

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2013

課題番号：21117002

研究課題名(和文) Toll様受容体の内因性リガンドの検索およびその活性制御機構の解明

研究課題名(英文) Toll like receptors; their endogenous ligands and mechanism regulating their activities

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 196,200,000円、(間接経費) 58,860,000円

研究成果の概要(和文)：病原体センサーToll様受容体(TLR)は、病原体成分ばかりでなく、自己由来内因性リガンドにも応答する。TLRに作用する脂質や核酸などの内因性リガンドの検索を進めた。TLR8の構造決定に成功し、構造から予測される内因性リガンドを検討した。また、内因性リガンドに対して、TLRがどのように活性を制御しているのか、検討した。活性制御機構として、TLRの局在を制御する分子Unc93B1が、TLR7の活性を制御している事を見いだした。これらの結果から、TLRは定常状態でも内因性リガンドと相互作用があり、その活性が厳密に制御されている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Toll-like receptors (TLR) sense not only microbial products, but also self-derived endogenous products. We here searched endogenous ligands such as lipids and nucleic acids. We succeeded in solving the structure of TLR8. The structure predicts endogenous ligands to TLR8. Those ligands were studied by in vitro functional analyses. We also studied mechanisms regulating TLRs in the steady state. Unc93B1 controls TLR trafficking. We have found that Unc93B1 also has a role in regulating TLR7 responses in the steady state. These results suggest that TLRs steadily respond to endogenous ligands and their activities are tightly regulated.

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：Toll様受容体

### 1. 研究開始当初の背景

病原体センサーのプロトタイプである Toll 様受容体 (TLR) は、病原体成分ばかりでなく、自己由来内因性リガンドにも応答し、恒常的な炎症反応(自然炎症)を誘導しており、その制御の破綻が非感染性慢性炎症につながる可能性が示されている。そこで、内因性リガンドと TLR との相互作用を示し、その相互作用がいかにより制御されているのか、明らかにする事を目指した。

### 2. 研究の目的

健常時および非感染性慢性炎症疾患において、TLR に作用する脂質や核酸などの内因性リガンドを検索、同定すること、それらに対して、TLR がどのように活性を制御して、内因性リガンドとの平衡状態を維持しているか、の 2 点について検討する。我々はすでに、エンドトキシンセンサーである TLR4/MD-2 について、内因性リガンドを検出する実験系を確立している。また、TLR7/9 による核酸認識について Unc93B1 という分子が自己由来核酸との平衡状態を維持するうえで重要である可能性を見出しており、その制御機能を欠損させた Unc93B1 ノックインマウスの作成も終えている。このマウスを用いて、平衡状態の破綻がどのような表現型として現れるのか、調べてゆく。

### 3. 研究の方法

#### (1). TLR の内因性リガンド検索システムの確立

我々は、NF- $\kappa$ B の活性化を GFP の発現誘導で検出する系を確立し、この系が持続的に作用する活性の検出に適していることを見出している。この系を用いて内因性リガンドの検索を進める。すでにいくつかのリン脂質に、マウス TLR4/MD-2 を刺激し活性を検出している。またヒト TLR4/MD-2 を発現させる細胞株も確立し、動脈硬化に関わるヒト TLR4 の遺伝子多型について、この実験系で検討する。

#### (2). 健常時及び疾患の際の内因性リガンドの検索、同定

TLR4/MD-2 の内因性リガンドを中心に検索同定を進める。代謝産物としては、脂質、リン脂質を中心に調べてゆく。得られた候補については構造生物学的な手法を研究分担者大戸と共同で進め、TLR4/MD-2 との結合を検討する。疾患に関連するリガンドについては、腎臓や肝臓の再還流障害やガン転移に関わる内因性リガンドなどについて、検索を進める。サンプルからリガンドを同定する方法として、メタボローム解析、リポドーム解析、プロテオーム解析を用いる。リポドーム解析は中西研究分担者と進めてゆく。

#### (3). TLR による核酸認識とその制御機構の解明

Unc93B1 は、核酸特異的な TLR7/9 が、核酸

認識の場であるエンドリソームへ移行する過程を制御する分子である。TLR7/9 の細胞内移行が、Unc93B1 によって相反的に制御されている事を我々は最近見いだした。その相反的な制御の欠損した Unc93B1 ミュータントを発現するノックインマウスを作製している。TLR7/9 と自己由来核酸との平衡状態における Unc93B1 の役割をノックインマウスの解析を通して明らかにする。

