

い,TLR9 シグナル刺激後の遺伝子発現を, DNA  
マイクロアレイ法を用いて調べた。

また,これらの P716 のサブクローン間では継代培養中にエピジェネティックな変化が起こっている可能性もあることから,ゲノムワイドの DNA メチル化解析も併用して解析を行った。現在これらの手法により得られたデータを解析しているところであり,今後,これらの解析で得られたデータを元にパスウェイ解析を行って,TLR9 シグナルに關与している候補遺伝子を絞り込み,各分子の機能的な解析を行っていく予定である。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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〕

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

北脇 年雄 (KITAWAKI, Toshio)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号 : 5 0 3 7 8 6 8 4

##### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号 :

##### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号 :