

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「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」

研究課題「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」

研究終了報告書

研究期間 平成21年11月～平成27年3月

研究代表者：谷口 維紹
(東京大学・生産技術研究所、特任教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本研究課題では、核酸を主体とした免疫応答活性化とその制御機構を明らかにすることによって、免疫病態の抑制法の原理を確立し、その応用利用を目指した研究を推進した。核酸による自然免疫系の活性化を担う仕組みについては既にいくつかの核酸受容体や下流のシグナル伝達分子が知られているが、未知の受容体の存在を含め、受容体間のシグナル伝達系の相互干渉の仕組みなど、その全貌は未だ明らかにされていない。核酸による免疫応答は、アレルギー疾患・自己免疫疾患と密接な関連があることから、これらを詳らかにしていくことで、自己免疫疾患、アレルギーの治療に有効な化合物などの開発と実用化に資することが可能となると考えられる。本研究課題では、核酸認識受容体やシグナル伝達分子など、免疫応答活性化に至るまでの経路を明らかにすると同時に、これらを標的とした免疫抑制剤の開発を可能とするため、核酸認識応答に関与する分子の同定、遺伝子欠損マウスの作製と解析、阻害剤の開発を推進した。

HMGB1 (High-mobility group box protein 1) が核酸認識による自然免疫応答に重要な役割を果たす分子であることを明らかにした (Yanai H et al, *Nature* 462: 99-103, 2009)。そこで、この HMGB1 の機能を抑制する新規のデコイオリゴ核酸 (ISM ODN) を開発した。ISM ODN は核酸刺激によるサイトカイン・ケモカインの産生のみならず、CD8⁺ T 細胞の活性化及び抗体産生を抑制することを明らかにした (Yanai H. et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 11542-11547, 2011)。さらに、ISM ODN は LPS 誘導性敗血症や実験的自己免疫脳脊髄炎 (EAE) の病態をも抑制することが判明し、疾患の治療薬として活用できる可能性が考えられた。現在、種々の病態モデルを用いて更なる検討を進めながら、JST の支援を受け、国際特許申請を行い、複数国において登録された (WO2012036215-A1)。また、(株)サノフィ社との共同開発研究も進めている。さらに HMGB1 の生理的役割について、その詳細を明らかにするため、*Hmgbl* コンディショナルノックアウトマウスの作製を行った。マクロファージなど、ミエロイド系細胞群において HMGB1 を欠損させたマウスでは、LPS 誘導性ショックや、リステリア感染に脆弱性を示すことを明らかにした (Yanai H. et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 20699-20704, 2013)。これらの作用は細胞内の HMGB1 の機能の一つであるオートファジーの異常に関与していることが示唆された。さらに、細胞外の HMGB1 の機能について、核酸と HMGB1 との関係性を視野に入れながら検討を行っている。また、核酸認識に関わる候補分子として同定した NAS1 (Nucleic acid-sensor 1)、NAS2 のノックアウトマウスの作製も行った。特に NAS1 に関して、核酸刺激に伴って核から細胞質に移行すること、DNA ウイルスである HSV-1 感染に脆弱性を示すことを見出しており、NAS1 は核酸によって誘導される免疫応答に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。NAS1 がどのように核酸認識に関わっているのか検討を進めている。一方、細胞質内核酸認識受容体シグナルで活性化される IRF3 転写因子によって TLR (Toll-like receptor) を介した IL-12p40 の誘導が抑制され、Th1/Th17 応答の抑制と Th2 応答の亢進といった適応免疫系の方向性が左右されるという新知見を得た (Negishi H et al, *Nat. Immunol.* 13: 659-666, 2012)。この知見に基づき、IRF3 を標的としたアレルギー応答の抑制 si-RNA を開発中である。また、TLR 刺激が、核酸認識受容体刺激による I 型 IFN の誘導を抑制することも見出している (Negishi H et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 19884-19889, 2013)。さらに、炎症やがんを抑制する化合物 IMF-001 の標的分子を同定しつつある。

このように本研究課題において、核酸認識受容体とそのシグナル制御の解析によって新知見が得られ、複数の課題から新規薬剤の開発へと繋がる成果が得られた。これらを活用しながら免疫疾患に対する新規治療技術の開発基盤が形成されたと考えている。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. TLR シグナルによって誘導される IL-12p40 の細胞質内核酸認識受容体シグナルによる抑制機構

概要:

細胞質内核酸認識受容体シグナルが活性化された際、転写因子である IRF3 を介し、TLR 刺激による IL-12p40 の誘導が抑制されることを見出した。結果をまとめ、*Nature Immunology* 誌に発表した (Negishi H et al, *Nat. Immunol.* 13: 659-666, 2012)。また、この成果についての紹介記事も掲載されている (*Nat. Immunol.* 13: 634-635, 2012, *Nat. Rev. Microbiol.* 10: 441 2012)。

2. HMGB1 の LPS 誘導性敗血症・リステリア感染における役割

概要:

HMGB1 は炎症応答、感染防御に役割を果たすと考えられている。我々はミエロイド系細胞群において HMGB1 を欠失したコンディショナルノックアウトマウスを作製し、HMGB1 の役割を検討した。その結果、HMGB1 欠損マウスは LPS 誘導性敗血症、リステリア菌の感染に脆弱性を示すことを見出した。HMGB1 の機能についても解析を行い、PNAS 誌に発表した (Yanai H. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 20699-20704, 2013)。

3. TSLP 遺伝子発現と腸恒常性維持において IRF3 は必須の役割を果たす

概要:

核酸刺激において、IRF3 は IL-33 及び TSLP 遺伝子の誘導に重要であることを見出した。これらの分子は腸管において恒常性を維持するために重要であり、これらの分子の遺伝子欠損マウスは DSS 誘導性腸炎に感受性を示す。実際、IRF3 遺伝子欠損マウスは DSS 誘導性腸炎に高感受性を示すことを明らかにした。結果をまとめ、PNAS 誌に報告した (Negishi H. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 21016-21021, 2012)。

<科学技術イノベーション・臨床応用に大きく寄与する成果>

1. HMGB タンパクを標的とした免疫応答抑制剤 ISM ODN の開発

概要:

HMGB タンパクと強力に結合する、非免疫原性核酸 ISM ODN が、核酸による免疫応答を抑制し、さらには HMGB1 や核酸応答が関与すると考えられる敗血症や実験的自己免疫性脳脊髄炎などの病態を抑制することを見出し、一連の結果を発表した (Yanai H. et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 11542-11547, 2011)。HMGB を阻害するこれらの阻害剤について、JST からの支援を頂き、国際特許申請を行い、複数国において登録された (W02012036215-A1)。また、(株)サノフィ社との共同開発研究も進めている。

2. TLR 刺激による IRF3 の抑制と抗細菌感染における役割

概要:

TLR 刺激によるシグナルが、核酸刺激によって RLR 受容体下流で活性化された IRF3 を抑制する現象を見出した。特に I 型 IFN の誘導が抑制を受けることが判明した。細菌感染時において I 型 IFN は生体にとって害となってしまうため、この抑制機構は、感染防御という観点から非常に重要であることが明らかとなった。一連の結果を PNAS 誌に報告した (Negishi H. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 19884-19889, 2013)。この TLR と RLR のシグナルクロストークを制御する薬剤の開発について、特に IRF3 を標的とした検討を行っている。

3. 抗体産生における IRF5 転写因子の役割と全身性エリテマトーデス (SLE) 様病態との関連

概要:

IRF5 遺伝子欠損マウスにおいて、pristane 誘導性の SLE 様の病態の特長である、抗核抗体、RNP の産生が低下し、また腎臓組織の損傷が減弱することが判明した。IRF5 は B 細胞における IgG2a 等の抗体産生に重要であることが明らかとなった。*In vitro* での詳細な解析から、IRF5 は抗体のクラススイッチを直接制御していることが判明した。これらの結果を PNAS 誌に報告した (Savitsky D. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 10154-10159, 2010)。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

①「谷口 維紹」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
谷口 維紹	東京大学・生産技術研究所	特任教授	H21.11～
柳井 秀元	同上	特任准教授	H21.11～
根岸 英雄	同上	特任助教	H21.11～
西尾 純子	同上	特任助教	H22.10～
生島 弘彬	同上	特任助教	H25.10～H26.3
Savitsky David	東京大学・医学系研究科・免疫学講座	特任助教	H21.11～H22.7
中里 款	同上	助教	H21.11～H22.8
新 幸二	同上	特任助教	H22.4～H23.10
新 奈緒子	東京大学・生産技術研究所	特任研究員	H22.10～H25.3
安 健博	同上	特任研究員	H26.4～H26.9
小柴 隆二	同上	特任研究員	H24.4～H25.3
清水 恵美	同上	学術支援職員	H25.2～
佐野 うさ	同上	技術補佐員	H25.3～
津坂 留美	同上	技術補佐員	H21.11～H25.2
弘中 今季子	同上	技術補佐員	H24.4～H25.2
千葉 志穂	東京大学・医学系研究科・免疫学講座	研究協力補助員	H21.11～H24.3
松田 淳志	同上	研究協力補助員	H21.11～H24.3
植木 紘史	東京大学・生産技術研究所	研究協力補助員	H23.4～H25.3
後藤 綾奈	同上	研究協力補助員	H24.4～H25.3
三木 祥治	同上	研究協力補助員	H24.4～H25.3
更級 葉菜	同上	研究協力補助員	H24.4～H25.3
松木 康祐	同上	研究協力補助員	H24.4～H26.3
遠藤 信康	同上	研究協力補助員	H24.4～H26.3

