

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16685

研究課題名(和文) TLR3応答制御におけるmTORC2の脂質センサーとしての機能の解析

研究課題名(英文) Analysis of function of mTORC2 as fatty acid sensor in TLR3 response

研究代表者

佐藤 亮太 (Sato, Ryota)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：90779703

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)：mTORはmTORC1、mTORC2の2つの複合体を形成している。そのうちmTORC2は申請者の先行研究によりmTORC2とTLR3応答の連携が明らかになったが、依然としてmTORC2の代謝センサーとしての役割は不明であった。申請者らは、gRNAライブラリースクリーニングにより脂肪酸合成経路関連分子が候補として得た。これらのノックアウト細胞において、TLR3応答が減弱された。脂肪酸の除去によって、TLR3リガンドpoly(I:C)刺激によるTLR3の細胞内移行が低下すること、脂肪酸添加によって回復することを確認した。このことから脂肪酸をmTORC2がセンシングしている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、mTORC2が脂肪酸のセンサーとしての役割を果たすことがわかった。また、mTORC2が脂肪酸の量をモニターし、十分であれば免疫応答を許容し、不十分であれば免疫応答を禁止し、代謝応答を促進し脂肪酸を作るというスキームを示せた。これは、mTORC2が免疫応答のバランスを制御するオペレーターの役割を果たす「Immuno-metabolism」の新たなモデルとなる。

研究成果の概要(英文)：mTOR forms two complexes, mTORC1 and mTORC2. Our previous research revealed mTORC2 is master regulatory molecule in TLR3 response, but a role as a metabolic sensor of mTORC2 was still unclear.

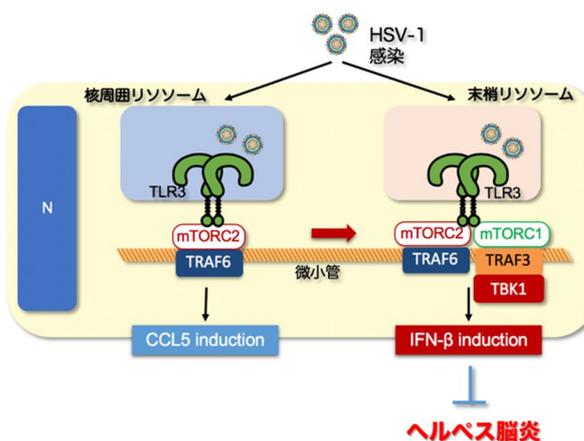
We obtained fatty acid synthesis pathway-related molecules as candidates by gRNA library screening. TLR3 responses were attenuated in these knockout cells compared with wild type. It was confirmed that the removal of fatty acids reduced the intracellular translocation of TLR3 stimulated by the TLR3 ligand poly (I: C), and that the addition of fatty acids restored it. This indicates that mTORC2 may sense the amount of fatty acids.

研究分野：自然免疫

キーワード：TLR 自然免疫 ウイルス学 代謝免疫学

1. 研究開始当初の背景

脂質異常症や糖尿病、肥満などが慢性炎症を呈することから、アミノ酸や脂質の代謝異常と免疫応答は密接に関わっており、その連携基盤の解明は重要な課題である。近年、代謝センサーである mechanistic target of rapamycin (mTOR) と自然免疫受容体の関連が明らかになりつつある。mTOR は mTORC1、mTORC2 の 2 つの複合体を形成している。mTORC1 はアミノ酸センサーであり、リソソームに局在し、一本鎖 RNA センサーである TLR7 依存的な I 型インターフェロン産生に必須である (Kobayashi *et al. Immunity*. 2014)。一方、mTORC2 は増殖因子などにより活性化され細胞内骨格の再構築を行うが、簡便な活性化の検出方法もないことから、代謝センサーとしてどの代謝物をセンスするか不明である。また、免疫受容体との関連についても報告がなかった。



