

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790386

研究課題名 (和文) 新規 NLR ファミリーによる病原体認識と獲得免疫誘導における役割

研究課題名 (英文) Role of a new member of the NLR family in pathogen recognition and shaping adaptive immunity

研究代表者 河合 太郎 (KAWAI TARO)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：50456935

研究成果の概要 (和文)：我々が同定した新規 NLR ファミリー分子 NLR-tb の自然免疫系における役割の解析を行った。その結果、NLR-tb は炎症性サイトカイン IL-1 ベータの産生を誘導する機能を有することが分かった。また、ノックアウトマウスの解析から、NLR-tb は他の NLR ファミリー分子により認識される病原体成分とは異なる未知の成分の認識に関わる可能性が示された。

研究成果の概要 (英文)：We analyzed roles of NLR-tb, a new member of the NLR family that we identified, in the regulation of innate immunity. We found that NLR-tb is capable of inducing the production of inflammatory cytokine IL-1beta. Furthermore, our analyses on NLR-tb-deficient mice suggested the possibility that NLR-tb responds to unknown pathogen components.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：自然免疫、感染、シグナル伝達、炎症、サイトカイン、アジュバント

1. 研究開始当初の背景

自然免疫は病原微生物の体内への侵入を迅速に察知するシステムであり主にマクロファージや好中球、樹状細胞 (Dendritic Cells: DC) といった抗原提示細胞により担われる。これら自然免疫担当細胞は IL-1 β 、IL-6 や TNF といった炎症性サイトカイン、I 型インターフェロン (IFN)、ケモカインの産生などを誘導することにより、感染局所における感染巣の拡大を防ぐ。また樹状細胞は病原体侵入に伴いサイトカイン産生、共刺激分子発現、抗原提示を促し、T 細胞の活性化や

B 細胞からの抗体産生を誘導することから、自然免疫と獲得免疫を橋渡しする上で重要な役割を果たしている。自然免疫担当細胞による病原体侵入の察知は非特異的なものであると考えられていたが、Toll-like receptor (TLR) ファミリーの発見を機に自然免疫系は TLR を介して病原体に固有に存在する分子構造 (Pathogen-associated molecular patterns: PAMPs) を認識し、活性化シグナルを伝達することが明らかとなってきた。TLR は現在 10 数種類同定されており、その多くは細菌、ウイルス、寄生虫などのタンパ

ク質、脂質、核酸成分を認識することが明らかとされている。一方、TLRは膜型受容体であるため細胞質内に存在するPAMPsを認識することはできない。近年、このような細胞質内PAMPsを認識する分子としてRIG-I-like receptor (RLR)ファミリー、NOD-like receptor (NLR)ファミリーが同定されてきた。RLRは3種類同定されており、RNAウイルスの複製産物であるRNAを認識する細胞質内センサーとして、ウイルス感染防御において必須の役割を果たしている。一方、NLRは、約30のメンバーから形成されており、主にウイルスや細菌の核酸、細菌のもつType III/IV分泌機構や細胞内寄生細菌により細胞質内へと放出された鞭毛や細胞壁成分を認識し、炎症反応を誘導するものと考えられている。NLRの中で、NLRP1やNLRP3は「インフラマソーム」と呼ばれる複合体を細胞質内で形成する。インフラマソームは様々なPAMPsにより活性化される。インフラマソームにはCaspase-1が含まれており、活性化したCaspase-1はIL-1 β 前駆体を切断し活性化型IL-1 β の産生を促す。すなわち、インフラマソームはPAMPs刺激によってIL-1 β を産生するための「装置」としての役割を果たしている。興味深いことに、インフラマソームはPAMPs以外にもアルミニウム塩などのアジュバントによっても活性化される。

感染症や腫瘍といった重要疾患に対する治療を考える上で、ワクチンアジュバントの開発は欠かすことができない。一般的に、抗原ペプチドのみを免疫原として用いても効率的な獲得免疫応答が得ることはできず、アジュバントとの共免疫が必要となる。アジュバントとして細菌菌体成分や化合物（核酸、アルミニウム塩など）が用いられ、これらのTLR、RLRもしくはNLRにより認識される。その一方、これら各センサーからのシグナルのみでは効率的な獲得免疫誘導には不十分であることが、これまでの研究から明らかになっている。すなわち、これらセンサーの「協調的」な作用による自然免疫の活性化が獲得免疫誘導には必要であると考えられる。したがって、各TLR、RLR、NLRが認識するPAMPsやアジュバント成分を同定し、またそれら遺伝子を単独もしくは複数欠損したマウスを用いて獲得免疫系への影響を調べることは、自然免疫から獲得免疫へ至る道筋を理解するに留まらず、効果的なワクチン開発という点で非常に有用である。

