

# 11. Toll-like receptor 7が1型インターフェロンを産生するにはLFA-1が重要な役割を果たしている

齋藤伸一郎

東京大学医科学研究所感染遺伝学

## はじめに

Toll-like receptor (TLR) 7は樹状細胞, マクロファージやB細胞などの免疫担当細胞に発現しており, ウイルスや細菌のRNA成分を認識するセンサーとして働いている。形質細胞様樹状細胞 (pDC) に発現しているTLR7は, インフルエンザ感染時にウイルスのRNA成分を認識して大量の1型インターフェロンを産生することが知られている。pDCは大量に1型インターフェロンを産生することができる特別に分化した細胞で, ウイルスを認識するTLR7とTLR9だけが発現している。ウイルスが感染するとこれらTLRが活性化して1型インターフェロンを大量に産生し, ウイルス防御機構が作動する<sup>1,2)</sup>。TLR7はこのようにウイルス感染に対する生体防御に有用な役割を果たしている受容体であるが, 最近全身性エリテマトーデス (SLE) モデルマウスの解析からSLEの発症にもかかわっていると報告された<sup>3,4)</sup>。このSLEの発症においても1型インターフェロンが重要な役割を果たしており, SLEの患者の重篤度と血清の1型インターフェロンの濃度は相関することが知られている。さらにウイルスの防御に重要な役割を果たす細胞であるpDCがSLEのマウスモデルにおいてSLEの発症にかかわっていると報告されている<sup>5)</sup>。これらの報告からTLR7を介したpDCからの1型インターフェロンの産生が厳密に制御される必要があることが推測される。しかし, pDCにおけるTLR7の反応調節機構についてはほとんど分かっていない。本稿ではpDCにおけるTLR7の1型インターフェロン産生の調節機構についてわれわれが明らかにしたことを解説する。

## 1. 細胞間の接着と1型インターフェロンの産生

pDCはウイルス感染において生体防御のため1型インターフェロンを大量に産生する細胞である。そのpDCがB細胞やNK細胞と接着することで1型インターフェロンをより大量に産生することが報告された<sup>6,7)</sup>。1型インターフェロンの増強にかかわる接着分子についても報告され, LFA-1の作用を抑制する抗体

で1型インターフェロンの産生は抑制された。LFA-1はインテグリンファミリーに属している。LFA-1はCD11aとCD18からなり, CD18はインテグリンベータ2として知られている。われわれはLFA-1の機能を特異的につぶすためCD11aのノックアウト (KO) マウスを解析した。TLR7刺激下でCD11aのノックアウトマウス由来のpDCは炎症性サイトカインであるIL-12は野生型のpDCと同等に産生をするが, 1型インターフェロンであるインターフェロンアルファ (IFN $\alpha$ ) の産生は著しく減少していた。pDCは細胞表面にLFA-1だけでなくそのリガンドであるICAM-1とICAM-2を発現していることから, pDC同士の細胞間接着が悪くなったことも観察された。pDCのTLR7を刺激すると刺激後3時間から4時間くらいでpDC同士のaggregationが観察された。しかし, CD11aKO pDCではそのaggregationがほとんど認められなかった。われわれの解析ではTLR7の活性化後にMyD88を介してLFA-1のinside-outシグナル伝達分子として知られているprotein kinase D, そしてRap1が活性化されることが明らかになった。このことからTLR7の活性化により細胞膜上のLFA-1が活性化され, 細胞間同士の接着を強めることが明らかとなった。われわれの解析においてpDCは極性を持っており, 刺激とともにleading edge側が伸長する。その伸長に伴って微小管がleading edge側に強く伸長する。そしてTLR7もleading edge側に移動することが観察された。しかし, LFA-1KO pDCでは微小管の伸長が著しく悪いことが明らかとなった。そしてTLR7のleading edgeへの動きは非常に抑制されていた。このことからTLR7の刺激に伴う移動がIFN $\alpha$ の産生に関与するものと推測した。

## 2. TLR7に会合する低分子量G蛋白質Arl8bとPLEKHM2を介したTLR7の移動の制御と1型インターフェロンの産生

われわれはLFA-1の解析とは独立して, TLR7に会合する分子でTLR7の機能を制御する分子を同定した。樹状細胞にTLR7やTLR9と会合して小胞体からエンドソーム・ライソソームへの移動にかかわるUNC93b1のC末端にGFPを導入して, 抗GFP抗体で免疫沈降

