

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390140

研究課題名 (和文) 病原体センサーTOLL 様受容体ファミリーの応答性調節機構の解明

研究課題名 (英文) Studying mechanisms controlling responsiveness of Toll-like Receptors

研究代表者

三宅健介 (Miyake Kensuke)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：60229812

研究成果の概要 (和文)：

病原体センサー、Toll 様受容体(Toll-like receptor, TLR)の活性制御機構の解析を進めた結果、TLR の活性は多くの分子により制御されている事が明らかとなった。PRAT4A は細胞表面 TLR の細胞表面への発現に重要であり、Unc93B1 は核酸認識 TLR の小胞体からエンドリソソームへの移送に必須であるとともに、RNA センサーTLR7 と DNA センサー TLR9 のバランスの制御にも関わっている事が明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：

In the present study, we analyzed mechanisms regulating responsiveness of the Toll family of receptors. A variety of molecules are required for regulating TLR function. PRAT4A, e.g., is required for trafficking of cell surface TLRs from the ER to the cell surface. Unc93B1 is required for the trafficking of nucleic acid-sensing TLRs from the ER to the endolysosomes. Unc93B1 also has a role in balancing RNA-sensing TLR7 and DNA-sensing TLR9.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2009 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：自然免疫

1. 研究開始当初の背景

病原体センサーToll-like receptor (TLR)は病原体に対してだけでなく、常在菌や内因性リガンドに対しても応答する。これら、異なるリガンドに対して応答が異なるのかどうか、明らかではない。免疫細胞や上皮細胞において TLR は、複数発現されており、リガンドである病原菌、常在菌、死細胞なども複数のリガンドを発現しているため、複数の TLR リガンドが複数の TLR を同時に刺激する。細胞は複数の TLR の応答性を制御すること

で、細胞の病原体に対する応答性を決めていることが予想されるが、その制御機構はわかっていない。

2. 研究の目的

細胞レベル、個体レベルにおいて、TLR ファミリーがいかに統御されているのかについて解析を進める。常在菌や内因性リガンドなどいわゆる弱いリガンドに対して、TLR は如何に応答しているのか、強いリガンドである病原菌に対する応答といかに異なっている

のか、これらを分子レベルで解明しなければ、個体レベルでの免疫応答の理解には至らないし、その破綻としての感染症、自己免疫疾患などの感染症関連疾患の病態理解も難しい。本研究においては、以下の4点を検討する。

- (1) 自己免疫疾患における TLR と内因性リガンドとの相互作用
- (2) 弱いリガンドに対する TLR 応答
- (3) 複数の TLR の応答性に影響する新規分子群
- (4) TLR 間の応答性のバランスを制御する分子機構

3. 研究の方法

- (1) 自己免疫疾患における TLR と内因性リガンドとの相互作用

TLR 関連分子 RP105/MD-1 の自己免疫疾患における役割を調べる。

(2) 弱いリガンドに対する TLR 応答、エンドトキシンセンサーである TLR4/MD-2 は、そのリガンドである Lipid A ばかりでなく、2つあるリン酸基のうち一つが欠けた MPL(Monophosphoryl Lipid A)にも応答する。MPLはその活性が Lipid A に比べてサイトカイン誘導能が弱いことが知られているが、獲得免疫を活性化するアジュバント活性においては、Lipid A と変わらないことが報告されている。しかしながら、メカニズムについては明らかではない。MPL 刺激に対する応答を解析し、強いリガンドである lipid A と比較する。

(3) 複数の TLR の応答性に影響する新規分子群、
複数の TLR の応答性に影響する分子 PRAT4A の解析を進める。

(4) TLR 間の応答性のバランスを制御する分子機構、
TLR7 と TLR9 のバランス制御に関わる分子 Unc93b1 の機能解析を進める。

4. 研究成果

- (1) 自己免疫疾患における TLR と内因性リガンドとの相互作用

RP105 のノックアウトマウスを自己免疫疾患モデルマウスである MRL/lpr にかき合わせて、病態における RP105 の役割を調べたところ、病態が軽くなることが明らかとなった(文献 5)。腎臓においては、糸球体腎炎の状態は変わらなかったが、血管炎の頻度に差

があった。自己抗体産生を調べたところ、抗核抗体やリウマチ因子の産生については、RP105 が欠損しても特に影響はなかった。これらの結果から、B 細胞の抗原提示において、RP105/MD-1 が関与している可能性が示唆された。

- (2) 弱いリガンドに対する TLR 応答

Lipid A 刺激と MPL 刺激の違いを明らかにするために、TLR4/MD-2 の下流で機能するシグナル伝達分子 TRAM に会合し、Lipid A 刺激の時に比べて、会合が異なる分子を検索した。具体的には、Lipid A や MPL 刺激後に TRAM を免疫沈降し、質量分析を行った。その結果、Lipid A 刺激の時に強く会合する分子と、MPL 刺激の時に強く会合する分子をそれぞれ一つ筒同定することに成功した。

- (3) 複数の TLR の応答性に影響する新規分子群

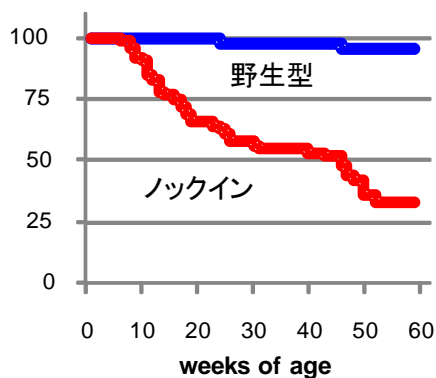
複数の TLR 応答に関わる分子として、同定した PRAT4A の解析を続けた。PRAT4A 遺伝子において、ヒトでは 145 番目のメチオニンをリジンに置換する 1 塩基変異が報告されている。この変異においては、TLR4、TLR9 の応答が低下するが、TLR2 の応答が比較的保たれることが分かった。この結果から、PRAT4A と TLR との相互作用は、個々の TLR で異なることが明らかとなった(文献 4)。

