

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2009

課題番号：19209015

研究課題名（和文） 樹状細胞のウイルスパターン認識分子による細胞性免疫活性化機構

研究課題名（英文） Pattern-recognition receptors in dendritic cells evoke cellular immunity in response to viral RNA patterns

研究代表者

瀬谷 司（SEYA TSUKASA）

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10301805

研究成果の概要（和文）：

ウイルス感染の宿主2重鎖（ds）RNA応答を解析した。PolyI:C（dsRNA analog）刺激によって樹状細胞は細胞接着でNK細胞を活性化した。樹状細胞に発現誘導される膜分子から、NK活性化に必要な因子を同定し、INAMと名付けた。INAMはpolyI:C刺激の樹状細胞TICAM-1経路（TLR3）かIPS-1経路（MDA5）によって発現誘導され、in vivo polyI:C投与でも同じ結果が再現された。NK誘導によって移植がんの退縮も誘導された。

研究成果の概要（英文）：

How host cells respond to viral dsRNA is analyzed in this study. Dendritic cells (DC) stimulated with polyI:C (an dsRNA analog) render the DC competent for NK activation. Since cell-cell contact was essential for this NK activation, the molecule expressed on DC to drive NK activation was identified from genes up-regulated by polyI:C stimulation. Ultimately, we identified a membrane protein responsible for NK induction and named it INAM. INAM is a tetraspanin-like molecule inducing NK tumoricidal activity and in vivo tumor regression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	13,800,000	4,140,000	17,940,000
2008年度	11,800,000	3,540,000	15,340,000
2009年度	11,800,000	3,540,000	15,340,000
年度			
年度			
総計	37,400,000	11,220,000	48,620,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：自然免疫、TLR、TICAM-1、IPS-1、樹状細胞、NK細胞、RNAパターン認識

1. 研究開始当初の背景

ウイルスの初期感染に NK 細胞の防御機構が起動することは知られていたが、ウイルス感染時に如何なる機序で NK 細胞が活性化するか不明であった。申請者らは TLR3 の dsRNA 認識経路が polyI:C に応答して type I IFN 誘導とともに NK 活性化も引き起こすことを KO マウス解析から推定していた。TLR 系は一般的に IFN などの液性メディエーター産生因子としてのみならず樹状細胞の成熟化因子として重要な概念が提出されてきたが、細胞質内センサー（パターン認識分子）が発見されてそれらとの機能的な相違も未知の状況であった。申請者らは TLR, RLR の KO マウスを作製してこの問題の解決を諮ることを企画した。

2. 研究の目的

ウイルス dsRNA 認識性の TLR（特に TLR3）の宿主細胞性免疫の起動経路を解明し、樹状細胞による NK 活性化機構を分子レベルで明らかにする。細胞内の RNA センサーの解析も含めて、がん・感染症の対策に適用できる自然免疫の宿主防御機構の概念を確立することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

TICAM-1, IPS-1 の KO マウスを 129 系で確立し、8 代 backcross して C57BL/6 の系として確立した。MyD88 KO マウスは審良研より恵与を受けた。担がんマウスモデル (B16, 3LL MIClow, EL4, EG7 MIChigh vs. C57BL/6) は当研究室で subline を作製し、NK ターゲットとなる B16D8 を抗がん NK 査定用に、CTL ターゲットとなる EL4 を CTL 査定用に使用した。Genechip 解析は育成センターに依頼し

た。各 TLR/RLR 経路に依存して発現誘導する遺伝子群を genespring ソフトで抽出した。レンチウイルスを用いた発現系は既報

(Akazawa et al. PNAS 2007) に則って作成し、IRES-GFP で発現を可視化した。siRNA による gene silencing は予想ソフトから配列を作成し、該当遺伝子の発現確認を行ってから knockdown 細胞を使用した。各種マウスサイトカインは ELISA と mRNA 定量 PCR で定量した。

