

「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選んだ)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。これらがん、ウイルス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の存在はmessageのみの推測結果であったが、本研究でヒト樹状細胞における蛋白質の発現として証明できた。まずヒトTLRの分布、細胞局在、リガンド認識阻害などをmDCを用いて検討した。核酸誘導体認識のTLR(3, 8)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(表1)。ヒトTLR3, 8の抗体は本企画で世界初の公表であり、TLR8はマウスになくてヒトにはmDCのみ

に局在することが判明した。一般にmDCは微生物産物認識性TLR (TLR1, 2, 4, 5, 6)を蛋白レベルで発現した。

これに対しpDCはmDCと異なり核酸認識TLR7, 9を蛋白レベルで強発現した。他の産物認識性TLRの発現はpDCで検出できなかった。従ってDCはサブセット特異的なTLRの発現プロフィールをもち、ヒトとマウスで一部異なる。

TLR2, 4は細菌成分を認識しNF- κ B依存的に急性期蛋白を発現誘導する。TLR3はdsRNAを認識しTICAM-1 (TRIF)-IRF-3依存性にinterferon (IFN) α / β を誘導する。その後、TLR7, 9はG/U-richなウイルスRNA, CpG DNAをそれぞれ認識してMyD88-IRF-7依存性にIFN- α を誘導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- β 誘導刺激でNK活性化能の高いmDCに、NF- κ 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)。CTL誘導性のmDCが如何なる特徴を持つか検討中である。一方、IFN- β 誘導性mDCの分化はNK活性化レセプターのNKG2Dを活性化することが判明した。ヒトmDCではULBP1/2をIFNが発現上昇させることが一因と考えられた (Tanabe et al., 投稿中)。マウスmDCではアダプターMyD88がCTL誘導を、TICAM-1がNK活性化を選択すると云える。ヒトmDCの解析は今後の企画に残される。

TLR3のIFN β 誘導を選別するアダプター分子TICAM-1の下流分子を同定する企画からmDCの機能選別に関与する分子を調べた。IFN β 誘導性TICAM-1の下流分子としてNAP1が同定できた。NAP1はIKK ϵ , TBK1 (kinase complex)と複合体を形成するregulatory subunitと判明した。この他にもIRF-3活性化kinaseの上流分子と想定されるもの、NF- κ B活性化を指向する分子が含まれており、機能同定を進めている。

ヒトTLR1, TLR2, TLR6の抗体は機能阻害効果を含めて検討し、TLR6の阻害でdiacyl lipoproteinのTLR2活性化作用が抑制されること、TLR1, TLR6はそれぞれmDCの膜上でTLR2と共局在を示すことを証明した (Nakao et al., 2005)。

表1 単クローン抗体によるヒトTLRの分布解析

DC subsets ³⁾	monoclonal antibodies against:							
	TLR1 ²⁾	TLR2 ²⁾	TLR6 ²⁾	TLR4 ²⁾	TLR3 ¹⁾	TLR7 ¹⁾	TLR8 ¹⁾	TLR9 ¹⁾
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 and NK細胞にも分布するが、その機能は不明である

2-2 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。他のBCG-inducible genesを含めて網羅的にRNAiを行い機能を検討している。

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、BCGの糖鎖、polyI:Cに結合する分子を蛋白化学的手法で同定中である。

麻疹ウイルスのワクチン株はIFN- β 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, CD150, CD46などを介して変動する遺伝子群がIFN- β 誘導に関与することが判明した（Tanabe, submitted）。また、従来ウイルスによって誘導されるIFN-inducible genesの中に細胞内IRF-3-IFN誘導の引き金因子、RIG-I, MDA5が含まれることが判明した。RIG-Iの下流分子をRNAiでサーチしたところ、NAP1, TBK1, IKK ϵ のkinase複合体が存在すると判明した（Shingai, Tanabe et al, submitted）。これらとすでにウイルス感染でup-regulateすると同定された機能未知の遺伝子群の機能検定をRNAiで試行中である。これらの遺伝子の機能と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。

2-3 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mDC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との関連を調べた（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。今年の知見はサカナの可溶性TLR5がflagellinの膜型TLR5活性化を著しく増加させること（Tsuji et al., 2005）を示した。ヒトでも同様の可溶性TLR5アジュバントが開発できるか検討中である。

