

平成 21年 6月 1日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790354

研究課題名 (和文) TLRによる自然免疫系分化・成熟機構

研究課題名 (英文) Differentiation and maturation of innate immune cells via TLR

研究代表者

長井 良憲 (NAGAI YOSHINORI)

富山大学・大学院医学薬学研究部・准教授

研究者番号：30431761

研究成果の概要：すべての血液細胞は、骨髄に存在する造血幹細胞、前駆細胞から分化する。その分化は、サイトカインや転写因子などにより、厳密に制御されている。本研究では、未分化な造血前駆細胞に細菌 DNA の受容体が発現していることを明らかにした。この受容体を介して、細菌 DNA やウイルスを認識することにより、造血前駆細胞からの形質細胞様樹状細胞への分化が誘導されることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

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：免疫学、自然免疫、Toll-like receptor、造血分化

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、以前の研究において、骨髄の未分化な造血前駆細胞に、病原体センサーである Toll-like receptor (TLR) が発現していることを明らかにした。さらに、造血前駆細胞における TLR2, TLR4 のシグナルにより、リンパ球系細胞への分化が抑制され、逆に急速な自然免疫系細胞への分化が誘導されることを明らかにした。すなわち、病原体の刺激も造血分化の重要な因子であることを示した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、研究代表者らが発見した TLR シグナルによる造血分化制御機構の分子メカニズムを明らかにすることである。

(1) 造血前駆細胞における、TLR2 や TLR4 以外の TLR の発現を検討し、そのシグナルにより自然免疫系細胞が分化するかどうかを検討する。

(2) 造血前駆細胞の TLR シグナル下流において誘導される転写因子やレセプター分子などの遺伝子を同定し、従来のサイトカインシグナルによる造血分化系と異なる点を明らかにする。

(3)造血前駆細胞における TLR シグナルを負に制御する分子を同定する。TLR シグナルの制御異常、すなわち過剰もしくは慢性の TLR シグナルが造血に与える影響を検討する。

(4) 個体発生における自然免疫系の分化と TLR シグナルとの関連について検討する。胎生期の造血前駆細胞や自然免疫系細胞における TLR の発現およびシグナル伝達系を検討する。

### 3. 研究の方法

(1)セルソーターを用いて各種造血前駆細胞を単離し、mRNA を抽出した。抽出した mRNA を鋳型に、一本鎖 DNA を合成し、TLR9 の発現を RT-PCR 法にて解析した。

(2)セルソーターを用いてリンパ球系前駆細胞 CLP を単離し、in vitro で CpG-DNA 刺激した。48 時間後に培養細胞を回収し、フローサイトメトリー法にて B リンパ球分化、樹状細胞分化を解析した。

(3)マウスに HSV-1 を感染させ、7 日後にセルソーターを用いて CLP を単離した。感染マウスとコントロールマウスから単離した CLP をリンパ球誘導系の培養条件で 8 日間培養し、フローサイトメトリー法にて B リンパ球分化、樹状細胞分化を解析した。

### 4. 研究成果

(1)研究の主な成果

①造血前駆細胞、特にリンパ球系前駆細胞 (CLP、ELP) に TLR9 が高発現していることを明らかにした (図 1)。

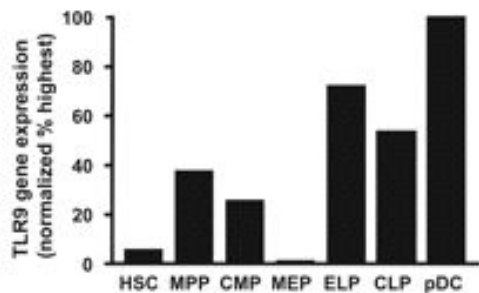


図 1

②リンパ球造血における TLR9 シグナルの影響を検討するために、マウス骨髄より CLP を単離し、CpG-DNA で刺激した。CpG-DNA で刺激しない CLP から分化した細胞のほとんどは B リンパ球であったが、CpG-DNA で刺激した CLP からは多数の樹状細胞が分化し、反対に B リンパ球への分化は抑制された。さらに樹状細胞のなかでも、形質細胞様樹状細胞

(pDC) と NK 様キラー樹状細胞 (NK-like IKDC) が多数を占めていた (図 2)。

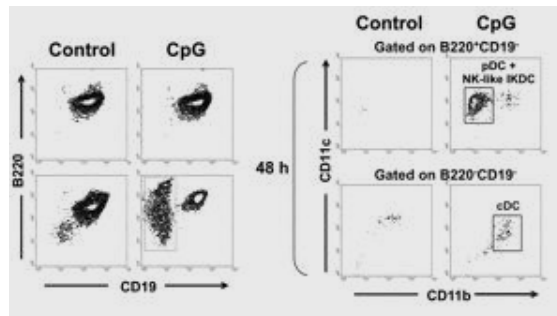


図 2

③TLR9 依存性のウイルスである HSV-1 を野生型マウスに接種した後、CLP を単離し、in vitro で培養したところ、CpG-DNA で刺激した時と同様に、B リンパ球分化は抑制され、代わりに pDC と NK-like IKDC への分化が促進された。さらにこの現象は、TLR9 欠損マウスに HSV-1 を感染させても認められなかった (図 3)。