4. 研究成果

TICAM-1 (TRIF) 経路の細胞性免疫起動への影響は不明であった。PolyI:C 刺激 (s.c. 投与) 有り無し wild-type, 各種 KO マウスで in vivo NK 活性化を NK-sensitive 移植がんの退縮を評価に解析した。PolyI:C による腫瘍退縮は樹状細胞 TICAM-1 経路依存性の NK 活性化によるものと査定できた (Akazawa et al., PNAS 2007)。一方、遅れて確立できた IPS-1 KO マウスでも NK 活性化は著しく阻害された。いずれの場合も樹状細胞に特異な膜分子が誘導されて NK が活性化する (Ebihara et al., J Exp Med 2010)。この膜分子は IRF-3-derived NK-activating molecule (INAM) と命名された。この際、樹状細胞は dsRNA を endosome uptake し TLR3、または細胞質に落ちて RIG-I/MDA5 に認識すると判明した (Ebihara et al., Hepatology 2008)。TLR3 は TICAM-1 経路、RIG-I/MDA5 は IPS-1 経路を採り、どちらも共通の IRF-3 活性化キナーゼ TBK1/IKKe を活性化する (Sasai et al., 2006)。しかし、早期の感染・炎症過程に NK 細胞が果たす役割は不明である。この点を麻疹ウイルス、ポリオウイルス、VSV、インフルエンザウイルスなどの感染マウスモデルを用いて解析している (Oshiumi et al., 未

発表)。これらウイルスが感染細胞に如何なる炎症応答を誘起しているかをウイルスごとの相違点を含めて解析中である (Takaki et al., 未発表)。ウイルスには樹状細胞に感染するものとしなないものがあり、樹状細胞成熟化の相違をウイルスごとに調べている。

一方、感染細胞に対する抗ウイルス CTL 誘導は樹状細胞の cross-priming が起動して起きる。polyI:C 刺激の樹状細胞 CTL 誘導活性を査定すると、樹状細胞の IPS-1 は CTL 誘導に殆ど関与せず、TICAM-1 経路が強い cross-priming と CTL 誘導を行なうことが判明した (Azuma et al., 未発表)。TICAM-1 の下流の責任分子は未同定だが、IRF-3/7 の KO によって cross-priming は大幅に抑制された。現在この樹状細胞責任分子を同定中である。

以上から樹状細胞成熟化に NK 活性化分子 INAM が寄与する場合、NK 細胞が抗ウイルスに機能すること、樹状細胞がウイルス感染 debris を取り込み、TICAM-1 経路が活性化することがウイルスの宿主応答に重要であることが判明した。ウイルスワクチン開発のために免疫アジュバントは重要であり、その開発を目指している。

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 36 件) 全て査読有

1. Tatematsu, M., A. Ishii, M. Horiuchi, H. Oshiumi, F. Inagaki, T. Seya, and M. Matsumoto. 2010. Molecular mechanism for activation of Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1 (TICAM-1). *J. Biol. Chem.* (in press).
2. Akazawa, T., N. Inoue, H. Shime, K. Sugiura, K. Kodama, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Adjuvant engineering for cancer immunotherapy: development of a synthetic TLR2 ligand with increased cell adhesion. *Cancer Sci.* (in press).

3. Oshiumi, H., K. Sakai, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase binds the RIG-I adaptor IPS-1 to up-regulate IFN-beta inducing potential. *Eur. J. Immunol.* (in press).
4. Ebihara, T., M. Azuma, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Identification of INAM, a polyI:C-inducible membrane protein, that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *J. Exp. Med.* (in press).
5. Seya, T., 2010. Innate immunity and vaccine. *Vaccine* (in press). (preface)
6. Seya, T., H. Shime, T. Ebihara, H. Oshiumi, and M. Matsumoto. 2010. Pattern-recognition receptors of innate immunity and their application to tumor immunotherapy. *Cancer Sci.* 101: 313-320 (review).
7. Sasai, M., H. Oshiumi, K. Funami, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM-1/TRIF adaptor of the Toll-like receptor 3/4 pathway. *Molec. Immunol.* 47: 1283-1291.
8. Kodama, K., M. Higashiyama, K. Takami, K. Oda, J. Okami, J. Maeda, T. Akazawa, M. Matsumoto, T. Seya, M. Wada, A. Hayashi, and K. Toyoshima. 2009. Innate immune therapy with a BCG cell wall skeleton for lung cancer: a case presentation and a case control study. *Surgery Today.* 39: 194-200.
9. Iwakiri, D., L. Zhou, M. Samanta, M. Matsumoto, T. Ebihara, T. Seya, S. Imai, M. Fujieda, K. Kawa, and K. Takada. 2009. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from Toll-like receptor 3. *J. Exp. Med.* 206: 2091-2099.
10. Seya, T., and M. Matsumoto. 2009. The extrinsic RNA-sensing pathway for adjuvant immunotherapy for cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 58:1175-1184 (review).
11. Seya, T., M. Matsumoto, T. Ebihara, and H. Oshiumi. 2009. Functional evolution of the TICAM-1 (TRIF) pathway for