研究項目

「谷口」グループ

① 研究代表者：谷口 維紹（東京大学 生産技術研究所 分子免疫学分野 特任教授）

② 研究項目

- ・ 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
- ・ 低分子化合物による免疫系の制御法の開発
- ・ 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明
- ・ 死細胞（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
- ・ DNA 認識受容体 DAI の機能解析
- ・ TLR アゴニストやアンタゴニストの開発に向けたスクリーニングおよび、作用機序の解明ならびに応用

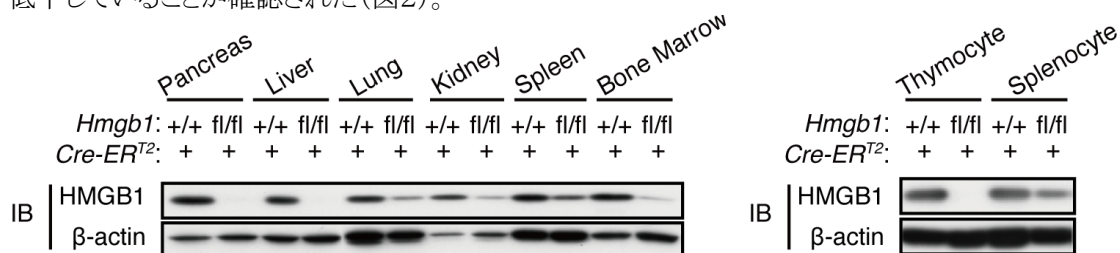
§ 3 研究実施内容及び成果

3.1 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 (東京大学 谷口グループ)

研究実施内容及び成果

HMGB タンパク(HMGB1, 2, 3)は核内に多量に存在する DNA 結合タンパク質であることが知られていたが、最近になって細胞質にも存在し、かつ分泌も起きることが知られるようになった(Lotze MT et al, *Nat Rev Immunol* 5:331-342, 2005)。また、我々は細胞質内 DNA の認識受容体を同定するため、細胞質で免疫系を強く活性化する B-型 DNA、poly(dA-dT)・poly(dT-dA)に結合するタンパクを網羅的に解析した結果、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いだした。そして、この 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”として機能する証拠を得た (Yanai H et al, *Nature* 462: 99-103, 2009)。また、最近、HMGB1 は LPS や IL-1、TNF- α などの炎症性の刺激によって、またはネクローシスなどの細胞死に伴って、核内から細胞外にまで放出されることが報告されており (Andersson U et al, *Annu. Rev. Immunol.* 29: 139-162, 2011)、こうして炎症性刺激や細胞死に伴い放出された HMGB1 は DAMPs (Damage associated molecular patterns) として機能し、TLR2 や TLR4、RAGE (Receptor for advanced glycosylation end products) といった PRRs によって認識され、免疫応答を活性化すると考えられている。また、放出された HMGB1 は LPS といった PAMPs と結合し、PAMPs の応答を強化することも報告されている。実際、組換え HMGB1 タンパクをマウスに投与した際、これらの PRRs を介して炎症応答を惹起することが報告されており (Bianchi ME *J. Leukoc. Biol.* 81:1-5, 2007)、さらに、LPS 誘導性敗血症モデルやコラーゲン誘導性慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患モデルにおいて、抗 HMGB1 中和抗体を投与することにより、これらの病態を軽減出来ることが報告されている。また、敗血症患者や心臓、肝臓等における虚血・再還流時において、血中 HMGB1 濃度が上昇することも報告されており、これらのことから HMGB1 は炎症性メディエーターとして機能し、病態との関連において重要な役割を担っていることが示唆されている (Klune J et al., *Mol Med.* 14: 476-484, 2008)。このため、HMGB1 は近年、臨床的に大変注目されており、アレルギーや自己免疫疾患など、核酸が関与すると考えられる病態において、HMGB1 の役割を明らかにすることは重要であると考えられる。しかしながら、HMGB タンパク群、特に HMGB1 の生理的機能については、コンベンショナルな *Hmgb1* 遺伝子欠損マウスが致死性を示すことから解析がなされていなかった。そこで本研究項目では、*in vivo* での HMGB1 の機能解析を行い、HMGB1 の核酸認識機構における役割について検討すると同時に、HMGB1 の機能を抑制する制御法の開発を目指すこととした。

平成 21 年度より *Hmgb1* コンディショナルノックアウトマウスの作製を開始し、平成 22 年度において作製を完了した。実際、全身性に HMGB1 を欠失するようにデザインした CAG-cre マウスは致死性を示す一方、タモキシフェンを投与することにより個体発生後に HMGB1 を欠失できる ER^{T2} -cre マウスとの交配から得られたマウスでは、各臓器における HMGB1 の発現量が著明に低下していることが確認された(図2)。

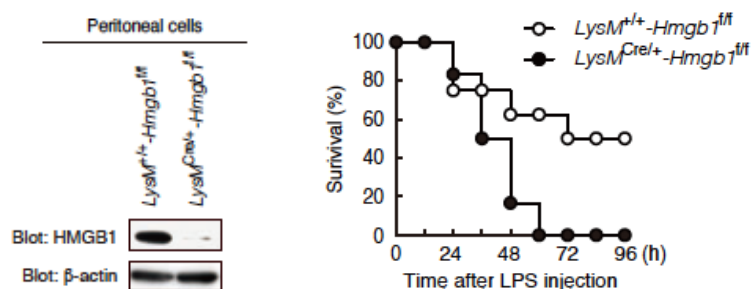


(図 1) *Hmgb1* ER^{T2} -cre マウスにおける HMGB1 の発現

コントロールマウス及び *Hmgb1*^{-/-} ER^{T2} -Cre マウスにタモキシフェンを投与し、各臓器由来のタンパクライゼートにおける HMGB1 の発現量について、抗 HMGB1 抗体を用いて検討した。

平成 23 年度においては、LPS 誘導性敗血症ショックモデルおよびリンパ球系細胞の分化について解析を行い、それらにおける HMGB1 の重要性について知見を得ている。特に B 細胞分化において、HMGB1 を欠失させたマウスでは脾臓・骨髄中に B 細胞が認められず、分化初期に異常を来す表現系が得られた。HMGB1 は核内において、RAG1、2 分子と相互作用し、B 細胞受容体、T 細胞受容体の V(D)J 組換えに関与することが報告されており (Numata M et al, *Genes Cells* 16:879-895, 2011)、組換え機構に HMGB1 が重要な役割を担っている可能性が考えられた。また、全身性に HMGB1 を欠損させた *Hmgb1* ER^{T2}-cre マウスにおいては LPS 誘導性敗血症ショックに抵抗性を示す結果を得ている (未発表)。

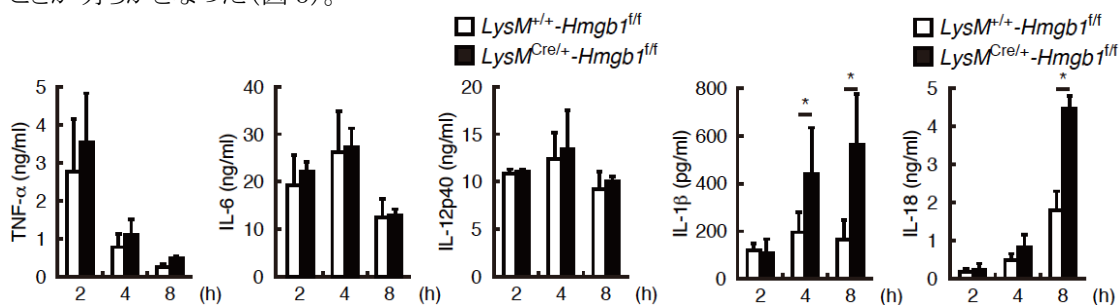
また、興味深いことに、LPS や炎症性サイトカインの刺激時において、HMGB1 の放出に関わっていると考えられているミエロイド系細胞群において HMGB1 を欠失したマウスを作製し、LPS 誘導性ショック時の生存率について検討を行ったところ、これまでの報告や予想と反し、脆弱性を示すことが明らかとなった (Yanai H. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 20699-20704, 2013; 図 2)。



(図 2) 腹腔マクロファージにおける HMGB1 の発現と LPS ショックにおける生存率

コントロールマウス及び *Hmgb1* LysM-Cre マウスから腹腔マクロファージを調製し、HMGB1 の発現について抗 HMGB1 抗体を用いて検討した (左図)。コントロールマウス及び *Hmgb1* LysM-Cre マウスに LPS を腹腔内投与し、生存率を検討した (右図)。

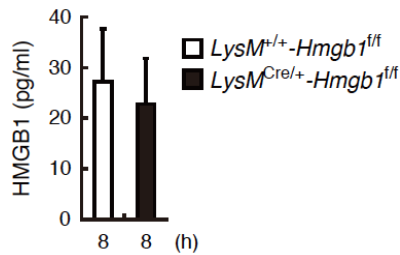
この時、血中の TNF- α や IL-6、IL-12p40 といったサイトカインの産生はコントロール群と HMGB1 遺伝子欠損群で差異はなかったが、IL-1 β 及び IL-18 といったサイトカインの産生が亢進していることが明らかとなった (図 3)。



(図 3) LPS 投与による血中サイトカイン産生

コントロールマウス及び *Hmgb1* LysM-Cre マウスに LPS を腹腔内投与し、2、4、8 時間後に血漿を採取し、各サイトカインについて ELISA にて検討した。

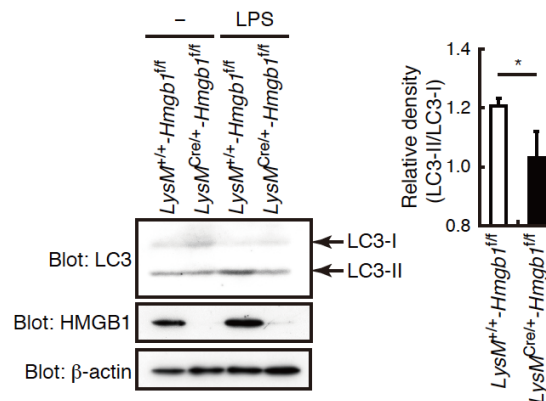
このことから、ミエロイド系細胞群において HMGB1 を欠失したマウスにおいては IL-1 β や IL-18 といったサイトカインの産生に関わる、インフラマソームの活性化が亢進しているものと考えられた。この機構に細胞外の HMGB1 が寄与しているかどうかについて検討するため、細胞外への HMGB1 の放出が遺伝子欠損マウスにおいて減弱するかどうか、検討を行った (図 4)。その結果、これまでの報告や予想と反し、血中の HMGB1 量は、減弱は認められるものの、大部分は残っていることが判明した。



(図 4) LPS 投与時の血中 HMGB1 量

コントロールマウス及び *Hmgb1* LysM-Cre マウスに LPS を腹腔内投与し、8 時間後の血漿中の HMGB1 量について ELISA にて検討した。

上記の結果から、LPS 投与時に血中に産生される HMGB1 は、マクロファージなどのミエロイド系細胞群によってのみ担われているのではないことが明らかとなった。血中への HMGB1 の産生を担っているような”ソース”となる細胞群が存在するかどうかは今後明らかにしていきたい。一方で、IL-1 β 及び IL-18 の産生亢進を担っているのは細胞内 HMGB1 の機能であることが考えられた。LPS 刺激時において、オートファジーの異常がインフラマソームの異常活性化を誘導し、IL-1 β 及び IL-18 の産生を促進することが報告されている (Saitoh T. et al., *Nature* 456: 264-268, 2008; Nakahira K. et al., *Nat. Immunol.* 8: 222-230, 2011)。また、HMGB1 は Beclin1 と結合し、Beclin1 を介したオートファジーの誘導に関与することが知られている (Tang D. et al., *J. Cell. Biol.* 190: 881-892, 2009)。そこで、HMGB1 はオートファジーの制御に関与する可能性について、検討を行った (図 5)。

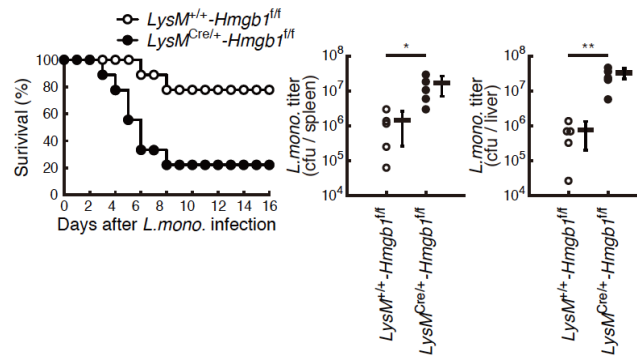


(図 5) LPS 刺激時のオートファジー誘導における HMGB1 の役割

コントロールマウス及び *Hmgb1* LysM-Cre マウスから腹腔内マクロファージを調製し、LPS 刺激時のオートファジーについて、抗 LC3 抗体を用いて検討を行った (左図)。LC3-I/LC3-II について、左図のバンドの濃さを定量した (右図)。

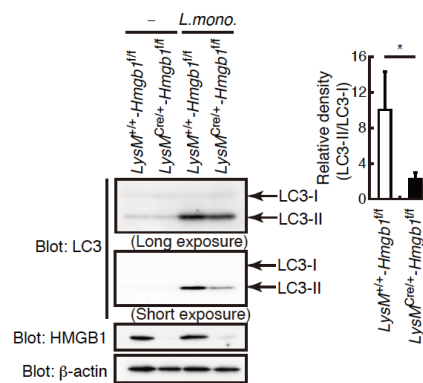
その結果、HMGB1 欠損マクロファージにおいて、LPS 刺激時のオートファジーが減弱していることが明らかとなった。このことから、HMGB1 欠損マウスにおいては、LPS 刺激時のオートファジーの異常によりインフラマソームの活性化が亢進し、IL-1 β 及び IL-18 の産生を伴って、ショックに脆弱性を示すものと考えられた。

オートファジーは細菌感染時の排除に重要な機構であることが知られている。HMGB1 のオートファジーにおける重要性についてさらに検討を行うため、リステリア感染実験を行った。その結果、HMGB1 欠損マウスは、予想通り、リステリア感染に対して脆弱性を示し、オートファジーの誘導も減弱することが判明した (図 6、7)。



(図6) リステリア感染における HMGB1 の役割

コントロールマウス及び *Hmgb1* LysM-Cre マウスにリステリア菌を感染させ、生存率(左図)、脾臓、肝臓でのリステリア菌タイターについて検討した(右図)。



(図7) リステリア感染時のオートファジー誘導における HMGB1 の役割

コントロールマウス及び *Hmgb1* LysM-Cre マウスから腹腔マクロファージを調製し、リステリア感染時のオートファジーについて、抗 LC3 抗体を用いて検討を行った(左図)。LC3-I/LC3-II について、左図のバンドの濃さを定量した(右図)。

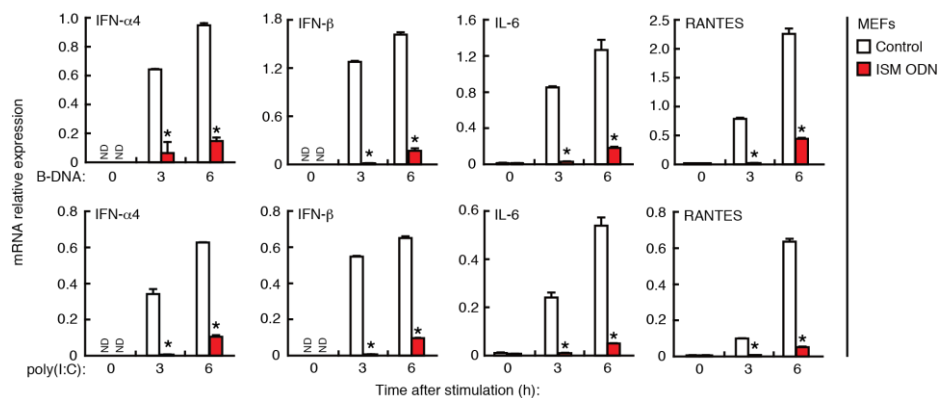
このように、細胞内 HMGB1 はオートファジーを介し、炎症抑制、感染防御に寄与していることが明らかとなった。このような機能は、遺伝子欠損マウス、又は細胞を使用したからこそ得られた結果であり、世界に先駆けて *Hmgb1* コンディショナルノックアウトマウスを作製した意義は大きいと考えられる。今後、本マウスを有効に活用していくことで、細胞外 HMGB1 の炎症促進作用についても明らかにできるものと期待している。

3. 2 低分子化合物による免疫系の制御法の開発 (東京大学 谷口グループ)

研究実施内容及び成果

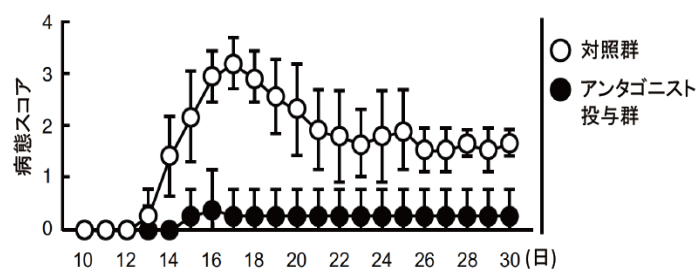
HMGBタンパク群、特にHMGB1に関して、関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis : RA) や全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患症例において発現の亢進が認められることから、これらの病態への関与が示唆されている (Lotze MT et al, *Nat Rev Immunol* 5:331-342, 2005)。しかし、そのメカニズムについては壊死細胞からの流出や、活性化マクロファージから分泌されNF- κ Bを介する炎症性サイトカイン産生を促進する等の仮説は出されているものの、HMGB1と核酸による免疫応答との関係は未知である。一方、SLE患者では血中の抗核抗体、DNA抗体、免疫複合体などの値が高いことはよく知られており、この病態の発症あ

るいは増悪にType I IFNが深く関与している、との報告もある (Sibbitt et al, *Arthritis Rheum* 28:624-629, 1985)。我々が見いだしたHMGBと核酸認識受容体活性化の成果を総合すれば、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。そこで本研究において、HMGBタンパクを標的とした化合物をスクリーニングし、HMGBを介した核酸免疫応答シグナルを調節する新たな免疫制御システムの構築、さらには自己免疫疾患の病態改善に有用な薬剤の実用化を目指した。平成21年度の研究において、我々はHMGB蛋白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が、さらに平成22年度の研究において、強力なHMGB1アンタゴニストを同定した。平成23年度において、本アンタゴニストをさらに改良したものを作製し (ISM ODN)、ISM ODNが*in vitro*において核酸刺激による免疫応答の活性化を抑制するとともに (図8)、ヒト多発性硬化症モデルであるEAE (experimental autoimmune encephalitis; EAE) の発症を抑制すること (図9)、及び、LPS誘導性敗血症ショックに抵抗性を付与するという結果を得た (図10)。本ISM ODNについては、JSTを通じて国際特許を申請しており、今後、製薬企業との共同開発等も視野に入れ、「HMGB1標的阻害剤による炎症反応抑制法の確立」を目指していきたい。



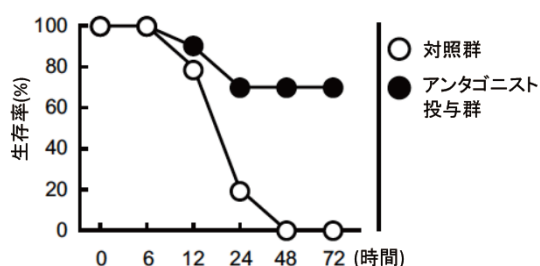
(図8) 核酸刺激によるサイトカイン産生における ISM ODN の影響

マウス胎児線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblasts; MEFs) に ISM ODN を1時間前に処理し、その後 B-DNA または poly(I:C)で刺激を行い、total RNA を回収した。qRT-PCR にて I 型 IFN 及びサイトカイン mRNA の誘導を検討した。



