

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：24701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23848

研究課題名(和文)免疫反応における小胞体ストレス応答の機能的意義の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the physiological roles of unfolded protein responses in immune responses

研究代表者

折茂 貴是(Orimo, Takashi)

和歌山県立医科大学・医学部・特別研究員

研究者番号：80843036

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文): コレラ毒素(CT)は、免疫アジュバントとしてT細胞応答や抗体産生などを誘導するが、その作用機序は不明である。我々は、マウス腹腔マクロファージにおいて、CTの構成因子であるBサブユニット(CTB)とリポ多糖(LPS)の刺激により炎症性サイトカインIL-1 β の産生が相乗的に誘導されることを見出した。本研究では、この分子機序の解明を目指す。網羅的遺伝子発現解析(RNAシーケンス)により、CTB刺激により小胞体ストレス応答関連遺伝子群の発現が上昇することがわかった。今回、小胞体ストレス応答がCTBによるIL-1 β 産生誘導に関与することを明らかにしたので、ここに発表する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、生体内のマクロファージにおける小胞体ストレス応答機構が明らかとなり、CTBによる免疫アジュバント活性の分子機序の一端が明らかとなった。小胞体ストレス応答は糖尿病などの慢性炎症性疾患の病態形成に密接に関与することが示唆されているが、その分子機序は不明な部分が多い。本研究成果は、微生物感染に対する有効な免疫アジュバントの開発に貢献するだけでなく、小胞体ストレス応答が関与する種々の慢性炎症性疾患の新規治療薬の開発にも貢献することが期待され、波及効果の大きいものであると考えられる。

研究成果の概要(英文): Cholera toxin (CT) functions as a strong immune adjuvant that can induce such as T cell responses or induction of antibody-producing cells. However, the molecular mechanisms remain unclear. We have found that CTB, a subunit of CT, can induce IL-1 β production from lipopolysaccharide (LPS)-primed murine resident peritoneal macrophages. Our aim is to elucidate the molecular mechanism of this IL-1 β production. Transcriptome analysis revealed that CTB could strongly induce the expression of endoplasmic reticulum (ER) stress related genes. In this research, we clarified that the ER stress responses are involved in CTB-induced IL-1 β production.

研究分野：免疫学

キーワード：小胞体ストレス応答 コレラ毒素

1. 研究開始当初の背景

コレラ毒素 (Cholera toxin: CT) は、コレラ菌により産生されるタンパク複合体であり、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。CTB は、細胞膜面上の糖脂質ガングリオシド GM1 (以下、GM1) に結合し、CT を細胞内に導入する。細胞内に侵入した CT は逆行輸送経路により小胞体に到達し、そこで CT は CTB と CTA に解離し、CTA はさらにプロセシングされて CTA1 となり、細胞質に放出される。細胞質に放出された CTA1 は、細胞内 cAMP 濃度を上昇させ、下痢などの症状を引き起こすと考えられている。このように CT は、感染症コレラの病因物質として機能するが、同時に、様々な T 細胞応答や抗体産生を誘導するなど、免疫増強 (アジュバント) 活性を持つことも知られている。また、CTB も炎症性サイトカイン IL-6 などを産生誘導することが知られているが、CTB がどのような細胞に認識され、どのように免疫アジュバント活性を発揮するのかは詳しく知られていない。

2. 研究の目的

我々は、CTB が定常状態のマウス腹腔マクロファージに作用し、リポ多糖 (Lipopolysaccharide: LPS) と協調して炎症性サイトカイン IL-1 β の産生を誘導すること、この誘導に GM1 を介した CTB の細胞内侵入が必須であり、NLRP3 インフラマソームと Pypin インフラマソームの両方が関与することを報告した (Orimo et al. *Int Immunol*, 2019;31:657-668)。しかし、CTB がどのような機序でインフラマソームを活性化し、どのように IL-1 β の産生を誘導するのかは不明なままである。そこで本研究では、CTB による IL-1 β の産生誘導に関与する分子機序の解明を目指す。

