

「免疫難病・感染症等の先進医療技術」

平成13年度採択研究代表者

瀬谷 司

(北海道大学大学院医学研究科 教授)

「自然免疫とヒト難治性免疫疾患」

## 1. 研究実施の概要

自然免疫(リンパ球以前の微生物識別・排除系)の分子反応系・細胞応答系を蛋白・遺伝子レベルで解明し、ウイルス疾患、がんなど難治性免疫疾患の病因・病態にアプローチする。微生物成分(PAMP)は一般に貪食とシグナルを担当細胞(ヒトならマクロファージと樹状細胞)に誘起する。Toll-like receptor (TLR)ファミリーは代表的なシグナルレセプターである。本報告ではまず、ウイルス成分や産物とTLRの応答を特に焦点化し、感染と防御の機構を自然免疫の視点から解析する。次にTLRのレセプター複合体、特にアダプター分子とウイルスの侵入レセプターの関連を貪食・シグナルなどの機能解析を通して明らかにする。レセプターによって誘起される自然免疫の細胞応答をoutcome(サイトカイン、副刺激分子、抗菌物質など)とmicroarray(本研究にて~200の感染誘導性の遺伝子を撰んだ)によって体系化する。次のがんの場合、がん抗原に加えて自然免疫の先行的活性化が抗がん免疫誘起に必須であるとの仮説をモデル動物と移植がんの系で検証していく。ヒトでは正常人の応答をまず資料化し、次に患者の樹状細胞で細胞応答の相違を検討する。アレルギーの場合、自然免疫とウイルス感染は増悪因子として働く。SNP情報を駆使して喘息患者の気道上皮TLR3の発現上昇と気道過敏性の関連を示唆するデータをえた。これらのSNPはI型IFNの産生を調節することで疾患発症とかかわりがあることが判明した。これら疾患と自然免疫関連因子の関係をgenechip profileから類推し、病態改善に必須な試薬(PAMPのアゴニスト・アンタゴニスト)をスクリーンする。これらを動物実験などで確認し、創薬化を企画する。難治疾患の診断・治療に必要な情報を自然免疫の観点からデータベース化する。

## 2. 研究実施内容

### 2-1 分子生化学的解析, リガンド・レセプターの同定と分子間反応

ヒトTLRの抗体を作成し、各細胞を染色した。TLR9のみは市販抗体を用いた。Monocyte-derived DC (mDC), plasmacytoid DC (pDC)について下記の結果を得た。これまでTLRはmessageのみの推測結果であったが、本研究で樹状細胞における蛋白質の発現として証明できた。TLRの分布、細胞局在、リガンド認識阻害などを樹状細胞(DC)を用いて検討し

た。核酸誘導体認識のTLR (3, 7, 9) は細胞内のオルガネラに局在すること、他の産物認識性のTLR (1, 2, 4, 6) は細胞表面に大部分が局在することが判明した (図1)。

一般にmDCは TLR2, 3, 4を蛋白レベルで発現した。pDCはmDCと異なりTLR7, 9を蛋白レベルで強発現した。DCはサブセット特異的なTLR の発現プロファイルをもつ。

TLR2, 4 は細菌成分を認識しNF- $\kappa$ B依存的に急性期蛋白を発現誘導する。TLR3, 7, 8, 9 は核酸誘導体を認識しinterferon (IFN)  $\alpha/\beta$  を誘導する。その後、TLR3はウイルスdsRNAを認識し、TLR7, 9はG/U-rich なウイルスRNAを認識することが報告された。我々は主要な抗原提示細胞のmDC がdsRNA, BCG成分で異なった成熟状態に誘導されることを示した。一般にmDCはIFN- $\beta$ 誘導刺激でNK活性化能の高いmDCに、NF- $\kappa$ B誘導刺激でCTL活性化能の高いmDCに分化する (Akazawa et al., Cancer Res 2004)。ウイルス感染実験でIFN- $\beta$ 誘導性mDCの分化が起こるかを検討中である (Tanabe et al., 投稿中)。

昨年、TLR3 のIFN  $\beta$  誘導を選別するアダプター分子TICAM-1を同定した。今年度はTICAM-1の下流分子をyeast two-hybridなどでいくつか同定した。この中にはIRF-3活性化kinaseの上流分子と想定されるもの、NF- $\kappa$ B活性化を指向する分子が含まれており、機能同定を急いでいる。

TLR2、TLR6は機能阻害抗体であった。リガンド (MALP-2) による樹状細胞活性化を阻害するかを検討中である (Nakao et al., 投稿中)。

表1 単クローン抗体によるヒトTLRの分布解析

DC subsets <sup>3)</sup>	monoclonal antibodies against:						
	TLR1 <sup>2)</sup>	TLR2 <sup>2)</sup>	TLR6 <sup>2)</sup>	TLR4 <sup>2)</sup>	TLR3 <sup>1)</sup>	TLR7 <sup>1)</sup>	TLR9 <sup>1)</sup>
Mon-derived	+	++	+	+	++	-	-
Plasmacytoid	-	-	-	-	-	++	++
Neutrophil	+	+++	+	+	-	-	-

1) 核酸認識性 TLRは細胞内に分布する

2) 微生物産物認識性TLRは原則的に細胞外に分布する

3) TLRsは T, B and NK 細胞にも分布するが、その機能は不明である

## 2-2 TLR SNP と疾患の関連 (白川グループ)

ヒトTLR1-10およびその関連分子であるCD14, Myd88, RP105, MD-1, MD-2, IL-12Bにおける遺伝子を探索し、新規SNPを含む遺伝子内の主要なSNPのリストを世界で初めて

作成するとともに、免疫関連の疾患である喘息を代表としてこれらのSNPを用いて患者一対照者における解析を行ない、以下の結果を得た。

- a. ヒトTLR1-10及びその関連分子を含む遺伝子内の全てのSNPを発見した。このうち蛋白質の変異を伴うものは、16個見出された。
- b. 上記のSNPに関して喘息症例（小児喘息346例、成人喘息386例）及び正常対照者680例を用いて関連研究を行なったところ、小児喘息とTLR3, IL-12Bに強い関連を認めた。
- c. 小児喘息ではウイルス感染に引き続いて引き起こされる症例が多いことが疫学的に知られており、TLR3とウイルス感染の関連が示唆された。さらにTH1誘導におけるIL-12の重要性が知られているが、その点においても小児喘息患者はIL-12の誘導に問題があることが判明した
- d. TLR3の発現と誘導されるIFNを測定するとTLR3の発現に比例してIFN産生が増強した。IL-12nomRNAの安定性が喘息患者群で低かった

以上の結果は、RNAウイルス由来のdsRNA刺激により気道上皮におけるTLR3の発現が調節され、それにより抗ウイルス作用を持つIFNが誘導されることを示したもので、喘息患者ではこの機能がSNPにより弱まり、さらにTH1誘導因子であるIL-12が十分産生されないことから、気道における炎症が遷延し、気道の過敏性を獲得するものと予想される。

### **2-3 自然免疫関連遺伝子群と病態の関連解析**

微生物成分は adjuvant として抗原と混合して免疫活性化を誘起するのに使われてきた。がん患者に実際に用いられて有効なBCGの細胞骨格成分（CWS）もadjuvantである。BCG-CWS のヒト樹状細胞刺激によって特異変動する遺伝子群は3群あった。Zn/Fe transporter family, Lectin receptor, IL-23などのcytokines であった（Begum et al., Infect Immun, 2004）。このうち、Zn/Fe transporter family がTLR2/4刺激で増加し、樹状細胞mDCのZn依存性の転写活性を上げている可能性（Begum et al., Genomics 2002）を示した。このfamily はBIGM103, LIV-1, HKE4などを含む。Zn依存性の転写活性はmDCの抗原提示機能の誘導に必須かもしれない。この点をRNAiなどで検証する予定である。

