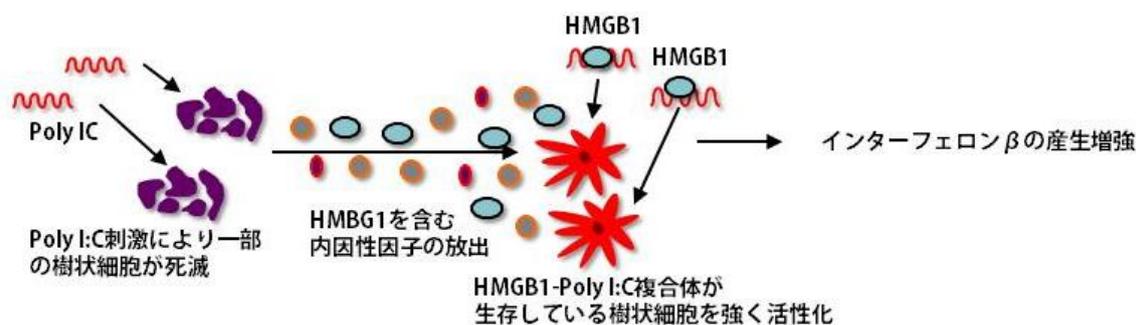


二本鎖 RNA の Poly IC は、カテプシン D-IPS-1 依存的経路を介して サイトカイン産生を増強するとともに、樹状細胞の細胞死を誘導する

概要

自然免疫による病原体成分の認識は炎症反応の誘導や、獲得免疫の成立に重要な役割を果たす生体防御機構です。今回、私達はウイルス RNA を模倣する合成二本鎖 RNA アナログの Poly I:C を用いて、自然免疫応答メカニズムの解析を行いました。その結果、Poly I:C により一部の樹状細胞にネクロシス様の細胞死が誘導されること、さらにこの細胞死がシグナル伝達経路の活性化により制御されていることが分かりました。さらに、死細胞から放出される内因性因子の一つ HMGB1 が Poly I:C と結合し、Poly I:C の作用を増強することも分かりました。これらの結果は、一部の樹状細胞の細胞死というものが、免疫賦活化において重要な役割を果たすことを強く示唆するものです。



今後の展望

樹状細胞の死が免疫賦活化に重要な役割を果たしていることから、将来的には、内因性因子を用いた新たなアジュバント開発や、細胞死に感受性の高い樹状細胞を用いた新たな免疫賦活化法や樹状細胞療法の開発などが期待されます。

掲載論文・雑誌

The double stranded RNA poly IC triggers a cathepsin D-IPS-1-dependent pathway to enhance cytokine production and mediate dendritic cell necroptosis

(訳) 二本鎖 RNA の Poly IC はカテプシン D-IPS-1 依存的経路を介してサイトカイン産生を増強するとともに樹状細胞の細胞死を誘導する

Jian Zou, Taro Kawai, Tetsuo Tsuchida, Tatsuya Kozaki, Hiroki Tanaka, Kyung-Sue Shin, Himanshu Kumar and Shizuo Akira

Immunity 38(4):717-28, 2013

< 詳細な解説 >

研究の背景

自然免疫は病原体の侵入を察知し、炎症をはじめとする病原体排除に必要な生体防御応答を誘導する生体防御システムである。病原体成分の認識は、Toll-like receptor (TLR)ファミリーに代表されるパターン認識受容体(Pattern Recognition Receptors: PRRs)により行われる。PRRs は病原体の生存に必須かつ特有の分子パターン(Pathogen-associated molecular pattern: PAMP)を直接あるいは間接的に認識し、生体防御に必要な反応を惹起するセンサーである。現在、TLR 以外にも、RNA 型ウイルスを認識し抗ウイルス応答を誘導する細胞質内 RIG-I-like receptor (RLR)が知られている。

自然免疫担当細胞の一つ樹状細胞は、PRRs を介してサイトカイン産生、共刺激分子発現を誘導し、最終的に T細胞の活性化や抗体産生といった獲得免疫を成立させるいわば自然免疫と獲得免疫の橋渡しの役割を果たす細胞である。樹状細胞には様々なサブセットが存在しているが、サブセット間の PRRs の発現様式やシグナル伝達経路には違いがある。したがって、こうした違いを理解することは、より適切な獲得免疫誘導を可能とする基盤技術の確立に繋がるものと期待される。特に、感染症、アレルギー、腫瘍に対するアジュバントとして、PRR やそのシグナル伝達分子は良い標的になると期待される。