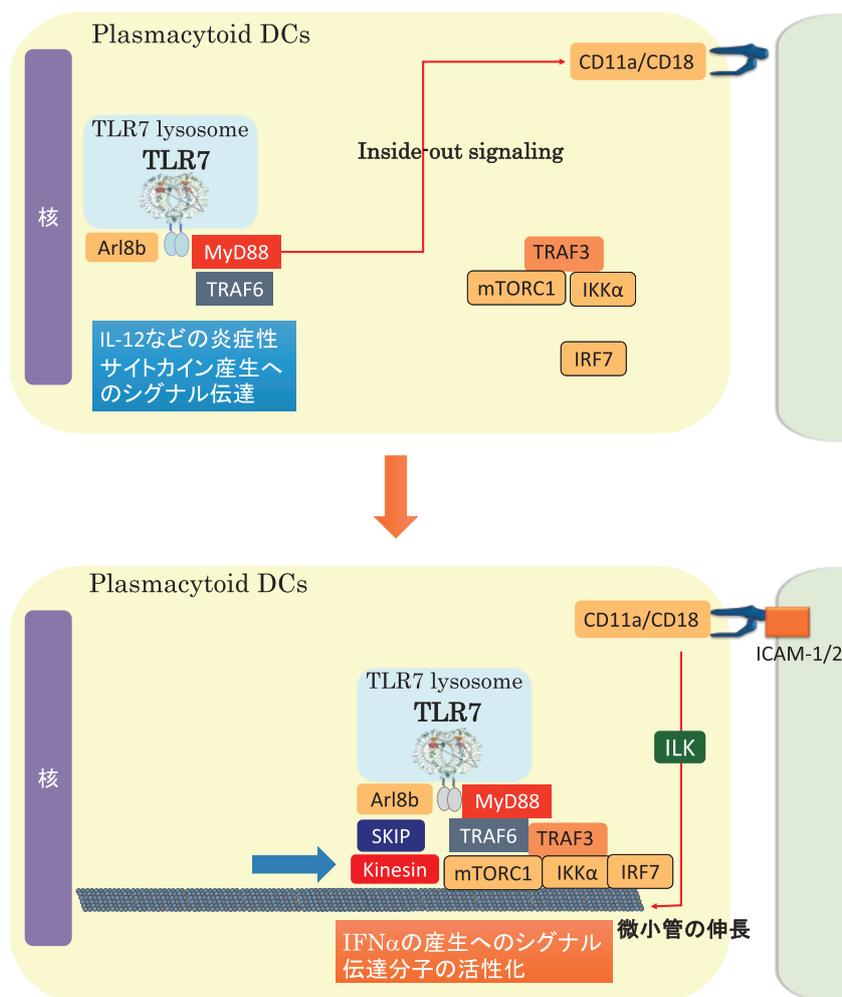


図1 細胞接着がTLR7の順行性の移動を促し、1型インターフェロンの産生を誘導する

刺激前においてTLR7は細胞内全体に存在するが、ほとんどのTLR7は核の近くに局在を示す。しかし、TLR7刺激が入ると炎症性サイトカイン産生に向けてNF- $\kappa$ Bの活性化などが起こる。そしてさらに、MyD88依存的にinside-outシグナル伝達が活性化し、インテグリンの活性化を誘導する。インテグリンの一つLFA-1が活性化すると、ICAM-1/2と会合して細胞の接着を強く誘導する。細胞間の接着は微小管の極性を持った伸長を起こすことにつながる。それらのシグナルがArl8bを活性化させ、PLEKHM2との会合が促進する。PLEKHM2はキネシンと会合して微小管に会合する。そのことがArl8bに結合しているTLR7を微小管に移動させて順行性の移動を促進させる。TLR7の順行性の移動は細胞内のmTORC1/TRAF3/IKK $\alpha$ の存在する場への移行につながり、TLR7がそのシグナルの場に入ることによって、IFN $\alpha$ の産生につながるシグナル伝達が起こる。

した。さらに、マクロファージを抗TLR7抗体にて免疫沈降することで、UNC93b1やTLR7に会合する分子を液体クロマトグラフィー質量分析法にて同定した。このUNC93b1にもTLR7にも会合していた分子はライソソームに局在する低分子量G蛋白質のADP-ribosylation factor-like 8b (Arl8b)であった<sup>8)</sup>。実際にpDCを用いてTLR7を免疫沈降するとArl8bが会合することが確認され、TLR9とはあまり会合していないこ

とからTLR7に対する特異性が示された。次にArl8bのpDCにおける機能を調べるため、Arl8bの発現を無くする遺伝子改変マウスArl8b GeneTrap (Arl8bGt)マウスを用いて解析した。するとArl8bGtのpDCはTLR7刺激特異的にIFN $\alpha$ の産生が著しく減少した。Arl8bはPLEKHM2と会合することでKinesin-1と会合し、微小管上を順行性に移動する<sup>9)</sup>。このようにArl8bはライソソームの順行性の輸送にかかわってい