3. 研究の方法

まず、腹腔マクロファージを LPS 単独または LPS と CTB で刺激し、CTB により誘導される遺伝子群の網羅的解析 (RNA シークエンス) を行う。次に、誘導される遺伝子群の発現が GM1 依存性かどうかを調べるため、GM1 欠損マクロファージを用いた解析を行う。また、CTB は GM1 を介して細胞内侵入後、ゴルジ体を経て小胞体 (Endoplasmic reticulum: ER) に到達することが知られているが、腹腔マクロファージにおける CTB の細胞内輸送経路はよくわかっていない。そこで、蛍光標識した CTB を用いて CTB の細胞内局在を解析し、その GM1 依存性を、GM1 欠損マクロファージを用いて解析する。さらに、CTB により誘導される遺伝子群が、IL-1 β の産生誘導に関与するかどうかを調べるため、種々の阻害剤を用いて検討する。

4. 研究成果

(1) CTB により誘導される遺伝子群の網羅的解析

RNA シークエンスの結果、LPS 存在下で、CTB の刺激で発現上昇する遺伝子が 510 個得られ、その中に小胞体ストレス応答に関与する遺伝子が数多く含まれていることが明らかになった。この結果から、CTB が小胞体ストレス応答を誘導することが示唆された。小胞体ストレスは、小胞体内に大量に蓄積された異常タンパク (unfolded protein) により引き起こされる。これらの異常タンパクは小胞体ストレスセンサー IRE1 α 、PERK、ATF6 により認識される。IRE1 α は RNA 分解活性があり、XBP1 の mRNA 前駆体をスプライシングして sXBP1 mRNA を生成し、これが転写因子 XBP1 となる。PERK は活性化すると ATF4 や CHOP といった転写因子を活性化させ、ATF6 は活性化するとプロテアーゼによる切断を受けた後、核内に移行して転写因子として機能する。これらの転写因子が、異常タンパクの修復や分解除去に関与する分子の発現を誘導する。この一連の応答は小胞体ストレス応答 (unfolded protein response: UPR) と呼ばれている。そこで、CTB による小胞体ストレス応答に、GM1 が必要かどうかを、GM1 欠損マウスを用いて検討した。野生型あるいは GM1 欠損マウス由来のマクロファージを LPS 単独または LPS と CTB で刺激し、細胞を回収し RNA シークエンスと RT-PCR を行った。RNA シークエンスの結果、野生型マクロファージにおいて CTB 刺激により小胞体ストレス応答遺伝子群の発現が誘導され、この誘導が GM1 欠損マクロファージでは消失した。また、RT-PCR の結果、野生型マクロファージにおいて CTB 刺激により XBP1 のスプライシングと CHOP の発現が誘導されたが、これらの誘導が GM1 欠損マクロファージでは全く認められなかった。これらの結果から、CTB は GM1 依存的に小胞体ストレス応答を誘導することが明らかになった。

(2) 腹腔マクロファージにおける CTB の細胞内輸送経路の同定

腹腔マクロファージにおける CTB の細胞内局在とその GM1 依存性を解析するため、野生型あるいは GM1 欠損マウス由来のマクロファージに FITC 標識 CTB を添加して培養後、細胞を回収して免疫組織化学染色法により検討した。その結果、野生型マクロファージにおいて CTB と IRE1 α の共局在が認められたが、GM1 欠損マクロファージではこの共局在は認められな

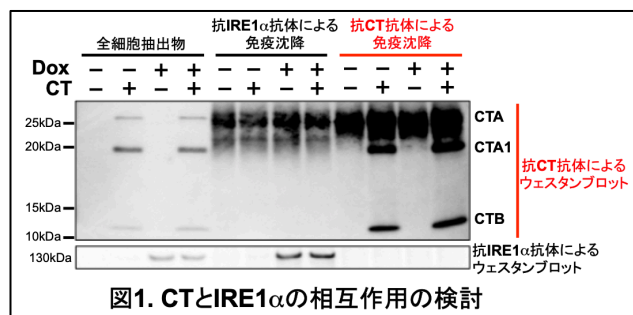
った。このことから、腹腔マクロファージにおいて CTB は GM1 を介して細胞内に侵入後、ER に到達することが示唆された。