Poly I:C はウイルス RNA を模倣するような合成 RNA アナログであり、マクロファージ、樹状細胞、上皮細胞といった様々な細胞から I 型インターフェロンや炎症性サイトカイン産生を促す。その結果、NK 細胞、抗体産生、キラーT細胞活性化などが誘導される。また、抗腫瘍効果も高いことが知られている。こうした誘導には、I 型インターフェロンが中心的な役割を果たしている。Poly I:C の認識に関わる PRRs として TLR3 と RLRs (RIG-I、MDA5)が知られている(図1)。その一方、生体内におけるそれぞれの経路の役割については不明な点が多かった。今回、我々はマウス骨髄由来の樹状細胞を用いて Poly I:C による免疫賦活化メカニズムの解析を行った。

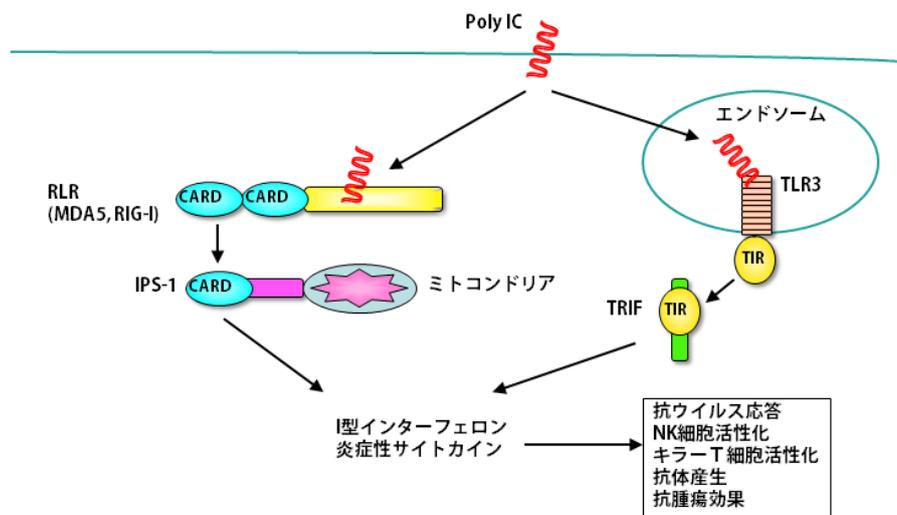


図 1

結果

1) 樹状細胞において、Poly I:C によるサイトカイン産生は RLRs 経路に依存する

マウス骨髄由来樹状細胞を用いて Poly I:C に対するサイトカイン産生を調べたところ、RLRs のアダプター分子 IPS-1 を欠損したマウスからの樹状細胞では、I 型インターフェロンや炎症性サイトカインの産生が顕著に減少していた(図2)。一方、TLR3 欠損マウスではサイトカイン産生に異常は認められなかった。このことから、樹状細胞においては RLRs 経路がサイトカイン産生に主要な役割を果たしていると考えられた。

続いて、Poly I:C の細胞内局在を調べたところ、刺激後 2 時間で poly I:C はリソソーム内に取り込まれているが、24 時間後にはリソソームから細胞質内へと移行していた。この移行が RLRs 活性化に重要な役割を果たしていると考えられるが詳細は不明なままである。

