

## 167. ヒト樹状細胞を標的とした抗炎症薬の開発

門脇 則光

Key words : 樹状細胞, I型インターフェロン, TLR9, エンドソーム, ダサチニブ

\*京都大学 大学院医学研究科  
血液・腫瘍内科学

### 緒言

形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cells: pDC) と呼ばれる樹状細胞サブセットは, Toll-like receptor (TLR) 7, 9 を介してウイルス核酸の刺激を受けると大量のインターフェロン(IFN)- $\alpha$  を産生し, 抗ウイルス免疫において重要な役割を果たす. ところが, pDC は死滅した自己細胞由来の核酸にも反応して IFN- $\alpha$  を産生し, 全身性エリテマトーデスや尋常性乾癬を引き起こす. したがって, pDC による IFN- $\alpha$  の産生を抑制することは, これらの炎症性疾患の治療につながる. われわれは最近, 慢性骨髄性白血病の治療薬であるチロシンキナーゼ阻害薬イマチニブ, ニロチニブ, ダサチニブのうち, ダサチニブのみが TLR9 リガンド CpG DNA の早期エンドソームへの滞留を阻害することにより, IFN- $\alpha$  の産生を強力に抑制することを見いだしたり. しかし, ダサチニブは多くのキナーゼを阻害する特異性の低い薬剤であるため, pDC における標的キナーゼとその基質を同定することによって, 特異性と安全性の高い抗炎症薬を開発することが可能と考えられる.

以上により本研究は, ヒト pDC の機能を特異的に操作する創薬標的を同定することによって, 「DC の制御による抗炎症薬の開発」を実現することを目的とする.

### 方法

われわれが新たに樹立したヒト pDC 細胞株 P716 を用いて, 以下の事項を解析する.

- 1) 標的キナーゼがわかっているキナーゼ阻害剤を用い, P716 を阻害剤の存在下で CpG DNA 刺激をすることにより, pDC による IFN- $\alpha$  の産生に必要なキナーゼの候補を絞り込む. このとき, 標的キナーゼがダサチニブとあまり重なっていない阻害剤 (図 1A) や, 大きく重なっている阻害剤 (図 1B) を組み合わせて, 絞り込みの効率を上げる.
- 2) さらに, pDC による IFN- $\alpha$  の産生に必要なキナーゼを siRNA によるノ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 による IFN- $\alpha$  の産生に必要なキナーゼ-基質の組み合わせを明らかにする.

以上の実験により, pDC 関連炎症に対する創薬の標的シグナル分子を見いだす.

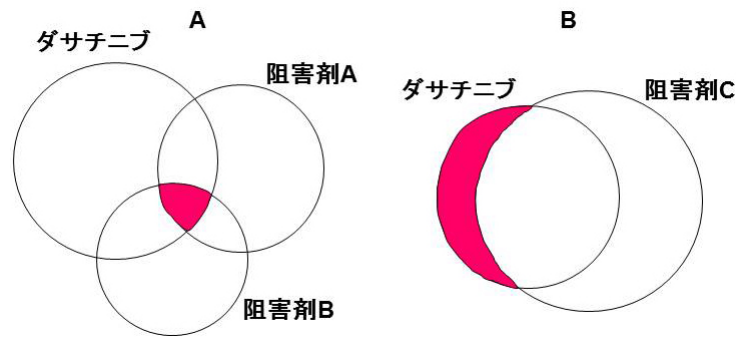


図1. キナーゼ阻害剤を用いた標的キナーゼの絞り込み戦略.

ダサチニブが pDC の IFN- $\alpha$  産生を抑制する際に標的となるキナーゼを絞り込むために、標的キナーゼがダサチニブとあまり重なっていない阻害剤 (A) や、大きく重なっている阻害剤 (B) を組み合わせて、絞り込みの効率を上げる。

## 結 果

まず、Src family kinase (SFK) がダサチニブによって強く阻害されるため、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, GSK3 $\beta$  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<sup>23)</sup>。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、①ダサチニブによる阻害程度が強いと報告されている、②pDC に強く発現する、③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 でノックダウンし IFN- $\alpha$  産生が低下するキナーゼとして、TESK1, LIMK1 (図 2), RIPK2 (図 3) の 3 つを同定した。