2 本鎖 RNA センサーである Toll like receptor3 (TLR3) は免疫細胞だけでなく線維芽細胞、神経細胞など多岐にわたる細胞に発現しウイルス感染に対する生体防御を行っている。ヒトにおいて、TLR3 およびその下流シグナル分子の機能低下遺伝子変異は、ヘルペス脳炎に対する感受性を高めることが報告されている (Lafaille *et al. Nature* 2012)。よって、TLR3 応答制御機構の解明は重要な課題である。申請者らはこれまでに抗 TLR3 抗体を作成し (Murakami *et al. J Immunol.* 2014)、TLR3 応答制御機構の解明に努めてきた。その中で、申請者は代謝センサーである mTORC2 が TLR3 応答のマスター制御因子であることを見出した (Sato *et al. Nat Immunol.* 2018) (上図)。mTORC2 はリガンドで刺激された TLR3 と会合し活性化され、炎症性サイトカイン産生および TLR3 の核周囲から末梢までの細胞内移行を促進する。細胞内移行は I 型インターフェロン産生に必須のシグナル分子と TLR3 との会合を促していた。したがって、mTORC2 は炎症性サイトカイン、I 型インターフェロン産生、細胞内移行といった TLR3 応答の全てを制御している。しかし、TLR3 シグナルの下流で mTORC2 は単なるシグナル分子として機能しているのか、または代謝センサーとして機能しているのか不明である。

2. 研究の目的

申請者の結果により mTORC2 と TLR3 応答の連携が明らかになったが、依然として mTORC2 の代謝センサーとしての役割は不明である。本研究の目的は、TLR3 応答をアウトプットにして mTORC2 の代謝センサーの機能、特に脂質センサーとしての機能を解明することである。

3. 研究の方法

mTORC2 が脂肪酸センサーとして働き、TLR3 応答を制御していることを明らかにしていく。基本的には、mTORC2 が関与する TLR3 依存的なケモカイン産生、ヘルペスウイルス I 型 (HSV-1) 感染依存的な IFN 産生、TLR3 細胞内移行を中心に検証を進めた。

(1) TLR3 応答における脂肪酸合成経路の役割

CRISPR/Cas9 による機能低下型のスクリーニングを行い、TLR3 応答に必要な分子を同定した。その結果、*de novo* 脂肪酸合成に必要な遺伝子 (Cs, Slc25a1, Acly, Fasn) が同定された。

脂肪酸合成経路関連分子ノックアウト細胞の解析

これらの遺伝子が本当に TLR3 応答に必須かどうかノックアウト細胞株または強制発現細胞株を作成し検討した。これまでの解析で TLR3 応答における mTORC2 の必要性において、線維芽細胞と神経細胞は類似する結果を得ている。

Fasn 阻害剤 C75 を用いた解析

ノックアウト細胞と同時に、*de novo* 脂肪酸合成の阻害剤である C75 を用いた解析も進めた。今後、HSV-1 と C75 を同時に脳内に投与して感染させる実験を行う予定である。この系においては、TLR3 の遺伝子欠損マウスが高い感受性を示すことをすでに確認している。

(2) TLR3 応答における脂肪酸の必要性の検証

de novo 脂肪酸合成が重要なのか、または脂肪酸自体が重要なのか検討した。C75 で低下した TLR3 応答に、飽和脂肪酸を加えたところ、CCL5 産生は回復する結果をすでに得ている。したがって、脂肪酸自体が TLR3 応答に必要な可能性が示されている。

TLR3 応答における培地中の脂肪酸の重要性の検証

脂肪酸の存在が重要か示すために、脂肪酸欠損培地中の細胞の TLR3 応答を検証する。我々が用いる細胞は数日なら脂肪酸欠損培地中でも生存できることはすでに確認済みである。また、TLR3 の細胞内移行については、脂肪酸の除去によって、TLR3 リガンド poly(I:C)刺激による TLR3 の細胞内移行が低下することを確認している。poly(I:C)刺激による CCL5 産生、HSV-1 感染における I 型 IFN 産生の検証を中心に進めた。

飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸

脂肪酸は飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸に分かれる。どちらの脂肪酸が TLR3 応答に重要かどうか脂肪酸欠損培地に添加して検証を進めた。様々な鎖の長さの飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸を用いて検討した。特に、高不飽和脂肪酸である EPA, DHA についても検討した。CCL5 産生、HSV-1 感染における I 型 IFN 産生について検討した。また、前述のように脂肪酸欠損培地で低下した刺激依存的な TLR3 細胞内移行が、脂肪酸を加えることで回復するかどうか検討した。

