

戦略的創造研究推進事業
発展研究（SORST）

研究課題
「自然免疫システムの
分子機構の解明」

研究期間：平成13年3月1日～平成14年11月30日

研究代表者
審良 静男
大阪大学微生物病研究所 教授

1 . 研究実施の概要

免疫系の大きな柱である自然免疫系と獲得免疫系のなかで、T細胞やB細胞が主役を務める獲得免疫系は、免疫反応の特異性と多様性を規定していることから、従来までは免疫学の研究の主流であり、精力的に解析されてきた。一方、自然免疫系は、非特異的免疫と呼ばれ、その分子機構については全く理解されていなかった。しかしながら、最近、Toll-like receptorの発見、機能解析を通じて、自然免疫系の活性化が、高次機能を有すると言われていた獲得免疫系の活性化の誘導に必須であることが明らかになってきた。獲得免疫系の分子機構の解明にもかかわらず、多くの免疫疾患の治療はいまだ成功していないし、免疫系を自由自在に人為的に操作（免疫を活性化させたり不活化させる）することができていない。それは、いまだ免疫系の本体が完全に理解されていないからである。このため、新世紀において種々の疾患での免疫療法の導入を可能にするためにも、ぜひ自然免疫系の解明が必要である。そこで本プロジェクトでは、自然免疫システムを、病原体の侵入を察知する機構をToll-like receptorの機能や、細胞内シグナル伝達経路の分子機構の解析を中心に、分子レベル、生体レベルで明らかにしていくことを目的として研究を展開してきた。具体的には(1) Toll-like receptorsのリガンドの同定、(2) Toll-like receptorを介するシグナル経路の解析、(3) Toll-like receptorsの免疫反応および感染症・免疫病における役割、の3つの研究プロジェクトを設け、研究を行ってきた。

(1) Toll-like receptorsのリガンドの同定では、これまでに、TLR4がグラム陰性菌の細胞壁主要構成成分であるリポ多糖、TLR2がグラム陽性菌の細胞壁に多く存在するペプチドグリカンや種々の微生物の細胞壁に存在するリポタンパク質を認識し、生体に炎症反応を惹き起こすための必須の受容体であることを証明した。さらに、TLR9が微生物に特有のDNAを認識することを発見した。これらの結果から、それぞれのTLRファミリーが病原体の構成成分を特異的に認識することを明らかにしてきた。この研究をさらに発展させ、TLR2と構造の似通ったTLR1とTLR6がそれぞれTLR2と機能的に協調し、リポタンパク質のなかで、それぞれトリアシル基、ジアシル基の付加の些細な構造の違いを識別していることを明らかにした。さらに、病原体の構成成分だけでなく、免疫賦活作用を有する合成化合物もTLRファミリーメンバーが認識しうることを、TLR7がヒトパピローマウイルスの感染症である尖形コンジローマの治療薬として臨床応用されているイミダゾキノリン化合物を認識する事実

から明らかにした。この結果は、TLRファミリーを活性化させる合成化合物の検索が、感染症、癌などの種々の疾患の応用にもつながることを示唆したものである。

(2) Toll-like receptorを介するシグナル経路の解析では、これまでに、TIRドメインを有するアダプター分子MyD88が、すべてのTLRファミリーによる炎症性サイトカインの産生誘導に必須の役割を果たすことを示していた。しかし、TLRごとに、細胞内シグナル伝達経路が微妙に異なっており、TLR4シグナルでは、MyD88を介さないシグナルがIRF3の活性化を通じてIFN- β を誘導し、IFN- β が樹状細胞の成熟や種々のIFN誘導性遺伝子の誘導などを引き起こすことを明らかにした。さらに、TIRドメインを有する第2のアダプターTIRAP/Malの生理機能を、ノックアウトマウスを用いて解析し、TIRAP/MalがTLR2とTLR4を介したMyD88依存性のシグナルに特異的に関与していることを明らかにすることができた。この結果は、TIRドメインを有するアダプター群が各TLRのシグナル伝達経路の特異性を規定している可能性をも示唆して。そこで、第3のTIRドメインを有するアダプターTRIFを同定することもできた。この生理機能は、ノックアウトマウスの作製をまたなければならないが、*in vitro*の解析から、TRIFはTLR3を介したIFN- β の誘導シグナルに関与していることが考えられる。

(3) Toll-like receptors の免疫反応および感染症・免疫病における役割では、樹状細胞の機能をTLRファミリーの関与を中心に解析し、MyD88を介したシグナルがTLR刺激によるTh1反応の誘導に必須であり、MyD88非存在下では樹状細胞は生体をTh2反応優位に導くことを明らかにした。この結果は、TLRファミリーによる樹状細胞などの自然免疫担当細胞の機能制御が、獲得免疫系の活性をも制御していることを直接しめすものである。また、マクロファージの活性がIL-10により活性化されるStat3により負に制御されており、Stat3がマクロファージで特異的に欠損すると、マクロファージがIL-12をはじめとした炎症性サイトカインを大量に産生するようになり、その結果Th1優位な慢性大腸炎を引き起こすことを明らかにした。さらに、炎症性サイトカインの異常産生は、TLR4による病原体の認識が最初のきっかけとなることも示すことができた。この結果は、TLRを介した病原体の認識が慢性炎症性腸疾患を引き起こすトリガーともなることを示した者である。

このように、各プロジェクトでそれぞれ意義ある結果を挙げることができ、その結果、自然免疫システムがTLRファミリーによって絶妙に制御されていることを明らかにすることができた。

2 . 研究構想

従来、免疫学の研究の主流であり、精力的に解析されてきた獲得免疫にくらべ、自然免疫は、非特異的免疫と呼ばれ、基本的に生物が持つ異物や病原体に対する防御システムで、哺乳動物ではほとんど機能していない過去の遺物として、ないがしろにされてきた。われわれは、過去5年間のCRESTでの研究を通じて、これまで不明であった、自然免疫システムの主要な機能の一つである、病原体の侵入を察知する機構をToll-like receptorの機能解析から明らかにした。海外においてもToll-like receptorファミリーは、自然免疫系において中心的な役割を果たしているものとして非常に注目を浴びており、種々の研究室がToll-like receptorファミリーの機能を解析している。自然免疫系は、直接病原体と宿主が最初に相互作用しあう場であるとともに下等動物や植物まで共通にもつ生体防御機構のため、微生物学・ウイルス学・免疫学・昆虫学・植物学を包括する新たな生体防御学の学問分野が形成されようとしている。また、新興・再興感染症という言葉が表すように、最近、感染症の分野でも新たな感染症対策の考案が求められている。そこで、感染の悪化を防ぐ生体防御反応の最初の砦である自然免疫システムの解明が期待されている。このように自然免疫系は、これからも非常に注目を浴びる分野と予想される。そこで、これまでの研究成果を発展させて、本基礎的研究発展推進事業では、自然免疫システムの解明を目指し、Toll-like receptorファミリーの自然免疫における役割とさらに獲得免疫成立への関与を中心に研究していく予定である。またこの成果により、免疫異常が深く関与しているがその発症機構が明らかでないSLE、慢性炎症性腸疾患など多数の難治性疾患の原因の解明が可能になる。さらに種々の疾患への免疫療法の応用（感染症予防の有効なワクチン開発、癌免疫療法、抗アレルギー剤の開発など）がより具体的に現実化するものと考えられる。このように、さまざまな疾患の原因究明、さらに治療薬の開発が可能になり、その市場性、注目度は極めて高いものと考えられる。