### 4. 研究成果

#### (1)TLR の内因性リガンドの検索

TLR の内因性リガンドについては、NF- $\kappa$ B-GFP を用いる検索システムで検索を進めたが、安定して活性が認められるものは検出できなかった。これまで内因性リガンドと報告されているものについても検討したが、安定した活性は認められなかった。さらに、Heat shock protein など、内因性リガンドと呼ばれているものについても精製した TLR4/MD-2 を用いて結合を調べたが、結合は検出できなかった。

一方、分担研究者の大戸らによって、ヒト TLR8 の構造を明らかにされた。この TLR8 の構造から、いくつかの内因性リガンドの存在が示唆された。そこで、現在、その候補となるリガンドについて、活性を検討している。

#### (2)Unc93B1 による TLR の活性制御機構の解明

Unc93B1 は、核酸特異的な TLR の細胞内局在を制御する分子である。我々は、この分子の N 末端から 34 番目のアスパラギン酸 (D34) が TLR7 を負に制御し、TLR9 を正に制御している事を見いだしている。すなわち、TLR7、TLR9 が相反的に制御されている可能性を示している。そこで、その制御機構の個体での役割を明らかにするために、D34 に変異を導入した D34A Unc93B1 ノックインマウスを作成した。その結果、マウスは全身性の致死性の炎症を示すことが明らかになった。脾臓は腫大しており、赤芽球やミエロイド系の細胞が増加していた。肝臓にもミエロイド系の細胞が浸潤していた。TLR7KO マウスと掛け合わせたところ、炎症は認められなかった事から、TLR7 の過剰活性化が原因である事が示された。また、T 細胞が活性化されており、T 細胞由来のサイトカインが定常時でも産生されていた。TLR7 は T 細胞には発現していないので、T 細胞の活性化は、TLR7 を発現している細胞によって誘導されている可能性が高い。そこで B 細胞の可能性を検討するために、B 細胞欠損マウスと掛け合わせたところ、T 細胞の活性化も炎症病態も認められなくなった。さらに、D34A ノックインマウスでは、定常時の IgG 産生が増加しており、リンパ節での B 細胞の比率が増加していた。従って、B 細胞が定常時でも活性化されていることが明らかとなった。これらの結果から、B 細胞が D34A Unc93B1 ノックインマウスでは、恒常的に活性化され、T 細胞活性化を通して、

全身に炎症を誘導することが明らかとなった。Unc93B1 は常に TLR7 の過剰活性化を抑制する役割がある事が明らかとなった。

#### 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 33 件)

1. Huh JW, Shibata T, Hwang M, Kwon EH, Jang MS, Fukui R, Kanno K, Jung DJ, Jang MH, Miyake K, and Kim YM (co-corresponding author) UNC93B1 is essential for the plasma membrane localization and signaling of Toll-like receptor 5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014, doi:10.1073/pnas.1322838111
2. Tanimura N, Saitoh S, Ohto U, Akashi-Takamura A, Fujimoto Y, Fukase K, Shimizu T, Miyake K. The attenuated inflammation of MPL is due to the lack of CD14-dependent tight dimerization of TLR4/MD2 complex at the plasma membrane. *Int. Immunol.* 2013, doi:10.1093/intimm/dxt071
3. Onji M, Kanno A, Saitoh S, Fukui R, Motoi Y, Shibata T, Matsumoto F, Lamichhane A, Sato S, Kiyono H, Yamamoto K, Miyake K. An essential role for the N-terminal fragment of Toll-like receptor 9 in DNA sensing. *Nat. Commun.* 2013;4:1949. doi: 10.1038/ncomms2949.
4. Tanji H, Ohto U, Shibata T, Miyake K, Shimizu T. Structural reorganization of the Toll-like receptor 8 dimer induced by agonistic ligands. *Science*, 2013, 339:1426-1429. doi: 10.1126/science.1229159.
5. Shibata T, Takemura N, Motoi Y, Goto Y, Karuppuchamy T, Izawa K, Li X, Akashi-Takamura S, Tanimura N, Kunisawa J, Kiyono H, Akira S, Kitamura T, Kitaura J, Uematsu S, Miyake K. PRAT4A-dependent expression of cell surface TLR5 on neutrophils, classical monocytes and dendritic cells. *Int Immunol.* 2012 24: 613-623. doi: 10.1093/intimm/dxs068
6. Yamakawa N, Ohto U, Akashi-Takamura S, Takahashi K, Saitoh SI, Tanimura N, Suganami T, Ogawa Y, Shibata T, Shimizu T, Miyake K. Human TLR4 polymorphism D299G/T399I alters TLR4/MD-2 conformation and response to a weak ligand monophosphoryl lipid A. *Int Immunol.* 2013 25:45-52.
7. Ohto U, Yamakawa N, Akashi-Takamura S, Miyake K, Shimizu T. Structural analyses of human Toll-like receptor 4 polymorphisms D299G and T399I. *J Biol Chem.* 2012, 287:40611-40617. doi: 10.1074/jbc.M112.404608.
8. Ohto U, Fukase K, Miyake K, Shimizu T. Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2012. 109:7421-7426. doi: 10.1073/pnas.1201193109
9. Fukui R, Saitoh S-I, Kanno A, Onji M, Shibata T, Ito A, Onji M, Matsumoto M, Akira S, Yoshida N, Miyake K. Unc93B1 restricts systemic lethal inflammation by orchestrating TLR7- and TLR9-trafficking. *Immunity*, 2011, 35:69-81.
10. 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.*, 2009, 206:1339-1350

