

「免疫難病・感染症などの先進医療技術」

平成13年度採択研究代表者

瀬谷 司

(大阪府立成人病センター研究所 所長)

「自然免疫とヒト難治性免疫疾患」

1. 研究実施概要

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、アレルギー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で作製)によって体系化する。次にがんの場合、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。これら疾患と自然免疫関連因子の関係をArray 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 1, 2, 3, 4, 6, 7 の6種の抗体を用いて、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。また、TLR 8, 9, 10について抗体作製を遂行中である。TLR7, 8, 9はscreeningに用いるsurface-expressed cellsの調製が難航したため遅れたが方法を確立できたので今年12月までに完了する予定である。

a. DCには複数のサブセットがあることが最近の研究から判明してきた。末梢血ミエロイ

ドDCはTLR2, 3, 4を蛋白レベルで発現した。Monocyte-derived DCも類似のTLR発現様式を示した。リンホイドDCはこれらと異なり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の発現プロフィールをもつ

- b. TLR2, 4 は細菌成分を認識し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) α/β を誘導する。ともに異なった仕様で樹状細胞の成熟化を誘導する。TLR3はウイルスdsRNAを認識し、TLR7,9はDNAを認識することから、ミエロイドDCはRNAウイルス、リンホイドDCはDNAウイルスの認識に関与することが示唆された。ウイルス感染実験でこの点を検証しつつある。
- c. TLR3のIFN β 誘導に到るシグナル系は不明であった。本年度はこれを解明することに主力を注いだ。TLR3をsurfaceに表現するヒト繊維芽細胞を用いてTLR3の下流にはMyD88, Mal/Tirapとは異なる第3のアダプター分子が存在することをyeast two-hybridで証明した。この分子はTICAM-1と名付けられた(Oshiumi Nat. Immunol. 2003)。TICAM-1 transfectionでIFN- β が大量に誘導された。
- d. TLR2の機能阻害抗体はリガンド (BCG-CWS) による樹状細胞活性化を部分阻害したので、この点を報告した (Uehori, Infect. Immun. In press, 2003)。

2-2 TLR SNP と疾患の関連 (白川)

ヒトTLR1-10およびその関連分子であるCD14, Myd88, RP105, MD-1, MD-2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—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に合計147個のSNPを発見した。このうち蛋白質の変異を伴うものは、12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280例を用いて関連研究を行なったところ、小児喘息とTLR3とTLR4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。
- d. そこでTLR3の気道における発現を確認する目的で、ヒト培養気道上皮を抗TLR3抗体で染色したところ明らかな発現が認められた。
- d. TLR3の誘導物質であるdsRNAでヒト気道上皮を刺激するとTLR3の発現が増強された。
- e. 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。

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により弱まるため、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 Innate 関連遺伝子群の収集とarray による病態解析

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。Adjuvant は抗がん免疫の立ち上げに重要な役目を持つ。このadjuvant 活性は微生物成分

が樹状細胞上のTLRを活性化して発揮されると仮定し、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）をadjuvantに用いて以下の実験を行なった。

- a. 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, submitted）。BCG-CWSの活性中心（TLR2/4 ligand activity）はpeptidoglycan（PGN）部分であったので（Uehori, Infect. Immun., 2003）、PGN, CWSで共通に動くものはTLR2/4由来と考えた。BCWSで特異的に動く遺伝子を探索し、TLR以外のreceptorのsignalを予測している。BCG-CWSの樹状細胞活性化（adjuvant）機能はTLRと未知の取込みreceptorで発揮されることを検証し、抗癌免疫の立ち上げに必要な分子、signalを同定していく。
- b. 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, CDw150, 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）。ウイルスの免疫抑制とIFN誘導能を検討中である。

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ゼブラフィッシュでがん、感染のモデル系を確立する予定である。

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Micro-array, プロテオームの開発・解析、PAMP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

