

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390136
 研究課題名（和文） インターロイキン15による新規自然免疫賦活機構の解明
 研究課題名（英文） ACTIVATION MECHANISM OF INNATE IMMUNE SYSTEM BY INTERLEUKIN-15
 研究代表者
 榑木 俊聡（OHTAKI TOSHIKI）
 秋田大学・医学部・教授
 研究者番号：50233200

研究成果の概要：インターロイキン15（IL-15）は自然免疫系の活性化に重要なサイトカインである。樹状細胞（DC）やマクロファージなどの抗原提示細胞、さらには上皮細胞などがIL-15を生産するが、その分子機構には不明な点が多い。我々は、代表的なToll様受容体リガンドであるCpGでDCを刺激すると、IL-12が産生され、IL-12依存性に転写因子IRF3が活性化して、IRF3依存性にIL-15の産生が誘導される経路を明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	10,700,000	3,210,000	13,910,000
2008年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

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：自然免疫、樹状細胞、サイトカイン、Toll様受容体、免疫賦活

1. 研究開始当初の背景

(1) 代表的なTLRリガンドの1つである非メチル化CpGモチーフ（CpG）は細菌やDNAウイルスに特徴的な配列であり、強力な免疫賦活効果を有することが知られており、それ故、さまざまな感染症・がん・アレルギーなどの予防や治療に有効なワクチンへの応用が模索されている。例えば、抗原の消化・分解や抗原提示能が上昇し、IL-12などの炎症性サイトカインの産生を介したTh1細胞の誘導が著しく促進する。

(2) インターロイキン15（IL-15）は自然免疫系を担うNK細胞・NKT細胞・上皮内

TCR $\gamma\delta$ ⁺細胞の分化やDCの機能成熟に、また獲得免疫系においてはCD8⁺メモリーT細胞の維持に各々重要であることが明らかにされている。

(3) 我々の研究から、細胞内寄生菌リステリアの感染系およびIL-15^{-/-}マウスなどを用いてCpGによる免疫賦活効果を評価したところ、DC由来のIL-15がCpGによる免疫賦活に必要であることが判明していた。

2. 研究の目的

既述のように、CpGの免疫賦活効果は、抗原提示能の増強およびIL-12産生亢進を介した

Th1細胞分化を促進するためである。一方、我々の研究から、CpGによる免疫賦活誘導におけるIL-15の重要性が示唆された。これらの結果は、IL-12とIL-15の相互作用の可能性を新たに提示した。具体的には、(1) IL-12がIL-15の生産を調節している、(2) IL-15がIL-12の生産を調節している、(3) IL-12とIL-15は、一方が他方の支配下にあるような上下関係ではなく、どちらも重要である、の3つの可能性である。これらを検証し、さらに詳細な分子基盤を探索することで、新たな自然免疫賦活機構を明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス

野生型 (WT)、IL-15^{-/-}マウスは日本クレア、Taconic 社から各々購入した。IL-12^{-/-}、CD11c-DTR-GFP tg、IRF3^{-/-}マウスは、石川博通博士、Steffen Jung博士、谷口維紹博士から各々分与された。すべてのマウスはSPF環境下で維持し、8-12週齢で実験に供した。すべての動物実験は、秋田大学動物実験倫理委員会および秋田大学バイオサイエンス安全委員会の審査・承認を経て遂行した。実験に当っては、秋田大学動物実験指針を遵守した。

(2) 各種試薬の *in vivo* 投与

CpG-Bは、(ODN1668) 50μgを腹腔内投与した。DCを除去するため、ジフテリアトキシン (DT) 100ngをCD11c-DTR-GFP tg腹腔内に投与した。

(3) ELISA

CpG-B投与後、経時的に血清サンプルを調整し、IL-12p70は市販のELISAキットで、IL-15は我々が作製した抗マウスIL-15モノクローナル抗体を用いて確立したELISAにより測定した。

(4) 細胞内サイトカイン染色

CpG-Bを投与したマウス脾臓から、適宜DCを精製して、CD11cおよびmPDCA-1に対する抗体で細胞表面を染色後、細胞内IL-12あるいはIL-15を染色した。

(5) IRF3の検出

CpG-Bを投与したマウス脾臓から精製したDCのIRF3単量体および二量体は、常法に従い native-PAGE法を用いて検出した。IRF3の核内移行は、上記DCをカバースリップ上に固定し、抗IRF3特異抗体およびAlexa488結合二次抗体を用いて検討した。核はDAPIで染色した。画像解析には、Leica蛍光顕微鏡を用いた。