(図9) EAE マウスモデルにおける HMGB アンタゴニスト (ISM ODN) 投与の影響

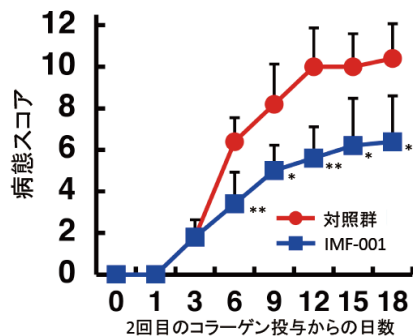
MOG ペプチドおよびアジュバントの投与から8日後、PBS または ISM ODN を投与し、EAE スコアについて検討した。



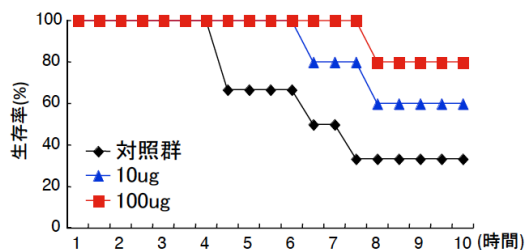
(図10) 敗血症モデルにおける ISM ODN 投与の影響 PBS または ISM ODN の投与から1時間後、1.25mg の LPS を投与し、生存率を観察した。

さらに、我々は炎症性サイトカインの誘導を抑制する化合物として IMF-001 を開発したが、平成 22-23 年度の研究によって、IMF-001 が敗血症および関節炎マウス実験モデルにおいて、病態を抑制することを見いだした（図 11、図 12；未発表）。また、IMF-001 が生存や増殖に関わる NF- κ B の活性化を抑制するとともに、アポトーシスの誘導を増強する p38/JNK を活性化することで、強力な抗がん作用を示すことが、細胞レベルおよびマウス個体レベルで示された（図 13；未発表）。さらに平成 23 年度の研究において、IMF-001 処理によってリン酸化が阻害される TLR4 下流の蛋白群を網羅的に解析した結果、IMF-001 は IRAK1/4 下流蛋白のリン酸化を著明に阻害することが明らかとなった。一方で、IMF-001 単独の処理でリン酸化が増強される蛋白を網羅的に解析したところ、細胞死に関わる多くの蛋白のリン酸化が増強される事を明らかにした。

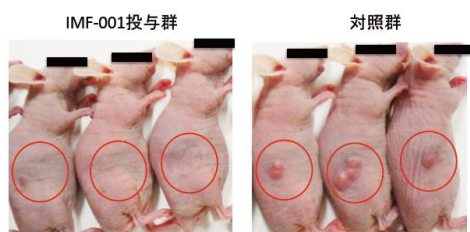
24 年度の検討によって、IMF-001 が PAMPs 刺激だけでなく、TNF- α 刺激による炎症性サイトカインの誘導も抑制することが明らかとなった。一方で、I 型 IFN 刺激による遺伝子誘導に対して、IMF-001 は影響をしないことから、IMF-001 は特異的に PAMPs、TNF- α 刺激によるサイトカイン誘導を抑制していると考えられた。25 年度は IMF-001 の結合蛋白を同定するため、リンカー結合型 IMF-001 を作成し、IMF-001 の不活性型類縁体の同定にも成功した。さらにこれらを使用し、IMF-001 に結合するタンパク群の同定が完了した。現在、IMF-001 結合蛋白の中から薬効と関連する蛋白の同定を推進し、IMF-001 の作用機序を明らかにすることで、疾患治療薬としての開発を進めていきたいと考えている。



(図 11) コラーゲン誘導性関節炎における IMF-001 投与の影響 2 回目のコラーゲンの投与から 3 日後、PBS または IMF-001 (50 μ g) を 3 日おきに 5 回投与し、病態の進行を観察した。*0.01>p、*0.05>p



(図 12) 敗血症マウスモデルにおける IMF-001 投与の影響 DMSO (対照群) または IMF-001 の投与から 1 時間後、LPS および D-ガラクトサミンを投与し、生存率を観察した。



(図 13) IMF-001 の抗腫瘍作用 ノードマウスの皮下に HeLa 細胞を投与後、2 日おきに 20 μ g の IMF-001 を皮下投与した。HeLa 細胞の投与から 18 日後に写真を撮影した。

3. 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明 (東京大学 谷口グループ)

研究実施内容及び成果

RIG-I 様受容体、RIG-I、MDA5 は細胞質内 RNA 認識受容体として知られており (Yoneyama et al, *Nat Immunol* 5:730-737, 2004)、これまで DNA による応答に関与しないとされてきた (Ishii et al, *Nat Immunol* 7:40-48, 2006)。しかしながら、我々の詳細な解析によってこれらの分子が DNA にも結合すること、これらの分子が欠損すると自然免疫系応答の中で Type I IFN 経路が選択的に抑制されることが新しく判明した。すなわち、細胞質内 RNA による免疫応答はすべての経路が RIG-I 様受容体依存性に活性化されるのに対し、DNA による応答経路は複雑に分岐していると予想される (Choi et al, *PNAS* 106:17870-17875, 2009)。平成 22-23 年度の研究によって、RIG/MDA5 両欠損細胞で細胞質内 RNA 刺激による遺伝子誘導が完全に阻害される一方で、細胞質内 DNA 刺激、DNA ウイルス感染においては I 型 IFN をのぞき、多くの遺伝子が正常に誘導されることが分かった。この結果は細胞質内 DNA を認識する未知の DNA センサーの存在を示唆していると考えられる。このような分子の候補として、我々は CpG-B DNA と結合する 2 つの分子 NAS1 (nucleic acid sensor 1) 及び NAS2 を同定した。平成 23-24 年度において、これら 2 つの分子のコンディショナルノックアウトマウスを作製した (図 14)。



(図14) *Nas1* 遺伝子欠損マウスの作製 *Nas1* 遺伝子欠損マウスを作製し、MEFs における NAS1 の発現について抗 NAS1 抗体を用いて検討した (左図)。*Nas1* 遺伝子欠損マウスには生育遅延が認められた (右図)。

Nas1 遺伝子欠損マウス由来の胸腺細胞、及び脾細胞における免疫担当細胞の細胞集団についてフローサイトメトリーにて解析を行ったところ、T 細胞、B 細胞の細胞集団に特に差異は認められず、NK 細胞、樹状細胞、マクロファージといった細胞集団においても異常は認められなかった。一方で、*Nas1* 遺伝子欠損マウスにおいては生育に遅延が認められた。NAS1 と生育との関連については現在のところ明らかでなく、今後の課題であると考えている。*Nas1* 欠損細胞では、特にマクロファージにおいて、核酸刺激による IL-12p40 の誘導などが顕著に減弱することを見出している (未発表)。また、NAS1 欠損マウスは HSV-1 感染、及びリステリア感染に脆弱性を示すことも見出している (未発表)。一方で、このような表現系は *Nas2* 欠損マウス、細胞では認められなかった。NAS2 は核酸と結合する性質は有するものの、刺激時のサイトカイン誘導等には関与しないものと考えられる。今後、NAS1 が核酸認識機構にどのように関与しているのか、RIG-I、MDA5 との関連について視野にいれながら検討を進めて行く予定である。

3. 4 DNA 認識受容体 DAI の機能解析 (東京大学 谷口グループ)

研究実施内容及び成果

我々は細胞質内 DNA 認識受容体として DAI を同定した (Takaoka A et al, *Nature* 448:501-506, 2007)。その後の研究によって DNA 認識システムは冗長性に富むことが明らかになった (Wang Z et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 105:5477-5482, 2008)。DAI の機能を更に明らかにするため、*Dai* 欠損マウスを作製し、DNA による免疫系活性化における DAI の役割について解析を行った。その結果、核酸刺激時において DAI が特定の遺伝子の誘導に重要であることが明らかとなった (未発表)。

現在、DAI 下流の遺伝子発現制御機構の詳細を解析するとともに、その生理的意義を解析するため、*Dai* 遺伝子欠損マウスあるいは他の核酸認識受容体遺伝子との二重欠損マウスの作製を検討している。さらに、*Dai* 遺伝子欠損マウスが細菌感染に脆弱性を示すという予備的知見も得てい

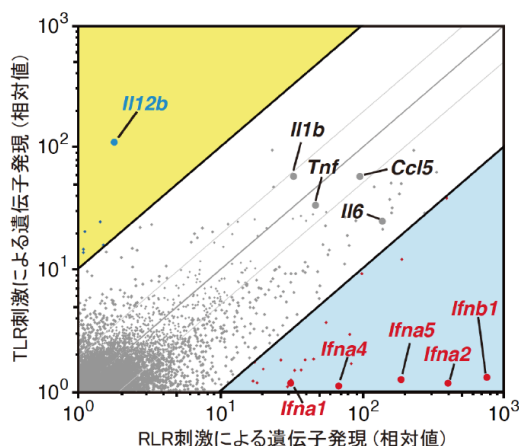
る。今後、感染応答における DAI の役割、自己免疫疾患や炎症応答への DAI の関与について検討する予定である。

