

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：16201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670460

研究課題名(和文) 樹状細胞の小胞輸送を標的とした抗炎症薬の開発

研究課題名(英文) Development of anti-inflammatory drugs by targeting vesicular traffic in dendritic cells

研究代表者

門脇 則光 (Kadowaki, Norimitsu)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：60324620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：形質細胞様樹状細胞(pDC)は、取り込んだDNAをToll-like receptor 9 (TLR9)で感知し、莫大な量のインターフェロン(IFN)-alphaを産生して、自己免疫性・炎症性疾患を引き起こす。広汎なキナーゼを阻害する薬剤ダサチニブはpDCのIFN-alpha産生を抑制する。その責任キナーゼと基質を同定するために、標的キナーゼがわかっているさまざまなキナーゼ阻害剤の添加とキナーゼmRNAのノックダウンにてLIMK1, TESK1, RIPK2の3つまで候補キナーゼを絞り込んだ。

研究成果の概要(英文)：Plasmacytoid dendritic cells (pDC) produce a vast amount of IFN-alpha by recognizing exogenous DNA through TLR9, and provoke autoimmune and inflammatory disorders. A multi-kinase inhibitor dasatinib suppresses the IFN-alpha production by pDC. To identify the responsible kinases and their substrates, we used various kinase inhibitors and mRNA knockdown, and selected 3 kinases as candidate kinases.

研究分野：血液学、免疫学

キーワード：樹状細胞

### 1. 研究開始当初の背景

形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid dendritic cells; pDC)は、エンドサイトーシスで取り込んだ核酸を早期エンドソームの長時間滞留させるという際だった特徴をもつ。これにより早期エンドソームの核酸受容体 Toll-like receptor 7 (TLR7), TLR9 にシグナルを入れ続け、莫大な量のインターフェロン (IFN)-alpha を産生する。そして、この IFN-alpha がいくつかの自己免疫性・炎症性疾患を引き起こすことが報告されている。したがって、pDC における核酸の早期エンドソームへの滞留は、抗炎症薬開発の新たな標的となり得る。

われわれは、広汎なキナーゼを阻害する薬剤ダサチニブが pDC における核酸の早期エンドソームへの滞留を阻害し、IFN-alpha 産生を抑制することを見いだした。このことから、pDC 内の特異な小胞輸送(早期エンドソームへの滞留)を起こすキナーゼが抗炎症薬の標的になり得る。

### 2. 研究の目的

- (1) DNA を pDC のエンドソームに滞留させる責任キナーゼを、キナーゼに対する siRNA ライブラリまたは複数のキナーゼ阻害剤を用いて同定する。
- (2) このキナーゼの基質をリン酸化プロテオーム解析により同定する。

以上により、pDC に起因する炎症性疾患の新たな創薬標的を見いだすとともに、小胞輸送に働く新規の分子メカニズムを明らかにし、細胞生物学上の新知見を得ることを目指す。

### 3. 研究の方法

ダサチニブは、pDC に発現する何らかのキナーゼを阻害することにより、CpG DNA の早期エンドソームへの滞留を阻害し、IFN-alpha の産生を抑制する。

この早期エンドソーム滞留シグナルの経路を阻害するためには、酵素(キナーゼ)、基質(リン酸化蛋白)という2つの標的がある。ダサチニブは多数のキナーゼ(主としてチロシンキナーゼ、一部セリン・スレオニンキナーゼ)を阻害することから、きわめて多くのリン酸化基質があり、しかもその大部分が機能不明と考えられるため、最初に基質を標的にすると候補を絞り込めない可能性が高い。したがって、まず pDC による IFN-alpha の産生に必要なキナーゼを絞り込む。そのときに用いる細胞として、ヒト末梢血 pDC はきわめて少数(末梢血単核球の 0.1-0.5%)で、解析に十分な数得るのが不可能であることから、pDC 細胞株が必要になるが、最近われわれは、pDC 白血病患者から細胞株 P716 を樹立した。これまで3つのヒト pDC 細胞株が報告されているが、いずれも IFN-alpha 産生能をほとんど失っている。これに対し、P716 は primary pDC と同様の高い

IFN-alpha 産生能を保持しており、世界で唯一の IFN-alpha 高産生性 pDC 細胞株である。この細胞株を用いる点が本研究で絶対的に有利な点である。

この細胞株を用いて、以下の事項を解析する。

- (1) CpG DNA 刺激を受けた pDC が IFN-alpha を産生する際に必要なキナーゼを、ヒトキナーゼに対する siRNA ライブラリまたは複数のキナーゼ阻害剤を用いて網羅的に検索する。
- (2) そのうち pDC に発現特異性が高く、しかも CpG DNA の早期エンドソームへの滞留に必要なキナーゼを siRNA によるロックダウンで同定する。
- (3) 上記キナーゼの基質をリン酸化プロテオーム解析にて同定することにより、pDC における CpG DNA の早期エンドソームへの滞留を引き起こすシグナル経路を明らかにする。

以上の実験により、pDC 関連炎症に対する創薬の標的キナーゼを見いだすとともに、小胞輸送の新規分子メカニズムという細胞生物学的新知見を得る。

### 4. 研究成果

ダサチニブが pDC による IFN-alpha の産生を阻害する際の責任キナーゼを絞り込むために、さまざまなキナーゼ阻害剤の存在下にヒト pDC 腫瘍由来細胞株 P716 を CpG DNA で刺激し、培養上清の IFN-alpha を ELISA にて測定した。まず、キナーゼを SFK と non-SFK に分けて考えた。ダサチニブで強く抑制されるキナーゼのうち、SFK、及びイマチニブ・ニロチニブで阻害されないキナーゼのうち、5種類以上を阻害する阻害剤として、EGFR/ErbB-2/ErbB-4 inhibitor (HDS 029), Gö6976, Cdk1/2 inhibitor III, GSK3beta inhibitor XII (TWS119), EXEL-2880/GSK-1363089 (Foretinib), Staurosporine の6つのキナーゼ阻害剤を選択した。これらの阻害剤を用い、候補キナーゼを35に絞り込んだ。そのうち、ダサチニブによる阻害程度が強いと報告されている、pDC に強く発現する、小胞輸送に重要なアクチン重合に関連すると報告されている、という基準で、候補キナーゼを11に絞り込んだ。さらに、これらのキナーゼを siRNA でロックダウンし IFN-alpha 産生が低下するキナーゼとして、TESK1, LIMK1, RIPK2 の3つを同定した。

### 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8件)

1. 門脇則光: がん分子標的療法と免疫療法の融合 癌と化学療法 42 (9): 1046-1049, 2015. 査読無
2. 門脇則光: ヒト樹状細胞による免疫制御。

Cytometry Research 25 (1): 7-12, 2015. 査読有

3. 門脇則光：レチノイン酸を高産生するヒト樹状細胞の同定。医学のあゆみ 251 (11): 1075-1076, 2014. 査読無
4. 門脇則光：慢性骨髄性白血病に対する分子標的薬による免疫制御 特集「免疫制御によるがん治療」血液フロンティア 24 (11): 39-43, 2014. 査読無
5. 門脇則光：慢性骨髄性白血病に対する分子標的薬による免疫制御 特集「免疫制御によるがん治療」血液フロンティア 24 (11): 39-43, 2014. 査読無
6. Sato T, Kitawaki T, Fujita H, Iwata M, Iyoda T, Inaba K, Ohteki T, Hasegawa S, Kawada K, Sakai Y, Ikeuchi H, Nakase H, Niwa A, Takaori-Kondo A, Kadowaki N. Human CD1c<sup>+</sup> myeloid dendritic cells acquire a high level of retinoic acid-producing capacity in response to vitamin D<sub>3</sub>. J Immunol. 191 (6): 3152-3160, 2013. 査読有 DOI: 10.4049/jimmunol.1203517
7. Fujita H, Kitawaki T, Sato T, Maeda T, Kamihira S, Takaori-Kondo A, Kadowaki N. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib suppresses cytokine production by plasmacytoid dendritic cells by targeting endosomal transport of CpG DNA. Eur J Immunol. 43(1): 93-103, 2013. 査読有 DOI: 10.1002/eji.201242699
8. 門脇則光：樹状細胞 特集「自己免疫疾患・アレルギー疾患（前篇）免疫の基礎、検査、治療」最新医学 68 (3月増刊号) : 502-512, 2013. 査読無

〔学会発表〕(計9件)

1. 門脇則光：がん分子標的療法と免疫療法の不思議な邂逅。ランチョンセミナー2、第74回日本癌学会学術総会、名古屋、2015年10月8-10日(招待講演)
2. 門脇則光：がん免疫療法の進歩。特別講演、第59回日本輸血・細胞治療学会近畿支部総会、枚方、2015年10月28日(招待講演)
3. 門脇則光：がん分子標的治療薬による免疫修飾。シンポジウム3「がん免疫療法 Update ~進む臨床応用と併用療法への視点~」第19回日本がん分子標的治療学会学術集会、松山、2015年6月10-12日(招待講演)
4. 門脇則光：がん分子標的療法と免疫療法の融合。シンポジウム2「基礎と臨床の融合」第27回日本バイオセラピー学会学術集会、大阪、2014年12月5日(招待講演)
5. Sato T, Kitawaki T, Fujita H, Iwata M, Iyoda T, Inaba K, Ohteki T, Takaori-Kondo A, Kadowaki N.

Human CD1c<sup>+</sup> myeloid dendritic cells acquire a high level of retinoic acid-producing capacity in response to vitamin D<sub>3</sub>. 13<sup>th</sup> International Symposium on Dendritic Cells, Tours, France, September 14-18, 2014.

6. 門脇則光：低分子化合物の樹状細胞に対する作用。専門スタディーフォーラム「樹状細胞・マクロファージ」第42回日本臨床免疫学会総会、東京、2014年9月25日~27日(招待講演)
7. 門脇則光：ヒト樹状細胞による免疫制御。シンポジウム「免疫の話題・樹状細胞」第24回日本サイトメトリー学会学術集会、枚方、2014年6月28, 29日(招待講演)
8. 佐藤貴之、北脇年雄、藤田晴之、岩田 誠、伊豫田智典、稲葉カヨ、榑木俊駿、長谷川 傑、河田健二、坂井義治、池内浩基、高折晃史、門脇則光：ビタミンD刺激によってレチノイン酸を高産生するヒト樹状細胞の同定、第17回日本がん免疫学会総会、宇部、2013年7月3-5日
9. Sato T, Kitawaki T, Fujita H, Iwata M, Iyoda T, Inaba K, Ohteki T, Takaori-Kondo A, Kadowaki N. Identification of human dendritic cells producing a high level of retinoic acid. The 4<sup>th</sup> JSH International Symposium 2013, Matsuyama, May 24-25, 2013.

〔図書〕(計1件)

1. Kadowaki N. The vesicular traffic system in plasmacytoid dendritic cells as a target for immune regulation. In Inflammation and Immunity in Cancer. Seya T, Matsumoto M, Udaka K, Sato N, eds. Springer Japan, Tokyo, pp. 145-158, 2015.

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://kagawa-ichinai.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

門脇 則光 (KADOWAKI, Norimitsu)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：60324620

(2) 研究分担者

研究者番号：

(3) 連携研究者

石濱 泰 (ISHIHAMA, Yasushi)

京都大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：30439244