4. 研究成果

(1) CpG投与後のIL-12、IL-15生産パターン

CpGは、I型インターフェロン誘導能の高い CpG-A (D19) とIL-12をはじめとする炎症性サイトカイン誘導能に優れた CpG-B (ODN1668) などに分類される。本研究では当該目的により適したCpG-Bを用いて実験を行った。野生型マウスにCpG-B投与後、血清中IL-12、IL-15の生産パターンを検討したところ、IL-12は投与後3~6時間をピークに、IL-15は同24時間をピークに誘導されることが明らかになった (図1 a)。次に、それらサイトカインの生産におけるDCの貢献度を検討する目的で、CD11c-DTR-GFP tgマウスを用いて同様に検討を加えた。同マウスは、CD11cプロモーターの下流にジフテリアトキシン受容体 (DTR) およびGFP発現を担う遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスであるため、DC特異的にDTRおよびGFPが発現している。さらに、DTを投与することにより *in vivo* でDCが除去されることになる。予めDTを投与してDCを除去したマウスにCpGを投与したところ、血清中IL-12、IL-15が著しく低下したことから、CpG投与時のこれらサイトカインの主要な生産源はDCであることが示唆された。DCは、古典的DC (cDC) と形質細胞様DC (pDC) に大別される。そこで、CpG投与時のIL-12およびIL-15の生産源としてのDCサブセットの役割をさらに検討した。その結果、CpG投与後3~6時間をピークとするIL-12はcDCおよびpDC両サブセットから、一方、24時間をピークに誘導されるIL-15は主にcDCから生産されることが明らかになった (図2)。

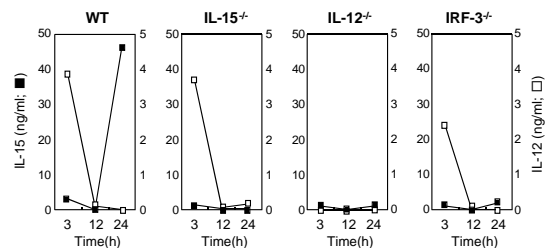


図1 CpG投与後IL-12、IL-15生産パターン

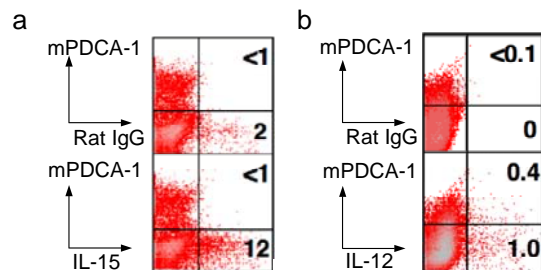


図2 IL-12、IL-15生産性DCサブセット

(2) DCからのIL-15生産にはIL-12が必要である

CpG投与時、IL-12の生産誘導がIL-15に先行するという結果から、DCからのIL-15生産にお

いてIL-12が何らかの役割を担っていることが予測されたため、WT、IL-12^{-/-}、IL-12^{-/-}マウスを用いて検討した。CpG投与後、IL-12^{-/-}マウスではIL-12の生産がWTマウス同様に観察されたが、IL-12^{-/-}マウスではIL-15の生産がほとんど誘導されなかったことから(図1 b, c)、IL-15の生産にはIL-12が必要不可欠であると結論した。

TLRリガンドの1つであるLPSでDCを刺激するとIRF3依存性にIL-15が生産されることが報告されている(*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306:860-866 (2003))。そこで、CpGをIRF3^{-/-}マウスに投与して検討したところ、IL-12は誘導されたが、IL-15の生産は著減していた。これらの結果は、CpG投与時、IL-12の生産にIRF3は必ずしも必要ないが、IL-15の生産には重要であることを示唆していた(図1 d)。

(3) DCからのIL-15生産におけるIL-12、IRF3の役割

これまで述べた成果から、IL-12およびIRF3がDCからのIL-15の生産に重要であることが明らかになった。さらにIL-12とIRF3の相互作用を探求すべく、特にIRF3の活性化・機能発現におけるIL-12の役割に焦点を絞り検討した。IRF3は定常状態でも細胞質に存在し、活性化に伴い二量体を形成して核内に移行し、さまざまな遺伝子のプロモーター領域に結合して遺伝子発現を誘導することが知られている。まず初めに、CpG投与後、WTおよびIL-12^{-/-}マウス脾臓からDC溶解液を調整し、native-PAGE法を用いてIRF3二量体の形成を検討したところ、いずれのマウス由来のDCにおいてもCpG刺激依存性にIRF3二量体形成が観察された(図3)。