3.5 細胞質核酸認識受容体と Toll-like receptor の免疫シグナルの違い・クロストークメカニズムの解析（東京大学 谷口グループ）

研究実施内容及び成果

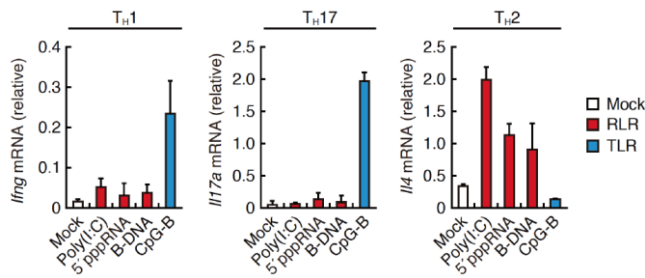
核酸認識自然免疫受容体には RIG-I/MDA5 (RIG-I-like receptors; RLRs) をはじめとする細胞質内受容体と TLR3, 7, 9 といった Toll-like receptor (TLRs) が関与するが、それらの経路から誘導される遺伝子発現プログラムの違いについて、免疫応答の方向付け、といった観点からの研究を推進している。既に平成 22 年度の研究により、RLR のシグナルが I 型インターフェロン (IFN- α/β) 遺伝子を強く誘導する一方で、IL-12p40 の遺伝子誘導を抑制することを見いだしており、さらに TLR シグナルが IFN- α/β 遺伝子を誘導せず、IL-12p40 の遺伝子を強く誘導することを明らかにした (図 15)。この結果は上記の異なったクラスの免疫受容体からのシグナルが免疫応答の方向性を指示していること示す知見である。平成 23 年度の研究では、上記の遺伝子発現の違いにより、RLR 経路は Th2 応答、TLR 経路は Th1/17 応答をより強く活性化することを明らかにした (Negishi H et al, *Nat. Immunol.* 13: 659-666, 2012; 図 16-19)。さらに背景にある分子メカニズムでは、転写因子 IRF3 が中心的な役割を果たしており、RLR 経路下流で活性化された IRF3 は I 型 IFN 遺伝子の誘導を活性化すると同時に、IL-12p40 の遺伝子の転写を強力に抑制するというユニークな機能を持つことを明らかにした (Negishi H. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 19884-19889, 2013)。また、この機構により、ウイルス感染は Th1/17 型の抗バクテリア応答を抑制し、バクテリア重感染に対する感受性を高めることを明らかにした。

24 年度の研究によって、RLR 下流で Th2 応答を活性化する遺伝子の特定に成功し、IL-33 および TSLP が IRF3 依存的に発現誘導されることを明らかにした (Negishi H. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 21016-21021, 2012)。IL-33 および TSLP はアレルギー疾患を増悪するサイトカインとして知られており、このような結果は、IRF3 欠損マウスがアレルギー喘息モデルにおいて、喘息を起こしにくいという過去の報告の分子機構を解明したものだと考えられる。また、一方で、IL-33 および TSLP は大腸炎からの回復に重要な遺伝子であることが報告されており、我々は *Irf3* 遺伝子欠損マウスにおいて DSS 誘導性の大腸炎が著明に増悪することを発見した。さらに、大腸における IRF3 の活性化には大腸内の核酸が重要であることも分かっており、このような核酸およびその核酸による IRF3 の活性化機構が解明できれば、大腸炎の抑制方法確立に繋がることから、25 年度はその分子機構の解析を行った。その結果、surfactant protein D (SPD) が細胞質内の核酸認識受容体である STING 経路の活性化を増強することを発見した。

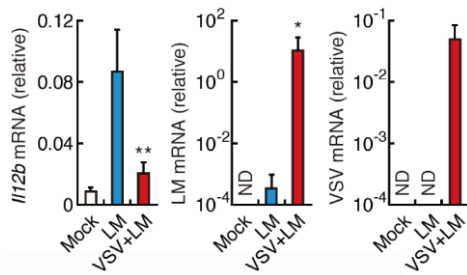


(図15) TLR 刺激と RLR 刺激で誘導される遺伝子の網羅解析

腹腔マクロファージを TLR (CpG-B)または RLR (B-DNA)刺激し、4 時間後の mRNA 誘導をマイクロアレイ解析によって、網羅的に解析した。

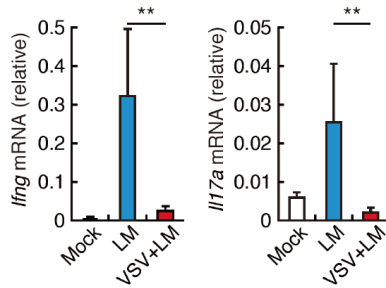


(図 16) TLR 経路、RLR 経路による T 細胞応答 野生型マウスの footpad に OVA 蛋白および各受容体経路のリガンドを免疫し、7 日後、膝窩のリンパ節から細胞を採取、CD4T 細胞特異的 OVA ペプチドで 2 日間再刺激した。図に示した遺伝子の発現は定量的 RT-PCR 法により解析した。



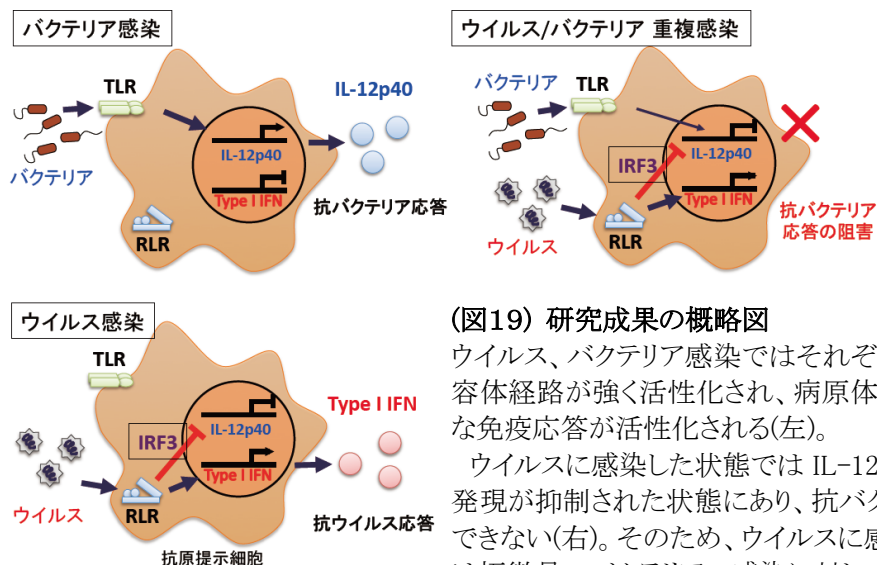
(図 17) ウイルス/バクテリア重複感染時の T 細胞応答

野生型マウスに水泡性口内炎ウイルス (VSV) を感染してから 1 時間後、さらにリステリア (LM) を感染させ、1 週間後、脾臓から CD4T 細胞を単離し、抗 CD3 抗体で 2 日間再刺激した。図に示した遺伝子の発現は定量的 RT-PCR 法により解析した。



(図 18) ウイルス/バクテリア重複感染時の脾臓における遺伝子発現

野生型マウスに水泡性口内炎ウイルス (VSV) を感染してから 1 時間後、さらにリステリア (LM) を感染させ、3 日後、脾臓を単離した。図に示した遺伝子の発現は定量的 RT-PCR 法により解析した。**<0.02、*<0.05



(図19) 研究成果の概略図

ウイルス、バクテリア感染ではそれぞれ異なった受容体経路が強く活性化され、病原体に応じた適切な免疫応答が活性化される(左)。

ウイルスに感染した状態では IL-12p40 遺伝子の発現が抑制された状態にあり、抗バクテリア応答ができない(右)。そのため、ウイルスに感染したマウスは極微量のバクテリアの感染に対しても、非常に高い感受性を示す。

§ 4 成果発表等

1. Savitsky, D., Yanai, H., Tamura, T., Taniguchi, T. and Honda, K.; Contribution of IRF5 in B cells to the development of murine SLE-like disease through its transcriptional control of the IgG2a locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 10154–10159, 2010.
2. Ebihara, T., Azuma, M., Oshiumi, H., Kasamatsu, J., Iwabuchi, K., Matsumoto, K., Saito, H., Taniguchi, T., Matsumoto, M., and Seya, T.; Identification of a polyI:C-inducible membrane protein, that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *J. Exp. Med.* 207: 2675–2687, 2010.
3. Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., Taniguchi, T., Takeda, K., Hori, S., Ivanov, I., Umesaki, Y., Itoh, K. and Honda, K.; Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 331: 337–341. 2011.
4. Tsushima, K., Osawa, T., Yanai, H., Nakajima, A., Takaoka, A., Manabe, I., Ohba, Y., Imai, Y., Taniguchi, T., and Nagai, R.; IRF3 regulates cardiac fibrosis but not hypertrophy in mice during angiotensin II-induced hypertension. *FASEB J.* 25: 1531–1543, 2011.
5. Matsuda, A., Ogawa, M., Yanai, H., Naka, D., Goto, A., Ao, T., Tanno, Y., Takeda, K., Watanabe, Y., Honda, K., and Taniguchi, T. ; Generation of mice deficient in RNA-binding motif protein 3 (RBM3) and characterization of its role in innate immune responses and cell growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411: 7–13, 2011.
- 6 Yanai, H., Chiba, S., Ban, T., Nakaima, Y., Onoe, T., Honda, K., Ohdan, H. and Taniguchi, T.; Suppression of immune responses by nonimmunogenic oligodeoxynucleotides with high affinity for high-mobility group box proteins (HMGBs). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 11542–11547, 2011.
7. Idrus, E., Nakashima, T., Wang, L., Hayashi, M., Okamoto, K., Kodama, T., Tanaka, N., Taniguchi, T., and Takayanagi, H.; The role of the BH3-only protein Noxa in bone homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun.* 410: 620–625, 2011.
8. Negishi, H., Yanai, H., Nakajima, A., Koshiba, R., Atarashi, K., Matsuda, A., Matsuki, K., Miki, S., Doi, T., Aderem, A., Nishio, J., Smale, ST., Honda, K., and Taniguchi, T. ; Cross-interference of RLR and TLR signaling pathways modulates antibacterial T cell responses. *Nat. Immunol.* 13: 659–666, 2012.
9. Negishi, H., Miki, S., Sarashina, H., Taguchi-Atarashi, N., Nakajima, A., Matsuki, K., Endo, N., Yanai, H., Nishio, J., Honda, K., and Taniguchi, T.; Essential contribution of IRF3 to intestinal homeostasis and microbiota-mediated *Tslp* gene induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109: 21016–21021, 2012.
10. Koshiba, R., Yanai, H., Matsuda, A., Goto, A., Nakajima, A., Negishi, H., Nishio, J., Smale, ST., and Taniguchi, T.; Regulation of cooperative function of the *Il12b* enhancer and promoter by the interferon regulatory factors 3 and 5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430: 95–100, 2013.
11. Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., Kim, S., Fritz, J. V., Wilmes, P., Ueha, S., Matsushima, K., Ohno, H.,

Olle, B., Sakaguchi, S., Taniguchi, T., Morita, H., Hattori, M., and Honda, K.; Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* 500: 232–236, 2013.