3 . 研究内容

(1)実施の内容

われわれはCREST研究領域「生体防御のメカニズム」(平成7年-13年)において、遺伝子欠損マウスの作製を通じて生体防御反応に深く関わる分子の生体での役割を研究してきた。その中でも、ショウジョウバエにおいて微生物の侵入に対

する生体防御反応(いわゆる自然免疫応答)に必須の受容体である Toll の哺乳類ホモログ Toll-like receptor (TLR)の機能を解析した。その結果、TLR4 がグラム陰性菌の細胞壁主要構成成分であるリポ多糖、TLR2 がグラム陽性菌の細胞壁に多く存在するペプチドグリカンや種々の微生物の細胞壁に存在するリポタンパク質を認識し、生体に炎症反応を惹きおこすための必須の受容体であることを証明した。さらに、TLR9 が微生物に特有の DNA を認識することを発見した。これらの結果から、それぞれの TLR ファミリーが病原体の構成成分を特異的に認識することを明らかにした。さらに、アダプター分子 MyD88 が、これら TLR ファミリーによる炎症反応の誘導に必須の役割を果たすことを見出した。このように、自然免疫系は TLR ファミリーを介して病原体の侵入を察知し、炎症反応を誘導することが明らかになった。一方、より特異的な獲得免疫系は、これまでの解析からさらに Th1, Th2 反応に分類されることが知られている。Th1 反応は特に細胞内に寄生する細菌やウイルスの再感染に機能を発揮し、Th2 反応は寄生虫の感染予防を司っている。また、生体内での Th1/Th2 反応のバランスは正常では絶妙に均衡が保たれているが、その破綻をきたすことがあり、その場合には Th1 反応が優位になると自己の組織破壊を伴う自己免疫疾患(糖尿病や慢性関節リウマチなど)を誘発し、一方 Th2 反応が優位になるとアレルギー性疾患を誘発するようになる。このように、獲得免疫系における Th1/Th2 反応は、詳細に解析され、生体防御反応と疾患における関与が明らかになってきている。この獲得免疫系の活性化は、単独では起こらず、自然免疫系の活性化が、それに先立ち必要である。自然免疫系の活性化に引き続き、何らかの教育を受けて Th1 あるいは Th2 反応が誘導されてくるものと考えられている。しかしながら、自然免疫系から、獲得免疫系にいかにして橋渡しが行われるかの分子機構はまったく理解されていない。

そこで、この基礎的研究発展推進事業では、TLR ファミリーを中心にその細胞内シグナル伝達系にも目を向け、自然免疫系の活性化機構の解析を行った。具体的には、以下のような 3 種の研究項目を設けて、研究を進めていった。

(1) Toll-like receptors のリガンドの同定

これまでに、TLR2, TLR4, TLR9 の機能を明らかにしてきた。そこで、まだその機能が明らかになっていない TLR ファミリーの役割、特に病原体の構成成分の認識における役割について検討する。各メンバーのノックアウトマウスを順次作製し、各マウスの免疫系細胞の、各種細菌、真菌、ウイルスの膜成分、産生分子に対する反応性を野生型の細胞と比較し、各 TLR がいかなる菌体成分の受容体であるのかを解析した。

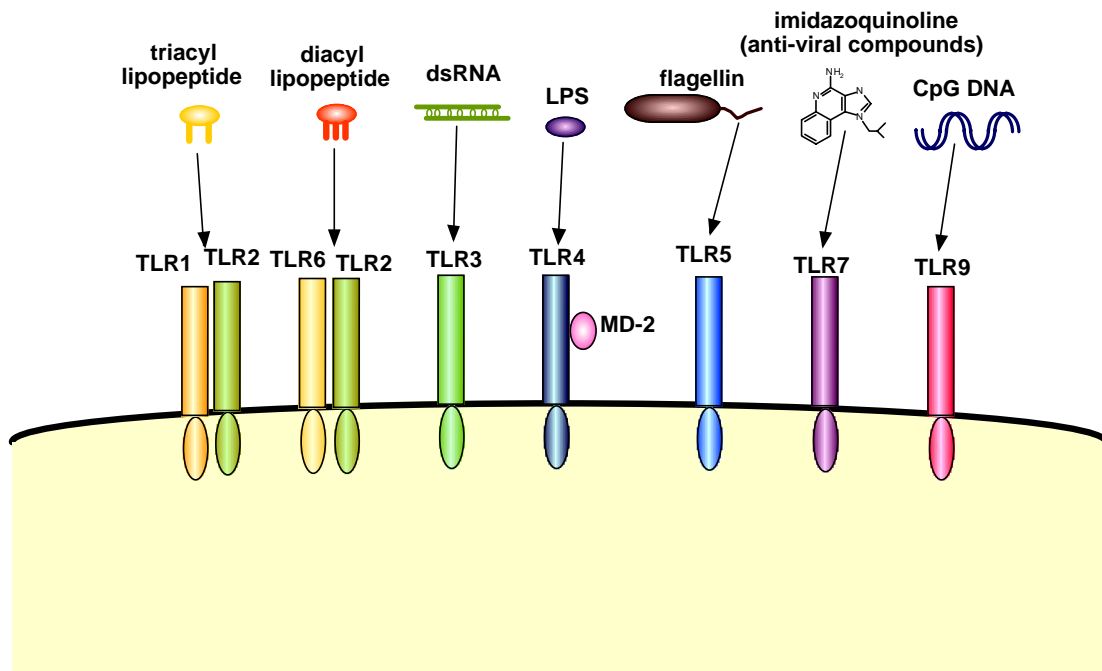
種々の細菌の細胞壁、細胞膜に存在するリポタンパク質の認識に必須である TLR2 は、その構造上 TLR1, TLR6 との相同性が極めて高い。そこで、TLR1, TLR6 の機能を、ノックアウトマウスを作成することにより解析した。TLR6 欠損マウス由来のマクロファージは、マイコプラズマ由来のリポタンパク質に対し TLR2 欠損マウスと同様に全く反応しなかった。しかしながら、グラム陰性菌由来のリポタンパク質には TLR2 欠損マウスと異なり正常に反応した。次に、TLR2/TLR6 二重欠損マウスの線維芽細胞にヒト TLR2, TLR6 の遺伝子をレトロウイルスにより遺伝子導入した。すると、グラム陰性菌由来のリポタンパク質の反応性は、TLR2 のみを導入することにより回復したが、マイコプラズマ由来のリポタンパク質の反応性は TLR2 と TLR6 の両者を導入しないと回復しなかった。さらに細胞外領域が TLR2/細胞内領域が TLR6、そしてその逆のキメラ構築を作製して、両者を TLR2/TLR6 二重欠損マウスの線維芽細胞に遺伝子導入すると、マイコプラズマ由来のリポタンパク質に対する反応性は回復したが、グラム陰性菌由来のリポタンパク質に対する反応性は回復しなかった。以上の結果から、マイコプラズマ由来のリポタンパク質の認識には、TLR2 と TLR6 の機能的会合が必要であることが明らかになった。一方、TLR1 欠損マウスのマクロファージは、マイコプラズマ由来のリポタンパク質に対し正常に反応し炎症性サイトカインを産生した。しかし、グラム陰性菌由来のリポタンパク質に対する応答性が顕著に障害されていた。さらに TLR1 は TLR2 と会合し、さらに NF- κ B の活性化誘導も相乗的に誘導することも確認された。両者のリポタンパク質の構造を比較すると、N 末端に付加されているアシル基の数がマイコプラズマ由来のリポタンパク質では 2 本(ジアシル基)なのに対し、グラム陰性菌由来のリポタンパク質では 3 本の付加(トリアシル基)がある。TLR1, TLR6 はリポタンパク質のアシル基の数という些細な構造の違いを、TLR2 と機能的に会合し識別していることが明らかになった。さらに、TLR1 が認識するトリアシルリポタンパク質に付加する脂肪鎖の長さが、TLR1 による認識に影響することも明らかになった。TLR1 欠損マクロファージは、N-パルミトイル-S-ディラウリルグリセリル基の付加された型のトリアシルリポタンパク質に対する反応性が最も低下していた。このことから、TLR1 はトリアシル基のなかでも、N-パルミトイル-S-ディラウリルグリセリル基の付加された型を最も効率よく認識することが明らかになった。