さらに我々は、PRAT4A のノックアウトマウスにおいて、細胞表面上の TLR4/MD-2 の発現は検出できなくなるが、それでも Lipid A に対する応答が残っている事に注目した。このような PRAT4A 非依存性の応答は骨髄由来マクロファージには認められるが、腹腔由来マクロファージには認められないことが分かった(文献 1)。我々は、この応答が、細胞内の TLR4/MD-2 による LPS 応答であると考えており、その可能性を現在追求している。

- (4) TLR 間の応答性のバランスを制御する分子機構。

TLR7、TLR9 の応答に必要な分子として、Unc93B1 を同定した。この分子は TLR7、TLR9 と小胞体で会合し、TLR7、TLR9 を小胞体から核酸認識の場であるエンドリソソームまで輸送する分子であることが報告された。我々は、さらに Unc93B1 が TLR7 に比べて TLR9 を優先的に移送していることを示した(文献 3)。この結果は、核酸に対する TLR 応答が、TLR9 優位に制御されている事を示す。興味深いことに、Unc93B1 の 34 番目のアスパラギン酸

(D34)に変異を入れると Unc93B1 は逆に TLR7 を優先的に移送するようになる。つまり TLR7 と TLR9 の間に相反的制御があることが明らかとなった。なぜ、そのような制御が必要なのか、明らかにするために、我々は D34A 変異を Unc93B1 に導入したノックインマウスを作成したところ、ノックインマウスはその 3 分の 2 が 1 年で死んでしまうことが明らかとなった(下図)。



その原因として、肝臓に炎症細胞が浸潤し、肝細胞死が認められ、肝不全になったことが推測された。さらに脾臓も腫大し、赤芽球と骨髄球が増加していた。ガンマインターフェロンなどの T 細胞由来サイトカインの産生が増大しており、サイトカインストームが脾臓や肝臓での病変の原因と考えられた(文献 2)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Shibata T, Motoi Y, Tanimura N, Yamakawa N, Akashi-Takamura S, and Miyake K Intracellular TLR4/MD-2 in macrophages senses Gram-negative bacteria and induces a unique set of LPS-dependent genes. *Int. Immunol.*, 査読有 2011, in press.
2. Fukui R, Saitoh S-I, Kanno A, Onji M, Shibata T, Ito A, Onji M, Matsumoto M, Akira S, Yoshida N, and Miyake K. Unc93B1 restricts systemic lethal inflammation by orchestrating TLR7- and TLR9-trafficking. *Immunity*, 査読有 2011, in press
3. Fukui R, Saitoh S-I, Matsumoto F, Kozuka-Hara H, Oyama M, Tabeta K, Beutler B, and Miyake K. Unc93B1 biases Toll-like receptor responses to nucleic acid in dendritic cells towards

DNA- but against RNA-sensing. *J. Exp. Med.*, 査読有 2009, in press.

4. Kiyokawa T, Akashi-Takamura S, Shibata T, Matsumoto F, Nishitani C, Kuroki Y, Seto Y and Miyake K. A single base mutation in the PRAT4A gene reveals differential interaction of PRAT4A with Toll-like receptors. *Int. Immunol.* 査読有 2008, 20:1407-1415.
5. Kobayashi, T., K. Takahashi, Y. Nagai, T. Shibata, M. Otani, S. Izui, S. Akira, Y. Gotoh, H. Kiyono, and Miyake K 2008. Tonic B cell activation by Radioprotective 105/MD-1 promotes disease progression in MRL/lpr mice. *Int. Immunol.* 査読有 20:881-891.
6. Tanimura N, Saitoh S, Matsumoto F, Akashi-Takamura S, Miyake K. Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有 2008, 368:94-99.
7. Matsumoto F, Saitoh S, Fukui R, Kobayashi T, Tanimura N, Konno K, Kusumoto Y, Akashi-Takamura S, Miyake K. Cathepsins are required for Toll-like receptor 9 responses. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有 2008, 11. 367:693-699

[学会発表] (計 5 件)

1. Ryutaro Fukui, Roles for Unc93 homolog B1-dependent TLR7/9 balance in vivo, 第 14 回国際免疫学会, 2010 年 8 月 23 日、神戸ポートピアホテル
2. Ryutaro Fukui, Unc93 homolog B1 regulates the balance of toll-like receptor 7 and toll-like receptor 9 responses reciprocally in dendritic cells, Tri-Society Annual Conference, 2009 年 10 月 20 日, Lisbon congress center, (リスボン、ポルトガル)
3. 福井竜太郎、Unc93 homolog B1 は TLR7 と TLR9 の応答バランスを相反的に制御する、第 39 回日本免疫学会学術集会、2009 年 12 月 4 日、大阪国際会議場
4. 福井竜太郎、Unc93B1 は TLR7 と TLR9 の応答性を制御する、第 38 回日本免疫学会学術集会、2008 年 12 月 2 日、国立京都国際会館
5. 柴田 琢磨、Detection of soluble PRAT4A (Protein Associated with Toll-like

Receptor4) by novel anti-PRAT4A
monoclonal antibody」第38回日本免疫学
会総会・学術集会』、2008年12月、国立京
都国際会館

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：Unc93B1 遺伝子改変マウスの確立とそ
の応用

発明者：三宅健介、斎藤伸一郎、福井竜太郎

権利者：東京大学

種類：

番号：**61/372191**

出願年月日：2010 年 8 月 10 日

国内外の別：米国

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅健介 (MIYAKE KENSUKE)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：60229812

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし