

## 119. コレラ毒素による免疫賦活作用の分子基盤の解明

佐々木 泉

和歌山県立医科大学 先端医学研究所 生体調節機構研究部

Key words : コレラ毒素

### 緒言

コレラ毒素 (Cholera toxin: CT) は、強力な粘膜系免疫アジュバントとして Th1、Th2、Th17 型免疫応答、免疫グロブリン産生、抗腫瘍免疫応答を誘導することが知られている<sup>1)</sup>。CT はマウスの実験で汎用されているだけでなく、ヒトでも使用されている<sup>2)</sup>。しかし、CT の免疫アジュバント活性の分子機構については不明な部分が多い。

我々は、マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 (以下、RAW 細胞) を用いた検討から、CT が炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  の産生誘導能を持つことを見出した。本研究では、この CT による IL-1 $\beta$  産生誘導に関与する分子機序の解明を試みた。その結果、アルギナーゼ-1 経路とポリアミン代謝経路がこの IL-1 $\beta$  産生誘導に関与することを示唆する知見が得られたのでここに報告する。

### 方法および結果

まず、RAW 細胞において、ELISA により、培養上清中の IL-1 $\beta$  産生量を測定した。CT 単独刺激では IL-1 $\beta$  の産生誘導は認められなかった。LPS 単独刺激では少量の IL-1 $\beta$  産生が誘導された。LPS 刺激後に CT で刺激すると、顕著に IL-1 $\beta$  の産生誘導が認められた (図 1)。この CT による IL-1 $\beta$  産生増強は 1 ng/ml より濃度依存的に認められた。このように、CT は IL-1 $\beta$  産生誘導能を持つことが明らかとなった。

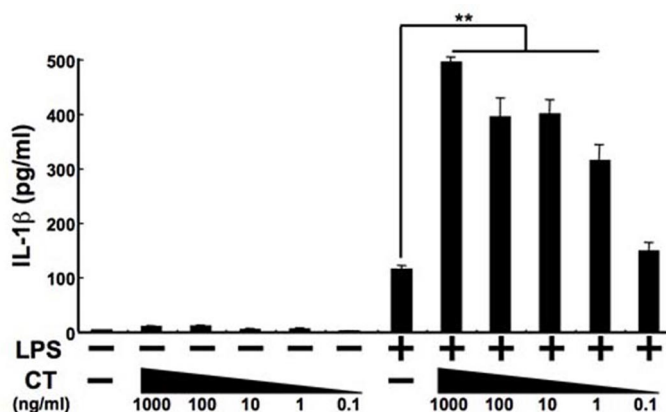


図 1. RAW 細胞における CT と LPS による IL-1 $\beta$  産生誘導の検討

RAW 細胞を LPS 存在下、あるいは非存在下で刺激後、CT 存在下あるいは非存在下で 24 時間培養し、培養上清中の IL-1 $\beta$  の産生量を ELISA 法により測定した。★★:  $P < 0.01$ , Student's t test.

マクロファージにおいて、シグナル伝達機構と代謝環境のクロストークが、炎症性サイトカイン産生誘導などの免疫応答に密接に関与する<sup>3)</sup>。そこで、CTによって活性化される代謝経路を明らかにするため、網羅的遺伝子解析（トランスクリプトーム）と網羅的代謝産物解析（メタボローム）の統合解析（オミックス解析）を行った。その結果、CTの刺激により活性化される代謝経路がいくつか示されたが、本研究ではアルギナーゼ-1経路とその下流のポリアミン代謝経路に焦点を当てて解析を行った。アルギニンはアルギナーゼ-1（Arginase 1: Arg1）を介してオルニチンに変換される（アルギナーゼ-1経路）。オルニチンはオルニチン脱炭酸酵素（Ornithine decarboxylase 1: Odc1）を介してポリアミンの一種であるプトレシンに変換され、ポリアミン代謝経路に導入される。プトレシンは更にスペルミジン合成酵素（Spermidine synthase: Srm）により、スペルミジンに変換される。これらのポリアミンはスペルミジン/スペルミン N1 アセチル転移酵素（Spermidine-Spermine Acetyl transferase 1: SAT1）により、アセチルポリアミンに変換される。これらのアセチルポリアミンのうち、N1-アセチルスペルミジンはポリアミン酸化酵素（Polyamine oxidase: Paox）によりプトレシンに変換され、リサイクルされる。これらのポリアミン群の産生量は定常状態では一定のバランスで保たれている（図2 A）。オミックス解析の結果、Arg1 や Odc1 の遺伝子発現が、CT の刺激により著しく増強されていた（図2 B）。また、CT と LPS で共刺激した細胞において、プトレシンや N-アセチルプトレシン、N1-アセチルスペルミジンが、無刺激あるいは LPS 単独刺激した細胞と比べ有意に増加していた（図2 C）。これらの結果から、CT の刺激によりアルギナーゼ-1 経路とその下流のポリアミン代謝経路、特にアセチルポリアミン合成経路が活性化していることが示唆された。

