

—平成17年度 岐阜薬科大学特別研究費（一般）—

Toll 様受容体刺激による Type I IFN 誘導シグナルに影響を 与える物質の探索とその作用メカニズム

杉山 剛志

1. 緒言

Toll 様受容体(TLR)は、リポ多糖体、リポタンパク質、ペプチドグリカン、非メチル化 CpG DNA、二本鎖 RNA など、微生物が共通に有する特徴的な構造物を認識する自然免疫受容体として、近年注目されている¹。哺乳動物の TLR は、現在までに 13 種が報告されており、これらの TLR は、膜貫通部位をはさんでいずれも細胞内には Toll/IL-1 receptor (TIR)ドメインを、細胞外に Leucine rich repeat (LRR)を持つが、個々の TLR の LRR はそれぞれ異なる微生物構造を認識し、また、TLR 毎に TIR ドメインに会合するアダプター分子の種類が異なり、リガンド特異的な細胞内シグナルを誘導することができる。

一部の TLR シグナルにおいては、Type I IFN を誘導することが知られており、マクロファージ系の細胞では、TLR3/4 から TRIF と呼ばれるアダプター分子を介するシグナル伝達系路により IFN- β が誘導される。また、樹状細胞においては、TLR7/8/9 からアダプター分子である MyD88 依存的に IFN- α が誘導される経路が報告されている。マウスマクロファージにおける TLR 刺激による誘導型一酸化窒素合成酵素の発現誘導には、この IFN 産生誘導およびそのオートクライン刺激が必須であることが知られている²。

我々はこれまでに、一酸化窒素(NO)産生を指標に TLR シグナルに影響を与える種々の化合物を明らかにしてきた。その中で、TLR リガンド刺激による IFN 産生誘導が 2-aminopurine (2-AP)によって阻害されることを報告した³。本研究では、2-AP による TLR シグナル阻害機構の解明と、さらに活性の高い化合物探索のため、種々のプリン誘導体について検討を行った。

2. 実験

試薬: 2-AP、polyinosinic-polycytidylic acid (polyI:C)および LPS (*Escherichia coli* O55:B5)は Sigma 社より、Imiquimod は和光純薬工業より購入した。CpG オリゴ DNA は(株)理科

研に合成を依頼し、購入した。一連のプリン誘導体は岐阜薬科大学薬品化学講座、廣田耕作教授、佐治木弘尚助教授より供与された⁴。

細胞: マウス由来マクロファージ様細胞株 RAW264 を 5%ウシ胎児血清加 RPMI1640 にて培養した。ヒト胎児腎臓由来 293 細胞は 5%ウシ胎児血清加 Minimum Essential Medium Eagle にて培養した。

レポータージーンアッセイ: RAW264 細胞にレポータープラスミド pNF- κ B-Luc、pISRE-Luc、IFN- α 4-Luc、または IFN- β -Luc をトランスフェクションした。24 時間後、1mM 2-AP を含む培地で 30 分間前培養し、TLR リガンドを添加した。24 時間後、細胞を溶解してルシフェラーゼ活性を測定した。293 細胞については、上記レポータープラスミドと同時に TBK1-pDEST26 をトランスフェクションし、6 時間後に 1mM 2-AP を含む培地に交換し、さらに 18 時間後細胞を溶解し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

NO 測定: RAW264 細胞を 2-AP または化合物を含む培地で 30 分間前培養後、TLR リガンドを添加し、24 時間培養した培養上清中の Nitrite を Griess 法により測定した。

3. 結果・考察

2-AP による TLR 刺激 IFN 誘導シグナル阻害のメカニズム: RAW264 細胞に種々のレポータープラスミドをトランスフェクションし、poly I:C (TLR3 リガンド)、LPS (TLR4リガンド)、Imiquimod (TLR7 リガンド)および CpG DNA (TLR9 リガンド)で刺激したところ、NF- κ B については 5~10 倍、Type I IFN のオートクライン刺激により活性化される ISRE プロモーターについては 2~4 倍の活性化が認められた。代表的な Type I IFN である IFN- α 4 および IFN- β のプロモーター活性を調べたところ、IFN- β プロモーター活性は poly I:C および LPS 刺激において 3~5 倍に上昇したが、IFN- α 4 プロモーター活性は LPS 刺激で僅かに上昇したのみで、樹状細胞で報告されているような TLR7/9 刺激による IFN- α 4 プロモーター活性の上昇は、RAW264 においては検出されなかった(以上、データ示さ

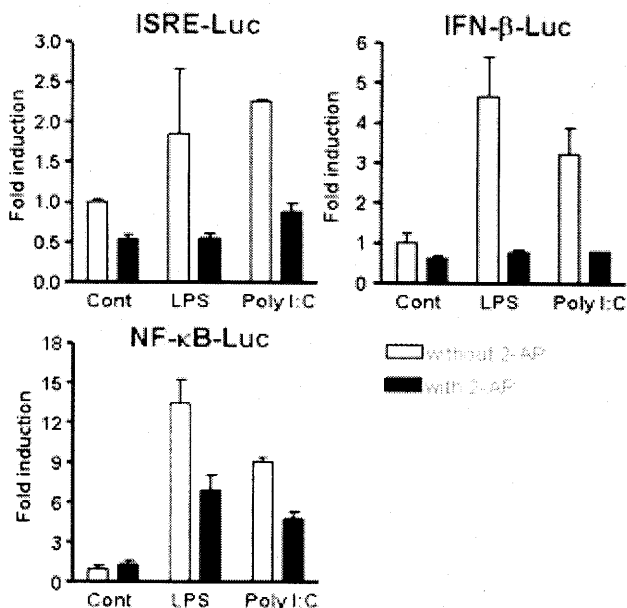


Fig. 1 Effect of 2-AP on ISRE, IFN-β and NF-κB promoter activity in LPS- or Poly I:C-stimulated RAW264 cells. The relative luciferase activity is expressed as the mean value of duplicates ± range.

