

「アレルギー疾患・自己免疫疾患などの発症機構と治療技術」
平成 21 年度採択研究代表者

谷口 維紹

東京大学・大学院医学系研究科・教授

核酸を主体とした免疫応答制御機構の解明とその制御法の開発

§ 1. 研究実施の概要

核酸を主体とした免疫応答活性化とその制御機構の解明によって、自然免疫系と適応免疫系の連携メカニズムの理解を深め、免疫病態の抑制法の原理の確立とその応用を目指す。当該年度は本研究計画の初年度にあたるため、全体の研究計画における支持基盤の構築に主眼をおき、進行中の研究について解析を行った。核酸認識による自然免疫系の活性化全体を担う共通のメカニズムとして同定した HMGB 分子の生体内での役割について評価するためコンディショナルノックアウトマウスの作製を進めた。また、HMGB、TLR、DAI 及び他の核酸認識受容体に対するアゴニストやアンタゴニストの開発に繋げていくため、各タンパクの精製系の確立と核酸との結合を評価出来るスクリーニング系の確立に取り組んだ。また、すでに得られている候補化合物については、その作用機序について検討を行った。これら一連の解析を通じて、自己免疫疾患・敗血症などの免疫病態の制御に有効な抑制化合物の開発に繋げていく。研究は概ね順調に進捗し、コンディショナルノックアウトマウスの作製など時間を要するものにおいては、キメラマウスの作製など一定の段階を達成しつつある。今後は更に研究の基盤の構築を進めつつ、これまでに得られた知見をもとに核酸認識受容体を介したシグナル系の解明、候補化合物の作用機序の解析及び新規化合物のスクリーニングを進めていく。

§ 2. 研究実施体制

(1)「谷口」グループ

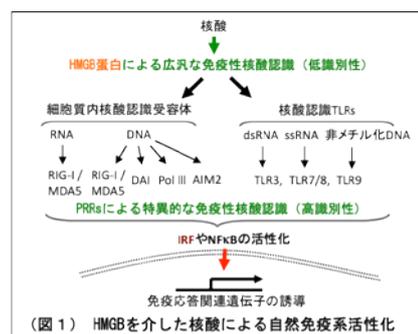
- ① 研究分担グループ長: 谷口 維紹 (東京大学、教授)
- ② 研究項目

1. HMGB タンパク群による核酸認識と下流で機能する核酸認識受容体の活性化機構の解析
 - HMGB1 コンディショナルノックアウトマウスの作製
 - HMGB1 の in vivo における機能解析
2. HMGB タンパク群を標的とした化合物による免疫系の制御法の開発
 - HMGB アンタゴニストのスクリーニング
 - 作用機序の解析と疾患モデルマウスを使用した in vivo 投与における効果の評価
3. 細胞質内 DNA による自然免疫系の活性化における RIG-I 様受容体依存性経路と非依存性経路の分岐メカニズムの解析
 - HMGB1 結合タンパクの機能解析と生体での役割の解析
 - DAI の機能解析と *Dai* 遺伝子欠損細胞、マウスを用いた解析
 - 死細胞(壊死細胞)による免疫系活性化機構の解析
4. TLR アゴニスト、アンタゴニストのスクリーニング、作用機序の解明ならびに応用
 - 化合物のスクリーニング
 - 作用機序の解析及びマウス疾患モデルを使用した、化合物の効果の評価

§ 3. 研究実施内容

(1) HMGBタンパク群による核酸認識と下流で機能するTLR、細胞質内受容体の活性化機構の解析

細胞質内DNAの認識受容体を同定するため、我々は細胞質で免疫系を強く活性化するB-型DNA、poly(dA-dT)・poly(dT-dA) (以下B-DNA) に結合するタンパクを網羅的に解析し、主要タンパクとしてHMGB1, 2, 3を同定した(Yanai H et al, *Nature* 462: 99-103, 2009)。興味深いことにHMGBはB-DNAやウイルス由来DNAのみならずRNAにも結合することを見出し、HMGBのDNA、RNAへの結合がすべての核酸認識TLRや細胞質内核酸センサーによる自然免疫系惹起の開始となること、すなわちHMGBが“common sentinel”として機能していることを見出している(図1)。しかしながら、HMGBを介した核酸認識が如何にして下流のTLR、細胞質内受容体といったパターン認識受容体の活性化に繋がるのか、その仕組みは未知であった。このHMGB1を介した免疫系活性化のメカニズムを解明するため、平成21年度においてHMGB1に結合する2つのタンパクを同定した。この2つの分子について、遺伝子の発現系、ノックダウン系を構築し、解析を行っている。また、HMGB1の生体内での炎症反応惹起における役割について検討を行うため、*Hmgb1*遺伝子のconditional knock-outマウスの作製を開始した。既に数クローンのターゲットES細胞を樹立し、キメラマウスを作製中である。今後、核酸認識機構の根幹を担うシステムを明らかにし、核酸認識とアレルギー疾患・自己免疫疾患との関わりについてモデルマウスを用いた検討を進めていく。



(2) 低分子化合物による免疫系の制御法の開発と実用化の研究

HMGB1は関節リウマチや全身性エリテマトーデス(SLE)などの自己免疫疾患症例において発現の亢進が認められ、これらの病態への関与が示唆されている。しかし、そのメカニズムについては壊死細胞からの放出や、活性化マクロファージから分泌されるHMGB1のNF- κ Bを介した炎症性サイトカイン産生への関与が示唆されているものの、HMGB1と核酸による免疫応答との関係は未知である。SLE患者では血中の抗核抗体、DNA抗体などの値が高いことはよく知られており、我々が見いだしたHMGBと核酸認識受容体活性化の結果から、マクロファージ・樹状細胞といった免疫細胞がHMGBと核酸の複合体を介して上記のような免疫の異常応答を担っている可能性が考えられる。そこで、HMGBタンパクを標的とした化合物をスクリーニングすることで、自己免疫疾患の病態改善に有用な薬剤の実用化を目指す。平成21年度において、HMGBを標的としたアンタゴニストのスクリーニング系を確立した。今後、この系を基にhigh through putスクリーニング系を設計し、市販の低分子化合物ライブラリーを用いてスクリーニングを開始する。また、我々は塩基を持たない糖鎖ポリマー(base-free phosphorothioate deoxyribose homopolymer: PS)がHMGBに対するアンタゴニストであることを見出しているが¹⁾、この物質は比較的不安定であり、生体への投与には適さない。よってHMGBアンタゴニスト候補分子の一つとして、PSの分子構造を改変した新規化合物をデザインし、安定性および生理活性に優れた化合物を探索する。

また、HMGB1のアンタゴニストのスクリーニングに加えて、我々は炎症性サイトカイン誘導を抑制する化合物としてIMF001を開発し、マウス実験モデルにおいて敗血症やコラーゲン誘導性の関節炎を抑制することを見出しつつある。IMF001の抗炎症機構について解析を進めたところ、IMF001はNF- κ Bの活性化を抑制すると同時に、p38/JNKの活性化を誘導する性質を有している可能性が示された。今後、IMF001のより詳細な作用機序を解析し、標的分子の解明を目指すとともに、アレルギー疾患・自己免疫疾患に対するIMF001の治療効果をin vitro、in vivoの系において評価し、実用化に向けた研究を進めていく予定である。また、状況が許せば、化合物の構造改変によるより効果的な薬剤開発の研究にも着手していく。

(3) 壊死細胞による免疫系惹起のメカニズムとその生物学的意義の解析

最近、死細胞、特に壊死細胞が引き起こす免疫系の惹起が注目を集めており、がん細胞の死、臓器移植に伴って生じる細胞死などが免疫反応を惹起する可能性が示唆されている。我々はこの死細胞によって誘導される免疫応答において、HMGB1が関与しているかどうか検討した。その結果、HMGB1欠損線維芽細胞に壊死を生じさせ、樹状細胞に作用させた際、野生型線維芽細胞と比較し、免疫応答の活性化が減弱することを見だし、壊死細胞による免疫系の活性化にHMGB1が関与していることが示唆された。HMGB1は細胞死に伴って細胞外に放出されることが報告されており、今後、壊死細胞由来のHMGB1が如何にして免疫原性を賦与するのか、核酸との結合の必要性など、その機構について分子メカニズムの解明に迫る。

(4) DNA認識受容体DAIの機能解析

核酸認識受容体による免疫応答の惹起という観点において、我々は新規細胞質内DNA認識受容体としてDAIを同定した(Takaoka A et al, *Nature* 448:501-506, 2007)。平成21年度には

DAIのDNA認識機構における役割を更に明らかにするため、*Dai*遺伝子欠損マウスを作成した。*Dai*遺伝子欠損マウスは正常に繁殖し、脾臓、胸腺におけるT細胞、B細胞等の免疫担当細胞の細胞集団も野生型マウスと比較して異常は認められなかった。*Dai*遺伝子欠損マウス由来の繊維芽細胞、樹状細胞においては、DAIの細胞種依存的な機能を明らかにした我々のこれまでの知見と一致し(Wang Z et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:5477-5482, 2008)、B-DNAなどの核酸刺激によって誘導されるIFNには野生型細胞と同様の誘導が認められたが、興味深いことに、一部の誘導遺伝子においてその誘導に著明な減弱が認められた。今後、他の細胞種における検討を含め、この知見を確固たるものとすると同時に、核酸による免疫系の活性化にDAIがどのように関与しているか、そのメカニズムについて検討を加えていく。また、*in vivo*での免疫系活性化におけるDAIの役割について解析していく。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 知財出願

- ① 平成 21 年度特許出願件数(国内 1件)

- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1件)