BCG-CWS、polyI:CなどTLRリガンドの結合レセプターを同定する仕事はmass spectrometryを使って検討する。この目的でLC-mass を起動させた。現在、技術習得中である。

麻疹ウイルスのワクチン株はIFN- $\beta$ を強く誘起するがwild-type は誘起しない。麻疹ウイルスの免疫抑制はBCG-CWS投与で改善しない。Genechip profiling からTLR3, CDw150, CD46などを介して変動する遺伝子群がIFN- $\beta$ 誘導に関与することが判明した（Tanabe, submitted）。また、従来IFN-inducible genes と同定されなかった機能未知の遺伝子群がウイルス感染で樹状細胞に強く誘導されることが判明した。これらの遺伝子の機能をウイルス依存性の免疫抑制やIFN誘導能との関連を検討中である。

## 2-4 ヒトの機能未知の基本免疫関連因子群の解析, innate immunity のモデル動物の開発

BCG-CWS によって誘導される遺伝子の機能を解析する。自然免疫解析用の動物モデルを作製して分子機能を明らかにしていく。

- a. BCG-CWS によって誘導される遺伝子群のうち、エンドソームで高発現が誘導される metal-transporter について機能解析を行なった (Begum, Genomics, 2002)。これらは DC 活性化 (cross-priming) と連動していることが移植がんの拒絶実験から示唆された (Akazawa, submitted)。
- b. Genome project が進行しているフグでヒト TLR の保存性を関連を調べた (Oshiumi, Immunogenetics, 2003)。サカナがヒト自然免疫 (TLR系) のモデルになることが判明したのでフグゲノム情報から cDNA cloning が可能なメダカでがん、感染のモデル系を確立する予定である。

## 2-5 合成物による樹状細胞活性化

放線菌由来の TLR 活性化物質 (TAN シリーズ) が脂質と同定されたので、武田薬品工業 (谷田ら) とこれを合成し活性を再現できた。TAN は lipoprotein で diacylated form, triacylated form があり、前者は TLR2 と TLR6, 後者は TLR2 と TLR1 をレセプターとすることが 1) mDC の抗体阻害実験と 2) HEK293 の発現実験から証明できた。マウス担がんモデルの in vivo 実験から TAN には強い抗がん活性が見出された。TAN には GM-CSF の誘導活性もある。また、IL-10 など抑制性サイトカインも誘導する。これらの機能と抗がん効果について関連性を調べている。

この他、BCG-CWS の活性中心が monoacylated MDP と判明したので合成によって GMP 基準を満たす TLR2/4 活性化アジュバントを開発する計画である。これらは他のアジュバントの活性中心やペプチドワクチンと融合分子を作るにも有利である。

## 3. 研究実施体制

### 3-1 大阪府立成人病センター研究所グループ

- ① 研究分担グループ長：瀬谷司 (大阪府立成人病センター研究所 所長)
- ② 研究項目：Innate immunity に関与する遺伝子群の micro-array, genechip による同定、プロテオーム解析技術の開発、各種アジュバントの機能同定と探索、ウイルスレセプター、貪食・補体レセプターの同定・解析、動物実験系の確立

### 3-2 京都大学大学院医学研究科グループ

- ① 研究分担グループ長：白川太郎 (京都大学大学院医学研究科、教授)
- ② 研究項目：喘息における自然免疫分子の相関解析

### 3-3 理化学研究所遺伝子多型研究センターグループ

- ① 研究分担グループ長：白川太郎（理化学研究所、チーム・リーダー）
- ② 研究項目：喘息における自然免疫分子の発現と機能解析

#### 3-4 武田薬品（株）医薬探索センターグループ

- ① 研究分担グループ長：谷田清一（研究所、室長）
- ② 研究項目：各種微生物由来のToll-like receptor 刺激因子（PAMP）の調製、PAMP の誘導体の合成、機能の総合評価、高次構造解析

