

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870401

研究課題名(和文) コレラ毒素の免疫アジュバント作用に関する分子機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of cholera toxin-induced immune adjuvant effect

研究代表者

佐々木 泉 (Sasaki, Izumi)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・助教

研究者番号：80611037

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)：コレラ毒素(CT)は粘膜系の免疫アジュバントであり、経口投与によりIgA産生誘導やTh2免疫応答を誘導する。しかし、その作用機序は不明である。我々は、CTで刺激した細胞においてアルギナーゼ-1(Arg1)の遺伝子発現が顕著に誘導されることを見出し、これをもとにCTの免疫アジュバント作用に関する分子機序の解明を試みた。まず、CTの新規機能分子を探索し、PKAを含む幾つかの機能分子候補を選別した。そして、PKAやArg1が、CTとLPSによるIL-1産生誘導に、転写後レベルで関与することが明らかとなった。今後もCTによる免疫アジュバント作用の新規分子機序の解明を進める。

研究成果の概要(英文)：Cholera toxin (CT) is well known as a strong mucosal adjuvant, which can induce IgA production and Th2 responses. However, the molecular basis how CT works as an immune adjuvant remains unknown. We have previously found that arginase 1 (Arg1) gene expression was strongly induced in CT-stimulated cells. Based on this phenomenon, we tried to clarify an elucidation of molecular mechanism of CT-induced immune adjuvant effect. First, we have performed screening of novel signaling molecules, which was involved in CT-induced immune adjuvant effect. Then, we have identified several molecules including PKA. Furthermore, we have clarified that PKA and Arg1 were involved in CT plus LPS-induced synergistic IL-1 production at the post-transcriptional levels. We plan to further clarify the molecular mechanisms of CT-induced immune adjuvant effect.

研究分野：医歯薬学

キーワード：コレラ毒素

1. 研究開始当初の背景

コレラ毒素 (Cholera toxin:CT) は、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*) の外毒素であり、1 個の A サブユニット (CTA) と 5 個の B サブユニット (CTB) から構成されるタンパク複合体である。CTA は ADP-リボシル化活性を持ち、下痢を引き起こす。CTB は細胞表面の糖鎖であるガングリオシド GM1 に結合し、CT の細胞内侵入に関与する。CT は粘膜系の免疫アジュバントとしても知られており、CT の経口投与により IgA 産生や Th2 免疫応答が誘導されることがわかっている。しかし、CT による免疫アジュバント作用の分子機構はほとんどわかっていない。今回、この CT に着目し、CT で刺激した細胞においてアルギナーゼ-1 (Arginase I:ArgI) の遺伝子発現が顕著に誘導されることを見出した。ArgI は、L-arginine (アルギニン) を分解して L-ornithine (オルニチン) と尿素を生成する酵素であり、IL-4 や IL-10 などの Th2 サイトカインにより遺伝子発現が誘導されることが知られている。しかし、CT の免疫アジュバント作用における ArgI の機能的意義や、CT による ArgI 遺伝子発現誘導の分子機構は全くわかっていない。

2. 研究の目的

本研究では、CT による ArgI 遺伝子発現誘導を足がかりに、CT による免疫アジュバント作用の新規分子機構の解明を目指す。まず、CT による ArgI 誘導を指標に、CT のシグナル伝達機構に関与する機能分子をスクリーニングできる実験系を確立し、新規シグナル伝達分子を選別する。選別した新規シグナル伝達分子については機能的意義を明らかにする。これらの解析を進めて、CT の免疫アジュバント作用の分子機構を解明する。

3. 研究の方法

(1)CT の新規シグナル伝達分子の探索を行う。ArgI 遺伝子プロモーターで制御されるルシフェラーゼ遺伝子をマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 (以下 RAW 細胞) に導入すると、CT 刺激によりプロモーター活性が増強された。この系を用いて、種々の機能分子の関与を、siRNA や cDNA の導入、阻害剤を用いて検討する。