- extrinsic RNA sensing. *Immunol. Rev.* 227: 44-53 (review).
12. Takaki, H., H. Oshiumi, T. Kawanishi, M. Sasai, M. Matsumoto, and T. Seya. 2009. Cytoplasmic oligomerized TICAM-1 recruits nuclear BS69 to enhance type I interferon induction. *Eur. J. Immunol.* 39: 3469-3476.
 13. Yasukawa, K., H. Oshiumi, M. Takeda, Y. Yanagi, T. Seya, S. Kawabata and T. Koshihara. 2009. Mitofusin 2, a mitochondrial fusion mediator, acts as a negative regulator for mitochondrial antiviral signaling. *Science Signaling.* 2(84): ra47.
 14. Fujimoto, Y., M. Hashimoto, M. Furuyashiki, M. Katsumoto, T. Seya, Y. Suda, and K. Fukase. 2009. Innate Immunostimulatory lipopeptides of *Staphylococcus aureus* as TLR2 ligands; Prediction with mRNA expression, chemical synthesis and immunostimulatory activities. *ChemBioChem.* 10: 2311-2315.
 15. Akao, Y., T. Ebihara, H. Masuda, Y. Saeki, K. Hazeki, O. Hazeki, M. Matsumoto, and T. Seya. 2009. Enhancement of antitumor natural killer cell activation by orally administered Spirulina extract in mice. *Cancer Sci.* 100: 1494-1501.
 16. Wu, J. D., C. L. Atteridge, X. J. Wang, T. Seya, and S. R. Plymate. 2009. Obstructing shedding of the immune stimulatory MHC class I chain-related gene B prevents tumor formation. *Clin. Cancer Res.* 15: 632-640.
 17. Oshiumi, H., M. Matsumoto, S. Hatakeyama, and T. Seya. 2009. Riplet/RNF135, a RING-finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon- β induction during the early phase of viral infection. *J. Biol. Chem.* 284: 807-817.
 18. Matsuo, A., H. Oshiumi, T. Tsujita, H. Mitani, H. Kasai, M. Yoshimizu, M. Matsumoto, and T. Seya. 2008. Teleost TLR22 recognizes RNA duplex to induce IFN and protect cells from birnaviruses. *J. Immunol.* 181: 3474-3485.
 19. Ebihara, T., M. Shingai, M. Matsumoto, T. Wakita, and T. Seya. 2008. Hepatitis C virus (HCV)-infected hepatocytes extrinsically modulate dendritic cell maturation to activate T cells and natural killer cells. *Hepatology.* 48: 48-58.
 20. Funami K., M. Sasai, H. Oshiumi, T. Seya, and M. Matsumoto. 2008. Homo-oligomerization is essential for Toll/IL-1 receptor domain containing adaptor molecule-1-mediated NF-kappaB and interferon regulatory factor-3 activation. *J. Biol. Chem.* 283: 18283-18291.
 21. Fukuda, K., T. Watanabe, T. Tokisue, T. Tsujita, S. Nishikawa, T. Hasegawa, T. Seya, and M. Matsumoto. 2008. Modulation of Double-stranded RNA Recognition by the N-terminal Histidine-rich Region of the Human Toll-like Receptor 3. *J. Biol. Chem.* 283: 22787-22794.
 22. Itoh, K., A. Watanabe, K. Funami, T. Seya, and M. Matsumoto, 2008. The clathrin-mediated endocytic pathway participates in dsRNA-induced IFN- β production. *J. Immunol.* 181: 5522-5529.
 23. Shime, H., M. Yabu, T. Akazawa, K. Kodama, M. Matsumoto, T. Seya and N. Inoue. 2008. Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23-IL-17 proinflammatory pathway. *J. Immunol.* 180: 7175-7183.
 24. Shingai, M., M. Azuma, T. Ebihara, M. Sasai, K. Funami, M. Ayata, H. Ogura, H. Tsutsumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2008. Soluble G protein of respiratory syncytial virus inhibits Toll-like receptor 3/4-mediated IFN-beta induction. *Int. Immunol.* 20: 1169-1180.
 25. Bas, S., L. Neff, M. Vuillet, U. Spenato, T. Seya, M. Matsumoto, and C. Gabay. 2008. The proinflammatory cytokine response to *Chlamydia trachomatis* elementary bodies in human macrophages is partly mediated by a lipoprotein, the macrophage infectivity potentiator, through TLR2/TLR1/TLR6 and CD14. *J. Immunol.* 180: 1158-1168.
 26. Matsumoto, M., and T. Seya. 2008. TLR3 : interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60: 805-812.