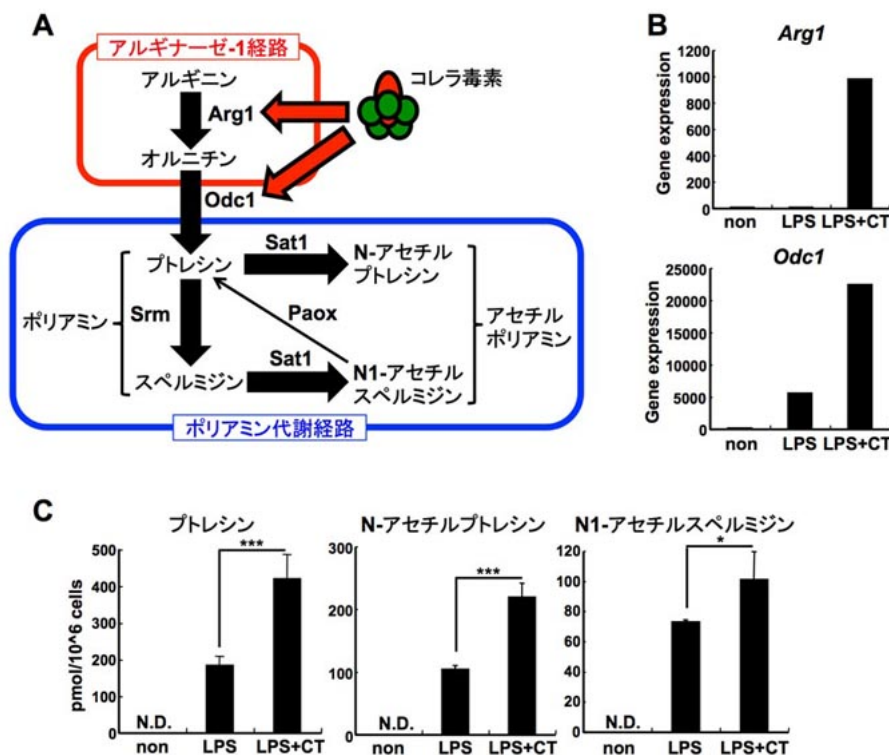


図2. RAW 細胞を用いたオミックス解析

A) CT 刺激により活性化される細胞内代謝経路の模式図。B) トランスクリプトーム解析データの中から Arg1 と Odc1 の遺伝子発現量を示した。C) メタボローム解析データの中からプトレシン、N-アセチルプトレシン、N1-アセチルスペルミジンのデータを示した。

★:  $P < 0.05$ , ★★★:  $P < 0.001$ , Student's t test. N.D.: not detected.

CTにより活性化されるこれらの細胞内代謝経路が、CTによるIL-1 $\beta$ 産生誘導に関与するかどうかを明らかにするため、代謝酵素の阻害剤を用いて検討した。アルギナーゼ-1経路を阻害するためArg1の阻害剤であるS-2ボロノエチルLシステイン(S-(2-boronoethyl)-L-cysteine: BEC)を用い、ポリアミン代謝経路を阻害するためOdc1の阻害剤で

ある DL- $\alpha$ -ジフルオロメチルオルニチン (DL- $\alpha$ -Difluoromethylornithin; DFMO) を用いた (図 3 A)。BEC あるいは DFMO 存在下において、阻害剤を添加しない場合と比べ、CT と LPS による IL-1 $\beta$  産生誘導が有意に障害された (図 3 B)。この障害作用は、BEC については 1  $\mu$ M から、DFMO については 0.66 mM から濃度依存的に認められた。このことから、アルギナーゼ-1 経路およびポリアミン代謝経路が CT と LPS による IL-1 $\beta$  産生誘導に関与することが明らかとなった。

IL-1 $\beta$  の産生誘導は、プロ IL-1 $\beta$  (不活性型 IL-1 $\beta$ ) の遺伝子発現のレベルと、カスパーゼを含むインフラマソームと呼ばれるタンパク複合体による不活性型 IL-1 $\beta$  の切断による活性化型 IL-1 $\beta$  の生成、つまり遺伝子発現後のレベルで制御されている。アルギナーゼ-1 経路が、IL-1 $\beta$  産生誘導のどのレベルに関与するのかを明らかにするため、Arg1 の siRNA を用いて検討を行った。Arg1 は LPS 刺激では遺伝子発現は誘導されないが、CT の添加により著しく発現が誘導される。この CT による Arg1 遺伝子発現誘導が、Arg1 siRNA 処理細胞では顕著に障害された (図 3 C)。このとき、Arg1 siRNA 処理細胞において、CT と LPS の共刺激により培養上清中に分泌された IL-1 $\beta$  はネガティブコントロールの細胞 (siNega) と比べて有意に減少していたが (図 3 D)、IL-1 $\beta$  の遺伝子発現は正常であった (図 3 E)。これらの結果から、アルギナーゼ-1 経路は、IL-1 $\beta$  の遺伝子発現レベルではなく、遺伝子発現後のレベルに関与することが示唆された。