われわれは、MyD88 と呼ばれるアダプター分子が、TLR ファミリーを介したシグナル伝達に必須の役割を担っていることを、ノックアウトマウスの解析からこれまでに明らかにしてきた。MyD88 欠損マウス由来のマクロファージ

は、TLR ファミリーが認識する、各病原体構成成分による炎症性サイトカインの誘導が全く認められない。そこで、正常マクロファージではサイトカイン産生を誘導するが、MyD88 欠損マウス由来のマクロファージでは誘導しない、免疫賦活物質をスクリーニングした。その中から、イミダゾキノリン(imidazoquinolines)に属する Imiquimod と R-848 (Resiquimod) が MyD88 欠損マクロファージに対し、サイトカイン産生を誘導できないことを見出した。このことは、イミダゾキノリンが TLR ファミリーによって認識されている可能性を示唆した。そこで、われわれは TLR7 欠損マウスを作製して、イミダゾキノリンに対する反応性を解析した。TLR7 欠損マウスでは、イミダゾキノリン刺激によるマクロファージのサイトカイン産生、脾細胞の増殖、樹状細胞の成熟が認められなかった。また、イミダゾキノリンを静脈内投与しても、正常では認められる血中へのサイトカイン産生も、TLR7 欠損マウスでは認められなかった。このことから TLR7 はイミダゾキノリンの認識に必須であることが明らかになった。イミダゾキノリンは、現在、新たな抗ウイルス剤として臨床応用されている合成化合物である。従来の抗ウイルス薬は、ウイルスの増殖を阻害するものが主流であったが、この薬剤は体内からインターフェロンを誘導することによって免疫系を賦活し、抗ウイルス活性を発揮する。さらに、膀胱癌に対し臨床応用されているプロピリミン(Bropirimine)が TLR7 により認識されることにより免疫系を活性化することを明らかにした。イミダゾキノリンやプロピリミンと同じようにインターフェロンをはじめとした炎症性サイトカインを誘導するロキシソリビン(Loxoribine)も抗ガン剤としての臨床応用が極めて期待されているが、TLR7 がロキシソリビンを認識することを明らかにした。この結果は、TLR を介した自然免疫系の活性化が、合成化合物でも誘導でき、種々の感染症、癌などの免疫療法に応用できることを直接証明したものである。

以上のように、新たに TLR1, TLR6, TLR7 の機能を明らかにすることができた。

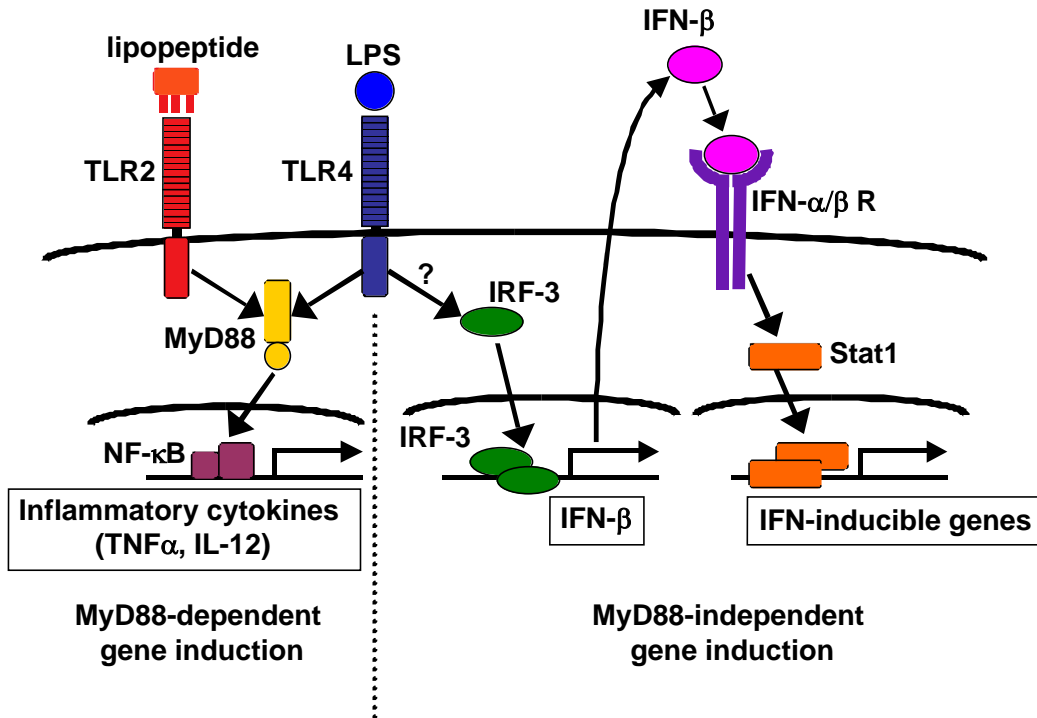
図1 TLR ファミリーとそのリガンド



(2) Toll-like receptor を介するシグナル経路の解析

TLR ファミリーは IL-1 受容体を介したシグナルで用いられているものと共通のシグナル伝達分子を利用して細胞内にシグナルを伝達する。実際、アダプター MyD88 ノックアウトマウスではすべての TLR リガンド刺激による炎症性サイトカインの産生が認められない。しかしながら、LPS による TLR4 の活性化では、MyD88 非依存性の経路が明らかになっている。MyD88 欠損マクロファージでも、LPS 刺激によって MyD88 非依存性に転写因子 IRF3 の活性化が誘導され、種々の IFN 誘導性遺伝子の発現が誘導されることを見出していた。そのメカニズムを、マクロファージと同じ自然免疫系で重要な役割を果たす樹状細胞を用いて解析した。その結果、LPS 刺激により MyD88 非依存性に IRF3 が活性化され、まず IFN- β を誘導する。そして IFN- β が二次的に樹状細胞に働きかけ、IFN α/β 受容体を介し Stat1 を活性化させ、種々の IFN 誘導性遺伝子の発現を誘導していることを明らかにした。さらに、MyD88 欠損マウス由来の樹状細胞は、LPS 刺激により機能的成熟をほぼ正常マウス由来の樹状細胞と同様に示すが、これも IRF3 活性化を介した IFN- β の産生が大きな要因であることが明らかになった。