12. Negishi H, Matsuki K, Endo N, Sarashina H, Miki S, Matsuda A, Fukazawa K, Taguchi-Atarashi N, Ikushima H, Yanai H, Nishio J, Honda K, Fujioka Y, Ohba Y, Noda T, Taniguchi S, Nishida E, Zhang Y, Chi H, Flavell RA, Taniguchi T.: Beneficial innate signaling interference for anti-bacterial responses by a TLR-mediated enhancement of the MKP-IRF3 axis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 110: 19884–19889, 2013.

13. Yanai, H., Matsuda, A., An, J., Koshiba, R., Nishio, J., Negishi, H., Ikushima, H., Onoe, T., Ohdan, H., Yoshida, N., and Taniguchi, T.; Conditional ablation of HMGB1 in mice reveals its protective function against endotoxemia and bacterial infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 110: 20699–20704, 2013.

14. Chiba, S., Ikushima, H., Ueki, H., Yanai, H., Kimura, Y., Hangai, S., Nishio, J., Negishi, H., Tamura, T., Saijo, S., Iwakura, Y., and Taniguchi, T.; Recognition of tumor cells by Dectin-1 orchestrates innate immune cells for anti-tumor responses. *Elife* 2014 in press.

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

(英文総説)

1. Savitsky, D., Tamura, T., Yanai, H. and Taniguchi, T; Regulation of immunity and oncogenesis by the IRF transcription factor family. *Cancer Immunol. Immunother.* 59: 489–510, 2010.

2. Yanai, H., Ban, T. and Taniguchi, T.; Essential role of high-mobility group proteins in nucleic acid-mediated innate immune responses. *J. Intern. Med.* 270: 301–308, 2011.

3. Ikushima, H., Negishi, H., and Taniguchi, T.; The IRF family transcription factors at the interface of innate and adaptive immune responses. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 78:105–116. 2013.

4. Yanai, H., Ban, T., and Taniguchi, T.; High-mobility group box family of proteins: ligand and sensor for innate immunity. *Trends. Immunol.* 33: 633–640, 2012.

5. Yanai, H., Negishi, H., and Taniguchi, T.; The IRF family of transcription factors: Inception, impact and implications in oncogenesis. *Oncoimmunol.* 1: 1376–1386, 2012.

6. Yanai, H., and Taniguchi, T.; Nucleic acid sensing and beyond: virtues and vices of HMGB1. *J. Intern. Med.* 2014 in press.

(日本語総説)

1. 著者名 ; 柳井秀元

タイトル ; 核酸認識におけるHMGBタンパクの役割

書籍名 ; 細胞工学 vol. 29:1014–1019, 2010

2. 著者名 ; 柳井秀元

タイトル ; 核酸アナログによる自然免疫応答の調節

書籍名 ; ウイルス vol. 61:139–150, 2011

3. 著者名；柳井秀元、千葉志穂

タイトル；オリゴ核酸投与による敗血症病態の抑制とその標的分子

書籍名；敗血症の診断／治療の実状と病態・メカニズムをふまえた開発戦略，
2013

4. 著者名；西尾純子

タイトル；抗 CD3 抗体などによる自己免疫疾患の治療戦略

書籍名；細胞工学 vol. 32:1232-1237, 2013

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

- ① 招待講演 (国内会議 16 件、国際会議 14 件)

〈国内〉

1. 発表者；谷口維紹

タイトル；Nucleic acid sensing and activation of immune responses

学会名；14th International Congress of Immunology (ICI 2010)

場所；兵庫県 神戸市

月日；2010 年 8 月 22-27 日

2. 発表者；柳井秀元

タイトル；Hierarchical nucleic acid sensing system for innate immune responses

学会名；8th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2010

場所；熊本県

月日；2010 年 5 月 20 日

3. 発表者；谷口維紹

タイトル；第 155 回日本獣医学会学術集会、特別講演“免疫系のシグナル伝達と遺伝子発現；複雑系の解明を基盤とした医学への貢献に向けて“

場所；東京都

月日；2013 年 3 月 28 日

4. 発表者；谷口維紹

タイトル；Regulation of inflammatory responses by classical and non-classical cytokines、自然免疫と獲得免疫の接点：マクロファージ、樹状細胞、ヘルパーT 細胞のネットワーク

学会名；第 78 回 日本インターフェロン・サイトカイン学会総会 (JSICR) 第 21 回 マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム (MMCB) 合同学術集会

場所；東京都

月日；2013 年 5 月 21 日

5. 発表者；谷口維紹

タイトル；免疫システムからみた感染・炎症と発がんの調節機構

学会名；第 1 回えひめ骨と免疫学セミナー

場所；愛媛県

月日；2013 年 7 月 2 日

6. 発表者；谷口維紹

タイトル;炎症・免疫のシグナルと遺伝子発現の制御機構;基礎から応用に向けて

学会名;第3回 Clinical& Basic Research Forum

場所;千葉県

月日;2013年7月20日

7. 発表者;谷口維紹

タイトル;細胞運命決定のシグナル伝達

学会名;第86回日本生化学会大会

場所;神奈川県

月日;2013年9月11日

8. 発表者;谷口維紹

タイトル;サイトカインを基軸とした自然免疫系シグナル伝達と遺伝子発現機構の解析とその応用

学会名;第61回日本ウイルス学会学術集会

場所;兵庫県

月日;2013年11月10日

9. 発表者;谷口維紹

タイトル;炎症・免疫応答における自己・非自己の識別;シグナル伝達と遺伝子発現の研究を基盤とした医学への貢献に向けて

学会名;第24回先端医療センターMonthly Lecture

場所;兵庫県

月日;2013年11月22日

10. 発表者;谷口維紹

タイトル;炎症と免疫におけるシグナル伝達と遺伝子発現;基礎研究を基盤とした医学への貢献に向けて

学会名;「全身性炎症疾患の病因・病態の解明に関する助成」第3回研究発表会

場所;東京都

月日;2014年1月25日

11. 発表者;谷口維紹

タイトル;Session1-1: Immunoregulation of Cancer

学会名;第4回新学術領域発がんスパイラル国際シンポジウム

場所;北海道

月日;2014年2月10日

12. 発表者;谷口維紹(東京大学)

タイトル;Signaling and Gene Expression for Cytokines in Inflammation and Immunity; Towards Contribution to Medical Sciences

学会名;第78回日本循環器学会学術集会 真下記念講演,

場所;東京都

月日;2014年3月22日

13. 発表者;谷口維紹

タイトル;自然免疫系における自己・非自己の識別;がん・炎症の制御機構解析とその応用

学会名;第79回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会

場所;北海道

月日;2014年6月20日

14. 発表者;柳井秀元

タイトル; 炎症・感染におけるHMGB1の役割

学会名;第4回 Cancer-Infection-Transplantation セミナー

場所;広島県

月日;2014年7月9日

15. 発表者;谷口維紹

タイトル; 炎症・免疫・がんについてのヒト疾患モデルマウス

学会名; 東京理科大学 生命医科学研究所 ヒト疾患モデル研究センター 動物実験棟竣工
記念シンポジウム

場所;千葉県

月日;2014年7月12日

16. 発表者;谷口維紹

タイトル; 核酸による炎症・免疫応答の調節機構; 関連疾患の治療法の開発を目指して

学会名; 次世代医薬「核酸医薬」創出に向けた Strategy2014

場所;東京都

月日;2014年7月15日

〈国際〉

1. 発表者;谷口維紹

タイトル;Immunity and cancer—From the dawn of cytokine molecular biology to IRFs and
regulation of innate immune responses

学会名;Cold Spring Harbor Asia Conference “James Watson Symposium on Cancer

場所;中国 蘇州

月日;2010年4月6-11日

2. 発表者;谷口維紹

タイトル;Activation of immune responses by HMGBs and other pattern recognition
receptors

学会名;The Fourth International HMGB1 Symposium –Signals of Tissue Damage

場所;ヘルシンキ(フィンランド)

月日;2010年6月20-23日

3. 発表者;谷口維紹

タイトル;Signaling Cross Talks and Gene Expression in the Innate Immune System

学会名;PATHOLOGY & IMMUNOLOGY CENTENNIAL SYMPOSIUM

場所;アメリカ合衆国 セントルイス(ワシントン大学)

月日;2010年9月20日

4. 発表者;谷口維紹

タイトル;Innate immune response and inflammation

学会名;Cold Spring Harbor Asia Conference “Frontiers of Immunology in Health and
Diseases

場所;中国 蘇州

月日;2010年11月7-10日

5. 発表者;谷口維紹

タイトル;Regulation of innate immune responses by nucleic acid sensors and their partners

学会名;Avison Biomedical Symposium 2011 “Innate Immunity and Mucosal Inflammation”

場所;韓国 ソウル

月日;2011年2月25日

6. 発表者;谷口維紹

タイトル;“Signaling and gene expression for old and new cytokines”

学会名;Cold Spring Harbor Asia 2012 Symposium on Frontiers of Immunology in Health and Diseases

場所;中国 蘇州

月日;2012年9月3日-7日

7. 発表者;谷口維紹

タイトル;“At the Interface of Innate and Adaptive Immunity: Regulation of Signal Transduction by and for Cytokines”

学会名;The 12th International Symposium on Dendritic Cells

場所;韓国 大邱広域市

月日;2012年10月9日

8. 発表者;谷口維紹

タイトル;Regulation of Inflammatory Responses by HMGB1 and classical cytokines、

学会名;Honors Lecture, New York University, Medical Center、New York University、

場所;NY アメリカ合衆国

月日;2013年4月1日

9. 発表者;谷口維紹

タイトル;At the interface of innate and adaptive immunities: Signal transduction and gene expression by and for cytokines

学会名;78th Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology Immunity & Tolerance

場所;アメリカ合衆国

月日;2013年6月1日

10. 発表者;谷口維紹

タイトル;Regulation of immune responses by typical and atypical cytokines

学会(発表先)名;Charles A. Janeway Jr. Memorial Symposium, Yale University、Yale University

場所;アメリカ合衆国

月日;2013年6月4日

11. 発表者;谷口維紹

タイトル;Regulation of inflammatory responses by HMGB1 and classical cytokines

学会名;A Croucher Foundation-Sponsored Conference: Molecular Mechanisms of Innate Immunity 2013、Department of Biochemistry, LKS Faculty of Medicine, The University of Hong Kong、

場所;香港

月日;2013年6月14日

12. 発表者;谷口維紹

タイトル;Regulation of inflammatory responses by HMGB1 and classical cytokines
学会名;15th International Congress of Immunology
場所;ミラノ イタリア
月日;2013 年 8 月 27 日

13. 発表者;谷口維紹
タイトル;Classical and Non-Classical Cytokines in the Regulation of Innate Immunity
学会名;2013 Inaugural Meeting of the International Cytokine and Interferon Society (ICIS)
場所;CA アメリカ合衆国
月日;2013 年 9 月 30 日

14. 発表者;谷口維紹
タイトル;Keynote Address: HMGB1 as a Universal Sentinel
学会名;HMGB1 World Congress 2013
場所;NY アメリカ合衆国
月日;2013 年 10 月 9 日

② 口頭発表 (国内会議 2 件、国際会議 2 件)

〈国際〉

1. 発表者;谷口維紹
タイトル;“Regulation of inflammatory responses by classical and non-classical cytokines”
学会名;3rd Joint Symposium of the Max-Planck Society and University of Tokyo
場所;日本
月日;2013 年 3 月 7 日

2. 発表者;柳井秀元
タイトル;“Role of HMGB1 in inflammatory diseases and nuclei acid-mediated immune responses”
学会名;AAI Immunology 2014
場所;ピッツバーグ, アメリカ合衆国
月日;2014 年 5 月 5 日

〈国内〉

1. 発表者;生島弘彬
タイトル;がん関連分子パターンの認識による自然免疫受容体活性化を介したがん免疫監視機構
学会名;第 18 回がん分子標的治療学会学術総会
場所;宮城県 仙台市
口頭発表・ポスター発表の別:口頭発表

2. 発表者;生島弘彬
タイトル;Recognition of tumor cells by pattern-recognition receptors for anti-tumor innate immune responses
学会名;第 18 回がん免疫学会学術総会
場所;愛媛県 松山市
口頭発表・ポスター発表の別:口頭発表

③ ポスター発表 (国内会議 16 件、国際会議 5 件)

〈国内〉

1. 発表者;柳井秀元

タイトル;A selective contribution of the RIG-I-like receptor pathway to type I interferon responses activated by cytosolic DNA

学会名;第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会

場所;兵庫県 神戸市

月日;2010 年 12 月 7-10 日

2. 発表者;藩龍馬

タイトル;HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses

学会名;第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会

場所;兵庫県 神戸市

月日;2010 年 12 月 7-10 日

3. 発表者;千葉志穂

タイトル;Inhibition of Promiscuous Nucleic-Acid-Sensing Molecules HMGB Proteins and Suppression of Immune Activations

学会名;第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会

場所;兵庫県 神戸市

月日;2010 年 12 月 7-10 日

4. 発表者;三木祥治

タイトル;ウイルス感染による IL-33 遺伝子発現誘導機構の解析

学会名;第12回東京大学 生命科学シンポジウム

場所;東京都

月日;2012 年 6 月 30 日

5. 発表者;植木 紘史

タイトル;がん転移抑制における転写因子 IRF5 の役割の解析

学会名;がん若手研究者ワークショップ

場所;長野県

月日;2012 年 9 月 5 日-8 日

6. 発表者;千葉志穂

タイトル;自然免疫応答における新規核酸認識候補分子の探索と解析

学会名;第 35 回日本分子生物学会年会

場所;福岡県福岡市

月日;2012 年 12 月 12 日 (口頭発表、ポスター発表)

7. 発表者;柳井秀元

タイトル;自然免疫応答・炎症性疾患における HMGB1 の役割

学会名;第 35 回日本分子生物学会年会

場所;福岡県福岡市

月日;2012 年 12 月 13 日 (口頭発表、ポスター発表)

8. 発表者;植木紘史

タイトル;がん転移抑制における IRF5 転写因子の役割
学会名;「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム
場所;東京都
月日;2013 年 1 月 29 日-30 日

9. 発表者;松木康祐
タイトル;Cross-interference of RLR signaling against the TLR-mediated IL-12p40 gene induction
学会名;JSICR-MMCB 2013
場所;東京都
月日;2013 年 5 月 20 日-21 日

10. 発表者;三木祥治
タイトル;Essential contribution of IRF3 in microbiota-mediated Tslp and IL-33 gene inductions
学会名;第 78 回日本インターフェロン・サイトカイン学会総会
場所;東京都
月日;2013 年 5 月 20 日

11. 発表者;千葉志穂
タイトル;Exploration and characterization of cytoplasmic nucleic-acid-recognizing molecules involved in innate immune responses
学会名;第 13 回東京大学生命科学シンポジウム
場所;東京都
月日;2013 年 6 月 8 日

12. 発表者;千葉志穂
タイトル;がんの自然免疫監視機構における細胞間相互作用
学会名;2013 年度がん若手ワークショップ
場所;長野県
月日;2013 年 9 月 6 日

13. 発表者;千葉志穂
タイトル;抗腫瘍応答における IFN regulatory factor 5 (IRF5)の役割
学会名;第 36 回日本分子生物学会年会
場所;兵庫県
月日;2013 年 12 月 5 日

14. 発表者;松田淳志
タイトル;*In vivo* role of HMGB1 in innate immune responses and inflammation
学会名;第 36 回日本分子生物学会年会
場所;兵庫県
月日;2013 年 12 月 3 日

15. 発表者;西尾純子
タイトル;Impact of TCR repertoire on intestinal homeostasis
学会名;日本免疫学会
場所;千葉県
月日;2013 年 12 月 13 日

16. 発表者;根岸英雄

タイトル;Innate immune receptor-mediated beneficial cross-interference for anti-bacterial response

学会名;日本免疫学会

場所;千葉県

月日;2013 年 12 月 11 日

〈国際〉

1. 発表者;柳井秀元

タイトル;Deciphering the complexity of the cytosolic DNA-sensing machiner

学会名;Cold Spring Harbor Asia Conference, Frontiers of immunology in Health and Disease

場所;中国、蘇州

月日;2010 年 11 月 7-10 日

2. 発表者;松田淳志

タイトル;Identification and functional analysis of RNA binding motif protein 3 (RBM3) in innate immune responses

学会名;Cold Spring Harbor Asia Conference, Frontiers of immunology in Health and Disease

場所;中国、蘇州

月日;2010 年 11 月 7-10 日

3. 発表者;千葉志穂

タイトル;Suppression of immune responses by non-immunogenic oligonucleotides with high-affinity for HMGB proteins

学会名;Cold Spring Harbor Asia Conference, Frontiers of immunology in Health and Disease

場所;中国 蘇州

月日;2010 年 11 月 7-10 日

4. 発表者;更級葉菜

タイトル;Essential contribution of IRF3 in microbiota-contributed Tslp induction and protection against intestinal inflammation

学会名;第 15 回国際免疫学会議

場所;イタリア ミラノ

月日;2013 年 8 月 23 日

5. 発表者;西尾純子

タイトル;Imapact of TCR repertoire on Intestinal Homeostasis,

学会名;The Gut Microbiome:The Effetor/Regulatory Immune Network

場所;Taos, New Mexico, アメリカ合衆国

月日;2013 年 2 月 10-15 日

(4)知財出願

①国内出願 (2 件)

1. 出願番号: 特願 2012-534041

発明の名称:HMGB タンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑制剤及びスクリーニング方法

発明者：谷口維紹、柳井秀元
出願人：独立行政法人科学技術振興機構
出願日：2011 年 9 月 14 日

2. 出願番号：特願 2012-097620
発明の名称:Hmgb1 コンディショナルノックアウト非ヒト動物
発明者：谷口維紹、柳井秀元、吉田進昭
出願人：谷口維紹
出願日：2012 年 4 月 23 日

②海外出願（1 件）

1. 出願番号：米国出願番号 US2013183348-A1；中国出願番号 CN103096899-A；
カナダ出願番号 CA2811501-A1；ヨーロッパ出願番号 EP2617426-A1
発明の名称:Agent useful in composition for inhibiting high-mobility group box
protein-mediated immune response activation, comprises one or more compounds
chosen from phosphorothioate oligonucleotides
発明者：谷口維紹、柳井秀元
出願人：独立行政法人科学技術振興機構
出願日：2011 年 9 月 14 日

