

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460585

研究課題名(和文)新規分子の探索を中心とした核酸認識系TLR応答制御機構の解明

研究課題名(英文)Search for new molecules controlling the response of nucleic acid-sensing TLRs

研究代表者

福井 竜太郎 (FUKUI, Ryutaro)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：60554508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Toll-like receptor 7 (TLR7)を中心とした核酸認識系TLRの応答制御機構を解明するために、ファンクショナルクローニングを行ってTLR7の応答を制御する分子の探索を行った。また、TLR7の応答が亢進して自己免疫疾患を発症するマウス(Unc93 homolog B1のD34A変異マウス。以下D34Aマウス)において、その表現型に關与する分子を探索した。

その結果、後者のアプローチから、I型インターフェロン受容体のシグナルがD34Aマウスの発症に關わることを明らかにした。また、I型インターフェロンが特定の細胞におけるTLR7発現の維持に關わることを示した。

研究成果の概要(英文)：We tried functional cloning to find new molecules controlling the response of nucleic acid-sensing Toll-like receptors (TLRs), like TLR7. As the other way, we analyzed the phenotype of Unc93 homolog B1 (Unc93B1) D34A mutant mice, which suffer from systemic inflammation caused by TLR7 hyperactivation

As results, we found that the phenotype of D34A mice was attenuated by lacking type I interferon receptor (IFNAR1). Type I IFN signaling maintained the expression of TLR7 in B cells, and the number of TLR7-expressing conventional dendritic cells, respectively.

研究分野：免疫学

キーワード：自然免疫 自己免疫疾患 Toll-like receptor 核酸認識 I型インターフェロン Unc93 homolog B1
新規分子探索

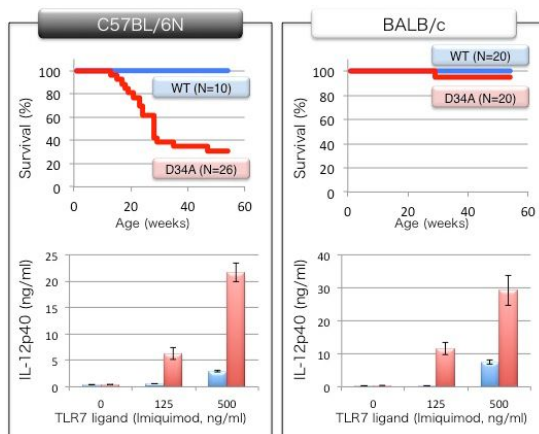
1. 研究開始当初の背景

(1) 自然免疫系の受容体は、病原体に共通する構造を認識して免疫応答を惹起する、生体防御の最前線を担う分子である。その一方、自己(宿主)に由来する分子をも内因性リガンドとして認識し、非感染性の慢性炎症である「自然炎症」を誘導することが知られている。特に、核酸は病原体と宿主との間で高度に保存された構造を持つことから、核酸を認識する自然免疫系受容体の応答性は厳密に制御されなくてはならない。

(2) 核酸認識系受容体の一つである Toll-like receptor 7 (TLR7)の過剰な応答は、全身性エリテマトーデスや乾癬などの因子として考えられていた。また、我々は TLR7 の応答制御に Unc93 homolog B1 (Unc93B1) が必要であり、Unc93B1 に D34A 変異を加えると応答制御機構が破綻して TLR7 の応答性が亢進することを見出していた。Unc93B1 に D34A 変異を持つマウスは (Unc93b1^{D34A/D34A}、以下 D34A マウス) TLR7 の応答性が亢進する結果として全身性の自己免疫疾患を自然発症する。

(3) D34A マウスは系統によって表現型が異なる。すなわち、C57BL/6 バックグラウンドでは血小板減少や脾腫などの表現型が見られるのに対して、BALB/c バックグラウンドではこれらの表現型が弱い(下図)。しかしながら、TLR7 の応答亢進については両方の系統で認められたため、D34A マウスで見られるような表現型の誘導には、TLR7 の過剰な応答に加え、遺伝子背景依存的な調節因子の存在が予測された。

また、D34A マウスの細胞は活性化され、様々なサイトカインやインターフェロンが誘導されていることから、これらサイトカインの表現型に対する関与が考えられた。



2. 研究の目的

D34A マウスの表現型は脾腫、肝炎、血小板減少症、自己抗体の産生など多岐に及ぶ。しかたがって、TLR7 の応答制御は生体の恒常性維持に必須であると考えられるが、応答

