

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 8日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790454

研究課題名（和文） 自然免疫系における相反的な核酸応答制御機構の研究

研究課題名（英文） Analysis of the mechanism for controlling reciprocal balance in nucleic acid sensing-innate immune system

研究代表者 福井 竜太郎 (FUKUI RYUTARO)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：60554508

研究成果の概要（和文）：自然免疫系の核酸認識受容体である Toll-like receptor 7 (TLR7)と TLR9 は、Unc93 homolog B1 (Unc93B1)と呼ばれる分子によって相反的な応答バランスを保っている。本研究では Unc93B1 の変異マウスを作製し、TLR7 と TLR9 の応答バランスが破綻した状態が生体に与える影響について検討した。その結果、このマウスは TLR7 の応答性が亢進することで肝炎、脾腫、血小板減少、糸球体腎炎などの様々な表現型を呈し、死に至ることが示された。したがって、相反的な TLR7/TLR9 バランスの維持は生体の恒常性を保つ上で必須の機能であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）： We generated *Unc93b1*^{D34A/D34A} mutant mouse to analyze the significance of reciprocal TLR7/TLR9 balance in vivo. As results, various phenotypes were developed in these mice spontaneously and over half of mice died within 1 year because of TLR7 hyper-response. For example, hepatitis, splenomegaly, thrombocytopenia, and glomerulonephritis were observed. From these results, it is confirmed that reciprocal TLR7/TLR9 balance is an essential mechanism for avoiding lethal homeostatic inflammation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	2,000,000	600,000	2,600,000
平成23年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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、Toll-like receptor、Unc93 homolog B1、自然炎症、サイトカイン、内因性リガンド、新規分子探索、肝炎

1. 研究開始当初の背景

(1) TLR は病原体に共通する構造を認識し、免疫応答を惹起する自然免疫系担当分子である。TLR は病原体のみならず、宿主由来の

物質をも内因性のリガンドとして認識することが知られている。なかでも核酸は宿主と病原体との間で高度に保存されていることから、宿主由来の核酸は TLR によって認識されやすく、自己免疫疾患などを引き起こす

ことが知られている。したがって、核酸認識系 TLR の応答性は適切に制御されなくてはならない。

(2)核酸認識系 TLR のうち、TLR7は RNA を、TLR9 は DNA を認識する。我々は TLR7 と TLR9 の応答性が Unc93B1 によって相反的に保たれていることを発見した (Fukui et al., *J. Exp. Med.* 2009)。Unc93B1 は N 末端側から 34 番目のアスパラギン酸を中心とした部位によって TLR7/TLR9 バランスを制御しているため、このアスパラギン酸をアラニンに置換した変異体 (D34A 変異体) は TLR7 の応答性を亢進させ、TLR9 の応答性を減弱させる。当時すでに TLR7 の過剰応答マウスが自己免疫疾患を自然発症するとの報告がなされていたものの、それらは TLR7 の発現量が増加したマウスモデルであり、核酸認識系 TLR の応答制御が破綻した際に生体が受ける影響については未知であった。

2. 研究の目的

本研究においては相反的な TLR7/TLR9 バランスについて、生体内における役割の解明を目標として設定した。また、TLR7/TLR9 バランスの制御機構について検討を行い、詳細な分子メカニズムに迫ることを目指した。これらの解析を通して核酸認識系 TLR の応答制御機構を明らかにすることで、核酸認識系 TLR が関わる各種疾患の制御を目指すことが最終目標として設定された。

3. 研究の方法

(1) Unc93B1 の遺伝子領域に D34A 変異を持つマウス (D34A マウス) を作製するにあたって、図 1 に示したような方法で変異ベクターを作製した。このベクターを ES 細胞に導入し、遺伝子組み換えが起こった細胞を選択した。選択された組み換え ES 細胞を C57BL/6 の胚に導入し、D34A マウスを樹立した。

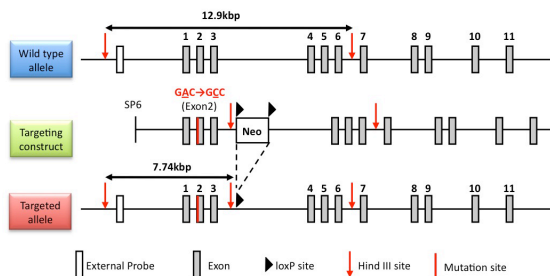


図 1 D34A 変異ベクターの設計図

(2) D34A マウスについては各種臓器の病理学的解析や血清学的解析などを行い、表現型を解析した。また、脾臓やリンパ節などから細胞を採取し、フローサイトメトリーによって細胞の活性化状態や各種細胞群の割合などを検討した。