#### 4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

##### (1) 論文発表

##### 瀬谷グループ

- Uehori, J., M. Matsumoto, S. Tsuji, T. Akazawa, O. Takeuchi, S. Akira, T. Kawata, I. Azuma, K. Toyoshima, and T. Seya. 2003. Simultaneous blocking of human Toll-like receptor 2 and 4 suppresses myeloid dendritic cell activation induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG)-peptidoglycan (PGN). *Infect. Immun.* 71: 4238-4249.
- Oshiumi, H., K. Shida, M. Sasai, T. Fujita, M. Matsumoto, and T. Seya. 2003. Identification of the Toll-like receptor (TLR)-adapter that participates in TLR4-mediated interferon-beta induction. *J. Biol. Chem.* 278: 49751-49762.
- Matsumoto, M., K. Funami, M. Tanabe, H. Oshiumi, M. Shingai, Y. Seto, A. Yamamoto, and T. Seya. 2003. Subcellular localization of human Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J. Immunol.* 171: 3154-3162.
- Seya, T., T. Akazawa, Uehori J., M. Matsumoto, I. Azuma, and K. Toyoshima. 2003. Role of Toll-like receptors and their adapters in adjuvant immunotherapy for cancer. *Anticancer Res.* 23: 4369-4376 (review).
- Takeuchi, J., E. Watari, E. Shinya, Y. Norose, M. Matsumoto, T. Seya, M. Sugita, S. Kawana, and H. Takahashi. 2003. TGF-beta1 maintains the skin homeostasis by modulating responsiveness of Langerhans cells against bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306: 674-679.
- Honda, K., S. Sakaguchi, C. Nakajima, A. Watanabe, H. Yanai, M. Matsumoto, T. Ohteki, T. Kaisho, A. Takaoka, S. Akira, T. Seya, and T. Taniguchi. 2003. Selective contribution of IFN-a/b signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 10872-10877.
- Tanabe, M., M. Kurita-Taniguchi, K. Takeuchi, M. Takeda, M. Shingai, M. Ayata, H. Ogura, M. Matsumoto, and T. Seya. 2003. Mechanism of up-

regulation of human Toll-like receptor (TLR) 3 secondary to infection of measles virus attenuated strains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311: 39-48.

- Shingai, M., M. Ayata, H. Ishida, I. Matsunaga, Y. Katayama, T. Seya, H. Tatsuo, Y. Yanagi, and H. Ogura. 2003. Receptor use by vesicular stomatitis virus pseudotypes with glycoproteins of defective variants of measles virus isolated from brains of patients with subacute sclerosing panencephalitis. *J. Gen. Virol.* 84: 2133-2143.
- Begum, N. A., K. Ishii, M. Kurita-Taniguchi, M. Tanabe, M. Kobayashi, Y. Moriwaki, M. Matsumoto, Y. Fukumori, I. Azuma, K. Toyoshima, and T. Seya. 2004. BCG-cell-wall-specific differentially expressed genes identified by differential display and cDNA subtraction in human macrophages. *Infect. Immun.* 72: 937-948.
- Akazawa T., H. Masuda, Y. Saeki, M. Matsumoto, K. Takeda, S. Akira, I. Azuma, K. Toyoshima, and T. Seya. 2004. Adjuvant-mediated tumor regression and tumor-specific CTL induction are impaired in MyD88-deficient mice. *Cancer Res.* 64: 757-764.
- Funami, K., M. Matsumoto, H. Oshiumi, T. Akazawa, A. Yamamoto, and T. Seya. 2004. Multifunctional feature of Toll-like receptor 3 cytoplasmic tail that regulates receptor localization and signaling. *Int. Immunol.* (in press).
- Ishida, H., M. Ayata, M. Shingai, I. Matsunaga, Y. Seto, Y. Katayama, N. Iritani, T. Seya, Y. Yanagi, O. Matsuoka, T. Yamano, and H. Ogura. 2004. Infection of different cell lines of neural origin with subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus. *Microbiol. Immunol.* 48: 277-287.
- Matsumoto M., K. Funami K., H. Oshiumi, and Seya T. 2004. Molecular mechanism of TLR3-mediated interferon-beta induction. *Microbiol. Immunol.* 48: 147-154. (review)
- Kimura, Y., N. Inoue, A. Fukui, H. Oshiumi, M. Matsumoto, M. Nonaka, S. Kuratani, T. Fujita, M. Nonaka, and T. Seya. 2004. A short consensus repeat-containing complement regulatory protein of Lamprey, which participates in cleavage of lamprey C3. *J. Immunol.* (in press).