図2 TLR を介した MyD88 依存的、非依存的シグナル伝達経路

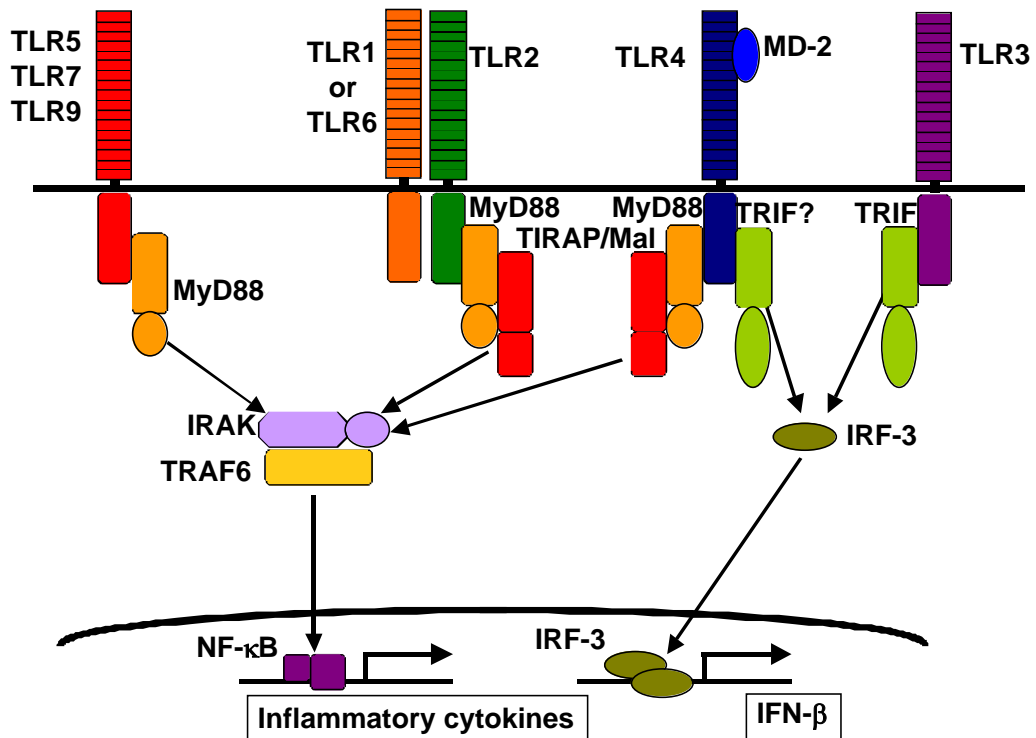


さらに、個々の TLR の活性化は異なる遺伝子発現を誘導することが知られている。このことから、TLR を介したシグナルにはすべての TLR に共通の MyD88 以外に、TLR のシグナルの特異性を規定する分子が存在することが考えられた。このような中で 2001 年に、MyD88 や TLR の細胞質内に存在する TIR ドメインを持つ新規アダプター分子 TIRAP/Mal が同定された。In vitro の解析から、TIRAP/Mal は TLR4 と特異的に会合し、上述の TLR4 を介した MyD88 非依存性のシグナルにも関与することが示された。我々は TIRAP/Mal の生理機能を明らかにするために、ノックアウトマウスを作製した。TIRAP/Mal 欠損マウス由来のマクロファージは、TLR4 リガンドの LPS による炎症性サイトカインの産生が全く認められなかった。しかしながら、LPS 刺激による NF- κ B の活性化が MyD88 欠損マクロファージと同様に遅れて観察された。さらに、LPS 刺激によるマクロファージの IRF3 の活性化、IFN 誘導性遺伝子の発現誘導、樹状細胞の機能的成熟も、MyD88 欠損マウスと同様に認められた。このように、TIRAP/Mal 欠損マウスでは、LPS による炎症性サイトカインの産生 (MyD88 依存性のシグナル) は障害されているが、IFN 誘導性遺伝子の発現誘導 (MyD88 非依存性のシグナル) は障害されていないことが明らかになった。TIRAP/Mal は MyD88 との相同性が高いので、TIRAP/Mal の欠損を MyD88 が補っている可能性が考えられたので、TIRAP と MyD88 の二重欠損マウスを作製した。TIRAP と

MyD88 の二重欠損マウスでも IFN 誘導性遺伝子の発現誘導、樹状細胞の機能的成熟が正常に認められた。このことは、TIRAP/Mal が TLR4 を介したシグナルで MyD88 を介したシグナルに必須であるが、MyD88 非依存的シグナルには関与していないことを示している。さらに TIRAP/Mal 欠損マウス由来のマクロファージを各種の TLR リガンドで刺激し、その反応性を解析した。TLR3, TLR7, TLR9 のリガンドに対しては、TIRAP/Mal 欠損マウスは正常に反応した。しかしながら、TIRAP/Mal 欠損マウスは、TLR2 リガンドであるペプチドグリカンやマイコプラズマ由来のリポタンパク質に対する応答性が顕著に障害されていた。これらの結果から、TIRAP/Mal は TLR2 および TLR4 を介した MyD88 依存性のシグナル伝達経路に特異的に関与していることが明らかになった。当初 TIRAP/Mal は MyD88 非依存性のシグナルに関与していることが、*in vitro* の解析から示唆されたが、このシグナルには生理的には関与しないことが明らかになった。さらに、この結果は、TIR ドメインを有するアダプターが TLR を介したシグナルの特異性を規定していることを強く示唆した。

そこで、データベース上で TIR ドメインを有する分子を検索した。その結果、新規アダプター分子 TRIF を同定した。TRIF は、MyD88, TIRAP に比べ長い塩基配列にコードされており、タンパク質の中央に TIR ドメインを有している。293 細胞に発現させると、MyD88, TIRAP ほど強くはないが NF- κ B 依存性のプロモーターを活性化した。さらに、MyD88, TIRAP とは対照的に TRIF は、IFN- β プロモーターの活性化を強く誘導した。TLR3 に認識される二本鎖 RNA は、IRF3 の活性化を通じて IFN- β の発現を誘導する。293 細胞にドミナントネガティブ型 TRIF を発現させると、TLR3 刺激による IFN- β プロモーターの活性化を抑制した。また、TRIF と TLR3, IRF-3 との会合も免疫沈降法により認められた。以上の結果から、TRIF は TLR3 を介した IFN- β 誘導のシグナルに関わるアダプターであることが示唆された。また、ドミナントネガティブ型 TRIF は、TLR2, TLR7, TLR9 を介した NF- κ B 活性化も抑制することから、TRIF は他の TLR を介したシグナルにも関与している可能性が示された。

図3 TLRを介するシグナル伝達経路



(3) Toll-like receptors の免疫反応および感染症・免疫病における役割

樹状細胞は、自然免疫系の活性化から獲得免疫系の活性化を誘導する橋渡しに必須の役割を果たす細胞である。この樹状細胞の機能とTLRの関わりについて解析した。まずMyD88欠損マウス由来の樹状細胞は、TLR4リガンドのLPSに应答して機能的に成熟することをこれまでに示していた。このMyD88欠損樹状細胞の機能をさらに詳細に解析した。その結果、TLR4刺激を受けた正常の樹状細胞は、CD4陽性T細胞のアロMLR (mixed lymphocyte reaction) でT細胞のIFN-g産生を強く誘導するが、TLR4刺激を受けたMyD88欠損樹状細胞は、IL-4産生を強く誘導することを見出した。このことは、正常樹状細胞は、TLR4刺激によりTh1反応を誘導するのに対し、MyD88欠損樹状細胞はTh2反応を誘導することを示している。