2-4 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。脂質にはhydrophilic amino acidsを修飾付加することがTLR活性化とそれから導かれる抗がん効果に必須であることが判明した（Akazawa et al., 2005）。

この他、BCG-CWSのTLR2/4リガンド活性中心が6-O-monoacylated MDPと判明した（Uehori et al., 2005）。このことはmonoacyl MDPの合成によってGMP基準を満たすTLR2/4活性化アジュバントを開発できることを示唆する。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 北海道大学大学院医学研究科グループ

- ① 研究分担グループ長：瀬谷司（北海道大学大学院医学研究科 教授）
- ② 研究項目：Innate immunityに関与する遺伝子群、TLR/アダプター群の構造・機能、PAMPの機能同定と探索、合成アジュバントと機能の指向性の検討、ウイルスレセプター、貪食・補体レセプターの同定・解析、魚の自然免疫とTLRの解析

3-2 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：松本美佐子（大阪府立成人病センター研究所免疫学部門 部長）
- ② 研究項目：患者検体のgenechip解析、SNPデータベースを用いたSNP—疾患の関連解析、TLRによるリガンド認識機構の解析、取り込みレセプターの同定、RNAi法などによる遺伝子機能の検索、抗体などによる分子複合体の分子同定と解析、マウス移植がんの系を用いたアジュバントの効果査定、動物実験系の確立

3-3 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（武田薬品工業株式会社医薬研究本部 主席部員）
- 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（原著論文）発表

- Funami, K., M. Matsumoto, H. Oshiumi, T. Akazawa, A. Yamamoto, and T. Seya. 2004. The cytoplasmic 'linker region' in Toll-like receptor 3

- controls receptor localization and signaling. *Int. Immunol.* 16: 1143-54.
- 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 that participates in cleavage of lamprey Complement 3. *J. Immunol.* 173: 1118-28.
 - Tsujita, T., H. Tsukada, M. Nakao, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2005. Sensing Bacterial Flagellin by Membrane and Soluble Orthologs of Toll-like Receptor 5 in Rainbow Trout (*Onchorhynchus mikiss*). *J. Biol. Chem.* 279: 487588-48597.
 - Sasai, M., H. Oshiumi, M. Matsumoto, N. Inoue, F. Fujita, M. Nakanishi, and T. Seya. 2005. Cutting Edge: NF- κ B-activating kinase-associated protein 1 participates in TLR3/Toll-IL-1 homology domain-containing adapter molecule-1-mediated IFN Regulatory Factor 3 activation. *J. Immunol.* 174: 27-30.
 - Tsukada, H., A. Fukui, T. Tsujita, M. Matsumoto, T. Iida, and T. Seya. 2005. Fish soluble Toll-like receptor 5 (TLR5S) is an acute-phase protein with integral flagellin-recognition activity. *Int. J. Mol. Med.* 15: 519-525.
 - Nakao, Y., K. Funami, S. Kikkawa, M. Taniguchi, M. Nishiguchi, Y. Fukumori, T. Seya, and M. Matsumoto. 2005. Surface-expressed TLR 6 Participates in the Recognition of Diacylated Lipopeptide and Peptidoglycan in Human Cells. *J. Immunol.* 174: 1566-1573.
 - Ishii, K., M. Kurita-Taniguchi, M. Aoki, T. Kimura, Y. Kashiwazaki, M. Matsumoto, and T. Seya. 2005. Gene-inducing program of human dendritic cells in response to BCG cell-wall skeleton (CWS), which reflects adjuvancy required for tumor immunotherapy. *Immunol. Lett.* (in press).
 - Uehori, J., K. Fukase, T. Akazawa, M. Matsumoto, I. Azuma, K. Toyoshima, S. Kusumoto, and T. Seya. 2005. Dendritic cell (DC) maturation induced by muramyl dipeptide (MDP) derivatives: Monoacylated MDP confers TLR2/TLR4 activation. *J. Immunol.* (in press).
- (2) 特許出願
H16年度特許出願件数 : 2件 (CREST研究期間累積件数 : 7件)