(5)受賞・報道等

①受賞

平成 22 年 内藤記念科学振興賞、谷口維紹
平成 25 年 第 8 回(2013 年)日本免疫学会研究奨励賞、柳井秀元、

②マスコミ(新聞・TV等)報道

平成 24 年 12 月 6 日 朝刊 6 面 化学工業日報 たん白質「IRF3」が遺伝子発現に関与
平成 24 年 12 月 6 日 朝刊 23 面 日刊工業新聞 大腸炎の抑制機構解明
平成 25 年 12 月 4 日 日経電子版 東大、細胞質内タンパク質 HMGB1が敗血症・感染症の抑制
に重要であることを発見

(6)成果展開事例

①社会還元的な展開活動

- ・ 本研究成果をインターネット
(URL; <http://www.iis.u-tokyo.ac.jp/~mol-immu/ja/top/member.html>)で公開し、一般に情報
提供している。

§ 5 研究期間中の活動

5. 1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2010.1.27	一般講演(公開)	東京大学	60 人	Yale University, Dr. Richard Flavel の招待講演
2010.2.3	一般講演(公開)	東京大学	60 人	New York University, Dr. Ivaylo I. Ivanov の招待講演
2010.2.5	一般講演(公開)	東京大学	60 人	九州大学, 中山敬一先生 の招待講演
2010.3.23	一般講演(公開)	東京大学	60 人	Osaka University, Dr. Katrin Breitbach の招待講演
2010.3.25	一般講演(公開)	東京大学	60 人	Harvard Medical School, Dr. Junko Nishio の招待講演
2010.6.3	一般講演(公開)	東京大学	60 人	京都大学 坂口志文先生 の招待講演
2010.7.23	一般講演(公開)	東京大学	60 人	大阪大学 熊ノ澤淳先生 の招待講演
2010.8.20	一般講演(公開)	東京大学	60 人	Institute for Systems Biology Seattle, Dr. Alan Aderem の招待講演
2010.9.3	一般講演(公開)	東京大学	60 人	NIH, Dr. Hidehiro Yamane の招待講演
2010.12.3	一般講演(公開)	東京大学	60 人	The Scripps Research Institute, Dr. Hugh Rosen の招待講演
2010.12.3	一般講演(公開)	東京大学	60 人	New York University, Dr. Jan T. Vilcek の招待講演
2011.2.9	一般講演(公開)	東京大学	60 人	The Rockefeller University, Dr. Jeffrey V. Ravetch の招待講演
2011.5.26	一般講演(公開)	東京大学	60 人	大阪大学 坂口志文先生 の招待講演
2011.6.2	一般講演(公開)	東京大学	60 人	The Rockefeller University, Dr. Jeffrey V. Ravetch の招待講演
2011.6.2	一般講演(公開)	東京大学	60 人	Seattle Biomedical Research Institute, Dr. Alan Aderem の招待講演
2011.6.2	一般講演(公開)	東京大学	60 人	Amgen Inc., Dr. Roger Perlmutter の招待講演
2011.9.12	一般講演(公開)	東京大学	60 人	California Institute of Technology, Dr. David Baltimore の招待講演
2011.11.2	一般講演(公開)	東京大学	60 人	Johns Hopkins University, Dr. Akira Sawa の招待講演
2011.11.22	一般講演(公開)	東京大学	60 人	Washington University in St.Louis, Dr. Takeshi Egawa の招待講演

2011.11.28	一般講演(公開)	東京大学	60 人	The University of Michigan, Dr. Gabriel Núñez の招待講演
2011.11.29	一般講演(公開)	東京大学	60 人	University of Pennsylvania, Dr. David Artis の招待講演
2011.11.30	一般講演(公開)	東京大学	60 人	Columbia University Medical Center, Dr. Ivaylo I.Ivanov の招待講演
2011.11.30	一般講演(公開)	東京大学	60 人	University of Michigan, Dr. Naohiro Inohara の招待講演
2012.1.13	一般講演(公開)	東京大学	60 人	Singapore Immunology Network, Dr. Florent Ginhoux の招待講演
2012.1.23	一般講演(公開)	東京大学	60 人	Singapore Immunology Network, Dr. Maria A. Curotto de Lafaille の招待講演
2012.2.15	一般講演(公開)	東京大学	60 人	The Rockefeller University, Dr. Jeffrey V. Ravetch の招待講演
2012.2.21	一般講演(公開)	東京大学	60 人	理化学研究所, 谷内一郎先生 の招待講演
2012.3.19	一般講演(公開)	東京大学	60 人	理化学研究所, 西川伸一先生 の招待講演
2012.5.24	一般講演(公開)	東京大学	60 人	Harvard Medical School, Dr.Diane J. Mathis, Emory University of Medicine, Dr. Max D. Cooper の招待講演
2012.8.24	一般講演(公開)	東京大学	30 人	eLife, Dr. Mark Patterson の招待講演
2012.9.14	一般講演(公開)	東京大学	30 人	東京大学医科学研究所、中江進先生の招待講演
2012.10.15	一般講演(公開)	東京大学	30 人	Cancer Research UK London Research Institute, Dr. Caetano Reis e Sousa の招待講演
2012.10.24	一般講演(公開)	東京大学	30 人	Nature Immunology, Dr. Zoltan Fehervari の招待講演
2012.12.5	一般講演(公開)	東京大学	60 人	The Scripps Research Institute, Dr. Hugh Rosen の招待講演
2013.1.8	一般講演(公開)	東京大学	60 人	The Rockefeller University, Dr. Jeffrey V. Ravetch の招待講演
2013.6.25	一般講演(公開)	東京大学	60 人	Max Planck, Dr. Rudolf Grosschedl の招待講演
2013.6.27	一般講演(公開)	東京大学	60 人	The Rockefeller University, Dr. Jeffrey V. Ravetch の招待講演
2013.9.12	一般講演(公開)	東京大学	30 人	Imperial College London, UK. Dr. Shuiping Jiang の招待講演
2013.12.2	一般講演(公開)	東京大学	30 人	The Wistar Institute Philadelphia, USA, Dr. Kazuko Nishikura の招待講演

2013.12.12	一般講演(公開)	東京大学	30 人	New York University Langone Medical Center, Dr. Dan Littman の招待講演
2014.1.16	一般講演(公開)	東京大学	50 人	生命誌研究館顧問、NPO AASJ 代表西川伸一 博士 の招待講演
2014.3.27	一般講演(公開)	東京大学	30 人	McGowan Institute for Regenerative Medicine, Dr. Michael T. Lotze の招待講演

§6 最後に

《研究の目標等から見た達成度、得られた成果の意義等の自己評価、今後の研究の展開、研究代表者としてのプロジェクト運営について(チーム全体の研究遂行、研究費の使い方等)、その他自由に記入してください。また、公開して良い研究室の雰囲気が伝わるようなメンバーの集合写真、実験室や作製した主な研究設備のスナップ写真等あれば添付してください。》

(研究成果の意義・自己評価について)

本研究課題において、核酸による免疫応答の制御と疾患との関わりについて、当初計画で予定していたコンディショナルノックアウトマウスの作製は全てが完了し、また、HMGB1 コンディショナルノックアウトマウスを用いた解析から、当初予想はしていなかったことではあるが、細胞質内 HMGB1 の炎症抑制に関与する新規機能が明らかとなった。さらに、細胞外の HMGB1 が炎症促進に機能することを、欠損マウスを用いて明らかにしつつある状況である。また、核酸認識に関わる新規分子を複数同定し、そのうちいくつかについては、遺伝子欠損マウス、細胞を用いた解析からも核酸認識応答に関与することを明らかにしている。さらに、核酸認識と炎症という観点から解析を進めた結果、RLR シグナルと TLR シグナルとの相互干渉機構という新知見を得、Nature Immunology に論文として報告するまでに至っている。これらの知見を基にして、今後更に、核酸認識受容体シグナルについて、新規知見を得て行くと同時に、それに基づく新しい概念の創出を行うことができると確信している。核酸認識受容体を介した免疫応答を抑制するような抑制剤についても、ISM ODN の作製を含め、その有用性について知見を得ており、JST を通じ、国際特許を申請している。この成果に基づいて世界屈指の製薬会社であるサノフィ株式会社と共同開発研究を進めることが出来ることになったことは、CREST の主旨に沿った成果と考えている。さらに低分子化合物による免疫系の制御法の開発について”は、スクリーニング系の構築、それを用いることにより炎症性サイトカインを誘導する IMF-001 の同定までを順調に行っており、実際に IMF-001 が自己免疫疾患や炎症病態を抑制することを、*in vivo*における検討において明らかにしている。今後、製薬企業との共同開発も視野に入れ、さらに改良・知見を積み重ねていくことで、より良いシーズ、実際の創薬へと繋がるものと期待している。本研究には複数の製薬企業が関心を示しながらも標的分子の同定が困難を極めていたことから共同研究にまで進めなかった。ようやく、CREST の追加支援をいただき、網羅的解析を遂行でき、標的分子同定への基盤データが得られたことで新しい展望が開けると考えている。また、壊死細胞による免疫系惹起のメカニズムについて、炎症病態を制御する新しい分子の同定も進めている。

このように、本研究課題における研究は当初計画に従って順調に推進され、論文発表を含め、病態治療に繋がる薬剤開発、応用についてもいくつかの成果が得られた。今後についても、現在の研究項目を柱とした研究を推進していくことで、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を明らかにし、A-STEP 制度の活用(既に申請中)などを視野に入れながら、これらの基礎的研究の知見を活用した自己免疫疾患・アレルギーの治療や臓器移植における免疫抑制に有効な化合物などの開発と実用化を目指し、社会に貢献していきたいと考えている。

研究室の風景写真

