

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08458

研究課題名(和文) 形質細胞様樹状細胞の活性を制御する機能性単糖の開発

研究課題名(英文) Development of monosaccharides that regulate the functions of the plasmacytoid dendritic cells.

研究代表者

星野 克明 (Hoshino, Katsuaki)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：50324843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：D-グルコースの異性体である希少糖D-アロースが、サイトカイン産生(IFN- およびIL-12p40)を主とする形質細胞様樹状細胞(pDC)の機能を抑制することを発見した。D-アロースによる抑制メカニズムを調べた結果、細胞内シグナル伝達分子の活性化、および糖代謝系が抑制されていることを確認した。また、R848誘導型のSLE病態モデルマウスにD-アロースを投与すると、血清中の抗2本鎖DNA抗体価が低下する傾向を示した。D-アロースはpDCの機能を抑制することで、SLEモデルの病態形成に対し保護的に働くと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫細胞に対する希少糖D-アロースの作用を初めて報告した。D-アロースは、形質細胞様樹状細胞のサイトカイン産生を著しく抑制する効果を有する。全身性エリテマトーデスに代表される自己免疫疾患では、形質細胞様樹状細胞によるインターフェロン- 産生の亢進が病態を悪化させる一因となっている。D-アロース標品の使用、および作用メカニズムの解明は、形質細胞様樹状細胞を標的とする新しい治療手段の開発に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The rare sugar D-allose, a C-3 epimer of D-glucose, was found to inhibit the function of plasmacytoid dendritic cells (pDCs), which are primarily responsible for the production of cytokines such as IFN- and IL-12p40. We investigated the inhibitory mechanism of D-allose and found that activation of intracellular signaling molecules and glycolytic pathway were downregulated. In addition, treatment of R848-induced SLE model mice with D-allose tended to reduce the titer of anti-double-stranded DNA antibodies in serum. These results suggest that D-allose may have a protective effect against the pathogenesis of the SLE model by suppressing pDC function.

研究分野：免疫学

キーワード：希少糖 形質細胞様樹状細胞 サイトカイン 自己免疫疾患 単糖 糖代謝

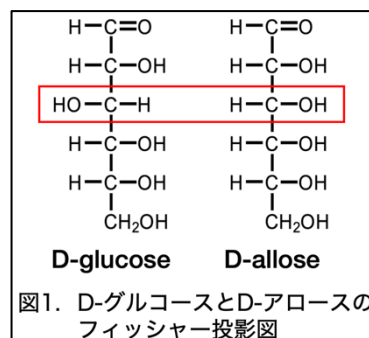
様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

形質細胞様樹状細胞 (pDC) は、微生物あるいは自己の核酸により活性化されると、極めて多量の I 型インターフェロン (IFN) を産生する機能を有する。この I 型 IFN 産生は、ウイルスなどの感染時に生体防御反応として機能する。その一方で、この I 型 IFN 産生は、全身性エリテマトーデス (SLE) や尋常性乾癬に代表される、自己免疫疾患の病態形成にも関わっている。pDC の I 型 IFN 産生を誘導するメカニズムが、明らかにされてきた。pDC に発現している Toll 様受容体 (TLR7, TLR9) が核酸を認識すると、細胞内に活性化シグナルが入力される。そのシグナルは、アダプター分子 (MyD88, IRAK1 など) を介して、最終的に転写因子 (IRF-7, NFATC3) を活性化させる。続いて、これら転写因子は核内に移行し、I 型 IFN 遺伝子の転写活性化を誘導する。申請者らは、I κ B キナーゼ α が pDC の I 型 IFN 産生に必須であることを世界に先がけて報告した (Hoshino et al. Nature 440, 949-53, 2006)。I κ B キナーゼ α は IRF-7 をリン酸化して活性化する役割を持つことを示した、また、pDC に強く発現している転写因子 Spi-B が、IRF-7 による I 型 IFN 遺伝子の転写活性化を相乗的に増強することを明らかにした (Sasaki, Hoshino et al. Blood 120, 4733-43, 2012)。さらに、IFN- α 4 遺伝子プロモーター領域に Spi-B が結合する位置を特定し、Spi-B と転写コアクチベーター-p300 の結合が、IFN- α 4 遺伝子の転写活性化を相乗的に増強するために必要であることを明らかとした (Miyazaki, Hoshino et al. BBRC 525, 477-82, 2020)。

上述の自己免疫疾患に対する治療手段として、ステロイド薬が使用されている。ステロイド薬による治療は有効であるが、多くの細胞や組織がステロイド薬により影響を受けるため、副作用に対する注意が必用である。一方、pDC の I 型 IFN 産生を抑える方法は、既存の治療法と比較すると、標的細胞への選択性が高いため副作用も限定的であると考えられる。故に、pDC の I 型 IFN 産生メカニズム解明は、pDC を標的とする新しい治療手段の開発に繋がると考える。I 型 IFN 産生誘導にかかわる分子群が明らかにされてきたが、これらの分子は pDC 以外の細胞でも機能しているため、pDC 選択的な治療手段のターゲットになり得ない状況であった。