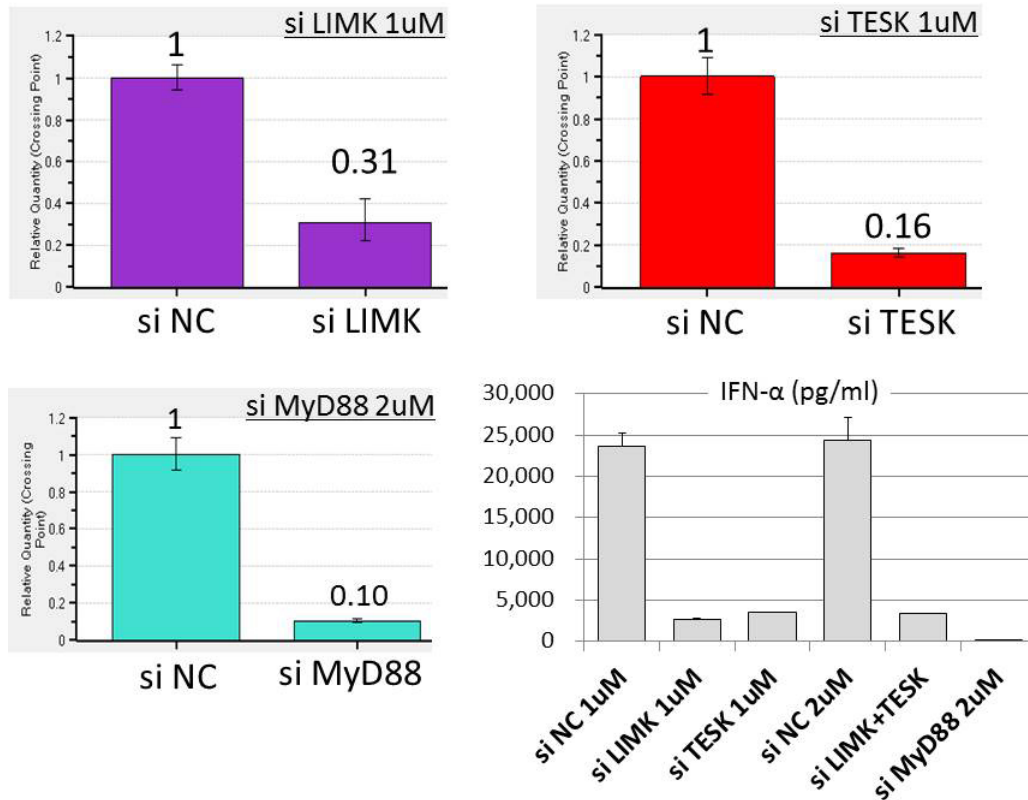


図2. LIMK1, TESK1 のノックダウンによる IFN- $\alpha$  産生の阻害.

表示した濃度の siRNA によりヒト pDC 細胞株 P716 の LIMK1, TESK1, MyD88 mRNA 発現が効率よく低下した. そして, それに伴い CpG DNA (ODN2216) 刺激による P716 の IFN- $\alpha$  産生が強く抑えられた. MyD88 のノックダウンは IFN- $\alpha$  産生抑制のポジコンとして用いている. siNC: si Negative Control.