(2)CT の新規シグナル伝達分子の機能的意義を明らかにする。CT 刺激により産生誘導されるサイトカインについて、機能分子候補の

siRNA や阻害剤を用いて検討する。

4. 研究成果

(1) CT による ArgI プロモーター活性化を指標に、PKA (siRNA、cDNA および dominant negative form cDNA にて確認)、C/EBP β (siRNA にて確認)、脱スモ化酵素 (siRNA、cDNA にて確認)、Ets ファミリー転写因子 (siRNA、cDNA にて確認) を選別した。

(2) CT で刺激した RAW 細胞において、アルギニンが減少し、オルニチンが増加していることが明らかとなった (慶応大学福田真嗣先生との共同研究)。このことは、CT 刺激した RAW 細胞において ArgI を介したアルギニン代謝経路が活性化していることを示唆している。

また RAW 細胞を CT 単独で刺激しても炎症性サイトカインの IL-1 β の産生は誘導されないが、LPS 存在下では CT 刺激により顕著に IL-1 β 産生が誘導された。IL-1 β の産生誘導は、pro-IL-1 β の転写誘導、pro-IL-1 β から成熟 IL-1 β へのプロセッシング、成熟 IL-1 β の放出という 3 つの段階により制御されている。この LPS 存在下における CT による IL-1 β 産生誘導に、アルギニン代謝経路および ArgI が関与するかどうか、siRNA や阻害剤を用いて検討した。その結果、アルギニン代謝阻害剤および siArgI 存在下において、LPS 存在下における CT による IL-1 β 産生誘導が阻害された。このとき、pro-IL-1 β の転写誘導は正常であった。このことからアルギニン代謝および ArgI は、LPS 存在下における CT による IL-1 β 産生誘導において、転写後レベルで関与することが明らかとなった。

次に、PKA が CT による ArgI 遺伝子発現誘導や、LPS 存在下における CT による IL-1 β 産生誘導に関与するかどうか、siRNA を用いて検討した。PKA の siRNA で処理した RAW 細胞において、CT による ArgI 遺伝子発現誘導の障害や、LPS 存在下における CT による IL-1 β 産生誘導の障害が認められた。このとき、pro-IL-1 β の転写誘導は正常であった。以上の結果から、CT は PKA を介して ArgI の遺伝子発現を誘導し、活性化した ArgI を介したアルギニン代謝経路が、LPS 存在下における CT による IL-1 β 産生誘導の転写後レベルで関与していることが示唆された (図 1)。

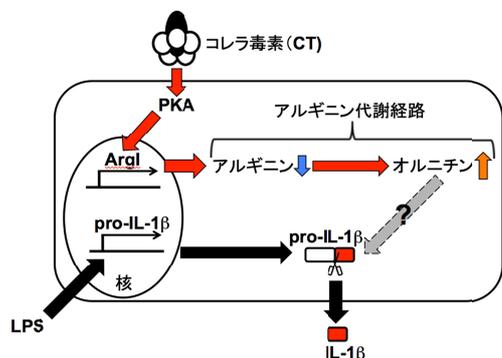


図1. コレラ毒素によるアルギニン代謝経路活性化およびIL-1 β 産生誘導

CT による IL-1 β 産生誘導に細胞内代謝経路が関与することはこれまで報告が無い。よって今回明らかとなった、ArgI を介したアルギニン代謝経路依存的な IL-1 β 産生誘導は、新規の IL-1 β 産生誘導機構であると考えられる。現在、LPS 存在下において CT 刺激により誘導される遺伝子群および活性化される代謝経路を探索しており、アルギニン代謝の他に、CT による IL-1 β 産生誘導に関与する代謝経路が存在するかどうか検討している。また、pro-IL-1 β から成熟 IL-1 β へのプロセッシングにカスパーゼ-1 を含むタンパク複合体、いわゆるインフラマソームが関与するが、ArgI を介したアルギニン代謝とインフラマソームの活性化が、どう関連するのかについても検討を進めている。IL-1 β は IgA 産生誘導などに関与することが知られており、CT による IgA 産生誘導などの免疫アジュバント作用に関与することが期待される。よって本研究成果は CT の免疫アジュバント作用の分子機序解明につながり、新規免疫制御薬開発のための分子基盤構築に貢献することが期待される。

