

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870851

研究課題名(和文)TLR9シグナルの新規制御分子Sortilinの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of Sortilin in innate immune cells

研究代表者

和田 俊樹(矢部俊樹)(YABE-WADA, Toshiki)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：10451634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：形質細胞様樹状細胞(pDC)は、細菌やウイルス感染時に多量のI型インターフェロン(IFN)産生を行う免疫細胞である。我々は、DNAマイクロアレイ解析から見出したSortilinの免疫細胞における機能の解明を通し、pDCによるI型IFN産生機構の解明を目指した。種々の解析の結果、NGF- やIFN- に加えて、IFN- やIL-6とSortilinが結合し、ノックダウンによってIFN- の分泌が顕著に減少した。このことから、SortilinはpDCにおいてIFN- の細胞外への輸送に重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) are bone marrow-derived cells that sense viruses through Toll-like receptor 9 (TLR9) and TLR7, and secrete large amounts of type I interferon (IFN) in response to viruses. It is known that abnormal activation of pDCs causes several human pathologies, such as systemic lupus erythematosus. Here we report that Sortilin functions as cytokine carrier in pDCs. Knockdown of Sortilin in pDC indicated reduction of IFN- secretion, while IFNA2 transcription activity was not influenced by knockdown. Our findings suggest that Sortilin is involved in exocytic trafficking of IFN- in pDC.

研究分野：機能生物化学

キーワード：自然免疫 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

ウイルスや細菌などの外来性抗原に対する生体の防御システムである免疫機構は、マクロファージや好中球を主体とする前感作なしに反応する自然免疫と、B細胞やT細胞などリンパ球を主体とする抗原特異的な応答を行う獲得免疫の2つに大別される。本研究でとりあげるpDCは、ウイルス排除に必須なサイトカインとして知られているI型IFN産生の大部分を担っているDC分画である¹⁾。pDCは、ウイルスや細菌に多く含まれる非メチル化CpG-DNA配列を認識するTLR9を高発現し、細胞内に取り込まれたりリガンドをすぐに分解せず、TLR9と共にエンドソーム内に長く留まらせることでI型IFNを高産生するという特徴をもつ²⁾。

pDCによるI型IFN産生機構は、ウイルス感染防御において重要な役割を果たす一方、その機構の詳細は未だ不明な点が多い。最近では、Solute carrier familyの一つであるSlc15a4の変異マウスのpDCでI型IFN産生が低下することが報告された³⁾。また、アダプター蛋白質のAP-3やPLSCR1によるTLR9の細胞内局在制御が、I型IFN産生に重要であることも報告された^{4,5)}。一方で、細胞外に存在する非メチル化CpG-DNAを細胞表面にて認識する受容体は同定されておらず、TLR9へCpG-DNAを運び込む機構に関しても未だ不明な点が多い。マクロファージにおいては、分泌蛋白質であるProgranulinが細胞外に存在するCpG-DNAと結合し、TLR9へ輸送するキャリアとして機能することが報告されている⁶⁾。しかしながら、Progranulin-CpG-DNA複合体の細胞内への取り込み機構やpDCにおけるProgranulinの役割は不明である。

MHCクラスI分子をリガンドとする免疫グロブリン様受容体PIR-Bは、DCやマクロファージ、好中球のエフェクター機能を抑制する抑制型受容体である⁷⁻⁹⁾。最近我々は、PIR-B欠損(*Pirb*^{-/-})マウスの脾臓pDCでは、CpG-DNA刺激によるIFN- α 産生が亢進することを見いだした(発表論文1)。またPIR-Bの細胞内領域に会合して働く脱リン酸化酵素SHP-1の変異マウス、*motheaton viable* (me/v) マウスのpDCでも同様の所見が得られている(未発表)。一方、活性化型受容体に会合する膜サブユニット分子、Fc受容体 γ 鎖およびDAP12もTLR9のシグナルを抑制することが、他の研究グループによって報告されている¹⁰⁾。これらの事実は、pDCのエフェクター機能が、抑制型受

容体と活性化受容体の双方によって制御される可能性を示唆している。

本知見から、*Pirb*^{-/-}、*Dap12*^{-/-}およびme/v由来のpDCで共通して発現変動している遺伝子には、pDCにおけるI型IFN産生に関わるものが多数含まれると予想される。そこでDNAマイクロアレイ解析を行い、*Pirb*^{-/-}、*Dap12*^{-/-}およびme/v由来のpDCに共通して発現量に変動している約50種の遺伝子を見出した。見出した遺伝子の中にはIFN産生への関与が想定されていなかった遺伝子も多数含まれていたため、これらの遺伝子を対象としてsiRNAによるスクリーニングを試みた。その結果、SortilinのノックダウンによってpDCでのCpG-ODN刺激によるIFN- α の産生が減少することを見出した。Sortilinは、細胞外領域に様々な蛋白質と会合し、会合した蛋白質の細胞内局在を制御する膜蛋白質として知られ、先に述べたProgranulinとも会合することが示されている^{11,12)}。このことから、SortilinはProgranulinとCpG-DNAの複合体を細胞表面で認識しTLR9が局在するエンドソームへ輸送する可能性が推察される。

2. 研究の目的

本研究では、DNAマイクロアレイ解析によって見出したSortilinがTLR9シグナルにおけるCpG-DNA受容体として機能するかを明らかにする。また、トランスクリプトーム解析によるI型IFN産生に関わる新規因子の同定も試み、TLR9シグナル制御機構の詳細を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、上記目的を達成するため、以下の実験を行った。

(1) SortilinのTLRシグナルにおける機能解析

SortilinのTLR9シグナルにおける役割を明らかにするため、Sortilinノックダウンによるサイトカイン産生に与える影響を、骨髄から分化誘導したpDCで検証した。siRNAを用いてSortilinをノックダウン後、細胞に対してCpG-DNAで刺激を行い、IFN- α などのサイトカイン産生量をqPCRおよびELISAで測定することによって検証した。また、表面プラズモン共鳴によるSortilinと結合する分子との相互作用解析を行った。

(2) Sortilinと会合する分子の探索

Sortilinは、AP-1やAP-2などの小胞輸送ア

ダプター蛋白質と共同して Solute carrier protein の GLUT4 の細胞内局在を制御する¹¹⁾。pDC においても Solute carrier protein の Slc15a4 が I 型 IFN 産生に重要である³⁾ことから、Sortilin が Slc15a4 の細胞内局在を制御している可能性がある。そこで、Sortilin がマクロファージや pDC において、Slc15a4 及びそのパラログである Slc15a3 と会合するか、免疫沈降解析によって検討を行った。CpG-DNA 刺激の有無によって会合状態が変化するかどうかについても検討を行った。

(3) トランスクリプトーム解析による I 型 IFN 産生に関わる新規因子の同定

I 型 IFN 産生に関わる新規因子の同定を行なうため、次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析を行った。マウス骨髄より pDC を培養し、CpG-DNA の刺激前後の pDC から mRNA を精製した。精製した試料を用いて mRNA-seq を次世代シーケンサーで行い、pDC で発現している全ての mRNA の発現量を定量した。得られたデータを用いて CpG-DNA の刺激前後での mRNA 発現量を比較し、発現変動している遺伝子をリスト化すると同時に、qPCR での発現確認も行った。

4. 研究成果

(1) Sortilin の TLR シグナルにおける機能解析

B6 マウス及び *Pirb*^{-/-} マウス由来 pDC より RNA を調整し、DNA マイクロアレイ解析によって発現変動が確認された遺伝子に関して qPCR 解析を行い、DNA マイクロアレイ解析と同様に *Pirb*^{-/-} にて mRNA 量が変動していることを確認した。次に、DNA マイクロアレイ解析及び qPCR 解析から *Pirb*^{-/-} マウスの pDC で発現変動していた遺伝子、Sortilin を siRNA でノックダウンさせ、CpG-ODN 刺激による IFN- α の産生への影響を、ELISA 及び qPCR 解析によって検討した。結果、ノックダウンによって pDC での CpG-ODN 刺激に依存した IFN- α の産生が減少することを見出した。一方、qPCR 解析の結果から、CpG-ODN 刺激に依存した IFN- α の mRNA 量の上昇は Sortilin のノックダウンによって影響されないことが明らかとなった。以上から、Sortilin は pDC において TLR9 シグナルにおける CpG-DNA の認識ではなく、IFN- α の分泌に関与している可能性が推察された。そこで、組換え蛋白質を用いて SPR 解析を行ったところ、NGF- β に加えて、IFN- α や IFN- γ 、IL-6、IL-10 といったサイトカインとの結合が観察された。また、Sortilin と IFN- α を蛍光タンパク質

との融合蛋白質として細胞内に発現させたところ、共局在することが観察された。以上から Sortilin は IFN- α 等のサイトカインを細胞外への輸送するキャリア分子である可能性が示唆された。

(2) Sortilin と会合する分子の探索

マウス腹腔より採取したマクロファージを用い、抗 Sortilin 抗体により Sortilin 分子を沈降させ、Slc15a3 及び Slc15a4 が共沈降するかをイムノプロットによって解析した。結果、Sortilin と共沈降する分子は確認されなかった。また、共焦点レーザー顕微鏡による観察でも、上記分子と Sortilin の共局在は観察されなかったことから、Slc15a3 及び Slc15a4 とは会合していないことが考えられる。

(3) トランスクリプトーム解析による I 型 IFN 産生に関わる新規因子の同定

CpG-ODN 刺激前後の pDC より RNA を調製し、Poly-A 選択的に mRNA を精製し、mRNA を次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析に供した結果、既知の TLR9 シグナル関連遺伝子に加え、新たに発現変動をしている遺伝子も確認された。

【参考文献】

1. Kumar H et al. *Int. Rev. Immunol.* 30, 16-34 (2011)
2. Honda K et al. *Nature* 431, 1035-1040 (2005)
3. Blasius AL et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 107, 19973-19978 (2010)
4. Talukder AH et al. *Cell Res.* 22, 1129-1139 (2012)
5. Sasai M et al. *Science*, 329, 1530-1534 (2010)
6. Park B et al. *Immunity* 34, 505-513 (2011)
7. Nakamura A, Kobayashi E, Takai T *Nat. Immunol.* 5, 623-629 (2004)
8. Masuda A, Nakamura A, Maeda T et al. *J. Exp. Med.* 204, 907-920 (2007)
9. Endo S et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105: 14515-14520 (2008)
10. Chu CL et al. *Eur J Immunol.* 38, 166-173 (2008)
11. Willnow TE et al. *Curr. Opin. Lipidol.*, 22, 79-85 (2011)
12. Hu F et al. *Neuron* 68, 654-667 (2010)

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 2 件）

- ① Avery G Frey, Anjali Nandal, Jong Hwan Park, Pamela M Smith, Toshiki Yabe, Moon-Suhn Ryu, Manik C Ghosh, Jaekwon Lee, Tracey A Rouault, Myung Hee Park, Caroline Philpott
The iron chaperones PCBP1 and PCBP2 mediate the metallation of the dinuclear iron enzyme deoxyhypusine hydroxylase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111; 8031-8036 (2014)
10.1073/pnas.1402732111
査読有

- ② Sebastien Leidgens, Kimberley Z. Bullough, Haifeng Shi, Fengmin Li, Minoo Shakoury-Elizeh, Toshiki Yabe, Poorna Subramanian, Emory Hsu, Navin Natarajan, Anjali Nandal, Timothy L. Stemmler, Caroline C. Philpott
Each member of the PCBP family exhibits iron chaperone activity toward ferritin
J. Biol. Chem., 288, 17791-17802 (2013)
10.1074/jbc.M113.460253
査読有

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① Shintoaro Matsuba, Toshiki Yabe-Wada, Kazuya Takeda, Toshiyuki Takai, Akira Nakamura
A regulatory role of secretory leukoprotease inhibitor (SLPI) in allergic effector cells
第 42 回日本免疫学会学術集会, 千葉・幕張メッセ, 2013 年 12 月 11 日-13 日
- ② 松葉慎太郎, 和田俊樹, 武田和也, 佐藤哲也, 須山幹太, 高井俊行, 中村晃
好酸球・好塩基球における SLPI の制御機構の解析
第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京・ホテルニューオータニ, 2013 年 11 月 28 日-30 日
- ③ Anjali Nandal, Avery Frey, Jong-Hwan Park, Toshiki Yabe, Myung-Hee Park, Caroline Philpott
Activation of the essential di-iron enzyme deoxyhypusine hydroxylase by the iron chaperones PCBP1 and PCBP2
2013 International BioIron Society Meeting, University College London, London, UK, April 14-18, 2013

- ④ Sebastien Leidgens, Kimberley Bullough, Haifeng Shi, Toshiki Yabe, Minoo Shakoury-Elizeh, Poorna Subramanian, Emory Hsu, Navin Natarajan, Anjali Nandal, Timothy Stemmler, Caroline Philpott
Each member of the PCBP family exhibits iron chaperone activity toward ferritin
2013 International BioIron Society Meeting, University College London, London, UK, April 14-18, 2013

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 俊樹（矢部 俊樹）（YABE-WADA, Toshiki）

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：10451634