申請者は、香川大学が開発した機能性単糖 (希少糖と命名) を用いて、樹状細胞の反応を調べていた。予備実験において、D-グルコースの C-3 位エピマーである希少糖 D-アロース (図 1) が pDC の TLR7/9 刺激によるサイトカイン (IFN- α , IL-12p40) 産生を著しく低下させることを発見した。一方、pDC とは異なる機能を持つ通常樹状細胞 (cDC) の場合は、TLR 刺激によるサイトカイン (TNF- α , IL-12p40) 産生は、D-アロースによって低下しなかった。同様に、マウス腹腔内マクロファージの TLR 刺激による TNF- α 産生も、D-アロースによって低下が見られなかった。このような背景から、D-アロースが pDC 選択的にサイトカイン産生を抑制するメカニズムを解明する研究を計画した。



2. 研究の目的

SLE などの自己免疫疾患では、pDC が自己の核酸により活性化され、I 型 IFN を多量に産生している。この I 型 IFN 産生が、自己免疫疾患の病態を悪化させる一因となっている。そのため、pDC の I 型 IFN 産生だけを制御することが、疾患に対する新しい治療手段になると考えた。本研究では、pDC のサイトカイン産生を選択的に抑制する効果を持つ、D-アロースの作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。本メカニズムの解明は、新しい治療手段を開発するために必須である。さらに、動物モデルにおいて、D-アロースが免疫機能調整剤として機能するか検討する。本研究により、pDC 機能の亢進が見られる自己免疫疾患に対し、D-アロースを用いて pDC の機能制御を行うなど、pDC を標的とする新しい治療手段の探索・開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) D-アロースが pDC のサイトカイン産生を抑制する分子メカニズムを明らかにする。

マウス骨髓細胞を *in vitro* で分化させた骨髓由来樹状細胞から pDC を単離して用いた。pDC が TLR7/9 リガンドを細胞外からエンドソーム内に取り込み、TLR7/9 によって認識するまでの過程で D-アロースが作用しているか調べた。続いて、TLR7/9 リガンド刺激の入力により誘起される、細胞内シグナル伝達分子のリン酸化が、D-アロースにより阻害されるか調べた。

(2) マウス個体における D-アロースの pDC に対する作用の検証。

D-アロースをマウスに投与し、その直後に pDC を刺激するために 1 本鎖 RNA を静脈内投与した。経時的に血清中の IFN- α と IL-12p40 レベルを ELISA で測定し、pDC 活性化の指標となるサイトカイン産生が、D-アロース投与により低下するか調べた。

(3) マウス病態モデルを用いて、D-アロースの免疫機能制御剤としての作用を検討する。

マウスに R848 を投与することで誘導する SLE 病態モデルを用いた。病態を誘導する時に D-アロースを腹腔内投与し、D-アロースが病態の進行に対し保護的に働くか調べた。検査項目として、血清中の抗二本鎖 DNA 抗体濃度、尿中タンパク質濃度、腎糸球体の組織像、脾臓の組織像、肝臓の組織像、肺の組織像を解析した。

4. 研究成果

(1) D-アロースは pDC のサイトカイン産生を抑制する。

マウス樹状細胞の培養液として、0.2% (w/v) D-グルコース、あるいは 0.2% (w/v) D-アロースを添加した RPMI1640 培養液を用いた。TLR7 リガンド (PolyU と Lipofectamine 2000 の複合体)、および TLR9 リガンド (CpG DNA D19 および ODN1668) で pDC を刺激し、24 時間後に培養上清中の IFN- α 、および IL-12p40 濃度を ELISA 法で測定した。その結果、D-アロースを含む培養液中で、これらサイトカイン産生が著しく減弱した (図 2)。一方、別の TLR7 リガンド (R848, Gardiquimod, Loxoribine) で刺激した場合は、これらのサイトカイン産生は減弱しなかった。また、CpG DNA D19 および PolyU 刺激により誘起される CD86 発現の亢進も、D-アロースを含む条件では減弱していた。