27. Ebihara, T., H. Masuda, T. Akazawa, M. Shingai, H. Kikuta, T. Ariga, M. Matsumoto, and T. Seya. 2007. NKG2D ligands are induced on human dendritic cells by TLR ligand stimulation and RNA virus infection. *Int. Immunol.* 19: 1145-1155.
28. Funami K., M. Sasai, Y. Ohba, H. Oshiumi, T. Seya, and M. Matsumoto. 2007. Spatiotemporal mobilization of Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1 in response to dsRNA. *J Immunol.* 179: 6867-6872.
29. Shiratori, I., Y. Suzuki, H. Oshiumi, N. A. Begum, T. Ebihara, M. Matsumoto, K. Hazeki, K. Kodama, Y. Kashiwazaki, and T. Seya. 2007. Recombinant IL-12/IL-18 antitumor therapy in a guinea pig hepatoma cell implanted model. *Cancer Sci.* 98: 1936-1942.
30. Yoshioka, M., N. Fukuishi, S. Iriguchi, K. Ohsaki, H. Yamanobe, A. Inukai, D. Kurihara, N. Imajo, Y. Yasui, N. Matsui, T. Tsujita, A. Ishii, T. Seya, M. Takahama, and M. Akagi. 2007. Lipoteichoic acid down-regulates Fcε receptor I expression on human mast cells through Toll-like receptor 2. *J. Aller. Clin. Immunol.* 120: 452-461.
31. Akazawa T., M. Sasai, T. Ebihara, M. Shingai, N. Inoue, M. Matsumoto, and T. Seya. 2007. Tumor immunotherapy using bone marrow-derived dendritic cells overexpressing Toll-like receptor adaptors. *FEBS Lett.* 581: 3334-3340.
32. Takada, E., S. Okahira, M. Sasai, K. Funami, T. Seya, and M. Matsumoto. 2007. C-terminal LRRs of human Toll-like receptor 3 control receptor dimerization and signal transmission. *Molec. Immunol.* 44: 3633-3640.
33. Shingai, M., T. Ebihara, N. A. Begum, A. Kato, T. Honma, K. Matsumoto, H. Saito, H. Ogura, M. Matsumoto, and T. Seya. 2007. Differential type I interferon (IFN) inducing abilities of wild-type vs. vaccine strains of measles virus. *J. Immunol.* 179: 6123-6133.
34. Akazawa T., M. Okuno, Y. Okuda, K. Tsujimura, T. Takahashi, M. Ikawa, M. Okabe, T. Ebihara, M. Shingai, N. Inoue, M. Tanaka-Okamoto, H. Ishizaki, J. Miyoshi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2007. Antitumor NK activation induced by the Toll-like receptor3-TICAM-1 (TRIF) pathway in myeloid dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 252-257.
35. Niimi, K. K. Asano, Y. Shiraishi, T. Nakajima, M. Wakaki, J. Kagyo, T. Takihara, Y. Suzuki, K. Fukunaga, T. Shiomi, T. Oguma, K. Sayama, K. Yamaguchi, Y. Natori, M. Matsumoto, T. Seya, and M. Yamata, A. Ishizaka. 2007. Toll-like receptor 3-mediated synthesis and release of eotaxin-1/CCL11 from human bronchial smooth muscle cells stimulated with double-stranded RNA. *J. Immunol.* 178: 489-495.
36. Ishii, A., A. Matsuo, H. Sawa, T. Tsujita, K. Shida, M. Matsumoto, and T. Seya. 2007. Lamprey Toll-like receptors with properties distinct from those of variable lymphocyte receptors. *J. Immunol.* 178: 397-406.

〔学会発表〕（計 72 件）
省略

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.hucc.hokudai.ac.jp/~e20536/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬谷 司 (SEYA TSUKASA)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：10301805

(2) 研究分担者

松本 美佐子 (MATSUMOTO MISAKO)
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：30332456
(H20-H21：連携研究者)
赤澤 隆 (AKAZAWA TAKASHI)
大阪府立成人病センター・研究所・大阪府
研究職
研究者番号：80359299
(H20-H21：連携研究者)

(3) 連携研究者