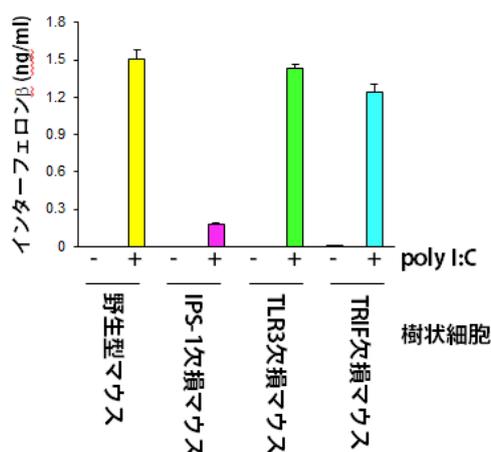


図2

2) Poly I:C 刺激によりリソソームから細胞質へと漏出したプロテアーゼ Cathepsin D が IPS-1 と結合する

Poly I:C がリソソームに取り込まれた後、リソソームの崩壊が誘導されることをアクリジンオレンジ染色で確認した。このことからリソソーム内に存在する蛋白質なども Poly I:C と共に細胞質内へと移行すると考えられた。私達は、IPS-1 と結合する蛋白質を同定する目的で酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行い、リソソームに存在するアスパラギン酸プロテアーゼ Cathepsin D を得た。そこで、Cathepsin D の細胞内局在を調べてみると、Poly I:C 刺激に伴って細胞質内へと漏出することが認められた(図3)。さらに、この漏出は IPS-1 非依存的であった。従って、Poly I:C によるリソソームの崩壊に伴い、Cathepsin D が細胞質へと移行し IPS-1 と複合体を形成すると考えられた。

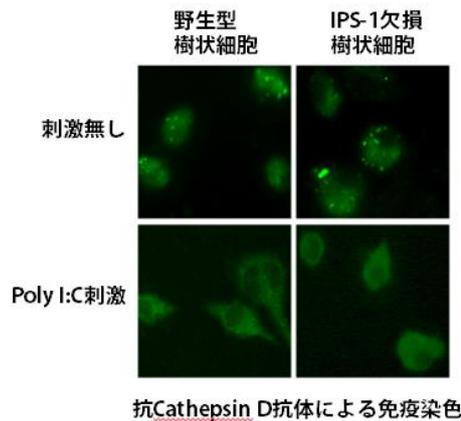


図3

3) Cathepsin D-IPS-1 複合体による細胞死(ネクロプトーシス)の誘導。

Poly I:C 刺激により一部の樹状細胞に細胞死 (Annexin V 陽性、PI 陽性) が誘導されることが認められた (図4A)。さらに詳しく調べてみると、細胞内小器官の膨潤や細胞質の透明化といった典型的なネクローシス様の形態を示した (図4B)。最近、プログラムされたネクローシス (ネクロプトーシス) という概念が提唱されている。ネクロプトーシスはネクローシスと似た表現形を示す一方、RIP-1、RIP-3 と呼ばれるキナーゼ群の活性化により制御されている。この細胞死は TNF α 、紫外線、ウイルス感染等で誘導される。つまり、ネクロプトーシスはネクローシスとは異なり、シグナル伝達経路で制御されているネクローシス様の細胞死である。そこで、我々は Cathepsin D の阻害剤である Pepstatin A (PepA) を用いて細胞死の検討を行ったところ、Poly I:C による樹状細胞の死が抑制された。さらに、Poly I:C 刺激依存的に IPS-1 が RIP-1 と結合すること、Cathepsin D の強制発現が RIP-1 の活性化 (K63 型ユビキチン化) を誘導することを見出した。これらのことから、Poly I:C 刺激により Cathepsin D と IPS-1 の複合体形成が誘導され、そこに RIP-1 がリクルートされることで活性化し、ネクロプトーシスが誘導されることが示唆された。