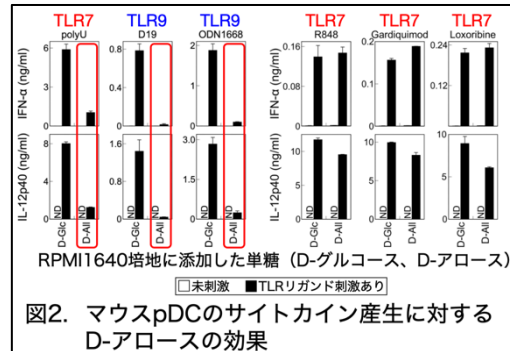


図2. マウスpDCのサイトカイン産生に対するD-アロースの効果

D-アロースによる pDC のサイトカイン産生低下について、細胞死が原因であるか調べるために、樹状細胞を PolyU で刺激後にフローサイトメトリー解析した。その結果、D-アロースを添加した培養液でも、D-グルコースと同様の割合で pDC が見られた (図 3)。これらの結果から、pDC のサイトカイン産生低下は、D-アロースによる細胞死が主たる原因でないことが考えられた。

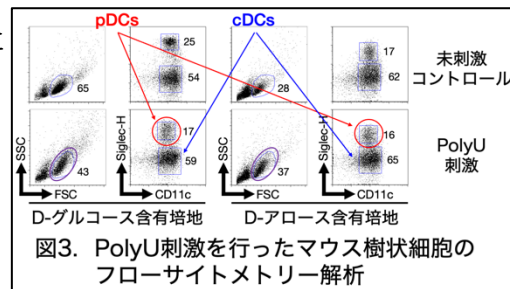


図3. PolyU刺激を行ったマウス樹状細胞のフローサイトメトリー解析

TLR7/9 は pDC のエンドソーム膜上に局在しているため、TLR リガンドは細胞内に取り込まれる必要がある。D-アロースが、TLR リガンドの pDC 細胞内への取り込みを抑制しているか調べた。Cy5 標識した CpG DNA D19 をトレーサーとして用い、細胞内への蛍光物質の取り込みをフローサイトメトリー解析した。37°C 処理で見られる細胞内への Cy5 の取り込みは、D-アロースを含む条件でも低下しなかった (図 4)。D-アロースは、CpG DNA が細胞内に取り込まれた後に、何らかの阻害効果を発揮することが示唆された。

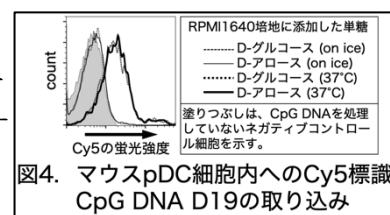


図4. マウスpDC細胞内へのCy5標識CpG DNA D19の取り込み

続いて、TLR7/9 がリガンドを認識した後で生じる、細胞内シグナル伝達分子の活性化を解析した。pDC を刺激後に経時的に細胞溶解物を作成し、NF- κ B、および MAPK ファミリーのリン酸化をウエスタンブロット解析した (図 5)。D-グルコースを含む培養液では、CpG DNA D19 刺激により、Erk1/2、SAPK/JNK、p38 MAPK のリン酸化が生じた。しかし、D-アロースを含む培養液では、D19 刺激により生じる MAP キナーゼファミリーのリン酸化が減弱していた。MAPK ファミリーとは異なり、NF- κ B p65 のリン酸化は D-アロースを含む培養液でも、D-グルコースを含む条件と同じレベルで認められた。同様の反応は、PolyU 刺激を行ったケースでも認められた。一方で、D-アロースによるサイトカインの産生低下が認められない R848 刺激を行った場合は、MAPK ファミリーのリン酸化の減弱は見られなかった。これらの結果から、①D-アロースがあ

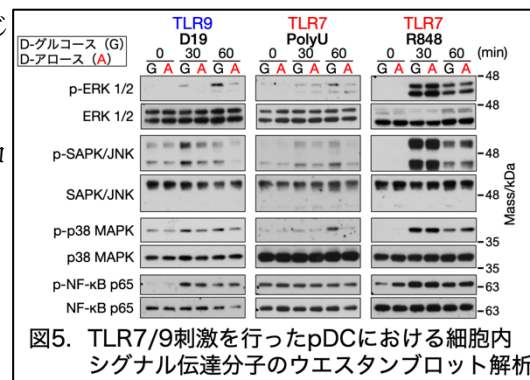


図5. TLR7/9刺激を行ったpDCにおける細胞内シグナル伝達分子のウエスタンブロット解析

る条件でも TLR7/9 シグナルが入力されていること、②MAPK ファミリーのリン酸化レベルの低下と、pDC のサイトカイン産生低下に相関関係があることが明らかとなった。

続いて、MAPK ファミリーのリン酸化減弱とサイトカイン産生低下の因果関係について調べた。各種 MAP キナーゼ阻害薬を加えた条件で pDC を刺激し、培養上清中のサイトカイン濃度を測定した結果、p38 MAPK 阻害剤が濃度依存的に pDC のサイトカイン産生を抑制することが明らかとなった。D-アロースによる MAPK のリン酸化阻害メカニズム解析が、今後の課題である。