(3) D34A マウスから樹状細胞やマクロファージなどを誘導し、各種 TLR リガンドで刺激して応答性を確認した。指標として、サイトカイン産生や刺激に伴う細胞増殖などを測定した。

(4) TLR7 欠損マウスや成熟 B 細胞への分化が行われないマウスと D34A マウスを交配させ、各種遺伝子が欠損した D34A マウスを作製した。このマウスを解析することにより、欠損させた各種因子が D34A マウスの表現型に与える影響を検討した。

(5) BALB/c や C57BL/6 など各種遺伝子背景を持つ D34A マウスを作製し、その表現型などを検討した。

4. 研究成果

(1) D34A マウスはメンデルの法則通りに誕生したので、骨髄から樹状細胞やマクロファージを誘導し、刺激を行った。その結果、各種細胞において in vitro での結果と同様に TLR7 の応答性が亢進し、TLR9 の応答性が減弱していた。

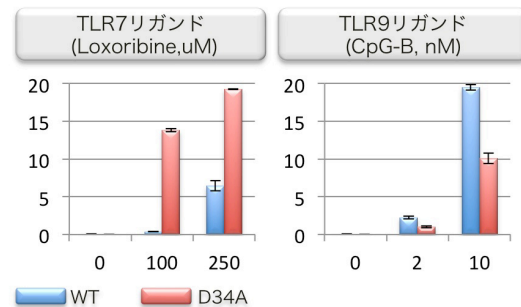


図 2 樹状細胞刺激時の IL12p40 産生

(2) D34A マウスは生後 2 ヶ月齢程度から死亡する個体が現れ、一年以内に半数以上が死亡する (図 3)。また、血小板減少、肝炎、脾腫などが観察される (図 4)。これらの表現型は D34A マウスの TLR7 を欠損させると見られなくなることから、TLR7 の過剰な応答が致死的な炎症を誘導していると考えられた。その中でも主な死因として考えられたのは肝炎であり、他の TLR7 過剰応答マウスでは糸球体腎炎が主な死因とされる点とは異なっていた。D34A マウスにおいても糸球体腎炎は認められるが、致命的ではなかった。

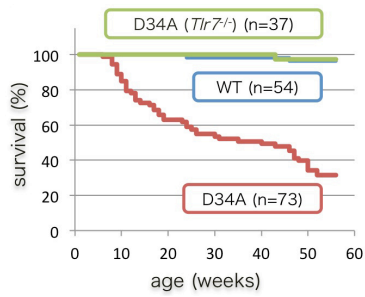


図3 D34A マウスの生存曲線

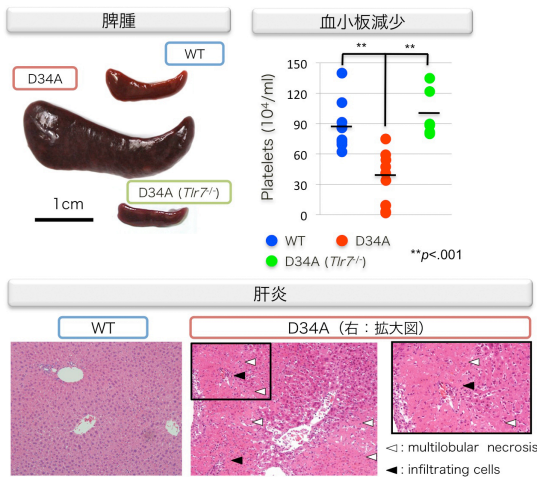


図4 D34A マウスの各種表現型

(3) D34A マウスは自然免疫系のみならず、獲得免疫系の活性化も見られる。T 細胞については大部分がメモリー細胞へと分化しており、活性化されていることを伺わせた (図5)。また、活性化の指標である ICOS の発現上昇が見られた他、Th1 や Th17 への分化・増殖が亢進していた。Th17 の分化は他の TLR7 過剰応答マウスでは報告がなく、D34A マウス特異的な表現型である。