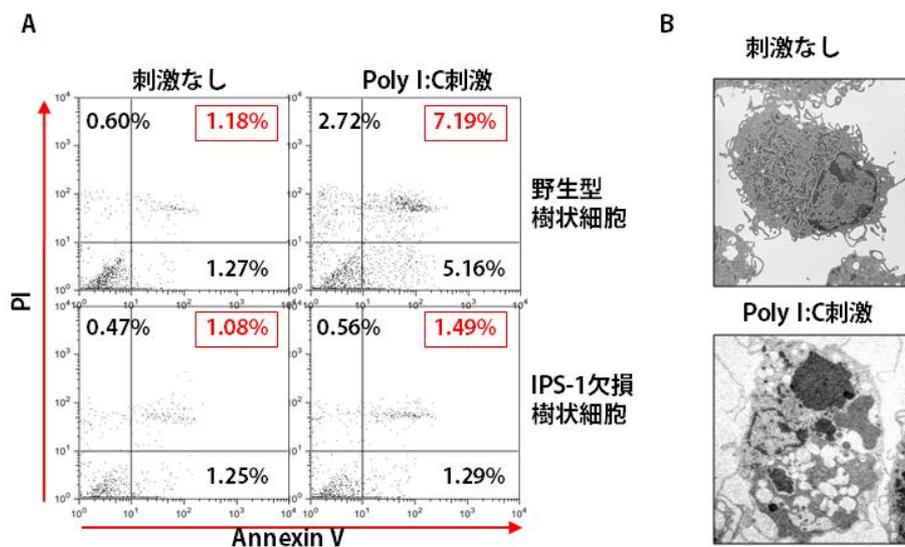


図4

4) 死細胞由来の HMGB1 が Poly I:C と協調して自然免疫を活性化する

ネクローシスを起こした細胞からは、様々な細胞内容物が放出し、炎症が誘導される。我々は、Poly I:C 刺激により死滅した細胞から放出される内因性因子に着目し、HMGB1 と呼ばれる蛋白質が IPS-1 依存的に細胞外へと放出されることを見出した(図5)。さらに、この放出は PepA 処理や、RIP-1 の阻害剤である Necrostatin-1 (Nec1)処理で抑制されたことから、細胞死依存的であると考えられた。興味深いことに、Nec1 は Poly I:C 刺激による I 型インターフェロン産生を部分的に抑えた。このことは、細胞死が I 型インターフェロン産生を増強する役割を担っていることを示唆している。そこで、核酸と結合すると知られていた HMGB1 が Poly I:C と結合するか検討したところ、両者の結合が認められた。さらに Poly I:C で樹状細胞を刺激する際に、両者の結合を阻害する抗体を培養液中に加えたところ、I 型インターフェロンの産生の部分的減少が認められた。

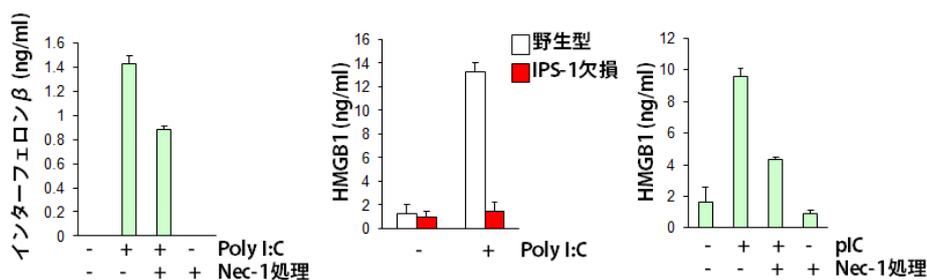


図5

まとめ

以上のように、Poly I:C が樹状細胞の一部にネクロプトーシスを誘導すること、さらにこの経路が Cathepsin D-IPS-1-RIP1 依存的に制御されていることが明らかとなった(図6)。さらに死滅した樹状細胞からは HMGB1 が放出され、これが Poly I:C と協調することで I 型インターフェロン産生を増強することが示された。これらのことから、RLRs を介したシグナル伝達経路の活性化によりもたらされる樹状細胞の死というものが、免疫賦活化において重要な役割を果たすことが強く示唆された。

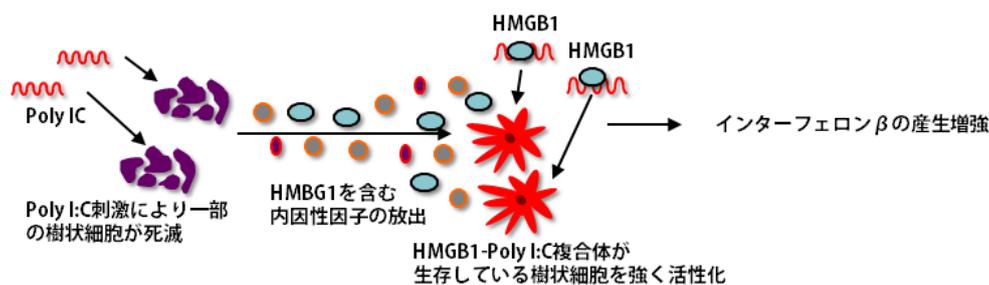


図6

今後の展開

今後は、感染や癌に伴いネクロプトーシスを起こす樹状細胞サブセットを生体内より単離、解析する必要がある。こうした細胞死に感受性の高い樹状細胞からは、免疫賦活化に関わる様々な内因性因子が放出されると考えられることから、癌や感染に対する新たな免疫療法開発の新たな基盤となる可能性がある。