

「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)が宿主免疫応答の引き金となって多様なエフェクターを発動することが判明して来た。エフェクターは cytokines, type I interferon (IFN), 抗体, NK, CTL などがあり、微生物成分 (adjuvant) が樹状細胞の Toll-like receptor (TLR) を刺激して誘導される。即ち抗原ではなく、adjuvant がエフェクターの指向性を樹状細胞に付与すると云える。これに伴い、本研究企画は TLR の機能研究から抗がん免疫・感染免疫成立の分子基盤を解明する方向へ研究領域が広がる見込みである。本研究報告では抗原提示細胞に多様な細胞応答を誘導する system としての adjuvant, TLR 解析を試みた。NK, CTL の誘導因子、ウイルス応答と IFNs の分子反応系、抗原提示・cross-priming の引き金、Tmemory の確立因子、など広い見解が要求され、来年度への持ち越し課題が多かった。また、サカナとヒトの TLR 系の機能解析がほぼ終了し、相違点が明確化された。サカナを自然免疫の解析モデル、system biology のベースとするための基礎資料を用意できたことになる。これらの基礎資料は今後の forward genetics 的な展開を可能にする。また、以外な展開として、サカナ TLR にはヒトに新たな自然免疫の機能を付与する可能性を示唆するものもあり、これらは TG mice を作製して抗がん・抗感染 adjuvant 機能をテストする価値があると想定された。合成 adjuvant の中にもヒトの adjuvant として有望な候補があり、マウスを用いて検討中である。これらの意図する所はヒトのウイルス疾患、がんなど難治性免疫疾患の免疫療法に指向性を持った種々の adjuvants を提供できる基盤を用意することである。

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 は抗原提示樹状細胞 (mDCs) で MyD88 か TICAM-1 (TRIF) をアダプターに選び、NF- κ B, IRF-3 などの転写因子を活性化することが判明した。H17 年度の本項目では 1. TLR, アダプターの分布、局在と活性化における再分配などを endogenous 染色が可能な抗体 (昨年度作製) で検討している。また、2. MyD88 経路、TICAM-1 経路の mDCs 活性化における役割を KO マウスで検討している。最近細胞質内に dsRNA 検知システムが存在し内因性のウイ

ルス複製にはこの系が感知し type I IFN を誘導せしめることが報告された。一方、TLR3/4-TICAM-1 経路の output として type I IFN の産生があることが我々を含めたグループの研究で解明されて来た。それ故、3. ウイルスなどの感染における TICAM-1 経路の意義を「細胞質 dsRNA 認識系」と比較検討することを試みている。これら 3 点の結果を下記する。

(1) TLR/アダプターの分布・局在

mDCs の TLR については TLR3, 8 が細胞内 (endosome) 局在を示すこと、TLR3 は主に late endosome に局在することが抗体と confocal 解析で判明した。TLR8 の局在は検討中である。TLR アダプターは TLR3 と TICAM-1 の共局在が late endosome で観察できた。TICAM-1 の主な下流分子 NAP1 は confocal では内因性 TICAM-1 と殆ど会合が見られず mitochondria 周辺に局在することが判明した。Mitochondria には細胞内 IFN 誘導系のアダプター分子 IPS-1/MAVS が存在すると報告されたので、NAP1 と IPS-1 の会合を confocal で観察した。結果、IPS-1 と NAP1 が内因性に会合することが判明した (Sasai et al., 投稿準備中)。NAP1 は IKK ϵ , TBK1 (kinase complex) と複合体を作り IRF-3 を活性化して IFN- β を誘導する。TICAM-1 の overexpression は NAP1 を recruit することから、細胞の状態によって NAP1 は TICAM-1 にも IPS-1 にもスイッチするらしい。通常 TICAM-1 は蛋白発現が抑えられている (さもないとアポトーシスになる) ので NAP1 との共局在のシグナルは微弱であると推測される (Funami et al., 未発表)。なお、TICAM-2 と TICAM-1 の confocal 共局在は TLR4 の下流で再現されず、その動態を追跡中である。

(2) MyD88 経路、TICAM-1 経路の mDCs 活性化における役割

MyD88 経路は B16 melanoma の移植系で BCG-CWS による C57BL/6 抗がん活性の誘導に必須である (Akazawa et al., Cancer Res. 2004)。BCG-CWS は TLR2/4 を活性化する。MyD88 KO mice では B16 melanoma に対する BCG-CWS 依存性の CTL 誘導が阻害され、MyD88+/+ の樹状細胞投与によって CTL 誘導が回復する。B16 は MHC class I 陰性だが、移植がんの MHC class I は陽転しており TLR2/4 から IFN- γ 誘導が起きることが判明した。これは樹状細胞以外の TLR が関与するかもしれない。とにかく MyD88 経路には樹状細胞 cross-priming を誘起する機能がある。