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 4 件)

1. Review(1 件)

Sasaki, I., Kaisho, T., Transcriptional control of dendritic cell differentiation, *Curr Top Microbiol Immunol.*, 381;257-78:2014 (doi: 10.1007/82_2014_378.) (査読有)

2. 原著論文(3 件)

Sasaki, H., Kurotaki, D., Osato, N., Sato, H., Sasaki, I., Koizumi, S., Wang, H., Kaneda, C., Nishiyama, Akira.,

Kaisho, T., Aburatani, H., Morse, H. C. 3rd, Ozato, K., Tamura, T., Transcription factor IRF8 plays a critical role in the development of murine basophils and mast cells. *Blood.* 125(2):358-69:2015 (doi: 10.1182/blood-2014-02-557983.) (査読有)

Akiyama, N., Shinzawa, M., Miyauchi, M., Yanai, H., Tateishi, R., Shimo, Y., Ohshima, D. Matsuo, K., Sasaki, I., Hoshino, K., Wu, G., Yagi, S., Inoue, J., Kaisho, T., Akiyama, T., Limitation of immune tolerance-inducing thymic epithelial cell development by Spi-B-mediated negative feedback regulation. *J. Exp. Med.* 211(12):2425-38:2014 (doi: 10.1084/jem.20141207.) (査読有)

Yamazaki, C., Sugiyama, M., Ohta, T., Hemmi, H., Hamada, E., Sasaki, I., Fukuda, Y., Yano, T., Nobuoka, M., Hirashima, T., Iizuka, A., Sato, K., Tanaka, T., Hoshino, K., Kaisho, T., Critical roles of a dendritic cell subset expressing a chemokine receptor, XCR1, *The Journal of Immunology.*, 190(12):6071-82:2013 (doi: 10.4049/jimmunol.1202798.) (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

Sasaki, I., Fukuda, S., Orimo, T., Hemmi, H., Kaisho, T., Roles of Arginase I in Cholera toxin-induced production of proinflammatory cytokines, 第 43 回日本免疫学会学術集会 2014 年 12 月 10-12 日、京都、(Oral presentation)

Ohta, T., Okura, S., Hemmi, H., Sugiyama, M., Sasaki, I., Yamazaki, C., Hoshino, K., Kaisho, T., XCL1 and XCR1 are involved in intestinal immune homeostasis by dendritic cells, 第 43 回日本免疫学会学術集会 2014 年 12 月 10-12 日、京都

大田友和、邊見弘明、杉山正伸、佐々木 泉、改正恒康、腸管免疫制御機構における XCR1 陽性樹状細胞の役割、第 24 回日本樹状細胞研究会、2014 年 6 月 20 日、山形

Hemmi, H., Sugiyama, M., Ohta, T., Sasaki, I., Yamazaki, C., Tanaka, T.,

Hoshino,K., Kaisho,T., Function of XCR1-expressing dendritic cells in oral tolerance, 第42回日本免疫学会学術集会 2013年12月11-13日、幕張メッセ(千葉県)

Ohta,T., Hemmi,H., Yamazaki,C., Sugiyama,M., Sasaki,I., Hoshino,K., Kaisho,T., A novel mechanism to generate the intestinal intraepithelial T lymphocytes by XCR1-expressing dendritic cells, 第42回日本免疫学会学術集会 2013年12月11-13日、幕張メッセ(千葉県)

佐々木泉、星野克明、邊見弘明、改正恒康、形質細胞様樹状細胞の機能と分化制御における Ets ファミリー転写因子 Spi-B の役割、第23回日本樹状細胞研究会、2013年5月17日、京都、(口答発表、学術奨励賞受賞)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.wakayama-med.ac.jp/med/seita/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 泉(SASAKI IZUMI)
和歌山県立医科大学・先端医学研究所・助教
研究者番号：80611037

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし