

129. 形質様樹状細胞におけるサイトカイン産生機構の研究

笹井 美和

Key words : 樹状細胞, サイトカイン産生, TLR

大阪大学 微生物病研究所
感染症態分野

緒言

自然免疫の中でも I 型膜貫通型受容体である TLRs は, 病原体の生存に必須の構成成分を認識することにより病原体の感染を的確に感知して, 感染拡大を阻止するために様々なサイトカインの産生を誘導する. 産生されるサイトカインの中でも I 型インターフェロンは, 特に抗ウイルス作用を持つ分子の発現を誘導するサイトカインであり, I 型インターフェロンを産生する TLR としてウイルスの複製副産物である二重鎖 RNA を認識する TLR3, 一本鎖 RNA を認識する TLR7, 非メチル化 CpG モチーフを持つ DNA を認識する TLR9 が報告されている. I 型インターフェロンはウイルス感染細胞から細胞種非特異的に発現が誘導されることが可能であるが, 中でも pDCs は他の細胞と比べて非常に多量の I 型インターフェロンの産生を誘導する事が知られており, pDCs に発現している TLR である TLR7 および TLR9 もそれぞれのリガンドを認識することにより, 多量の I 型インターフェロン産生を誘導する事が知られている. その一方で, TLR7 を介したシグナル伝達の破綻は全身性エリテマトーデスといった自己免疫疾患を誘発する事や, TLR9 が持続的に活性化することにより血球貪食症候群といった慢性炎症の症状が見られる事が報告されており, TLR7/TLR9 を介したサイトカイン産生を適切に制御する事は感染症の抑制のみでなく恒常性の維持という意味においても非常に重要な課題である.

TLR ファミリーの中でも TLR7/TLR9 は細胞内小胞膜上に発現しており, 未刺激時には小胞体に局在しているが, 細胞に刺激が入ると細胞内小胞へと移動して小胞内在性酵素により切断を受ける事により活性化型へと変化してサイトカイン産生を誘導する事が知られていたが, 詳細な制御機構は未解明のままであった. 筆者は先の研究で TLR7 および TLR9 を介したサイトカイン産生の制御機構について解析を行い, これらの TLR を介した I 型インターフェロン産生に特異的に関与している可能性のある小胞の同定に成功していた. そこで本研究はこれらの TLR を介した I 型インターフェロン産生特異的小胞の特徴とその詳細な分子メカニズムの解明を目的とした.

方法

先の研究の中で筆者はこの I 型インターフェロン産生特異的小胞にリン脂質成分の 1 つであるホスファチジルイノシトール-3,5-ビスリン酸 (Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate, PIP(3, 5)P₂) が関与している予備的結果を得ていた事から, まず PIP(3, 5)P₂ の特異的合成酵素として報告されている PIKfyve に着目し, 解析を行った. リン脂質合成経路はホスファチジルイノシトール-3-リン酸を元に様々な酵素が関与する事により, 種々のリン脂質が合成される事が知られているが, PIP(3, 5)P₂ の合成には PIKfyve が唯一関与している事が報告されており, ごく最近 PIKfyve に非常に特異性の高い阻害剤が合成されている (YM201636). そこで本研究ではまず, この PIKfyve の特異的阻害剤を用いて, TLR7/TLR9 を介したサイトカイン産生 (特に I 型インターフェロン産生) への PIP(3, 5)P₂ の関与について, マウス骨髄由来 Fh3L 誘導性形質様樹状細胞を用いて, ELISA 法ならびに定量的 PCR 法を用いて解析を行い, また, TLR の局在に関しては, マウスマクロファージ培養細胞である RAW264.7 細胞に, HA タグを付加または GFP を融合させた TLR9 を恒常的に発現させ, TLR9 リガンドで刺激を行った際の TLR9 の局在変化等について共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析を行った.

結果

マウス骨髄細胞を Flt3L の存在下で培養する事により得た細胞を TLR9 リガンドである CpG-A で刺激をした際に産生される IFN- α ならびに IL-12p40 に対する PIKfyve 特異的阻害剤「YM201636」の影響について、ELISA 法を用いて解析を行った結果、CpG-A 刺激によって誘導される IFN- α の産生は YM201636 処理により顕著にその産生が抑制されていたのに対して、炎症性サイトカインである IL-12p40 ならびに TNF- α の産生量はどちらの刺激においても YM201636 処理の影響を受けなかった。