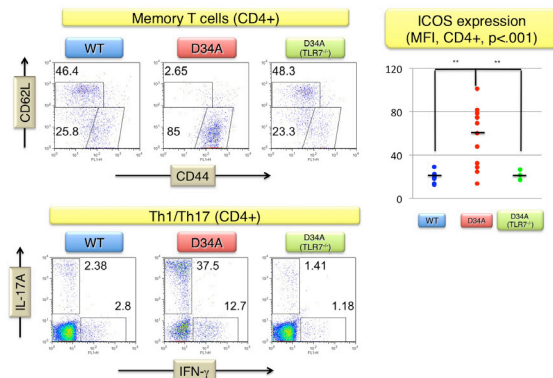


図5 T 細胞の活性化

(4) D34A マウスにおける T 細胞の活性化は TLR7 依存的であったが、T 細胞には TLR7 の発現がほとんど見られない。そこで我々は

TLR7 を発現している B 細胞について検討を行った。リンパ節における T 細胞と B 細胞の比をフローサイトメトリーによって調べたところ、D34A マウスでは TLR7 依存的に B 細胞の割合が T 細胞よりも多くなっていた (図6)。また、脾臓においては B 細胞受容体に強い刺激が加えられた結果として、marginal zone B 細胞の現象が見られた。さらに血清抗体価も D34A マウスでは増加していたことから、D34A マウスの獲得免疫系においては B 細胞も活性化されていると考えられた。

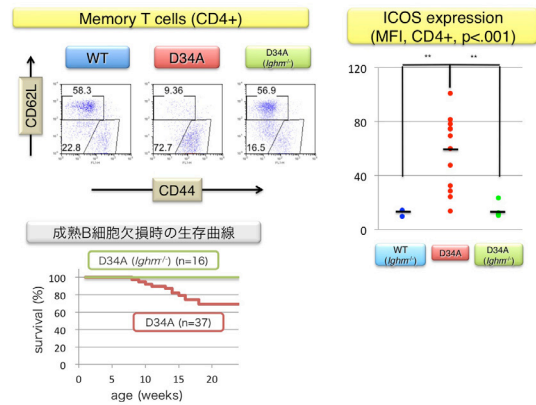


図6 B 細胞の活性化

(5) これらリンパ球系細胞のうち先行して活性化されている細胞を特定するため、D34A マウスの Ighm を欠損させ成熟 B 細胞が存在しない D34A マウスを作製した。このマウスでは T 細胞の活性化が見られず、また生存曲線も保たれていた (図7)。

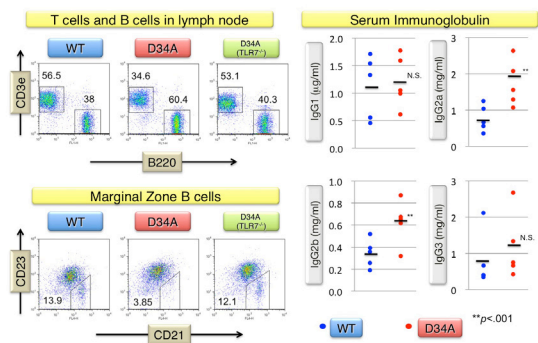


図7 成熟 B 細胞の欠損が D34A マウスの表現型に与える影響

(6) 以上のことから、D34A マウスでは B 細胞やミエロイド系細胞が TLR7 依存的に活性化され、その結果として T 細胞が活性化を受けることが明らかとなった。このようにして炎症の悪循環 (vicious circle) が形成され、致死的な自然炎症を引き起こしている可能性が示唆された (図8)。したがって、Unc93B1 による TLR7/TLR9 バランスの応答制御は生体

の恒常性維持に必須の機能であると考えられた。

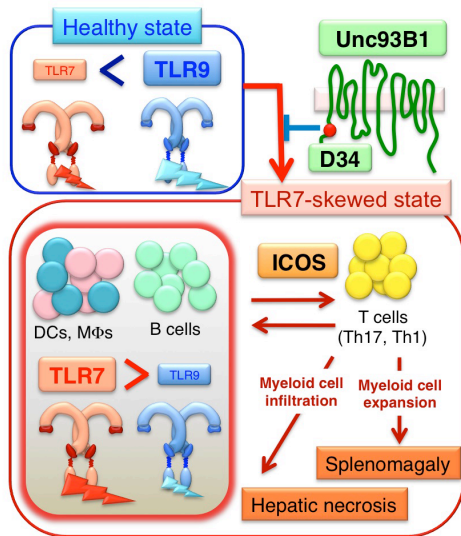


図8 TLR7/TLR9 バランスの概要

(7) 当初作製した D34A マウスは 129 系統の ES 細胞を使用したため、遺伝子背景が 129 系統である。自己免疫疾患モデルマウスなどには遺伝子背景によって表現型の異なるものが知られていることから、D34A マウスを C57BL/6 系統 (B6) や BALB/c 系統 (BALB) などに戻し交配し、各種遺伝子背景の D34A マウスを得た。これらについて表現型を調べたところ、B6 系統では 4 ヶ月齢で血小板減少が見られるのに対し、BALB 系統では見られなかった。また、生存曲線にも差が見られた (図 9)。