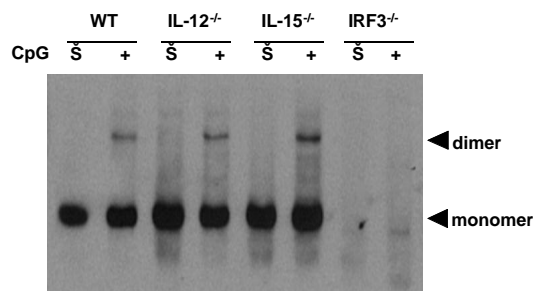


図3 CpG依存性IRF3二量体形成

この結果は、IL-12がIRF3の二量体形成には必要ないことを示していた。そこで次に、IRF3の核内移行を検討した。野生型マウス由来DCでは、CpG刺激依存性にIRF3が細胞質から核内に移行したが(図4 a, b)、興味深いことに、IL-12^{-/-}マウス由来DCでは、IRF3の核内移行がほとんど観察されなかった(図4 c, d)。さらに重要なことに、CpGと同時にIL-12を投与したIL-12欠損マウスから調整したDCでは、

IRF3の核内移行が回復していた(図4 e)。これらの結果から、IL-12がIRF3の核内移行に必要なことが明らかになった。

(1)~(3)の結果を総合すると、CpGで刺激されたDCからIL-12が生産され、同IL-12非依存性にIRF3が二量体形成後、IL-12依存性に核内移行し、IL-15の遺伝子発現を誘導するという、IL-15生産に至る一連の分子機構が明らかになった。今後の検討課題としては、IL-12が如何にIRF3の核内移行を調節するのか、その分子機構の詳細をさらに解明する必要がある。将来的には、目的に応じてIL-15の生産を促進あるいは抑制する人為的分子標的療法の開発に繋がることを期待される。

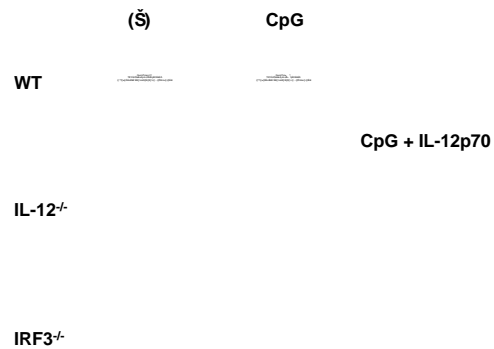


図4 IL-12依存性IRF3核内移行

(4) その他の主な研究成果

本研究課題に関連した研究成果として、以下のことを明らかにした。

- ①我々の作製したマウスIL-15に対する中和抗体を用いて米国のKatz博士らと共同研究を行い、GVH様マウスモデルにおいて、自己反応性CD8⁺T細胞の活性を規定する因子としてIL-15が重要であることを明らかにした。
- ②フランスのZitvogel博士らと共同研究を行い、定常状態の二次リンパ組織において、DCとNK細胞の相互作用を、調節性T細胞(Treg)が調節していること、そのメカニズムとしてTregによる自己反応性T細胞の制御が重要なことを明らかにした。
- ③BALB/c-IL-15^{-/-}マウスおよびC57BL/6-IL-15^{-/-}マウスを用いて、京都府立医大の木下教授らと共同研究を行い、C57BL/6遺伝的背景においては、MHC一致異系角膜の移植片拒絶はIFN-γおよびIL-17非依存性に誘導されることを明らかにした。
- ④細胞内寄生原虫リーシュマニアの効果的排除にマクロファージに発現する癌抑制遺伝子Ptenが重要なこと示した。
- ⑤I型インターフェロン(I型IFN)は、ウイルス感染時に宿主細胞に抵抗性を付与し、免疫系を活性化してウイルスを排除するために重要な役割を担うことが知られている。我々

は、意外なことに、I型IFNが造血幹細胞(HSC)に作用して、一過性刺激の場合はHSCの増殖を、過剰かつ慢性刺激の場合にはHSCの減少を誘導することを明らかにした。

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9件)