一方、TICAM-1 経路の機能は polyI:C 投与 TICAM-1 KO マウスで検討しよう。B16 (class I 陰性) と EL4 (class I 陽性) C57BL 移植がんの系で TICAM-1 の役割を調べると B16 の場合 NK が強く誘導された (Akazawa et al., 投稿準備中)。CTL の誘導は見られなかった。CTL 不応答の状況ではがんの完全退縮も無かった。Class I 陽性の EL4 では polyI:C によって NK, CTL 両方が誘導され、がんの完全寛解が誘導された。NK については B16 の結果を確認できた。CTL 誘導は TLR3、TICAM-1 いづれかを KO することで損なわれた。PKR, IFN- β , IFN- α の KO マウスでは損なわれなかった。IFNAR KO では部分阻害を受けた。がんの rechallenge 実験を追加中であるが、CTL 誘導には TLR3-TICAM-1 経路が関与する。他の IFN 誘導系と産物としての IFN は mDCs の cross-priming と CTL 誘導に必須ではない。TICAM-1 経路は恐ら

く Tmemory 誘導能を司る。この点を検証中である。

(3) ウイルス感染と TICAM-1 経路

RIG-I - IPS-1 系が細胞質内に見出され、ウイルス複製のセンサーとして機能することが判明しつつある。我々は TICAM-1 経路が RNA ウイルスの認識から感染阻害に働くかを種々のウイルスを用いて検討した。その結果 respiratory syncytial virus (RSV) の F protein が TLR4 を活性化する際 TICAM-1 経路依存性の IFN 誘導を引き起こすこと、この IFN 誘導は RSV G protein によって阻害されること、を見出した (Shingai et al., 投稿中)。HCV の NS3/4A のみならずウイルスには TICAM-1 を標的にして IFN 系を抑えるものがある。この阻害系は細胞内 RIG-I-IPS-1 経路の起動は阻害しないのでウイルス RNA が外因性に細胞を活性化する状況を感じ取るのかも知れない。ウイルスによる TICAM-1 経路の阻害と抗ウイルス CTL 誘導の関係は今後の検討課題である。

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。がん患者に有効な adjuvant を開発することは paptide vaccine 療法を確立ために必須の命題と認識されている。現状でヒトに実際用いている adjuvant, BCG の細胞骨格成分 (CWS) の機能解析を網羅的に進めてきた。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、3 群 (Zn/Fe transporter family, Lectin receptor, IL-23 などの cytokines) を昨年まで解析対象としてきた。しかし、上記の資料から TLR から CTL 誘導に至る系は複数あること、CTL だけでなく、Tmemory を誘導する経路を活性化するのが抗がん免疫の必須条件であることが判明したので、CTL/Tmemory を output にして遺伝子スクリーンを行う系を考案中である。本項で蓄積された機能遺伝子の siRNA 査定にこれらの新知見を反映させる方法を動物モデル (下記) で検討することも予定している。この観点から、BCG-inducible genes の他に polyI:C-inducible genes を含めて網羅的に機能検討する必要がある。

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重要度が増すので優先的に進めて来た。結果、polyI:C を細胞膜上で結合して取り込むレセプターは polyI:C Sepharose に結合する樹状細胞の分子として surface-labeling/blotting で 2 種存在することが示唆された。樹状細胞で大量培養して分子を精製するのは難があるのでこの分子を高発現する細胞株を検討中である。部分精製の段階で mass spectrometry の分子同定系に持って行く予定である。この目的で大学内に設置した LC-mass は現在稼働中である。現在、BCG の糖鎖に結合する分子も蛋白化学的手法で追跡中である。

ウイルスによる免疫抑制のメカニズムを感染樹状細胞 TLR の応答として捉える際に IFN- β 誘導が鍵になる。ウイルスの IFN 誘導経路は複数あることが ongoing で示されてきた。TLR7/9 経路、TLR3 経路、RIG-I-IPS-1 経路、PKR 経路などがある。ウイルスの樹状細胞応答におけるこれらの経路の役割を検討する。ウイルスには種特異性があるので