(3) CTB による IL-1 β 産生誘導における小胞体ストレスセンサーの機能的意義

CTB による IL-1 β 産生誘導に、どの小胞体ストレスセンサーが関与するかを、各センサーの阻害剤を用いて検討した。まず IRE1 α の阻害剤 4 μ 8c について検討を行った。腹腔マクロファージにおいて、CTB 添加前に 4 μ 8c を加え、刺激後、細胞と培養上清を回収し、細胞は RNA を抽出後 RT-PCR を、培養上清は ELISA を行い、IL-1 β レベルを測定した。4 μ 8c 存在下では、CTB による XBP1 のスプライシングと IL-1 β 産生誘導の両方が有意に障害された。このことから、IRE1 α シグナルは CTB による IL-1 β 産生誘導に関与することが示唆された。同様に PERK や ATF6 についても、それぞれの阻害剤を用いて検討したが、PERK 阻害剤および ATF6 阻害剤存在下で、CTB による IL-1 β 産生誘導は障害されなかった。このことから、PERK も ATF6 も、CTB による IL-1 β 産生誘導に関与しないことが示唆された。

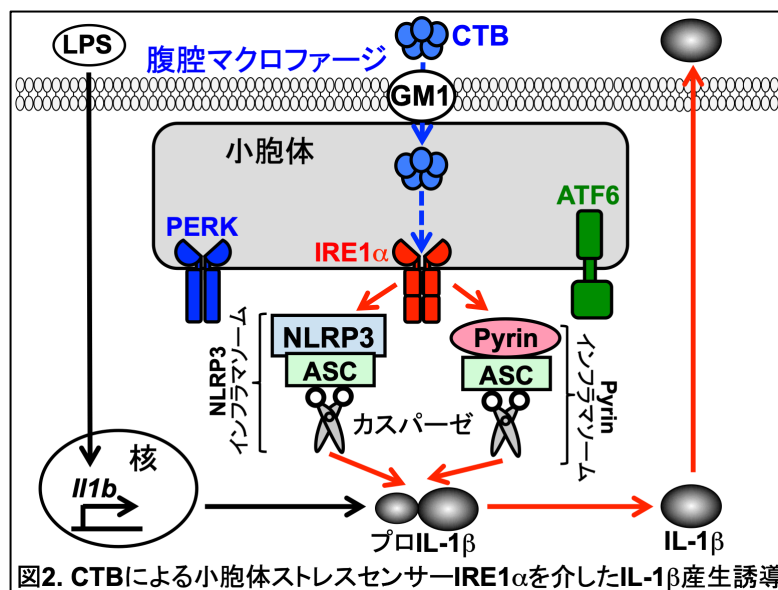
(4) CT と小胞体ストレスセンサー IRE1 α の相互作用の検討

最後に、CT が小胞体ストレスセンサー IRE1 α と結合するかどうかを、小胞体ストレスセンサー発現細胞株を用いて検討した。薬剤 (Doxycycline: Dox) により IRE1 α の発現を誘導できる腭 β 細胞株を用いて、CT と IRE1 α との相互作用を免疫沈降法により検討した。全細胞抽出物と比べ、抗 IRE1 α 抗体の免疫沈降により IRE1 α のバンドが濃縮され、抗 CT 抗体の免疫沈降により CTA1 および CTB のバンドが濃縮された (図 1)。このことから、抗 IRE1 α 抗体および抗 CT 抗体による免疫沈降は正しく機能していることがわかった。このとき、抗 IRE1 α 抗体の免疫沈降物中において、CTA1 や CTB のバンドは認められなかった。また、抗 CT 抗体の免疫沈降物中において、IRE1 α のバンドは認められなかった (図 1)。以上の結果から、この細胞株を用いた検討では、CT と IRE1 α との直接的な相互作用は認められなかった。