- ① Sato, T., Onai, N., Yoshihara, H., Arai, F., Suda, T., and Ohteki, T., IRF-2 protects quiescent HSCs from type-I interferon-dependent exhaustion. Nat. Med., (2009) in press, 査読有
- ② Yamada, J., Hamuro, J., Fukushima, A., Ohteki, T., Terai, K., Iwakura, Y., Yagita, H., and Kinoshita, S., MHC-matched corneal allograft rejection in an IFN- γ /IL-17-independent manner in C57BL/6 mice. Invest. Ophthalm. Vis. Sci. 50, 2139-2146, (2009), 査読有
- ③ Miyagawa, F., Tagaya, Y., Kim, B.S., Patel, H.J., Ishida, K., Ohteki Waldmann, T.A., and Katz, S.I., IL-15 serves as a costimulator in determining the activity of autoreactive CD8 T cells in an experimental mouse model of graft-versus-host-like disease. J. Immunol. 181, 1109-1119, (2008), 査読有
- ④ Kuroda, S., Nishio, M., Sasaki, T., Horie, Y., Kawahara, K., Sasaki, M., Natsui, M., Matozaki, T., Tezuka, H., Ohteki, T., Förster, I., Mak, T.W., Nakano, T., and Suzuki, A., Effective clearance of intracellular *Leishmania major* in vivo requires Pten in macrophages. Eur. J. Immunol. 38, 1331-1340, (2008), 査読有
- ⑤ Terme, M., Chaput, N., Combadiere, B., Ma, A., Ohteki, T., and Zitvogel, L., Regulatory T cells control dendritic cell/NK cell cross-talk in lymph nodes at the steady state by inhibiting CD4⁺ self-reactive T cells. J. Immunol. 180, 4679-4686, (2008), 査読有
- ⑥ Onai, N., Obata-Onai, A., Schmid, M.A., Ohteki, T., Jarrossay, D., and Manz, M.G., Identification of clonogenic common Flt3⁺M-CSFR⁺ plasmacytoid and dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. Nat. Immunol., 8, 1207-1216 (2007), 査読有
- ⑦ Tezuka, H., Abe, Y., Iwata, M., Takeuchi, H., Ishikawa, H., Matsushita, M., Shiohara, T., Akira, S., and Ohteki, T., Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. Nature, 448, 929-933 (2007), 査読有
- ⑧ Kishimoto, H.,* Ohteki, T.* (*equal contribution), Yajima, N., Kawahara, K., Natsui, M., Kawarasaki, S., Hamada, K.,

Horie, Y., Kubo, Y., Arase, S., Taniguchi, M., Vanhaesebroeck, B., Mak, T.W., Nakano, N., Koyasu, S., Sasaki, T., and Suzuki, A., The Pten/PI3K pathway governs the homeostasis of Valpha14iNKT cells. Blood, 109, 3316-3324, (2007), 査読有

- ⑨ Ohteki, T., The dynamics of dendritic cell-mediated innate immune regulation. Allergol. Int., 56, 209-214, (2007), 査読有

[学会発表] (計11件)

- ① Ohteki, T., Proliferation and exhaustion of HSCs by type-1 interferon. 第8回日本再生医療学会総会, シンポジウム Stem Cell Niche, 2009年3月5-6日, 東京
- ② Onai, N., The role of hematopoietic cytokine in dendritic cell subsets development. 第38日本免疫学会総会・学術集会, 2008年12月1-3日, 京都
- ③ Sato, T., IRF-2 protects haematopoietic stem cells from type-I interferon-dependent replicative exhaustion. 第38日本免疫学会総会・学術集会, 2008年12月1-3日, 京都
- ④ Kuwajima, S., Molecular mechanism of IL-15 production from DC upon CpG stimulation in vivo. 第38日本免疫学会総会・学術集会, 平2008年12月1-3日, 京都
- ⑤ Fujioka, Y., Molecular mechanism of DC production of IL-15 upon CpG stimulation in vivo. The 10th International Symposium on Dendritic Cells, 2008年10月1-5日, 神戸
- ⑥ 榎木俊聡, 樹状細胞による免疫調節ダイナミズム研究. (第10回日本免疫学会賞受賞講演) 第37回日本免疫学会総会・学術集会, 2007年11月21日, 東京
- ⑦ Kuwajima, S., pDC-derived interferon- α downregulates TLR7-mediated immune responses through DC apoptosis. 第37回日本免疫学会総会・学術集会, 2007年11月21日, 東京
- ⑧ 榎木俊聡, 樹状細胞による粘膜免疫調節機構. 第3回東北内分泌研究会総会 (第15回日本内分泌学会東北地方会), 2007年10月13日, 秋田
- ⑨ Kuwajima, S., Plasmacytoid dendritic cell-derived interferon- α regulates dendritic cell homeostasis. 第7回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 2007年9月2-5日, 淡路
- ⑩ 榎木俊聡, 形質細胞様樹状細胞の生産するIFN- α による新規免疫制御機構. 第18回樹状細胞研究会, 2007年8月23-24日, 淡路
- ⑪ Ohteki, T., Plasmacytoid dendritic cell-derived interferon- α regulates dendritic

cell homeostasis. International Symposium on
Molecular Cell Biology of Macrophages 2007,
2007年6月14-15日, 静岡

[図書] (計2件)

- ① 樗木俊聡、樹状細胞による免疫調節ダイナミズム. 南山堂, 東京, 谷口維紹, 本一彦 (編) 免疫応答と免疫病態の統合的分子理解. (2007) pp. 125-134.
- ② 桑島精一、樗木俊聡、CpGによる樹状細胞活性化とIL-15依存性クロストーク. 中外医学社, 東京, 奥村康, 平野俊夫, 佐藤昇志 (編) Annual Review 免疫 2008. (2007) pp. 138-145.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.akita-u.ac.jp/~kisei/Default.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樗木 俊聡 (OHTEKI TOSHIAKI)

秋田大学・医学部・教授

研究者番号 : 50233200