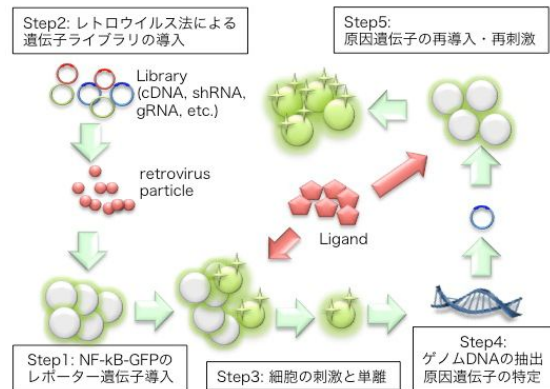
制御機構には未知の部分が多く残されている。

また、TLR7 の応答制御破綻による炎症と、表現型とを結びつける因子も多様に存在することがうかがえる。そこで本研究では、TLR7 の応答制御機構を解明するべく、新規関連分子の探索と解析を目的とした。

3. 研究の方法

(1) Unc93B1 の N 末端側は可塑性に富む天然変性領域であると推測されることから、様々な分子との相互作用を持つ可能性がある。Unc93B1 の D34A 変異体は「機能欠損型」であるとするならば、野生型の Unc93B1 は特定の分子と結合し、TLR7 の応答性を抑制しているとの仮説を立てた。したがって、この分子を欠損させることができれば、TLR7 の応答は亢進すると予測された。

この仮説に基づき、shRNA ライブラリとレポーターアッセイを組み合わせたファンクショナルスクリーニングを行った(下図)。この系では、特定の分子に対する shRNA によって TLR7 の応答性を抑制する分子がノックダウンされると仮定している。また、研究期間の終盤には、sgRNA ライブラリ(遺伝子ノックアウト型)に切り替えて探索を継続した。



(2) C57BL/6 (B6)および BALB/c (BALB) 背景を持つ D34A マウスを交配させ、F1 マウスを得た。さらに、この F1 マウスを B6 および BALB 系統の D34A マウスへ戻し交配して N2 マウスを得た。この N2 マウスについて表現型を観察し、連鎖解析を行った。

(3) 各種サイトカイン・インターフェロンのノックアウトマウスと D34A マウスを交配させ、それぞれの遺伝子を欠損した D34A マウスを作成した。また、主に T 細胞や B 細胞を欠損する D34A マウスを作成して、これらの表現型を観察した。

4. 研究成果

(1) shRNA ライブラリを用いたファンクショナルスクリーニングにより、ノックダウンすることで TLR7 の応答性を亢進させる分子が複数得られた。しかし、これらは全てオフ

ターゲット効果によるものであったことから、shRNA ライブラリによるスクリーニングは断念した。

しかし、TLR7 の応答性が亢進した細胞を得られたことから、shRNA のオフターゲット効果を除けば、ファンクショナルクロニングによる探索系は問題なく機能していると考えられた。そこで、shRNA よりも特異性が高いとされる sgRNA ライブラリに切り替えて、検討を進めた。現時点では予備実験の段階だが、TLR7 の応答に必要な分子を探索したところ、一連の既知分子が同定された。したがって、sgRNA ライブラリを用いたファンクショナルクロニングを行えば、TLR7 の応答性を抑制する分子が同定できるものと期待している。本研究は、こうした技術的な基盤を築く上で有用であったと考えられる。

(2) B6 系統と BALB 系統の D34A マウスを用いて連鎖解析を行ったところ、B6 の N2 マウスでは表現系と有意に関連する染色体領域は得られなかった。この点については、調節因子の浸透率の低さが考えられる。

また、BALB の N2 マウスでは表現型を抑制する領域が見出されたものの、該当する領域が幅広く、遺伝子の同定には至らなかった。

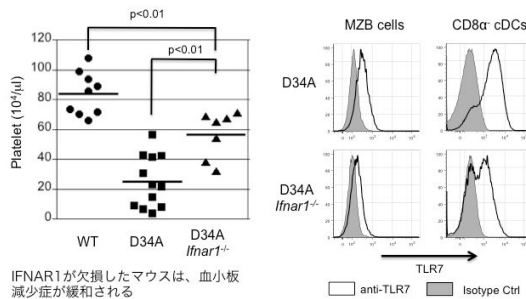
そこで、D34A マウスの系統を変更するべく、他の系統の表現型を検討した。その結果、C3H/HeN (C3H) 系統の D34A マウスは、BALB 系統よりも表現型が弱いことを見出した。このことから、C3H 系統と B6 系統を使用した連鎖解析により、より明確な結果が得られることが示唆された。

(3) D34A マウスでは Th1 や Th17 の顕著な増殖が見られたため、*Ifng* および *Il17a* 遺伝子をノックアウトして表現型を観察したが、これらのサイトカインを欠損させても特に表現型は影響を受けなかった。また、T 細胞を欠損させた場合も、B 細胞を欠損させた場合と比較して表現型の緩和が弱かった。なお、B 細胞を欠損させると T 細胞の活性化が見られなくなるが、ミエロイド系細胞の増殖は影響を受けなかった。