るとの報告があったため、pDCにおけるTLR7の局在を調べると、TLR7のほとんどはライソソームに局在していた。このことからArl8bGtのpDCにおいて刺激後のTLR7の動向を検討してみると、WTにおいては刺激とともにTLR7が微小管と共局在するにもかかわらず、Arl8bGtではそれがほとんど認められなかった。さらに刺激によるTLR7の移動もArl8bGt pDCではほとんど確認できなかった。そこでPLEKHM2KOマウスを入手しPLEKHM2KOのpDCを解析すると、Arl8bGtと同様にTLR7刺激依存的な微小管への局在もほとんど認められず、TLR7の順行方向への移動もほとんど認められなかった。そしてArl8bGtと同様にTLR7刺激後のIFN $\alpha$ の産生が著しく減少していた。これらの結果からTLR7にArl8bとPLEKHM2が会合することで、TLR7が刺激依存的に順行性に移動してIFN $\alpha$ の産生につながるシグナル伝達が始まることが予想された。TLR7は刺激後TRAF6を活性化させ、炎症性サイトカインのためのシグナル伝達であるNF- $\kappa$ BやMAP kinaseを活性化する。次にTRAF3やIRF7が活性化されることにより、IFN $\alpha$ の産生が起こる<sup>10-12</sup>。われわれはTLR7刺激後にTRAF6に1型インターフェロン産生にかかわるTRAF3とIRF7が会合してくることを免疫沈降法にて観察した。そして、この現象はArl8bGtのpDCではほとんど観察できなかった。このことから、TRAF6がTRAF3やIRF7と会合してIFN $\alpha$ の産生を誘導するにはArl8bを介したTLR7の移動が重要である可能性が示唆された。最後にインフルエンザウイルスを感染させArl8bGt pDCの反応を調べると、炎症性サイトカインIL-12の産生は野生型と変わらないにもかかわらず、IFN $\alpha$ の産生は著しく低下した。このインフルエンザウイルス感染においても、野生型のpDCではTLR7は微小管と共局在を示し、順行性の移動を確認できた。しかし、Arl8bGtのpDCではTLR7は感染後ほとんど微小管と共局在せず、TLR7の順行性の移動がほとんど観察できなかった。このことからウイルス感染における反応においてもTLR7の順行性の移動がIFN $\alpha$ の産生と結びついていることが示唆された。

## おわりに

図1に示すようにわれわれの研究結果をまとめるとTLR7刺激によりMyD88依存的なinside-out signalingの活性化によりLFA-1の活性化をもたらす、pDC同士の接着が起こる。そして、そのことがpDC内の極性をもった微小管の伸長を促し、TLR7に会合しているArl8bがPLEKHM2を介して微小管に会合するようになる。次にTLR7が微小管上を移動してIFN $\alpha$ の産生につながるシグナル伝達分子TRAF3やIRF7と出会う場であるmTorC1が存在するライソソームに順行性

の移行をするということである。pDC、そしてpDCに存在するTLR7やその下流の産生物であるIFN $\alpha$ はウイルスに対する防御に重要な役割を果たしているが、SLEの発症にもかかわるといわれている。そのため、次にわれわれはArl8bとSLEの発症に関して検討したい。

## 文 献

- 1) Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, et al. : Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303 : 1529-1531, 2004
- 2) Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. : Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303 : 1526-1529, 2004
- 3) Pisitkun P, Deane JA, Difilippantonio MJ, et al. : Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. *Science* 312 : 1669-1672, 2006
- 4) Christensen SR, Shupe J, Nickerson K, et al. : Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity* 25 : 417-428, 2006
- 5) Rowland SL, Riggs JM, Gilfillan S, et al. : Early, transient depletion of plasmacytoid dendritic cells ameliorates autoimmunity in a lupus model. *J Exp Med* 211 : 1977-1991, 2014
- 6) Hagberg N, Berggren O, Leonard D, et al. : IFN- $\alpha$  production by plasmacytoid dendritic cells stimulated with RNA-containing immune complexes is promoted by NK cells via MIP-1 $\beta$  and LFA-1. *J Immunol* 186 : 5085-5094, 2011
- 7) Ding C, Cai Y, Marroquin J, et al. : Plasmacytoid dendritic cells regulate autoreactive B cell activation via soluble factors and in a cell-to-cell contact manner. *J Immunol* 183 : 7140-7149, 2009
- 8) Khatter D, Sindhwani A, Sharma M : Arf-like GTPase Arl8 : Moving from the periphery to the center of lysosomal biology. *Cell Logist* 5 : e1086501, 2015
- 9) Rosa-Ferreira C, Munro S : Arl8 and SKIP act together to link lysosomes to kinesin-1. *Dev Cell* 21 : 1171-1178, 2011
- 10) Sasai M, Linehan MM, Iwasaki A : Bifurcation of Toll-Like Receptor 9 Signaling by Adaptor Protein 3. *Science* 329 : 1530-1534, 2010
- 11) Hacker H, Redecke V, Blagoev B, et al. : Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 439 : 204-207, 2006
- 12) Oganessian G, Saha SK, Guo B, et al. : Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and-independent antiviral response. *Nature* 439 : 208-211, 2006