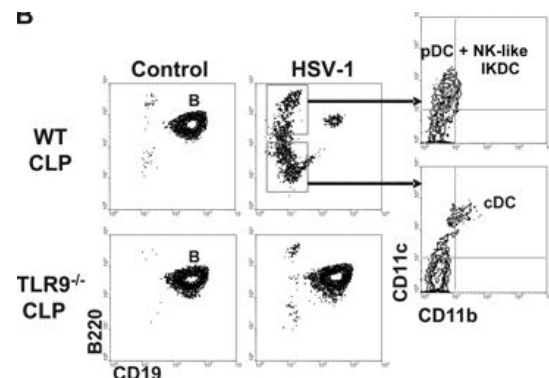


図 3

④以上の結果からリンパ球系前駆細胞に発現している TLR9 シグナルにより B リンパ球系への分化が抑制され、樹状細胞、そのなかでも特に pDC と NK-like IKDC への分化が促進されることが明らかになった。TLR2 や TLR4 のシグナルにより CLP からの B リンパ球分化が抑制され、骨髄球系樹状細胞への分化が促進されることは既に報告していたが、TLR9 のシグナルでは樹状細胞のなかでも pDC と NK-like IKDC への分化が促進されることから、TLR の種類によって分化する細胞の種類が異なることが示された。

(2)国内外における位置付けとインパクト  
海外の研究者の報告により、ヒト臍帯血の CD34 陽性細胞において TLR9 が発現し、CpG 刺激により IL-8 が産生されることが報告されている。本研究においては、マウスの造血前駆細胞、特にリンパ球系前駆細胞に TLR9 が高く発現していることを示した。さらに、CpG やヘルペスウイルスなどによる TLR9 シグナルにより pDC へと分化することを示した。造血前駆細胞の TLR9 シグナルが pDC 分化を誘導することを初めて明らかにした点は、世界的にもインパクトがあると考えられる。

### (3)今後の展望

pDC は、自己免疫病の病態形成において重要なメディエーターである。今回明らかにした TLR9 シグナルによる造血前駆細胞からの pDC 分化が、自己免疫病の病態に係わっているかどうか、興味を持たれる。

## 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 5 件)

- ① 長井良憲、塚本裕美子、高津聖志：TLR シグナルとクラススイッチ組換え、臨床免疫・アレルギー科、査読無、49(3):2008, 246-251.
- ② Welner, R. S., R. Pelayo, Y. Nagai, K. P. Garrett, T. R. Wuest, D. J. Carr, L. A. Borghesi, M. A. Farrar, P. W. Kincaid. Lymphoid precursors are directed to produce dendritic cells as a result of TLR9 ligation during herpes infection. *Blood* 査読有、112(9):2008, 3753-3761.
- ③ Kobayashi, T., K. Takahashi, Y. Nagai, T. Shibata, M. Otani, S. Izui, S. Akira, Y. Gotoh, H. Kiyono, K. Miyake. Tonic B cell activation by Radioprotective 105/MD-1 promotes disease progression in MRL/lpr mice. *Int. Immunol.* 査読有、20(7):2008, 881-891.
- ④ 長井良憲：自然免疫系細胞への分化における TLR の役割、臨床免疫・アレルギー科、査読無、47(5):2007, 610-618.
- ⑤ Takahashi, K., T. Shibata, S. Akashi-Takamura, T. Kiyokawa, Y. Wakabayashi, N. Tanimura, T. Kobayashi, F. Matsumoto, R. Fukui, T. Kouro, Y. Nagai, K. Takatsu, S. S-I. Saitoh, K. Miyake. A protein associated with Toll-like receptor 4 (PRAT4A) is required for TLR-dependent immune responses. *J. Exp. Med.*, 査読有、204(12):2007,

2963-2976.

[学会発表] (計 6 件)

- ① Nagai, Y., M. Ikutani, A. Kariyone, S. Ohta, K. Miyake and K. Takatsu. TLR4/MD-2 and RP105/MD-1 differentially regulate LPS responsiveness in B cells. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 2008. 12. 2, 京都
- ② Kouro, T., M. Ikutani, A. Teratani, Y. Nagai and K. Takatsu. B-cell-restricted differentiation of IL-7R+ lymphoid progenitors from fetal liver. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 2008. 12. 2, 京都
- ③ Nakamura, T., Y. Nagai and K. Takatsu. PDCA-1 and mouse plasmacytoid DC precursor cells. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 2008. 12. 2, 京都
- ④ Honda, H., Y. Nagai, K. Miyake and K. Takatsu. Natural plant products modulate innate immunity via TLRs. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 2008. 12. 2, 京都
- ⑤ Sasaki, S., Y. Nagai and K. Takatsu. Identification of soluble MD-1 and its role in autoimmune diseases. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 2008. 12. 3, 京都
- ⑥ Kobayashi, T., K. Takahashi, Y. Nagai, T. Shibata, Y. Gotoh, H. Kiyono, S. Akira and K. Miyake. Microbial flora-independent signaling via Toll-like receptor 2/4 and RP105 induces IgG3 and predisposes to lupus nephritis. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会, 2007. 11. 22, 東京

[図書] (計 1 件)

- ① 長井良憲、高津聖志：南江堂、免疫総論「免疫とは」臨床アレルギー学 (改訂第 3 版) 2007, 2-4.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長井 良憲 (NAGAI YOSHINORI)

富山大学・大学院医学薬学研究部・准教授

研究者番号：30431761