#### 白川グループ

- Shimada T, Cheng L, Ide M, Fukeda S, Enomoto T, Shirakawa T. Effect of lysed enterococcus faecalis FK-23 (LFK) on allergen-induced peritoneal accumulation of eosinophils in mice. *Clin. Exp. Allergy.* 2003;33:684-687.

- Bottini N, Mao XQ, Borgiani P, Saccucci P, Stefanini L, Greco E, Fontana L, Hopkin JM, Shirakawa T: Genetic control of serum IgE level; a study of lowmolecular weight protein tyrosine phosphatase. *Clin. Genet.* 2003;63:228-231
- Ouchi K, Suzuki Y, Shirakawa T, Kishi F. Polymorphism of SLC11A1 (formerly NRAMP1) gene confers susceptibility to Kawasaki disease. *J. Infect Dis.* 2003;187:326-329.
- Tanaka K, Roberts MH, Yamamoto N, Sugiura H, Uehara M, Mao X-Q, Shirakawa T, Hopkin JM: Heterogeneity of atopic eczema; a genetic variant of RANTES and high IgE level. *Clin. Exp. Allergy.* (in press)
- Hasegawa K, Hirota T, Obara K, Akahoshi M, Cheng L, Takahashi Shimizu M, Sekiguchi H, Kokubo M, Doi S, Fujiwara H, Miyatake A, Fujita K, Enomoto T, Mao X-Q, Tamari M, Shirakawa T: Association between genetic variation in the gene for ADAM33 and clinical severity of childhood asthma in the Japanese population. *Hum. Genet.* (in press).
- Akahoshi M, Ishihara M, Remus N, Uno K, Miyake K, Hirota T, Nakashima K, Matsuda A, Kanda M, Enomoto T, Ohno S, Nakashima H, Casanova JL, Hopkin JM, Tamari M, Mao XQ, Shirakawa T: Association between IFNA genotype and the risk of sarcoidosis. *Hum. Genet* 2004;114:503-509.
- Shao C, Suzuki Y, Kamada F, Kanno K, Tamari M, Hasegawa K, Aoki Y, Kure S, Yang X, Endo H, Takayanagi R, Nakazawa C, Morikawa T, Morikawa M, Miyabayashi S, Chiba Y, Karahashi M, Saito S, Tamura G, Shirakawa T, Matsubara Y: Linkage and association of childhood asthma with the chromosome 12 genes. *J. Hum. Genet.* 2004;49:115-122.
- Nakajima T, Iikura M, Okayama I, Matsumoto K, Uchiyama C, Shirakawa T, Yang X, Adra CN, Hirai K, Saito H: Identification of granulocyte subtype-selective receptors and channels by high-density oligonucleotide probe array. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004; 113:528-535.
- Peisong G, Mao XQ, Enomoto T, Feng Z, Gloria-Bottini F, Bottini E, Shirakawa T, Sun D, Hopkin JM: An asthma-associated genetic variant of STAT6 predicts low burden of ascaris worm infestation. *Genes Immun.* 2004;5:58-62.
- Fukuda S, Ishikawa H, Koga Y, Yaiba Y, Nakashima K, Cheng L, Shirakawa T: Allergy and serum antibodies against bacterial species of predominant commensal intestinal microflora in schoolchildren. *J. Adoles. Health.* 2004;35 (in press)

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数： 国内1 件、PCT 1 件

(研究期間累積件数： 国内 3件,、 P C T 出願 2件)