2. 研究の目的

我々はTBK1と呼ばれるキナーゼ分子と会合する分子として酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより新規NLRメンバー、NLR-tb（現在、NLRC5と呼ばれている）を同

定した。TBK1はTLRやRLRを介したシグナル伝達誘導において必須の役割を果たすキナーゼ分子であり、ウイルスや細菌感染による誘導されるI型IFN産生や炎症反応の制御に関わっている。一方、TBK1がNLRのシグナル伝達経路に関与するという報告はない。したがって、NLR-tbは何らかのPAMPsを認識し、TBK1経路を活性化する可能性のある新規自然免疫センサーであると考えられる。本研究では、NLR-tbを中心に、この分子がどのようなPAMPsもしくはアジュバント成分、結晶を認識し、どのような自然免疫応答を誘導するのかを明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

NLR-tbの機能を理解するために以下に述べる3点を柱として研究を展開した。

(1) NLR-tb 下流シグナルの解析

NLR-tb 過剰発現系を用いて、炎症性サイトカインやI型インターフェロン産生誘導に与える影響の検討を行った。

(2) NLR-tb 欠損マウスを用いた NLR-tb リガンドの探索と免疫応答に対する役割

NLR-tb 欠損マウスの作製を行った。このマウスからマクロファージや樹状細胞を取り出し、各種PAMPsやアジュバントに対する応答を検討した。

(3) NLR-tb に会合する分子のスクリーニング

NLR-tb の機能をさらに追求するために、酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行った。

4. 研究成果

(1) NLR-tb 下流シグナルの解析

NLR-tbはTBK1と結合する分子として我々が同定したものである。結合実験の結果から、NLR-tbのC末端に存在するロイシンリッチリピート部分とTBK1が結合することが分かった。また、この結合にはTBK1のキナーゼ活性に関係しなかった。TBK1の過剰発現はIFN β 遺伝子プロモーターを顕著に活性化するが、この活性化はNLR-tbの過剰発現により抑制された。このことから、*in vitro*の実験においては、NLR-tbはTBK1の負の制御因子であると考えられた。一方、NLR-tbをIL-1 β 前駆体とCaspase-1の発現ベクターと共に細胞内に過剰発現させると、IL-1 β 前駆体の切断による培養液中へのIL-1 β の産生がELISAで検出された。このことは、NLR-tbが「インフラマソーム」として機能することを強く示唆している。さらに、NLR-tbは炎症性サイトカインやIFNの刺激で発現が誘導されることを見出した。これらのことから、NLR-tbはウイル

スや細菌感染に伴い発現が誘導され、インターフェロンの産生を負に制御すると共にIL-1 β の産生を正に制御する因子であることが示唆された。

また、本研究期間中に、NLR-tb が炎症性サイトカイン遺伝子発現を制御する転写因子NF- κ Bの活性化に関わるキナーゼIKK β と結合しこのキナーゼの活性を抑制することで、NF- κ Bを負に制御することが他の研究グループにより Cell 誌に報告された (Cell, 141:483, 2010)。しかしながら、我々の実験ではIKK β に対するNLR-tbの抑制効果は認められなかった。これらの違いは不明であるが、細胞種や発現量の違いにより差が生じたと考えられる