(5) 総括

本研究により、CTB は腹腔マクロファージに作用し小胞体ストレス応答を誘導すること、特に IRE1 α のシグナルが IL-1 β 産生誘導に必要であることが示唆された (図 2)。今後は、腹腔マクロファージにおいてどのように CTB が IRE1 α を活性化するのか、IRE1 α からどのような機序によりインフラマソーム活性化に繋がるのかを解明し、小胞体ストレスセンサーの新たな機能的意義を見出していきたい。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 T. Orimo, I. Sasaki, H. Hemmi, T. Ozasa, Y. Fukuda-Ohta, T. Ohta, M. Morinaka, M. Kitauchi, T. Yamaguchi, Y. Sato, T. Tanaka, K. Hoshino, K. I. Katayama, S. Fukuda, K. Miyake, M. Yamamoto, T. Satoh, K. Furukawa, E. Kuroda, K. J. Ishii, K. Takeda, T. Kaisho.	4. 巻 31
2. 論文標題 Cholera toxin B induces interleukin-1 production from resident peritoneal macrophages through the pyrin inflammasome as well as the NLRP3 inflammasome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 657 ~ 668
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxz004	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 I.Y. Mizumoto, H. Hemmi, M. Katsuda, M. Miyazawa, Y. Kitahata, A. Miyamoto, M. Nakamori, T. Ojima, K. Matsuda, M. Nakamura, K. Hayata, Y. Fukuda-Ohta, M. Sugiyama, T. Ohta, T. Orimo, S. Okura, I. Sasaki, K. Tamada, H. Yamaue, T. Kaisho.	4. 巻 122
2. 論文標題 Anticancer effects of chemokine-directed antigen delivery to a cross-presenting dendritic cell subset with immune checkpoint blockade	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1185 ~ 1193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-020-0757-2	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10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐々木泉、折茂貴是、邊見弘明、古川鋼一、改正恒康
2. 発表標題 コレラ毒素Bサブユニットは細胞内病原体センサーNLRP3とPyrinを介して炎症性サイトカインIL-1 の産生を誘導する
3. 学会等名 第29回 日本樹状細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木泉、折茂貴是、邊見弘明、土屋慧馬、井上正一、熊谷直光、古川鋼一、改正恒康
2. 発表標題 コレラ毒素Bサブユニットによる炎症性サイトカインIL-1 産生誘導機構
3. 学会等名 第26回 日本免疫毒性学会学術年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	田村志宣、山下友佑、折茂貴是、大田(福田)有里、小笹俊哉、中嶋一貴、金澤伸雄、邊見弘明、大島孝一、改正恒康、園木孝志
2. 発表標題	Lig4遺伝子改変マウスを用いた腸管免疫寛容破綻の病態解明
3. 学会等名	第47回 日本臨床免疫学会総会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	I. Sasaki, S. Morita, D. Okuzaki, T. Orimo, H. Hemmi, K. Furukawa, T. Kaisho.
2. 発表標題	Roles of endoplasmic reticulum stress in cholera toxinB-induced interleukine-1 production from resident peritoneal macrophages.
3. 学会等名	第48回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	I. Sasaki, T. Orimo, H. Hemmi, K. Furukawa, T. Kaisho.
2. 発表標題	Cholera toxin B can induce interleukine-1beta production from resident peritoneal macrophages in synergy with lipopolysaccharides.
3. 学会等名	第18回 あわじ感染と免疫国際フォーラム (The 18th Awaji International Forum on Infection and Immunity) (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	邊見弘明、折茂貴是、佐々木泉、加藤喬、大田(福田)有里、金城紀子、濱田聡、木下晃、吉浦孝一郎、大西秀典、金澤伸雄、改正恒康
2. 発表標題	Impaired development of myeloid cells in mice carrying a patient-derived proteasome subunit mutation.
3. 学会等名	第3回日本免疫不全・自己炎症学会総会・学術集会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名 10. 佐々木泉、折茂貴是、張江伊水、滝沢優子、古川綱一、改正恒康
2. 発表標題 The roles of unfold protein responses in cholera toxinB-induced interleukin-1 production.
3. 学会等名 第27回日本免疫毒性学会学術年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 11. 田中日尚子、林茉莉、加藤喬、折茂貴是、大田（福田）有里、西山奈央子、中井千尋、佐々木泉、改正恒康
2. 発表標題 遺伝性炎症性疾患COPA症候群の分子基盤の解明
3. 学会等名 第88回和歌山医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 12. 張江伊水、滝沢優子、加藤喬、折茂貴是、大田（福田）有里、西山奈央子、中井千尋、佐々木泉、改正恒康
2. 発表標題 遺伝性炎症性疾患COPA症候群のモデルマウスの樹立とその解析
3. 学会等名 第88回和歌山医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 13. 三並桃花、石田エヴァ如月、加藤喬、折茂貴是、大田（福田）有里、西山奈央子、中井千尋、佐々木泉、改正恒康
2. 発表標題 自然免疫応答における小胞体ストレスセンサー IRE1a の機能的意義
3. 学会等名 第88回和歌山医学会総会
4. 発表年 2020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
---------	---------