また樹状細胞は種々のサブセットに分かれている。例えばヒトではplasmacytoid DCとmyeloid DCに分かれるが、両細胞でのTLR7リガンドに対する応答性を検討した。その結果、plasmacytoid DCはTLR7リガンド刺激でIFN-αを産生するのに対し、myeloid DCはIL-12を産生することが明らかになった。この結果は、同じTLR刺激でも樹状細胞のサブセットごとにその反応性が異なり、それが獲得免疫系の多彩な反応を演出している可能性を示している。

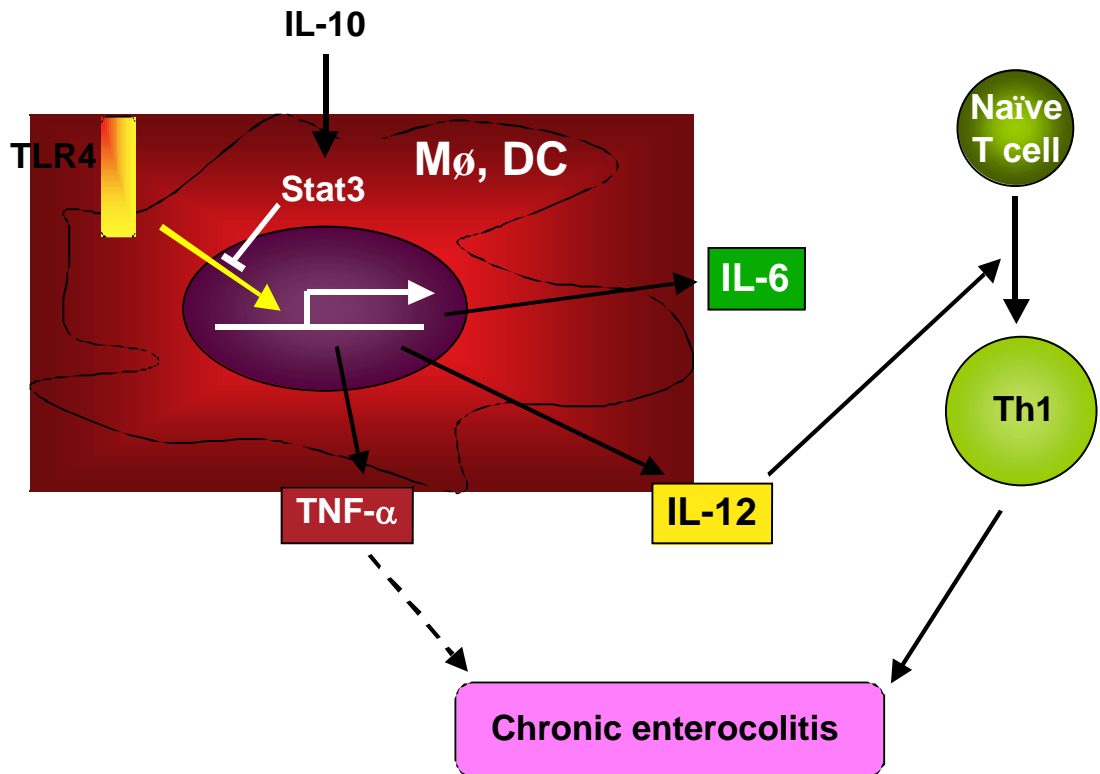
さらに、マウス樹状細胞の各サブセットに対するTLR9リガンドである

CpG DNA の反応性を解析した。CpG DNA はその構造、配列、生物学的活性から、B/K-type と A/D-type の 2 種類に分けられることが明らかになってきている。B/K-type CpG DNA は B 細胞の増殖、IL-6 の産生、マクロファージからのサイトカイン産生を強く誘導する。一方、A/D-type CpG DNA は、B 細胞やマクロファージへの効果は弱く、NK 細胞からの IFN- γ 産生、plasmacytoid DC (PDC) からの IFN- α 産生を強く誘導する。B/K-type CpG DNA による活性は、これまでに解析されてきたいわゆる古典的な CpG DNA で、この応答性は上述のように TLR9 が司っている。一方、活性の異なる A/D-type CpG DNA が TLR9 を介して免疫応答を誘導しているのかどうかは不明であり、また、これら 2 種類の CpG DNA のマウス DC サブセットに対する詳細な効果は不明であった。そこで、マウス樹状細胞を PDC のマーカーの一つである B220 の発現を指標に、B220 陽性 DC と陰性 DC とに分け、上記二種類の CpG DNA で刺激し、IFN- α と IL-12 の産生を比較した。B220 陰性 DC は両タイプの CpG DNA に反応して IL-12 を産生したが、IFN- α は産生しなかった。一方、B220 陽性 PDC は、古典的な CpG DNA に対しては IL-12 を主に産生し IFN- α の産生がほとんど認められず、A/D-type 刺激では IL-12 の産生と比べて IFN- α 産生が顕著であった。このように、マウス PDC は異なるタイプの CpG DNA に対して異なるサイトカイン産生を示すことが判明した。また TLR9、MyD88 欠損マウス由来の DC は、A/D-type CpG DNA による IFN- α 産生が欠如していた。このことから、A/D-type CpG DNA による免疫応答も TLR9/MyD88 に依存していることが明らかになった。さらに、A/D-type CpG DNA による IFN- α 産生は、IFN- α/β レセプター欠損マウス由来の樹状細胞で減少していたことから、A/D-type CpG DNA による IFN- α 産生にはウイルス感染による IFN- α 産生誘導と同様に IFN- α 自身によるポジティブフィードバックが必須であることが判明した。以上のことより、マウス PDC は異なるタイプの CpG DNA に反応して異なるサイトカインを産生することが明らかとなった。

自然免疫系で重要な役割を果たすマクロファージは、生体内に侵入した病原体を貪食、認識することにより活性化され、炎症反応を惹起し、感染防御の最初の砦を築く。このマクロファージの活性は、サイトカインにより、制御されている。IFN- γ の作用が消失する遺伝子改変マウスでは、マクロファージの活性化障害に伴いウイルス感染等に対する感受性が高まる。一方、IL-10 の作用が欠失するとマクロファージが異常に活性化され、IL-10 欠損マウスは慢性腸炎を発症するようになる。このことは、マクロファージの活性制御が生体で極めて重要であることを示している。われわれは、これまでにサイトカインのシグナルに関わる STAT ファミリーの機能を、遺伝子欠損マウスを作製する