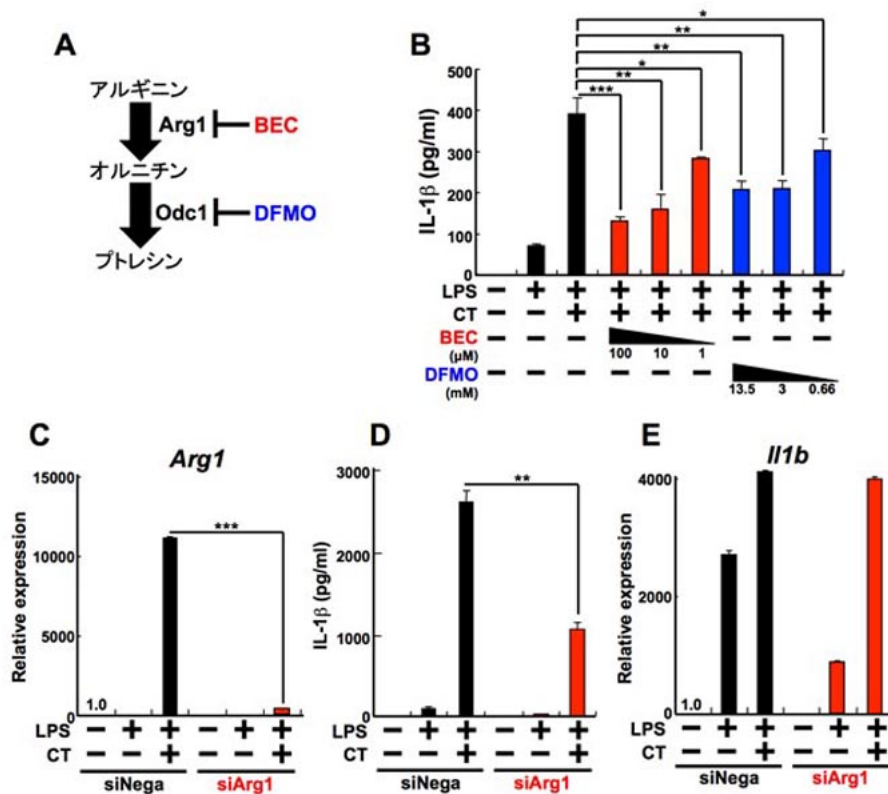


図 3. アルギナーゼ-1 経路阻害による IL-1 $\beta$  産生誘導障害

A) BEC および DFMO によるアルギナーゼ-1 経路およびポリアミン代謝経路阻害の模式図。B) RAW 細胞を LPS 存在下、あるいは非存在下で刺激後、CT 存在下あるいは非存在下で 24 時間培養し、培養上清中の IL-1 $\beta$  の産生量を ELISA 法により測定した。各阻害剤は CT 添加の 3 時間前に加えた。C~E) RAW 細胞に Negative control siRNA (siNega) あるいは Arg1 siRNA (siArg1) をトランスフェクションし、LPS 存在下あるいは非存在下で培養後、CT 存在下あるいは非存在下で 24 時間刺激し、培養上清および細胞を回収した。C, E) 回収した細胞から全 RNA を抽出し、リアルタイム PCR により Arg1 と IL-1 $\beta$  の発現を定量した。D) 回収した培養上清中の IL-1 $\beta$  の産生量を ELISA 法により測定した。\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ , Student's t test.

最後に、ポリアミン代謝経路、特にアセチルポリアミン合成経路が IL-1 $\beta$  産生誘導に関与するかどうか明らかにするため、アセチルポリアミン合成酵素である Sat1 の阻害剤を用いて検討した。Sat1 阻害剤であるペンタミジン (Pentamidine) は、プトレシンから N-アセチルプトレシンへの変換と、スペルミジンから N1-アセチルスペルミジンへの変換を阻害する (図 4 A)。ペンタミジン存在下において、阻害剤を添加しない場合と比べ、CT と LPS による IL-1 $\beta$  産生誘導が有意に障害された (図 4 B)。このペンタミジンによる障害作用は、5  $\mu$ M から濃度依存的に認められた。この結果から、アセチルポリアミン合成経路が、CT と LPS による IL-1 $\beta$  産生誘導に関与していることが示唆された。