(2) NLR-tb 欠損マウスを用いた NLR-tb リガンドの探索と免疫応答に対する役割

NLR-tb の生体における機能を理解するために、NLR-tb 欠損マウスの作製を行った。NLR-tb 欠損マウスはメンデルの法則に従って誕生した。調べた限り、免疫系の細胞 (マクロファージ、樹状細胞、B細胞、T細胞) の発生・分化について異常は認められなかった。まず、野生型及び NLR-tb 欠損マウスから樹状細胞やマクロファージを調整し、TBK1を活性化するTLRやRLRのリガンド(LPS、poly IC、RNAウイルス)で刺激し、炎症性サイトカインやI型IFNの発現をELISA法と定量PCR法にて測定したところ、刺激時間や刺激量に関わらず両者に有為差は認められなかった。また、これら以外にもDNAウイルス(HSV-1)や細菌(Listeria monocytogenes)感染後の炎症性サイトカインやI型インターフェロンにも差は認められなかった。加えて、TBK1を活性化するがまだその認識受容体が不明である二重鎖DNAに対するサイトカイン産生においても野生型とNLR-tb欠損マウス細胞で差は認められなかった。これらのことから、NLR-tb欠損はマウス生体内においてTBK1の機能に大きな影響を与えないことが分かった。続いて、NLR-tbがインフラソームとして機能しIL-1 β の産生に関与している可能性があることから、IL-1 β 産生誘導が可能な様々な成分や病原体を用いて検討を行った。その結果、アルミニウム塩、Zymosan、尿酸結晶、二重鎖DNA刺激によるIL-1 β の産生については、野生型とNLR-tb欠損マクロファージで差は認められなかった。また、Francisella tularensis や Listeria monocytogenes といった細菌の感染によるIL-1 β 産生およびSalmonella typhimurium感染後のCaspase-1の活性化にも差は認められなかった。これらのことから、NLR-tbは未知のリガンド認識に関わっている可能性が示唆される。今後さらなるスクリーニングが必要である。なお、本研究結果に関して、J.

Immunol. 誌にて報告を行った (Kumar H et al., NLR5 deficiency does not influence cytokine induction by virus and bacteria infections. J Immunol. 186:994, 2011)。

(3) NLR-tb に会合する分子のスクリーニング
NLR-tb の機能をさらに追求するために、引き続き酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行った。NLR-tb の各ドメインをベイトとし、ヒト胎盤、マウス脾臓、マウス脳から調整されたcDNAライブラリーのスクリーニングを行った。数百の陽性コロニーが得られ、すべてシーケンスを行った。現在これらの中から実際に結合に再現が認められるか、ほ乳類細胞株内での結合確認を行っているところである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計20件)

① Kumar H, Pandey S, Zou J, Kumagai Y, Takahashi K, Akira S, Kawai T. NLR5 deficiency does not influence cytokine induction by virus and bacteria infections. J Immunol. 2011 Jan 15;186(2):994-1000. 査読あり

② Tsuchida T, Zou J, Saitoh T, Kumar H, Abe T, Matsuura Y, Kawai T*, Akira S*. The ubiquitin ligase TRIM56 regulates innate immune responses to intracellular double-stranded DNA. Immunity. 2010 Nov 24;33(5):765-76. (*corresponding authors) 査読あり

③ Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat Immunol. 2010 May;11(5):373-84. 査読あり

④ Kumar H, Kumagai Y, Tsuchida T, Koenig PA, Satoh T, Guo Z, Jang MH, Saitoh T, Akira S, Kawai T. Involvement of the NLRP3 inflammasome in innate and humoral adaptive immune responses to fungal {beta}-glucan. J Immunol. 2009 Dec 15;183(12):8061-8067.

⑤ Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. Int Immunol. 2009 Apr;21(4):317-37. 査読あり

[学会発表] (計2件)

① T. Kawai, T. Tsuchida, Z. Jian, H. Kumar, S. Akira. The ubiquitin ligase TRIM56 regulates innate immune responses to

intracellular double-stranded DNA.
The CSI-IFReC Joint Symposium on
Immunology. 2010年11月2-5日(杭州、中
国)

② H. Kumar, Y. Kumagai, T. Tsuchida, PA.
Koenig, T. Satoh, Z. Guo², MH Jang, T.
Saitoh, S. Akira, T. Kawai. Involvement of
the inflammasome in innate and adaptive
immunity to β -glucan. 14th International
Congress of Immunology. 2010年8月22-27
日(神戸)

[図書] (計2件)

① 河合太郎、審良静男 ユビキチンリガー
ゼ TRIM56 は2本鎖DNAに対する自然免疫
応答を制御する ライフサイエンス 新着論
文レビュー統合データベースプロジェクト
<http://first.lifesciencedb.jp/archives/1531>
2010年11月24日

② 河合太郎 β グルカンとインフラマゾー
ム形成 科学評論社 臨床免疫・アレルギー
科 2011, 55(1), 22-27

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

[http://hostdefense.ifrec.osaka-u.ac.jp/
ja/index.html](http://hostdefense.ifrec.osaka-u.ac.jp/ja/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河合 太郎 (Kawai Taro)
大阪大学・微生物病研究所・准教授
研究者番号: 50456935

(2) 研究協力者

① クマール ヒマンシュ (Kumar Himanshu)
大阪大学・微生物病研究所・ポスドク研究
員
(2010年6月まで協力者として参画)

② 土田 哲夫 (Tsuchida Tetsuo)
大阪大学・微生物病研究所・大学院生
(2010年3月まで協力者として参画)