ことにより解析してきた。その中で、通常の遺伝子欠損マウスが胎生致死となる STAT3 の機能を、マクロファージで特異的に欠失させると、IL-10 の作用が消失しマクロファージは異常活性化を示すことを明らかにした。さらに、この STAT3 変異マウスは、強い Th1 反応を示し、IL-10 欠損マウスと同様に慢性腸炎を発症した。このことから、マクロファージでの IL-10 による STAT3 活性化が、マクロファージの機能抑制、さらには慢性炎症の抑制に必須であることを明らかにしてきた。そこで、STAT3 変異マウスで発症する慢性腸炎が、どのような因子により引き起こされるかを二重欠損マウスを作製することにより生体レベルで解析した。まず、マクロファージ活性化に必須の IFN- γ のシグナル伝達分子 STAT1 と STAT3 の二重変異マウスを作製した。このマウスでは、IFN- γ の作用が消失しているにも関わらず慢性腸炎を発症した。他に炎症を引き起こすサイトカインとして TNF- α や IL-12 が知られている。そこで、これらのサイトカインと STAT3 の二重変異マウスを作製した。TNF- α /STAT3 二重変異マウスでは、STAT3 単独変異マウスと全く同様に慢性腸炎を発症した。一方、IL-12/STAT3 二重変異マウスでは、Th1 反応が軽減され、慢性腸炎が発症しなくなった。さらに、T 細胞の欠損する RAG2 欠損マウスと STAT3 変異マウスを交配したところ、この二重変異マウスでも、慢性腸炎の発症が抑制された。以上の結果から、STAT3 変異マウスにおける慢性腸炎の発症には、サイトカインでは、各種の炎症誘導に關与する TNF- α ではなく、主にマクロファージから産生される IL-12 が重要であり、T 細胞の存在も必要であることが明らかになった。この結果は、慢性腸炎の発症の最初の trigger にマクロファージの活性化が関することを明確に示している。次に STAT3 欠損下でいかなる要因によりマクロファージが異常活性化を示すようになるかを、解析した。マクロファージが IL-12 などの炎症性サイトカインを産生するためには、TLR ファミリーを介した病原体の構成成分の認識が必要であることが明らかになってきている。そこで、LPS を認識する TLR4 と STAT3 の二重変異マウスを作製した。TLR4/STAT3 二重変異マウスでは、慢性腸炎の発症が優位に抑えられ、Th1 反応も軽減されていた。この結果は、STAT3 欠損マクロファージでは、TLR4 を介したシグナルにより異常活性化状態になり、慢性炎症の引き金になることを示している。以上の結果から、IL-12 の異常産生により慢性腸炎を発症する STAT3 変異マウスでは、TLR4 により病原体の構成成分を認識することが最初の trigger となり、マクロファージ系細胞が異常活性化になることが大きな要因であることが明らかになった。

図4 IL-10によるマクロファージの炎症反応制御機構



TLR を介したマクロファージの活性化は、時に生体に致死的效果をもたらす。特に TLR4 によって認識される LPS は、それ単独でエンドトキシンショックを引き起こし、臨床的にも敗血症の治療時に大きな問題となっている。その一方、強力な炎症反応を引き起こす LPS を一度投与すると、二次的な LPS 刺激に対して不応答となるエンドトキシントレランス (LPS トレランス) という現象が知られている。この現象は、生体が LPS による過度の炎症反応を防御するために備わったものと予想されるが、そのメカニズムは全く明らかになっていない。我々は以前マクロファージを用いて LPS トレランスの誘導機構について解析し、LPS 刺激を受けたマクロファージは細胞表面上の TLR4 の発現が減少し、これが LPS 刺激による LPS トレランスの誘導に関与していることを明らかにしていた。この LPS トレランスの誘導機構について、さらに検討を加えた。その結果、マクロファージは、LPS だけでなく、他の TLR リガンド (TLR2, TLR3, TLR7 リガンド) でも、LPS トレランスが誘導されることを見出した。さらに詳細に LPS トレランスの誘導を解析したところ、LPS (TLR4) 刺激では、LPS 二次刺激に対し、MyD88 依存性シグナルも MyD88 非依存性シグナルも両方とも障害を受けるが、TLR2 リガンド刺激の場合は、LPS 二次刺激に対し MyD88 依存性のシグナルのみが障害されることが明らかになった。逆に、MyD88 非依存性

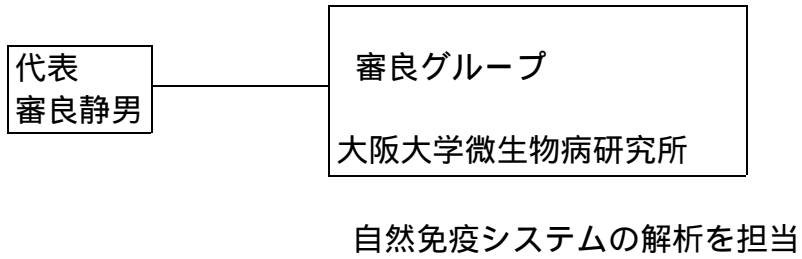
シグナルを主に用いている TLR3 刺激の場合は、LPS 二次刺激に対し MyD88 非依存性のシグナルのみが障害されていた。また、TLR7 刺激の場合には、他の刺激と異なり IRAK1, IRAK4 の発現がタンパク質レベルで減少することに誘導されることも見出した。このように、LPS トレランスは、各 TLR リガンドごとに異なるメカニズム、微妙に異なるトレランスを誘導することが明らかになった。

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

われわれは、この SORST プロジェクトおよびその以前の CREST プロジェクトにおいて、TLR ファミリーのノックアウトマウスの作製を通じて、TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR9 の認識するリガンドを明らかにしてきた。他にもアメリカ合衆国の Yale 大学のグループが、TLR3 が二本鎖 RNA を認識することを明らかにしている。このように、TLR ファミリーが病原体の構成成分をそれぞれ特異的に認識することが明らかになり、自然免疫系が極めて特異的に病原体の生体内侵入を感知することが明らかになった。これをきっかけに、免疫系の概念が獲得免疫系中心の考え方から、まず自然免疫系の病原体の認識による活性化があり、それに続いて獲得免疫系が活性化される、という自然免疫系中心の概念が確立された。この自然免疫系を中心とした免疫系の概念は、感染症、癌、アレルギーなどの疾患への治療応用にも多いに役立つことが予想される。実際、TLR9 のリガンドの CpG DNA は現在すでに上述の疾患に対する臨床応用が期待されている。今後 TLR の活性化を通じた自然免疫系の活性制御による、新規治療法の開発がおおいに期待される。

4 . 研究実施体制

(1)体制



(2)メンバー表

審良グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
審良 静男	阪大微研	教授	研究の総轄	平成13年4月～ 平成14年11月
改正 恒康	阪大微研	助教授	樹状細胞の機能解析	平成13年4月～ 平成14年11月
竹田 潔	阪大微研	助手	ノックアウトマウスの作製	平成13年4月～ 平成14年11月
星野 克明	阪大微研	助手	樹状細胞のシグナル伝達の解析	平成13年4月～ 平成14年11月
坂尾 宣充	阪大微研	研究生	自然免疫に関与する遺伝子の単離	平成13年4月～ 平成14年11月
竹内 理	阪大微研	学振研究生	TLRの生理機能の解析	平成13年4月～ 平成14年3月
山条 秀樹	阪大微研	大学院生	炎症反応に関与するシグナルの解析	平成13年4月～ 平成14年11月
辺見 弘明	阪大微研	大学院生	TLRの生理機能の解析	平成13年4月～ 平成14年11月
佐藤 慎太郎	阪大微研	大学院生	マクロファージの機能解析	平成13年4月～ 平成14年11月
植松 智	阪大微研	大学院生	ノックアウトマウスの作製	平成13年4月～ 平成14年11月
小林 正弥	阪大微研	大学院生	ノックアウトマウスの作製	平成13年4月～ 平成14年3月
堀内 亮郎	阪大微研	研究生	TLRの生理機能の解析	平成13年4月～ 平成14年3月
岩部 富夫	阪大微研	研究生	樹状細胞のシグナル伝達の解析	平成13年4月～ 平成13年8月
渡辺 康行	阪大微研	学振研究生	LPSのシグナル伝達の解析	平成13年4月～ 平成14年11月
桑田 啓貴	阪大微研	研究生	自然免疫に関与する遺伝子の単離	平成13年4月～ 平成14年11月
永山 和宣	阪大微研	研究生	マクロファージの機能解析	平成13年4月～ 平成14年11月
山本 雅裕	阪大微研	大学院生	ノックアウトマウスの作製	平成13年4月～ 平成14年11月
沖田 菜穂子	阪大微研	SORST技術員	ノックアウトマウスの作製・管理	平成13年4月～ 平成14年11月
石見 奈々	阪大微研	SORST技術員	ノックアウトマウスの維持・管理	平成13年4月～ 平成14年11月
堀田 枝実	阪大微研	事務員	事務	平成13年4月～ 平成14年11月