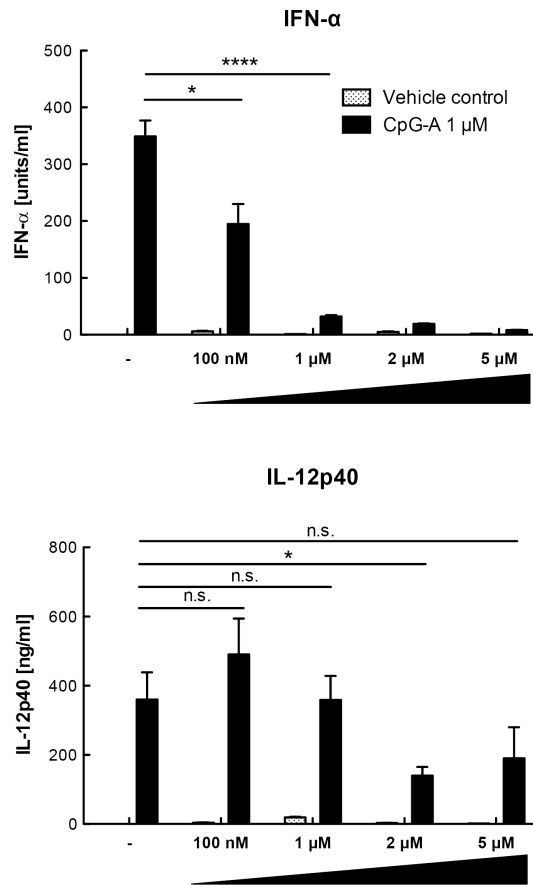


図1. TLR9 を介したサイトカイン産生への YM201636 の効果.

Flt3L で培養した骨髄細胞を CpG-A で 24 時間刺激し、培養上清中に産生されている IFN- α (上段) ならびに IL-12p40 (下段) の量について ELISA 法を用いて測定した。

そこで、YM201636 によるサイトカイン産生量の減少が転写レベルでもなされているかを調べるため、Flt3L で培養した樹状細胞を CpG-A で刺激した際に誘導される IFN- α と IL-12p40 の mRNA 量について定量 PCR 法を用いて解析を行った。その結果、YM201636 処理は mRNA レベルで CpG-A 刺激による IFN- α 産生を抑制している事が明らかとなり、IL-12p40 においては刺激後早期に誘導される mRNA は YM201636 により阻害されていたが、CpG 刺激 12 時間後においてはその mRNA 量は YM201636 未処理群と同レベルにまで回復した。

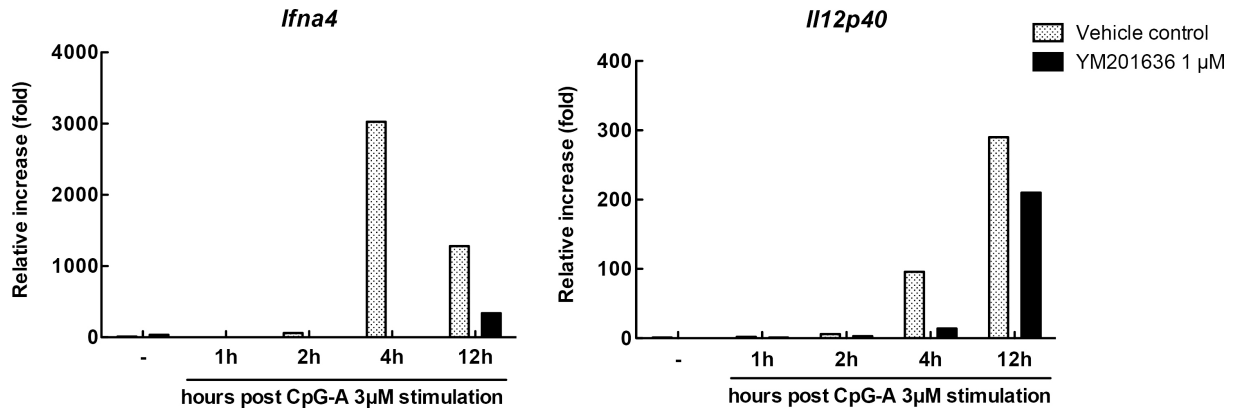


図2. TLR9 刺激によって誘導されるサイトカインの転写誘導における YM201636 の影響.

CpG-A で刺激した Flt3L で培養した骨髄細胞を経時的に回収し、IFN- α 4 (左側) または IL-12p40 (右側) のそれぞれの転写誘導量を、定量 PCR 法を用いて比較した.