本研究により、CT は RAW 細胞に直接作用し、細胞内のアルギナーゼ-1 経路とその下流のポリアミン代謝経路、特にアセチルポリアミン合成経路を活性化することが明らかとなり、この一連の代謝経路は炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  の産生誘導を遺伝子発現後のレベルで制御していることが示唆された (図 4 C)。

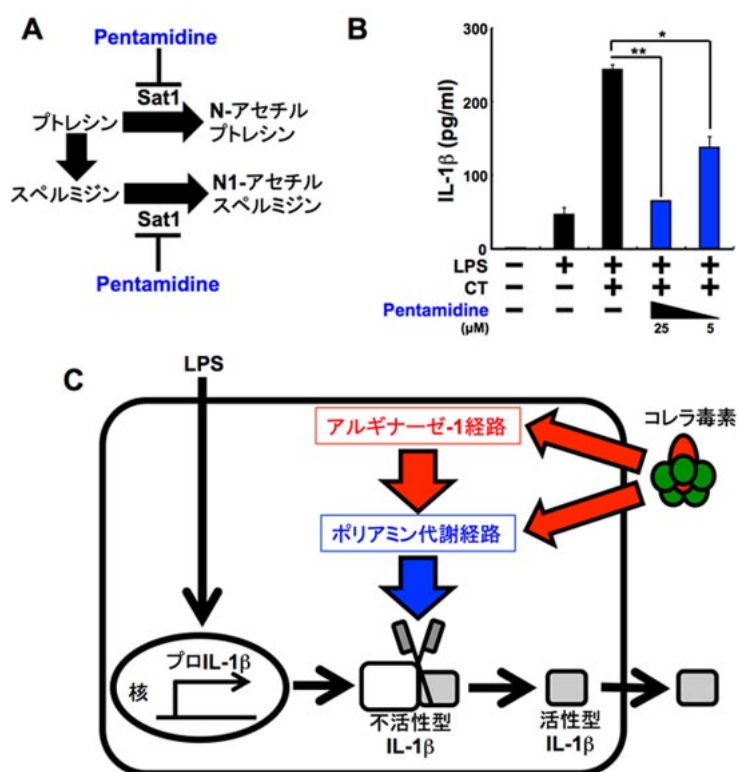


図 4. アセチルポリアミン合成阻害による IL-1 $\beta$  産生誘導障害

A) Pentamidine によるアセチルポリアミン合成経路阻害の模式図。B) RAW 細胞を LPS 存在下、あるいは非存在下で刺激後、CT 存在下あるいは非存在下で 24 時間培養し、培養上清中の IL-1 $\beta$  の産生量を ELISA 法により測定した。阻害剤は CT 添加の 3 時間前に加えた。C) CT による細胞内代謝経路依存的な IL-1 $\beta$  産生誘導の模式図。\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , Student's t test.

## 考 察

我々は、RAW 細胞を用いた検討から、CT が IL-1 $\beta$  産生誘導能を持つことを見出した。また、CT により活性化されるアルギナーゼ-1 経路やその下流のポリアミン代謝経路が、IL-1 $\beta$  産生誘導において、遺伝子発現後のレベルで関与することも明らかにした。CT が IL-1 $\beta$  産生誘導能を持つことはこれまで報告されていない。また、IL-1 $\beta$  が転写後どのように制御されているのかは不明な部分が多く、細胞内代謝経路との関連性も全くわかっていない。従って、本研究により我々が明らかにした、CT による細胞内代謝経路依存的な IL-1 $\beta$  産生誘導は、これまでになくユニークな分子

機構である。現在、Arg1 や、種々のポリアミン代謝酵素の遺伝子欠損マウスを用いて、*in vivo*においても CT による細胞内代謝経路依存的な IL-1 $\beta$  産生誘導が認められるかどうか検討している。

### 共同研究者

本研究の共同研究者は、和歌山県立医科大学先端医学研究所生体調節機構研究部、改正恒康教授、大学院生の折茂貴是君である。また、オミックス解析に関して、慶応義塾大学先端生命科学研究所の福田真嗣先生に、心より感謝の意を表します。本稿を終えるにあたり、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

### 文 献

- 1) Wakabayashi A, Nakagawa Y, Shimizu M, Moriya K, Nishiyama Y, Takahashi H. Suppression of an already established tumor growing through activated mucosal CTLs induced by oral administration of tumor antigen with cholera toxin. *J Immunol.* 2008 Mar 15;180(6):4000-10. PMID: 18322209
- 2) Lycke N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat Rev Immunol.* 2012 Jul 25;12(8):592-605. Doi 10/1038/nri3251.Review. PMID: 22828912
- 3) Pearce EL, Poffenberger MC, Chang CH, Jones RG. Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science.* 2013 Oct 11;342(6155):1242454. doi: 10.1126/science.1242454. Review. PMID: 24115444