ヒトのウイルスレセプターをTGしたマウスを感染モデルに使う。我々は麻疹ウイルス(特徴的に免疫抑制を誘起する)の動物モデル CD46/CD150 double TG マウスを作製した。さらに感染が起きるモデルとして IFNAR^{-/-} を交配して triple mutants を作製した (Shingai et al., J Immunol 2005)。この感染モデルでは IFN の重要性は分かるがどの IFN 誘導経路が麻疹ウイルスの種間トロピズムを規定しているかを査定できない。この点を IRF-3 KO, PKR KO, MyD88 KO などのマウスを用いて検討中である。樹状細胞の RNAi、transfection が Amasa など可能かを検討している。ウイルスと宿主遺伝子の機能とウイルス依存性の免疫抑制や IFN 誘導能との関連を調べて行く。

2-3 ヒトの機能未知の自然免疫関連因子群の解析, innate immunity のモデル動物の開発

フグ (*Takifugu rebripes*) ゲノムから TLR を抽出し、機能解析を試みた。フグは分類上メダカに近く、両者はほぼ相同の TLR セットを持つ。TLR5S (可溶型), TLR14, TLR21, TLR22, がサカナ特有の TLR と同定された。このうち、TLR5S は flagellin 鞭毛蛋白の TLR5 (膜型) 増幅応答系に必須の因子として報告した (Tsujita et al., J Biol Chem 2004)。TLR14 は円口類と硬骨魚類にあり、トリ、哺乳類には無い。水棲の微生物を認識すると仮定してリガンドを探索中である (Ishii et al., J Immunol 2006 in press)。TLR21 は細菌の lipopeptides を認識する (Matsuo et al., 報告中)。単独認識で TLR2 などの助けは要らない。TLR2, TLR1 は別個に見出せるがリガンドは異なるようである。TLR22 は dsRNA を認識する (Matsuo et al., 報告中)。TLR3 の局在は腸などに限られるが、TLR22 はほぼ ubiquitous である。さらに両者の認識する dsRNA の性状は異なるし、細胞内局在も異なる。これらは哺乳類に進化する過程で失われた遺伝子であるが、病原体への免疫応答は微生物の各論的に強力であると見える。これらをヒト樹状細胞で発現させると adjuvant 応答を増強するものがあるので、治療戦略として成立するかを検討している。動物モデルはマウス (審良研) 以外にサカナ (特にメダカ) を考えて以下の解析に使用する計画を遂行中である。

a. BCG-CWS によって誘導される遺伝子群のうち、endosome 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。BCG-CWS-inducible, polyI:C-inducible 遺伝子からサカナで解析が期待できるものを抽出した。

b. Genome project が進行しているフグとヒト TLR を比較検討した (Oshiumi, Immunogenetics, 2003) 仕事から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。ゲノム情報から cDNA cloning が可能になるメダカでがん、感染のモデル系を確立する予定である。具体化するためにメダカの loss-of-function 系を立ち上げている。今年度の知見はサカナの TLR 系を上記のように分子機能を含めて同定したことである。この知見をサカナの実験モデルを確立する基礎資料とする。

c. サカナ TLR22 はヒト TLR3 とは異なる分布と細胞応答を誘起する。TLR22 はマウス・ヒトに到る lineage では失われた。サカナにヒトと類似の自然免疫があることは判明したがこれらが発がんや感染の対策に有利な表現型をもたらすかは今後の問題として残される。TLR22 TG マウスを作製して adjuvant 機能への寄与を明らかにする企画を推進中である。

2-4 合成物による樹状細胞活性化

昨年度報告した放線菌由来の TLR 活性化物質 (TAN シリーズ) と 6-O-monoacylated MDP の adjuvant 活性を引き続きマウスの担がんモデルで検討中である。

これ以外に TLR7 の活性化剤を既知の TLR リガンドと組み合わせて adjuvant 機能高めることを検討している。このリガンドはある製薬会社に特許がある。この物質より優れた TLR 活性化剤を開発することが課題である。これらは他の adjuvant 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。よりよい adjuvant の創生を目指して合成物質の探索を継続する。

3. 研究実施体制

「瀬谷」グループ

①研究分担グループ長：瀬谷 司（北海道大学、教授）

②研究項目：

- ・TLR/アダプターの分布・局在
- ・ウイルス感染と TICAM-1 経路
- ・ヒトの機能未知の自然免疫関連因子群の解析, innate immunity のモデル動物の開発
- ・合成物による樹状細胞活性化

「松本」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、特別研究員）

②研究項目：

- ・TLR/アダプターの分布・局在
- ・MyD88 経路、TICAM-1 経路の mDCs 活性化における役割
- ・自然免疫関連遺伝子群と病態の関連解析

「白川」グループ (H16.3 離脱)

①研究分担グループ長：白川 太郎（京都大学 教授、理化学研究所 チームリーダー）

②研究項目：

- ・自然免疫関連遺伝子群と病態の関連解析

「谷田」グループ

①研究分担グループ長：谷田 清一（武田薬品工業㈱、主席部員）

②研究項目：

・合成物による樹状細胞活性化

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

- 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.
- Oshiumi, H., K. Shida, Y. Kimura, J. Katoh, S. Ohba, Y. Tamaki, T. Hattori, N. Yamada, N. Inoue, M. Matsumoto, S. Mizuno, and T. Seya. 2005. The regulator of complement activation (RCA) locus in the chicken: Identification of the chicken RCA gene cluster and functional characterization of the RCA proteins. *J. Immunol.* 175:1724-1734.
- Uehori, J., K. Fukase, T. Akazawa, T. Uematsu, S. Akira, S. Funami, K. Shingai, M. Matsumoto, I. Azuma, K. Toyoshima, S. Kusumoto, and T. Seya. 2005. Dendritic cell maturation Induced by Muramyl Dipeptide (MDP) Derivatives: Monoacylated MDP confers TLR2/TLR4 activation. *J. Immunol.* 174: 7096-7103.
- Xie, X., H. He, M. Colonna, T. Seya, T. Takai, and B. D. Croy. 2005. Pathways participating in activation of mouse uterine natural killer cells during pregnancy. *Biol. Reprod.* 73: 510-518.
- Wali, A, P. J. Morin, C. D. Hough, F. Lonard, T. Seya, M. Carbone, and H. I. Pass. 2005. Identification of intelectin overexpression in malignant pleural mesothelioma by serial analysis of gene expression (SAGE). *Lung Cancer.* 48: 19-29.
- Shingai, M., N. Inoue, M. Okabe, T. Akazawa, Y. Miyamoto, M. Ayata, K. Honda, M. Kurita-Taniguchi, M. Matsumoto, H. Ogura, T. Taniguchi, and T. Seya. 2005. A mouse model for wild-type measles virus infection: CD11c-positive dendritic cells are nidus for systemic viral spreading. *J. Immunol.* 175: 3252-3261.

- Okahira, S., F. Nishikawa, S. Nishikawa, T. Akazawa, T. Seya, and M. Matsumoto. 2005. Interferon- β induction through Toll-like receptor 3 depends on double-stranded RNA structure. *DNA Cell Biol.* 24: 614-623.
- 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.* 98: 280-290.
- Tsujita, T., A. Ishii, H. Tsukada, M. Matsumoto, F-S. Che, and T. Seya. 2006. Fish soluble Toll-like receptor (TLR)5 amplifies human TLR5 response via physical binding to flagellin. *Vaccine* 24: 2193-2199.
- Ii M, Matsunaga N, Hazeki K, Nakamura K, Takashima K, Seya T, Hazeki O, Kitazaki T, Iizawa Y. 2006. A novel cyclohexene derivative, TAK-242, selectively inhibits Toll-like receptor 4-mediated cytokine production through suppression of intracellular signaling. *Mol Pharmacol.* 69: 1288-1295.
- Muromoto R, Okabe K, Fujimuro M, Sugiyama K, Yokosawa H, Seya T, Matsuda T. 2006. Physical and functional interactions between STAT3 and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded LANA. *FEBS Lett.* 580: 93-98.
- Murai, M., K. Hazeki, S. Kinoshita, H. Kubo, R. Kashiwagi, M. Matsumoto, N. Inoue, T. Seya, and O. Hazeki. 2005. IRAK-4-dependent phosphorylation and ubiquitination of IRAK-1 is a negative feedback signal for TLR-mediated NF- κ B activation. *FEBS J.* (in press)
- Sukenobu, N., K. Hazeki, K. Yoshikawa, T. Yamamoto, U. Kikkawa, M. Matsumoto, T. Seya, and O. Hazeki. 2005. Protein kinase Cd associates TIRAP/Mal and regulates NF- κ B and mitogen-activated protein kinases in Toll-like receptor signaling. *J. Immunol.* (in press).
- 北川翔、奥田直樹、松本美佐子、瀬谷司、TLR と癌免疫 炎症と免疫 13: 66-71, 2005.
- 瀬谷 司、抗がん免疫成立における自然免疫の役割：Toll-like receptor による樹状細胞活性化 BCG・BRM 療法誌 28: 1-8, 2005
- 新開大史、舟見健司、松本美佐子、瀬谷司、Toll-like receptors による感染防御メカニズム、THE LUNG perspectives, 13, 73-77. 2005.

(2) 特許出願

H17 年度出願件数：0 件（CREST 研究期間累積件数：5 件）