5 . 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

なし

(2) 招聘した研究者等

なし

6 . 主な研究成果

(1)論文発表 (国内0件、海外18件)

1. Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T.: Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2, 675-680 (2001).
2. Takeda, K., and Akira, S.: Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes to Cells* 6, 733-742 (2001).
3. Kaisho, T., and Akira, S.: Bug detectors. *Nature*, 414, 701-703, (2001).
4. Takeda, K., and Akira, S.: Regulation of innate immune responses through Toll-like receptors. *Jpn. J. Infect. Dis.* 54, 209-219 (2001).
5. Kaisho, T., and Akira, S.: Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta.* 1589, 1-13 (2002).
6. Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., and Akira, S.: Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7-MyD88-dependent signaling pathway. *Nature Immunol.* 3, 196-200 (2002).
7. Uematsu, S., Matsumoto, M., Takeda, K., and Akira, S.: LPS-dependent prostaglandin E₂ production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E₂ synthase gene induced by the TLR4/MyD88/NF-IL6 pathway. *J. Immunol.* 168, 5811-5816 (2002).
8. Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. L., and Akira, S.: Role of TLR1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J. Immunol.* 169, 10-14 (2002).
9. Kaisho, T., Hoshino, K., Iwabe, T., Takeuchi, O., Yasui, T., and Akira, S. Endotoxin can induce MyD88-deficient dendritic cells to support T(h)2 cell differentiation. *Int Immunol* 14, 695-700 (2002).
10. Sato, S., Takeuchi, O., Fujita, T., Tomizawa, H., Takeda, K., Akira, S. A variety of microbial components induce tolerance to lipopolysaccharide by differentially affecting MyD88-dependent and -independent pathways. *Int. Immunol.* 14, 783-791 (2002).
11. Hoshino, K., Kaisho, T., Iwabe, T., Takeuchi, O., and Akira, S. Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *Int Immunol* 14, 1225-1231 (2002).
12. Takeda, K., Takeuchi, O., and Akira, S: Recognition of lipopeptides by

- Toll-like receptors. *J. Endotoxin Res.* 8, 459-463 (2002).
13. Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., Hoshino, K., Takeuchi, O., Kobayashi, M., Fujita, T., Takeda, K., and Akira, S.: Essential role for TIRAP in activation of the signaling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420, 324-329 (2002).
 14. Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Takeuchi, O., Hoshino, K., Takeda, K., and Akira, S.: A novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor that preferentially activates the IFN- γ promoter in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol.* 169, 6668-6672 (2002).
 15. Sanjo, H., Takeda, K., Tsujimura, T., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., and Akira, S.: TAB2 is essential for prevention of apoptosis in fetal liver but not for IL-1 signaling. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1231-1238 (2003).
 16. Hemmi, H., Kaisho, T., Takeda, K., and Akira, S.: The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-PKcs in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *J. Immunol.* 170, 3059-3064 (2003).
 17. Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S.: Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 335-376 (2003).
 18. Takeda, K., and Akira, S.: Toll receptors and pathogen resistance. *Cell Microbiol.* 5, 143-153 (2003).
 19. Kobayashi, M., Kweon, M., Kuwata, H., Kiyono, H., Takeda, K., and Akira, S.: Toll-like receptor-dependent IL-12p40 production causes chronic enterocolitis in myeloid cell-specific Stat3-deficient mice. *J. Clin. Invest.* In press

(2) 口頭発表

招待、口頭講演 (国内13件、海外10件)

1. Akira, S.: A link between innate immunity and acquired immunity via Toll-like receptors. 15th Annual meeting of the European macrophage society. Vienna, Austria, 2001. 8.31-9.1
2. 星野克明、河合太郎、審良静男、Toll-like receptorを介するシグナル伝達経路の解析、第74回日本生化学会大会、京都、2001.10.25-28
3. 改正恒康、星野克明、竹内理、岩部富夫、竹田潔、審良静男、LPS刺激MyD88欠損樹状細胞はTh2細胞分化支持能を有する、第31回日本免疫学会学術総会、大阪、2001.12.11-13

4. 星野克明、岩部富夫、竹内理、改正恒康、審良静男、マウス樹状細胞におけるToll-like receptorを介した遺伝子発現機構の解析、第31回日本免疫学会学術総会、大阪、2001.12.11-13
5. 佐藤慎太郎、野村 文子、竹内理、竹田潔、審良静男、Toll-like receptor (TLR) 2, TLR4を介したシグナル伝達におけるクロストランス成立機序の解析、第31回日本免疫学会学術総会、大阪、2001.12.11-13
6. 改正恒康、審良静男:Toll様レセプターと樹状細胞、第28回肝臓研究会、東京、2002.1.19
7. Akira, S: Toll-like receptors and their signalings: lessons from knockout mice. Keystone Symposia, Tahoe city, California, USA. 2002.3.20
8. Akira, S: Toll-like receptors: Their roles and signalings. International Conference: Immunity to Microbial pathogens: Receptors, Recognition, Response. Erlangen, Germany, 2002. 4. 5.
9. Takeda, K., and Akira, S.: Innate immune response by Toll-like receptors. The 7th Biennial Conference of the International Endotoxin Society. Washington, USA, 2002. 7. 18-21.
10. 審良静男、アジュバント受容体としてのToll-like receptors. 第61回日本癌学会総会、東京、2002. 10. 1-3.
11. Akira, S.: MyD88-dependent and -independent pathways in signaling via TLRs. 第32回日本免疫学会総会・学術集会、東京、2002. 12. 4-6.
12. 改正恒康、星野克明、竹内理、岩部富夫、審良静男、TLR4刺激MyD88欠損樹状細胞のTh2細胞分化支持能の解析、第32回日本免疫学会総会・学術集会、東京、2002. 12. 4-6.
13. 邊見弘明、改正恒康、審良静男、TLRシグナルによる樹状細胞サブセット依存性サイトカイン産生パターン、第32回日本免疫学会総会・学術集会、東京、2002. 12. 4-6.
14. 桑田啓貴、竹田潔、審良静男、DNAマイクロアレイを用いたIL-10の標的遺伝子の同定と機能解析、第32回日本免疫学会総会・学術集会、東京、2002. 12. 4-6.
15. 山本雅裕、佐藤慎太郎、邊見弘明、山条秀樹、植松智、改正恒康、星野克明、竹田潔、審良静男、TIRAP/MalはTLR4シグナルだけでなくTLR2シグナルにも関わっている、第32回日本免疫学会総会・学術集会、東京、2002. 12. 4-6.