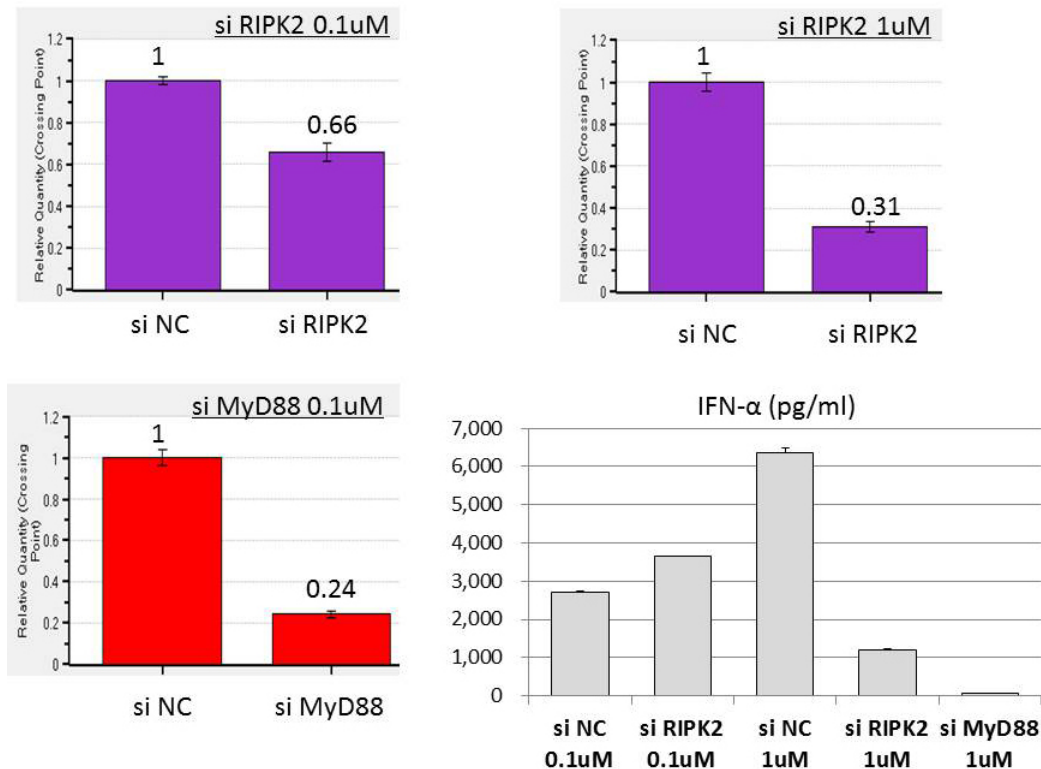


図3. RIPK2 のノックダウンによる IFN- $\alpha$  産生の阻害.

1  $\mu$ M, 0.1  $\mu$ M の siRNA によりそれぞれ P716 の RIPK2, MyD88 mRNA 発現が効率よく低下した. そして, それに伴い CpG DNA (ODN2216) 刺激による P716 の IFN- $\alpha$  産生が強く抑えられた. siNC: si Negative Control.

## 考 察

LIMK1, TESK1 は, いずれも cofilin をリン酸化し, F-actin を安定化させる. したがって, ダサチニブで LIMK1, TESK1 が阻害されると F-actin が不安定になり, CpG DNA が pDC の早期エンドソームに滞留できなくなって, IFN- $\alpha$  産生が抑制される可能性がある.

一方, RIPK2 は ULK1 のリン酸化を介して mitophagy を誘導する<sup>4)</sup>. また, noncanonical autophagy により TLR9 リガンドによる pDC の IFN- $\alpha$  産生が誘導される<sup>5)</sup>. したがって, pDC における RIPK2 の阻害により autophagy が阻害され, その結果 IFN- $\alpha$  産生が阻害される可能性がある.

今後, LIMK1, TESK1, RIPK2 の pDC における基質を, P716 を用いたリン酸化プロテオーム解析にて同定することにより, pDC による IFN- $\alpha$  の産生に必要なキナーゼ-基質の組み合わせを明らかにする. 上記3つのキナーゼは pDC のみならず広汎な細胞に発現するため, 基質に pDC 特異性があるかもしれない. そうなれば, その基質が pDC 特異的な抗炎症薬の標的になることが期待できる.

## 文 献

- 1) 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** : 93-103, 2013.
- 2) Anastassiadis, T., Deacon, S. W., Devarajan, K., Ma, H. & Peterson, J. R. : Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.*, **29** : 1039-1045, 2011.
- 3) Davis, M. I., Hunt, J. P., Herrgard, S., Ciceri, P., Wodicka, L. M., Pallares, G., Hocker, M., Treiber, D. K. & Zarrinkar, P. P. : Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.*, **29** : 1046-1051, 2011.

- 4) Lupfer, C., Thomas, P. G., Anand, P. K., Vogel, P., Milasta, S., Martinez, J., Huang, G., Green, M., Kundu, M., Chi, H., Xavier, R. J., Green, D. R., Lamkanfi, M., Dinarello, C. A., Doherty, P. C. & Kanneganti, T.-D. : Receptor interacting protein kinase 2-mediated mitophagy regulates inflammasome activation during virus infection. *Nat. Immunol.*, **14** : 480-488, 2013.
- 5) Henault, J., Martinez, J., Riggs, J. M., Tian, J., Mehta, P., Clarke, L., Sasai, M., Latz, E., Brinkmann, M. M., Iwasaki, A., Coyle, A. J., Kolbeck, R., Green, D. R. & Sanjuan, M. A. : Noncanonical autophagy is required for type I interferon secretion in response to DNA-immune complexes. *Immunity*, **37** : 986-997, 2012.