(2) マウス個体における D-アロースの pDC に対する作用の検証。

C57BL/6N マウスに D-アロースを投与した後で PolyU を静脈内投与し、経時的に採血した。血清中の IFN- α 濃度を測定したが、IFN- α 濃度の低下は見られなかった。D-アロースの投与方法（腹腔内投与、静脈内投与）を変えても、D-アロース投与から PolyU 投与までの時間を変化させても（60 分、数分）、血清中 IFN- α 濃度の低下は見られなかった。本マウスモデルにおいて D-アロースの pDC に対する反応を見ることは困難である。マウス体内における D-アロースの動態などを調べるなど、新たな検討が必要である。

(3) マウス病態モデルを用いて、D-アロースの免疫機能制御剤としての作用を検討する。

C57BL/6N マウスの左耳に、4 週間継続して R848 を塗布することで SLE 病態モデルを作成した。病態の誘導時に D-アロースを投与したマウスでは、血清中の抗 2 本鎖 DNA 抗体価が、コントロールと比較して低下する傾向であった。D-アロースは SLE モデルの病態に対し保護的に働くと考えられたが、マウス個体数を増やして再検討が必用である。各臓器の組織像は解析中である。また、本実験で使用したマウス系統は、多くの遺伝子欠損マウス系統の遺伝的背景となっている C57BL/6N を使用した。本系統は、R848 処理によりマクロファージ活性化症候群 (MAS) 様の症状を引き起こす事が報告されている。SLE 病態モデルを解析するために、BALB/c 系統を用いて再検証が必用である。

(4) D-アロースによる pDC の代謝変化

D-アロースによる pDC の代謝変化を細胞外フラックスアナライザーで解析した。D-アロース存在下では pDC の解糖系が著しく低下し、かつ、ミトコンドリアの酸素消費速度が約 20% 低下する結果を得た。また、pDC の ATP 量を定量した結果、D-アロース存在下では ATP 量が経時的に減少していた。D-アロースによる pDC のサイトカイン産生低下の一因に、ATP 量の低下も関連することが示された。D-アロースによるミトコンドリアの機能抑制メカニズムについても、既知のミトコンドリア阻害剤等を用いる解析が必用である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takao Kenjiro, Suzuki Makiko, Miyazaki Ryo, Miyake Minoru, Akimitsu Kazuya, Hoshino Katsuaki	4. 巻 627
2. 論文標題 Immunomodulatory effects of D-allose on cytokine production by plasmacytoid dendritic cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 130 ~ 136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.08.037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Onishi Keisuke, Fu Hai Ying, Sofue Tadashi, Tobiume Atsushi, Moritoki Masahiro, Saiga Hiroyuki, Ohmura-Hoshino Mari, Hoshino Katsuaki, Minamino Tetsuo	4. 巻 26
2. 論文標題 Galectin-9 deficiency exacerbates lipopolysaccharide-induced hypothermia and kidney injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 226 ~ 233
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10157-021-02152-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saiga Hiroyuki, Ueno Masaki, Tanaka Takashi, Kaisho Tsuneyasu, Hoshino Katsuaki	4. 巻 34
2. 論文標題 Transcription factor MafB-mediated inhibition of type I interferons in plasmacytoid dendritic cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 159 ~ 172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxab103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Horiuchi Shu, Koike Takuya, Takebuchi Hirofumi, Hoshino Katsuaki, Sasaki Izumi, Fukuda-Ohta Yuri, Kaisho Tsuneyasu, Kitamura Daisuke	4. 巻 14
2. 論文標題 SpiB regulates the expression of B-cell-related genes and increases the longevity of memory B cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2023.1250719	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Rahman S. M. Khaledur, Sasaki Sumire, Uyama Toru, Hussain Zahir, Sikder Mohammad Mamun, Saiga Hiroyuki, Ohmura Hoshino Mari, Ohta Ken ichi, Miki Yoshimi, Hoshino Katsuaki, Ueno Masaki, Murakami Makoto, Ueda Natsuo	4. 巻 37
2. 論文標題 <scp>PLAAT1</scp> deficiency alleviates high fat <scp>diet induced</scp> hepatic lipid accumulation in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202201033R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Katsuaki Hoshino, Kenjiro Takao, Makiko Suzuki, Minoru Miyake and Kazuya Akimitsu
2. 発表標題 Immunomodulatory effects of D-allose on the function of plasmacytoid dendritic cells
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Katsuaki Hoshino, Kenjiro Takao, Makiko Suzuki, Minoru Miyake and Kazuya Akimitsu
2. 発表標題 Immunomodulatory effects of D-allose on the function of plasmacytoid dendritic cells
3. 学会等名 Rare Sugar Congress 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 D - アロースを有効成分として含む、サイトカインの産生を抑制するための組成物、及びそれを用いたサイトカインの過剰生産に関連する疾患を治療又は予防する方法	発明者 星野克明、高尾健二 郎、何森健	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/009524	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------