- Hirahashi, T., M. Matsumoto, K. Hazeki, Y. Saeki, M. Ui, and T. Seya. 2002. Activation of the human innate immune system by spirulina: Augmentation of interferon gamma production and NK cytotoxicity by oral administration of spirulina. *Int. Immunopharmacol.* 2: 423-434.
- Kurita-Taniguchi, M., K. Hazeki, N. Murabayashi, A. Fukui, S. Tsuji, M. Matsumoto, K. Toyoshima, and T. Seya. 2002. Molecular assembly of CD46 with CD9, alpha3-beta1 integrin and protein tyrosine phosphatase SHP-1 in human macrophages through differentiation by GM-CSF. *Molec. Immunol.* 38: 689-700.
- Masuda H., Y. Saeki, M. Nomura, T. Hirahashi, M. Matsumoto, M. Ui, L. L. Lanier, and T. Seya. 2002. High levels of RAE-1 isoforms on mouse tumor cell lines assessed by the anti-pan-Rae-1 polyclonal antibody confers tumor cell cytotoxicity on mouse NK cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290: 140-145.
- Matsumoto, M., S. Kikkawa, M. Kohase, K. Miyake, and T. Seya. 2002. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293: 1364-1369.
- Seya T., and M. Matsumoto. 2002. Molecule in Focus: A lipoprotein of *Mycoplasma fermentans* confers host immune activation through Toll-like receptor 2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34: 901-906. (review)
- Seya, T., M. Matsumoto, S. Tsuji, N. A. Begum, I. Azuma, and K. Toyoshima. 2002. Structural-functional relationship of pathogen-associated molecular patterns: lessons from BCG-cell wall skeleton and Mycoplasma lipoprotein M161Ag. *Microbes Infect.* 4: 955-961. (review)
- Murabayashi, N., M. Kurita-Taniguchi, M. Ayata, H. Ogura, M. Matsumoto, and T. Seya. 2002. Susceptibility of human dendritic cells to measles virus depends on their activation stages in conjunction with the level of CDw150: role of Toll stimulators in DC maturation and MV amplification. *Microbes Infect.* 4: 785-794.
- Nomura, M., M. Kurita-Taniguchi, K. Kondo, N. Inoue, M. Matsumoto, K. Yamanishi,

- M. Okabe, and T. Seya. 2002. Mechanism of host cell protection from complement in murine cytomegalovirus (CMV) infection: Identification of a CMV-responsive element in the CD46 promoter region. *Eur. J. Immunol.* 32: 2954-2964.
- Begum, N. A., M. Kobayashi, Y. Moriwaki, M. Matsumoto, K. Toyoshima, and T. Seya. 2002. *Mycobacterium bovis* BCG cell wall and LPS induce a novel gene, *BIGM103*, whose main frame encodes a 7-TM protein: identification of a new protein family having Zn-transporter and Zn-metalloprotease signatures. *Genomics* 80: 630-645.
- Hirano, A., M. Kurita-Taniguchi, Y. Katayama, M. Matsumoto, T. C. Wong, and T. Seya. 2002. Isoform-specific ligation of human CD46 enhances interferon gamma-dependent nitric oxide production in macrophages. *J. Biochem (Tokyo)*. 132: 83-91.
- Fukui, A., T. Yuasa, Y. Murakami, K. Funami, N. Kishi, T. Matsuda, T. Fujita, T. Seya, and S. Nagasawa. 2002. Mapping the sites responsible for factor I-cofactor for cleavage of C3b and C4b on human C4b-binding protein by deletion mutagenesis. *J. Biochem (Tokyo)*. 132: 719-728.
- Oshiumi, H., M. Matsumoto, K. Funami, T. Akazawa, and T. Seya. 2003. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon α -induction. *Nature Immunol.* 4: 161-167.
- Oshiumi, H., T. Tsujita, K. Shida, M. Matsumoto, K. Ikeo, and T. Seya. 2003. Prediction of the prototype of the human Toll-like receptor gene family from the Pufferfish *Fugu. rubripes* genome. *Immunogenetics* 54: 791-800.
- Inoue, N., M. Ikawa, T. Nakanishi, M. Matsumoto, M. Nomura, T. Seya, and M. Okabe. 2003. Disruption of the mouse CD46 caused an accelerated spontaneous acrosome reaction in sperm. *Molec. Cell. Biol.* 23: 2614-2622.
- Hazeki, K., H. Masuda, K. Funami, N. Sukenobu, M. Matsumoto, S. Akira, O. Takeuchi, T. Seya and O. Hazeki. 2003. TLR-mediated tyrosine phosphorylation of paxillin via MyD88-dependent and -independent pathways. *Eur. J. Immunol.* 33: 740-747.

(2) 特許出願

2件