16. Akira, S: TLR family, the receptors linking between innate and acquired immunity. The 6th Elsinore Meeting on Infection Immunity. Elsinore, Denmark, 2002. 5. 17.
17. Akira, S: A Nobel Mini-symposium on Pattern Recognition and Effectors in Innate Immunity. Stockholm, Sweden. 2002. 6. 10.
18. Akira, S.: Toll-like receptors; their ligands and signaling. The 21st Annual American Society for Virology Meeting, Kentucky, USA. 2002. 7. 23.
19. Akira, S. Yamamoto, M., and Takeda, K.: Functional analysis of Toll-like receptors. 2002 Annual Meeting of the French Society of Immunology. Strasbourg, France, 2002. 11. 27-29.
20. 竹田潔、山本雅裕、審良静男、Toll-like receptorによる病原体の認識とそのシグナル伝達、第25回日本分子生物学会年会、横浜、2002. 12 14.
21. 山本雅裕、竹田潔、審良静男、TIRAP/MalのTLRシグナル伝達経路における役割、第8回日本エンドトキシン研究会、大阪、2002. 11. 29.
22. Akira, S: Role of Toll-like receptors in pathogen recognition and cell activation. Australasian Society for Immunology 32nd Annual Meeting, Brisbane, Australia, 2002. 12. 8-12.
23. Akira, S: Functional Analysis of Toll-like receptors. Joint Meeting of the Belgian and Dutch Societies for Immunology. Veldhoven the Netherlands. 2002. 12. 18-20.

ポスター発表 (国内8件、海外3件)

1. Hoshino, K., Kaisho, T., and Akira, S: LPS-induced maturation of the MyD88-deficient dendritic cells. 1st Awaji International Forum on infection and immunity. 淡路島、2001.8.19-21
2. Sato, S., Nomura, F., Takeda, K., and Akira, S: Induction of tolerance to microbial components in macrophages. 淡路島、2001.8.19-21
3. Kaisho, T., Takeuchi, O., Kawai, T., Hoshino, K., and Akira, S.: TLR4-mediated maturation of MyD88-deficient dendritic cells. The 11th International Congress of Immunology. Stockholm, Sweden, 2001. 7.22-27
4. 辺見弘明、改正恒康、竹内理、星野克明、竹田潔、審良静男、各種DNA

- による細胞の活性化におけるTLR9の寄与の検討、第31回日本免疫学会学術総会、大阪、2001.12.11-13
5. Hemmi, H., Takeuchi, O., Kaisho, T., Hoshino, K., Takeda, K., and Akira, S.: TLR9 mediates cellular response to immunostimulatory DNA containing the CpG motif, but not the other bioactive DNAs. Keystone Symposia, Keystone, Colorado, USA. 2002. 2.12-17.
 6. Takeda, K.: IL-12 is essential for development of chronic enterocolitis in myeloid cell-specific Stat3-deficient mice. The 2nd Awaji International forum on Infection and Immunity. 淡路島、2002. 8. 18-21.
 7. Hemmi, H., and Akira, S.: Activation of immune cells via anti-viral compounds, the imidazoquinolines, is mediated by TLR7. The 2nd Awaji International forum on Infection and Immunity. 淡路島、2002. 8. 18-21.
 8. 佐藤慎太郎、竹田潔、審良静男、Toll-like receptorファミリーを介して種々の菌体成分が誘導するLPSトレランスの成立機構の解析、第32回日本免疫学会総会・学術集会、東京、2002. 12. 4-6.
 9. 植松智、竹田潔、松本真琴、審良静男、膜結合型PGE2合成酵素の発現様式とノックアウトマウスの解析、第32回日本免疫学会総会・学術集会、東京、2002. 12. 4-6.
 10. 山条秀樹、竹田潔、審良静男、TAK1遺伝子欠損マウスの作製と解析、第32回日本免疫学会総会・学術集会、東京、2002. 12. 4-6.
 11. Hemmi, H., Kaisho, T., Takeda, K., and Akira, S: Differential cytokine induction pattern via TLR9 in murine dendritic cell subsets. Keystone Symposia, Dendritic cells, Keystone, USA, 2003. 3. 3-8.

プレス発表

1. 自然免疫を制御する Toll 様受容体を介した細胞内シグナル伝達経路の解明. 2002. 11.21.

(3)特許出願 (国内4件、海外0件)

国内

特願 2001-358295 号「免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物」平成 13 年 11 月 22 日

特願 2002-173254 号「マイコバクテリア由来リポタンパク/リポペプチド不応答性モデル動物」平成 14 年 6 月 13 日

特願 2002-237562 号「エンドトキシン及びリポタンパク・リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物」平成 14 年 8 月 16 日

特願2002-330972号「ウイルス由来二重鎖RNAによる免疫賦活に関わるシグナル伝達タンパク質及びその遺伝子」平成14年11月14日

海外

なし

(4)新聞報道等

新聞報道

2002年11月21日 大阪日日新聞「敗血症の関連タンパク質特定」

受賞

平成 13 年 11 月 1 日 第 45 回野口英世記念医学賞「自然免疫系における病原体認識機構の研究」

平成14年11月1日 第20回大阪科学賞「自然免疫における病原体認識システムの研究」

その他

海外招待講演

Akira, S.: A link between innate immunity and acquired immunity via Toll-like receptors. 15th Annual meeting of the European macrophage society. Vienna, Austria, 2001. 8.31-9.1

Akira, S: Toll-like receptors and their signalings: lessons from knockout mice. Keystone Symposia, Tahoe city, California, USA. 2002.3.20

Akira, S: Toll-like receptors: Their roles and signalings. International Conference: Immunity to Microbial pathogens: Receptors, Recognition, Response. Erlangen, Germany, 2002. 4. 5.

Akira, S: TLR family, the receptors linking between innate and acquired immunity. The 6th Elsinore Meeting on Infection Immunity. Elsinore, Denmark, 2002. 5. 17.

Akira, S: A Nobel Mini-symposium on Pattern Recognition and Effectors in Innate Immunity. Stockholm, Sweden. 2002. 6. 10.

Akira, S.: Toll-like receptors; their ligands and signaling. The 21st Annual American Society for Virology Meeting, Kentucky, USA. 2002. 7. 23.

Akira, S. Yamamoto, M., and Takeda, K.: Functional analysis of Toll-like receptors. 2002 Annual Meeting of the French Society of Immunology. Strasbourg, France, 2002. 11. 27-29.

Akira, S: Role of Toll-like receptors in pathogen recognition and cell activation. Australasian Society for Immunology 32nd Annual Meeting, Brisbane, Australia, 2002. 12. 8-12.

Akira, S: Functional Analysis of Toll-like receptors. Joint Meeting of the Belgian and Dutch Societies for Immunology. Veldhoven the Netherlands. 2002. 12. 18-20.

(5) その他特記事項

特許化したTLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR9, MyD88ノックアウトマウスは、オリエンタル酵母株式会社を通じて、委託販売を行うべく交渉がまとまり、2003年4月より実施される。

7 . 結び

当初掲げた研究目標に沿って研究成果を挙げていくことができたと思われま。また得られた研究成果は、自然免疫系を免疫学研究分野での一つのトピックに押し上げるほどのインパクトを世界中に与えた感があります。実際、2003年2月17日付の日本経済新聞では、ISI社による1997年以降の掲載論文の引用回数の調査で、われわれの論文の引用回数が、免疫学の分野で世界のトップとなった、と報告されています。このプロジェクトの進行中に、戦略的創造研究推進事業・総括実施型研究(ERATO)の研究総括に推薦され、2002年11月から開始された関係上、SORSTプロジェクトを任期半ばで辞退しなければならなくなりましたが、今後のERATOプロジェクトでは、さらにTLRだけでなく、自然免疫系のシステム全体を解明していきたいと思っております。これまで、CREST事業からSORST事業まで約7年にわたる援助を受けて、このような予想外の業績をあげることができましたことを、ここに深く感謝いたします。