ず)。

次に、poly I:C および LPS 刺激における NF-κB、ISRE および IFN-β プロモーター活性化に対する 2-AP による阻害活性を調べたところ、ISRE および IFN-β プロモーター活性の上昇は 2-AP 添加により対照とほぼ同程度まで抑制され、NF-κB の活性化についても抑制が見られた (Fig. 1)。この結果から、2-AP は TLR3/4 シグナルによる IFN-β 誘導を転写レベルで抑制していることが確認された。

さらに、2-AP の標的分子を同定するために、TLR3/4 シグナル伝達経路のキナーゼ分子である TBK1 を 293 細胞に過剰発現させることにより発生するシグナルに対する 2-AP の抑制作用を、レポータージーンアッセイを用いて調べた。TBK1 を過剰発現させると、NF-κB は約 2 倍程度、IFN-β プロモーター活性は約 20 倍に活性化され、いずれの活性化も 2-AP を添加することにより有意に抑制された (Fig. 2)。このことは TLR3/4 シグナル伝達系路の 2-AP の

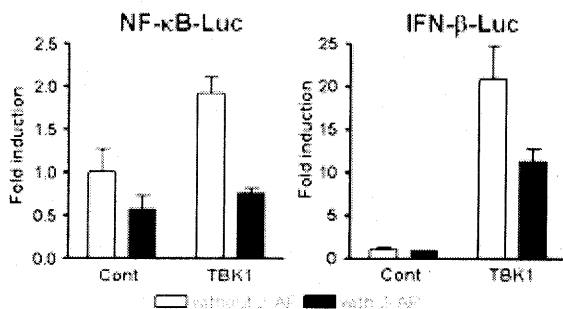


Fig. 2 Effect of 2-AP on NF-κB and IFN-β promoter activity in TBK1 overexpressed 293 cells. The relative luciferase activity is expressed as the mean value of triplicates ± SD.

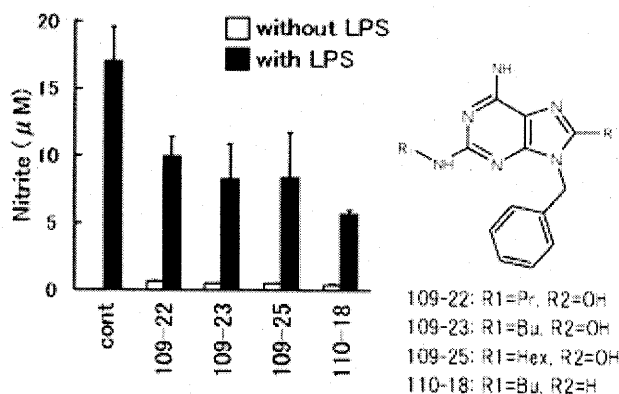


Fig. 3 Effect of purine derivatives on NO production from LPS-stimulated RAW264 cells. The nitrite concentration is expressed as the mean value of duplicates ± range.

標的分子が、TBK1 かその下流に存在することを示唆する。TBK1 は核因子である IRF-3 をリン酸化し、IRF-3 は IFN-β 遺伝子のプロモーター領域に結合して IFN-β を誘導すると報告されていることから¹、2-AP の標的分子は TBK1 か IRF-3 であると考えられる。また、TBK1 は TLR7/8/9 シグナルによる IFN 誘導にも関与する可能性があることから^{1c}、RAW264 細胞における TLR 刺激 NO 産生に対する 2-AP の阻害活性は、TBK1 阻害による可能性が示唆される。

TLR シグナル阻害活性を持つプリン誘導体の探索：24 種のプリン誘導体化合物について、LPS 刺激 NO 産生誘導に対する阻害活性をスクリーニングした。化合物を 100 μM で添加し、LPS で刺激を行ったところ、4 種の化合物が NO 産生阻害活性を示し、いずれも 2 位にアルキルアミノ基を有するものであった (Fig. 3)。これらの化合物は、低濃度で IFN を誘導することが報告されている化合物であり、RAW264 細胞においても 10 μM の濃度では化合物単独で NO 産生誘導が見られたが、100 μM では NO 産生は誘導されなかった。この結果から、これらのプリン誘導体では 2 位のアルキルアミノ基が IFN 誘導に抑制的に作用していると考えられ、TLR シグナルの制御に有用な化合物となりうることを示唆された。

4. 引用文献

- 1) Kawai T., Akira S., : (<http://www.nature.com/cdd/>), *Cell Death Differ.* AOP, January 20, 2006. b) Ishii K. J., Coban C., Akira S., *J Clin Immunol.*, **25**, 511, (2005). c) Moynagh P. N., *Trends Immunol.*, **26**, 469, (2005).
- 2) Toshchakov V., Jones B. W., Perera P. Y., Thomas K., Cody M. J., Zhang S., Williams B. R., Major J., Hamilton T. A., Fenton M. J., Vogel S. N., *Nat Immunol.* **3**, 392, (2002)
- 3) Sugiyama T., Fujita M., Koide N., Mori I., Yoshida T., Mori H., Yokochi T., *Microbiol Immunol.*, **48**, 957, (2004).
- 4) Hirota K., Kazaoka K., Sajiki H., *Bioorg Med Chem.*, **11**, 2715, (2003)