[学会発表](計 25 件)

1. Toll-like receptor logistics by Unc93B1. The 11th Awaji international forum on infection and immunity, Awaji, Sep 12, 2012
2. Toll-like receptor 7 in plasmacytoid DCs as a target for enhancing anti-tumor immunity., The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association., Sapporo, Sep 20, 2012
3. Toll-like receptor logistics by Unc93B1 as a mechanism regulating autoimmunity. French-Japanese Meeting “Immune defenses in humans and model organisms., Embassy of France in Japan, Sep. 21, 2012
4. Toll-like receptor logistics by Unc93B1, Symposium in The biennial meeting of International endotoxin and innate immunity society, Tokyo, Oct 24, 2012
5. Toll-like receptor logistics by Unc93B1, Symposium “Homeostatic Inflammation against self-derived products” at The 85th Annual meeting of the Japanese Biochemical Society, Fukuoka, Dec15, 2012
6. Nucleic acid-sensing Toll-like

- receptors: their recognition and regulation, The 21th international symposium of macrophage molecular and cellular biology (MMCB)2013, Tokyo, Japan, May20-21.
7. TLR logistics by Unc93B1 as a mechanism regulating autoimmunity, American Association of Immunologists (AAI) annual meeting 2013, Honolulu, USA, May3-7
  8. Toll-like receptor logistics as a mechanism regulating autoimmunity, Seoul, South Korea, May 31-June 1, The 5th East Asian Group of Rheumatology.
  9. TLR logistics by Unc93B1 as a mechanism regulating autoimmunity, France-Japan joint forum, Frontiers in Innate Immunity, Univ. Strasbourg, Strasbourg, France, June 6-7
  10. Nucleic acid-sensing Toll-like receptors: their recognition and regulation, The 86th annual meeting of the Japanese Society of Biochemical Society, Yokohama, Japan, Sep 13.
  11. Mechanisms Regulating Nucleic Acid Sensing Toll-like Receptors, The 58th annual meeting of Japanese College of Rheumatology, April 24, International symposium, Tokyo, Japan

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：炎症性疾患の予防又は治療剤  
発明者：三宅健介、菅野敦夫、恩地正浩、本井祐二  
権利者：東京大学  
種類：特許  
番号：特願 2013-089575  
出願年月日：平成 25 年 4 月 22 日  
国内外の別：国内、国外は PCT 出願

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shizen-enshow.jp/>

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

大戸 梅治 (OHTO, Umeharu)  
東京大学・薬学研究科・助教  
研究者番号：90451856

(3)研究分担者

中西 広樹 (NAKANISHI, Hiroki)  
秋田大学・生体情報研究センター・助教  
研究者番号：10466740

(4)連携研究者

高村 祥子 (TAKAMURA, Sachiko)  
東京大学・医科学研究所・助教  
研究者番号：00325599

(5)連携研究者

斉藤 伸一郎 (SITOH, Shin-Ichiroh)  
東京大学・医科学研究所・助教  
研究者番号：90361625