これらの結果から、D34A マウスの表現型は B 細胞とミエロイド系細胞の活性化を発端とするのではないかと考えた。これまでに、ミエロイド系細胞などから産生される I 型インターフェロンにより B 細胞の TLR7 発現が維持・増強されるという報告がなされていたため、D34A マウスにおいても I 型インターフェロン受容体 (IFNAR1) を欠損させ、その表現型を観察した。

その結果、脾腫や肝炎、血小板減少症などの表現型が緩和された (下図)。IFNAR1 欠損 D34A マウスの B 細胞は TLR7 の発現が減弱し、TLR7 の過剰応答が見られなくなっていた。また、B 細胞のみならず、cDC においても TLR7 の発現が減弱していた。ただし

cDC の場合は、IFNAR1 が欠損すると TLR7 陽性のサブセットが減少していたことから、I 型 IFN シグナルは B 細胞とは異なる方法で cDC における TLR7 応答の制御をしていることが示された。



IFNAR1 が欠損したマウスは、血小板減少症が緩和される

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 10 件)

1. Ryutaro Fukui, Atsuo Kanno, and Kensuke Miyake. Type I IFN contributes to the phenotype of *Unc93b1*^{D34A/D34A} mice by regulating TLR7 expression in B cells and dendritic cells. *J. Immunol.* **196**, 416-427 (2016) doi:10.4049/jimmunol.1500071 (査読有り)
2. Atsuo Kanno, Natsuko Tanimura, Masayuki Ishizaki, Kentaro Ohko, Yuji Motoi, Masahiro Onji, Ryutaro Fukui, Takaichi Shimozato, Kazuhide Yamamoto, Takuma Shibata, Shigetoshi Sano, Akiko Sugahara-Tobinai, Toshiyuki Takai, Umeharu Ohto, Toshiyuki Shimizu, Shin-ichiroh Saitoh, and Kensuke Miyake. Targeting cell surface TLR7 for therapeutic intervention in autoimmune diseases. *Nat. Commun.* **6**, Article number: 6119 (2015) doi: 10.1038/ncomms7119. (査読有り)
3. Mei Po Chan, Masahiro Onji, Ryutaro Fukui, Kohki Kawane, Takuma Shibata, Shin-ichiroh Saitoh, Umeharu Ohto, Toshiyuki Shimizu, Glen N. Barber, and Kensuke Miyake. DNase II-dependent DNA digestion is required for DNA sensing by TLR9. *Nat. Commun.* **6**, Article number: 5853 (2015) doi: 10.1038/ncomms6853 (査読有り)
4. Yusuke Murakami, Ryutaro Fukui, Yuji Motoi, Takuma Shibata, Natsuko Tanimura, Kensuke Miyake. Roles of

the cleaved N-terminal TLR3 fragment and cell surface TLR3 in double-stranded RNA. *J. Immunol.* **193**, 5208-17(2014)doi:10.4049/jimmunol.1400386 (査読有り)

5. Masahiro Onji, Atsuo Kanno, Shin-ichiroh Saitoh, **Ryutaro Fukui**, Yuji Motoi, Takuma Shibata, Fumi Matsumoto, Aayam Lamichhane, Shintaro Sato, Hiroshi Kiyono, Kazuhide Yamamoto, and Kensuke Miyake. An essential role for the N-terminal fragment of Toll-like receptor 9 in DNA sensing. *Nat. Commun.* **4**, Article number:1949(2013)doi:10.1038/ncomms2949 (査読有り)

〔学会発表〕(計 5件)

1. **福井竜太郎**, 菅野敦夫, 三宅健介. I型インターフェロンはB細胞と樹状細胞のTLR7発現を維持し、TLR7の過剰応答による致死的な炎症に関与する. 第80回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会. 東京工業大学蔵前会館, 東京都 (2015年7月17日)
2. **Ryutaro Fukui**, Atsuo Kanno and Kensuke Miyake. Expression patterns of TLR7 in DCs and B cells are controlled by Type-I IFN and influence TLR7 dependent inflammation. 第43回日本免疫学会学術集会. 国立京都国際会館, 京都府 (2014年12月10日)
3. 高橋紀子, **福井竜太郎**, 三宅健介. shRNAライブラリーを用いたファンクショナルスクリーニングによるTLR7応答の制御因子の探索. 第37回日本分子生物学会年会. パシフィコ横浜, 神奈川県 (2014年11月25日)
4. **Ryutaro Fukui** and Kensuke Miyake. Collapse of TLR7/TLR9 balance leads genetical background dependent phenotypes. **15th International congress of immunology**. Milan, Italy (2013年8月23日)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 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

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・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：