(3) mTORC2 と脂肪酸の相互作用の解明

TLR3 応答における脂肪酸と mTORC2 の関連性について検討した。

脂肪酸と mTORC2 活性化の関連性

脂肪酸を必要とするステージが TLR3 の直下の mTORC2 であるかどうか検証した。C75 処理、または脂肪酸除去、脂肪酸添加による mTORC2 下流分子のリン酸化の変化を検証した。

脂肪酸と mTOR2 および TLR3 との会合

mTORC2 は、活性化された TLR3 と会合する。その会合における脂肪酸の役割を検証するために、C75 処理、脂肪酸除去、添加した場合の mTOR と TLR3 の会合を検証した。また、脂肪酸自体が mTOR や TLR3 に結合するかどうかビオチン化した脂肪酸を用いた免疫沈降によって、これらの分子と脂肪酸の結合を検証した。

FABP ファミリーと TLR3 応答の関連性

脂肪酸と mTOR との相互作用において、関与する分子についても検討する。我々は、脂肪酸の細胞内移行や安定化に関与する脂肪酸結合タンパク質 (FABP) ファミリーに注目している。それぞれのノックアウトまたは強制発現線維芽細胞株を作成し、TLR3 応答を検証する。また、FABP と TLR3 の会合についても検証を行う。

4. 研究成果

(1) TLR3 応答における脂肪酸合成経路の役割

CRISPR/Cas9 による機能低下型のスクリーニングを行い、TLR3 応答に必要な分子を同定した。その結果、*de novo* 脂肪酸合成に必要な遺伝子(Cs, Slc25a1, Acly, Fasn)が同定された。これらの gRNA を用いて作製したノックアウト細胞では TLR3 刺激依存的な NF- κ B 活性化が減弱していた。

また、線維芽細胞において TLR3 リガンドである poly(I:C)刺激による CCL5 産生(右図)、HSV-1 感染における I 型 IFN 産生がすべて Fasn 阻害剤である C75 で抑制された。マウスにおける HSV-1 感染実験では、C75 投与マウスはコントロールに比べ、HSV-1 感受性が高いことがわかった。これらの結果は *de novo* の脂肪酸合成が TLR3 応答に必須である可能性を示している。

(2) TLR3 応答における脂肪酸の必要性の検証

de novo 脂肪酸合成が重要なのか、または脂肪酸自体が重要なのか検討した。C75 で低下した TLR3 応答に、飽和脂肪酸を加えたところ、CCL5 産生は回復する結果を得た。脂肪酸の存在が重要か示すために、脂肪酸欠損培地中の細胞の TLR3 応答を検証した。脂肪酸の除去によって、TLR3 リガンド poly(I:C)刺激による TLR3 の細胞内移行が低下することを確認した。Poly(I:C)刺激による CCL5 産生、HSV-1 感染における I 型 IFN 産生についても低下した。脂肪酸除去により低下した TLR3 応答は飽和脂肪酸を加えることで顕著に回復した。脂肪酸の鎖長は影響しなかった。したがって、飽和脂肪酸自体が TLR3 応答に必要な可能性が示された。

(3) mTORC2 と脂肪酸の相互作用の解明

TLR3 の細胞内移行およびサイトカイン産生、インターフェロン産生には mTORC2 の活性化が必要である。C75 処理後では、TLR3 刺激依存的な mTOR の活性化、mTORC2 の構成成分である Rictor の活性化、下流分子である Akt の活性化、NF κ B や Erk の活性化が全て減弱した。また、驚くことに、mTORC1 の構成成分である Raptor の活性化も阻害された。脂肪酸除去においても C75 と同様の結果が得られた。飽和脂肪酸の添加により、脂肪酸除去により低下したシグナル分子の活性化が回復した。

mTORC2 は、活性化された TLR3 と会合する。C75 処理および脂肪酸除去により TLR3-mTORC2 の会合が阻害され、飽和脂肪酸添加により回復した。

これらの結果より、飽和脂肪酸の存在自体が mTORC1,2 の活性化をコントロールしており、TLR3 との会合に飽和脂肪酸が大事であることが示された。

mTOR は細胞生存や増殖のための著名な代謝センサーであり、特に mTORC1 はアミノ酸や等を認識し様々なタンパク質の翻訳制御を行うことから、代謝センサーの面でも免疫との関連性の面でも研究が進んでいる。一方、mTORC2 は細胞骨格の再構築を行うことしか知られておらず、リガンドさえ不明瞭であることから、重要性が低いと思われており研究が進んでいなかった。本研究を通して mTOR が脂肪酸センサーということを示すことができたのは世界初であり、今後の mTORC2 の研究において非常に重要な発見となる。また、メタボリックシンドロームでは脂肪組織において慢性炎症が起こることや、近年でも EPA や DHA などの 3 不飽和脂肪酸に抗炎症作用があることなど、脂肪酸代謝と炎症についてはこれまでも研究されてきた。しかし、代謝物である脂肪酸自体が自然免疫応答に関わる報告はなかった。本研究により、mTORC2 が脂肪酸の量をモニターし、十分であれば免疫応答を許容し、不十分であれば免疫応答を禁止し、代謝応答を促進し脂肪酸を作るというスキームを示せた。これは、mTORC2 が免疫応答のバランスを制御するオペレーターの役割を果たす「Immuno-metabolism」の新たなモデルとなる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Miyake Kensuke, Saitoh Shin-ichiroh, Sato Ryota, Shibata Takuma, Fukui Ryutaro, Murakami Yusuke	4. 巻 106
2. 論文標題 Endolysosomal compartments as platforms for orchestrating innate immune and metabolic sensors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Leukocyte Biology	6. 最初と最後の頁 853 ~ 862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/JLB.MR0119-020R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sato Ryota, Reuter Tatjana, Hiranuma Ryosuke, Shibata Takuma, Fukui Ryutaro, Motoi Yuji, Murakami Yusuke, Tsukamoto Hiroki, Yamazaki Satoshi, Liu Kaiwen, Saitoh Shin-ichiroh, Latz Eicke, Miyake Kensuke	4. 巻 32
2. 論文標題 The impact of cell maturation and tissue microenvironments on the expression of endosomal Toll-like receptors in monocytes and macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 785 ~ 798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxaa055	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kato Akihisa, Adachi Shungo, Kawano Shuichi, Takeshima Kousuke, Watanabe Mizuki, Kitazume Shinobu, Sato Ryota, Kusano Hideo, Koyanagi Naoto, Maruzuru Yuhei, Arie Jun, Hatta Tomohisa, Natsume Tohru, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of a herpes simplex virus 1 gene encoding neurovirulence factor by chemical proteomics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4894
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-18718-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Ryota Sato, Akihisa Kato, Takahiko Chimura, Glen N Barber, Toshiya Manabe, Yasushi Kawaguchi, Kensuke Miyake
2. 発表標題 Combating herpesvirus encephalitis by potentiating a TLR3-mTOR axis
3. 学会等名 Keystone Symposia Immunometabolism (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryota Sato, Akihisa Kato, Takahiko Chimura, Glen N Barber, Toshiya Manabe, Yasushi Kawaguchi, Kensuke Miyake
2. 発表標題 Combating herpesvirus encephalitis by potentiating a TLR3-mTOR axis
3. 学会等名 IUIS2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryota Sato, Akihisa Kato, Takahiko Chimura, Glen N Barber, Toshiya Manabe, Yasushi Kawaguchi, Kensuke Miyake
2. 発表標題 Combating herpesvirus encephalitis by potentiating a TLR3-mTOR axis
3. 学会等名 AIFII2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryota Sato, Akihisa Kato, Takahiko Chimura, Glen N Barber, Toshiya Manabe, Yasushi Kawaguchi, Kensuke Miyake
2. 発表標題 Combating herpesvirus encephalitis by potentiating a TLR3-mTOR axis
3. 学会等名 ICBL2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------