先の研究で、TLR9 は形質様樹状細胞 (Plasmacytoid dendritic cells, pDCs) で CpG 刺激を受けると VAMP3 陽性小胞から LAMP2 陽性小胞へと Adaptor protein (AP)-3 依存的に局在を変化させている事が明らかとなっていたが、Flt3L で培養した樹状細胞には pDCs の中に conventional dendritic cells (cDCs) も含まれており、IL-12p40 の産生は特にどちらの細胞からも強く産生される事から、mRNA 産生の回復は別の細胞の影響を受けている可能性がある。そこで、Flt3L で培養した細胞群での pDCs と cDCs のシグナル機構を明確に把握するため、Flt3L 培養細胞を細胞表面マーカーによりセルソーターを用いて分離し、pDCs ならびに cDCs における YM201636 のサイトカイン産生への影響を検討した。その結果、pDCs では YM201636 処理によって IFN- α ならびに IL-12p40 の産生の両方が阻害されていたのに対して、cDCs では IFN- α 産生のみ阻害されていた。

また、TLR9 を介したシグナル伝達機構における PIKfyve の役割を解明するために、HA タグまたは GFP タグを付加した TLR9 を用いてその局在について検討した所、YM201636 処理を行うと TLR9 は I 型インターフェロン産生特異的小胞の指標と考えられる LAMP2 との共局在が激減し、また TLR9 と AP-3 の共局在も減少する結果が得られた。

考 察

これらの結果から、PIKfyve は VAMP3 陽性小胞膜上において PIP(3, 5)P₂ を合成し、その膜成分の性質を変化させて後期エンドソームの形成を行う中、AP-3 は PIP(3, 5)P₂ 陽性膜上に TLR9 を導き、LAMP2 陽性の後期エンドソームとなった膜上で初めて I 型インターフェロン産生が誘導される事が示唆された。

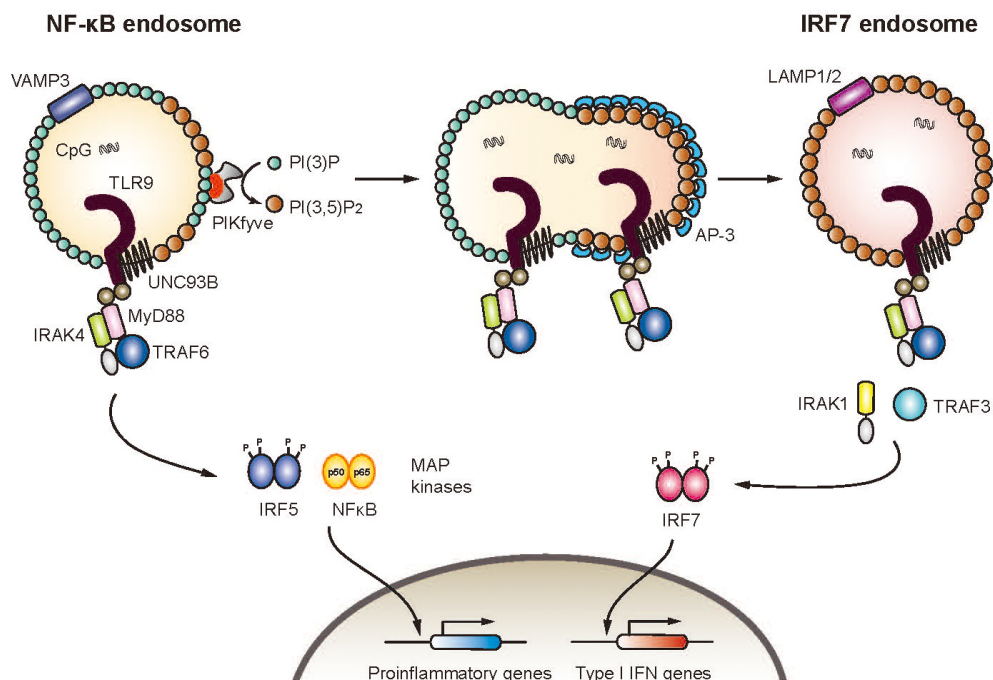


図3. PIKfyve 依存的な TLR9 の局在変化とシグナル伝達機構の概略図.

活性化した TLR9 は Myd88 を呼び寄せ、IRAK4 や TRAF6 といった転写因子のリクルートを介して、シグナル伝達をしているがこのシグナル伝達機構は主に NF- κ B を介したシグナルであり炎症性サイトカインの産生を誘導する. PIKfyve は NF- κ B エンドソームに結合して PI(3)P から PI(3,5)P₂ を合成し、この PI(3,5)P₂ に AP-3 が結合する事によって IRF7 エンドソームが形成され、TLR9 を介した I 型インターフェロンの産生が引き起されている.

この結果は、LAMP2 陽性小胞となる事が I 型インターフェロン産生に必須であることを示しており、I 型インターフェロン産生に特異的に関与している分子が IRF7 エンドソームに特異的に局在している可能性を暗示している. また、TLR family の中でも細胞内小胞に局在する TLR の局在変化によるサイトカイン産生の制御は、同じシグナル伝達分子を用いているにも関わらず多彩なサイトカイン産生を誘導する手法の 1 つであり、このような制御機構は TLR family に限らず、様々な遺伝子発現機構にも想定しうる事であることを暗示している.