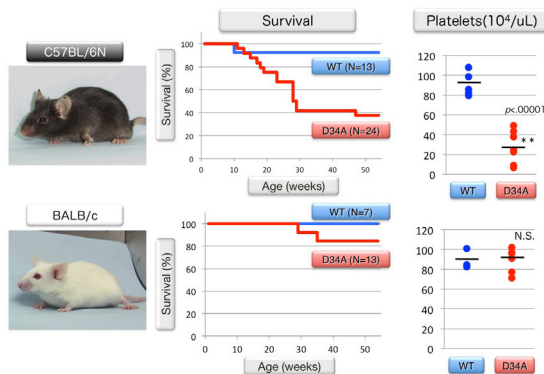


図9 B6 と BALB の表現型

(8) B6 および BALB 系統の骨髄から誘導した樹上細胞を各種 TLR リガンドで刺激し、産生された IL-12p40 を ELISA によって検出した。両系統の D34A マウスにおいて TLR7 の応答性が亢進し、TLR9 の応答性が減弱していたことから、Unc93B1 の D34A 変異による TLR7/TLR9

バランスの破綻は遺伝子背景非依存的であることが示された (図 10)。これらの結果から、TLR7/TLR9 バランスの破綻と表現型との間には遺伝子背景依存的な調節因子の存在する可能性が示唆された。この知見は今後の研究を進めるにあたって非常に重要であり、連鎖解析などによって調節因子を同定することが望まれる。

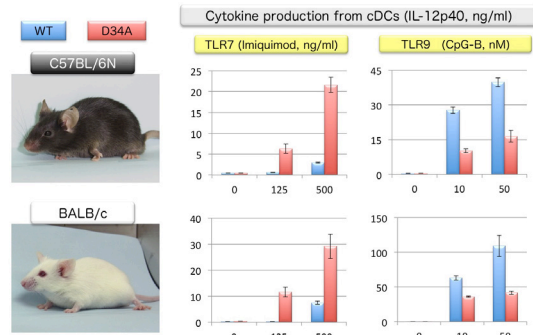


図10 各系統の D34A マウスにおける TLR の応答性

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 1 件)

1. Ryutaro Fukui, Shin-Ichiroh Saitoh, Atsuo Kanno, Masahiro Onji, Takuma Shibata, Akihiko Ito, Morikazu Onji, Mitsuru Matsumoto, Shizuo Akira, Nobuaki Yoshida, and Kensuke Miyake. Unc93B1 Restricts Systemic Lethal Inflammation by Orchestrating Toll-like Receptor 7 and 9 Trafficking. *Immunity* 35, 1-13 (2011) : 査読あり

DOI: 10.1016/j.immuni.2011.05.010

[学会発表] (計 4 件)

1. Ryutaro Fukui, Shin-Ichiroh Saitoh, Atsuo Kanno, Masahiro Onji, Takuma Shibata, Akihiko Ito, Morikazu Onji, Mitsuru Matsumoto, Shizuo Akira, Nobuaki Yoshida, and Kensuke Miyake. Unc93 homolog B1 restricts lethal homeostatic inflammation by regulating TLR7 and TLR9 reciprocally. 第 40 回日本免疫学会学術集会ワークショップ. 幕張メッセ, 千葉県 (2011 年 11 月 28 日)

2. Ryutaro Fukui, Unc93 homolog B1 restricts systemic lethal inflammation by orchestrating TLR7 and TLR9 response. Bio-Rheumatology International Congress (BRIC) Tokyo, The 8th GARN Meeting. ヒルトン東京ベイホテル, 千葉県 (2011年11月14日)
3. Ryutaro Fukui, Shin-Ichiroh Saitoh, Atuso Kanno, Masahiro Onji, Takuma Shibata, Akihiko Ito, Shizuo Akira, Nobuaki Yoshida, and Kensuke Miyake. Unc93 homolog B1 restricts systemic lethal inflammation by orchestrating TLR7 and TLR9 response. TOLL2011. Riva del Garda, Italy (2011年5月4日-7日)
4. Ryutaro Fukui, Shin-ichiroh Saitoh, Masahiro Onji, Takuma Shibata, Akihiko Ito, Keiko B. Kimura, Nobuaki Yoshida, Kensuke Miyake. Roles for Unc93 homolog B1-dependent TLR7/TLR9 balance in vivo. 14th International Congress of Immunology. Kobe, Japan (2010年8月23日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福井 竜太郎 (FUKUI RYUTARO)
東京大学・医科学研究所・特任助教
研究者番号：60554508

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：