

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25253032

研究課題名(和文) Toll様受容体ロジスティックスの分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular basis underlying Toll-like receptor logistics

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) 33,800,000円

研究成果の概要(和文)：Toll様受容体(TLR, Toll-like receptor)は、病原体成分を認識し、感染防御反応を誘導する。TLRは自己成分にも応答し、その制御破綻は様々な炎症病態を誘導する。本研究では、TLRの応答制御の分子基盤を解析した。その結果として、TLR応答にはTLRの細胞内移行が重要であるが、その分子基盤について解析し低分子量Gタンパク質の関与について解析した。また、TLRの細胞外ドメインのプロセシングのTLR応答における重要性、さらにDNAの認識において、DNA分解酵素DNase IIによる分解・プロセシングが重要であることも示した。TLR応答は様々なステップで制御されていることを示した。

研究成果の概要(英文)：Toll-like receptors (TLRs) sense microbial products and induce defense responses. TLRs also respond to self derived products and causes inflammatory diseases. The present study focused on the molecular mechanism regulating TLR responses. TLR trafficking in endolysosomes controls TLR responses. The roles of small GTPases in TLR trafficking was studied. We also studied the roles of: proteolytic processing of the extracellular domain of TLR9 and TLR3 in their responses; and DNase II in DNA processing for TLR9 responses. These results show that TLR responses are regulated at a variety of processes.

研究分野：免疫学

キーワード：自然免疫

1. 研究開始当初の背景

Toll 様受容体 (TLR, Toll-like receptor) は、菌体膜糖脂質、タンパク質、核酸などの病原体成分を認識し、感染防御反応を誘導する。しかしながら、TLR の病原体特異性は完全ではなく、細胞傷害や代謝障害に伴って放出される自己の脂質、タンパク質、核酸にも応答し、炎症を誘導することが示されつつある。最初のきっかけは感染症であっても、いったん組織傷害が起こると、病原体成分がなくても TLR が持続的に活性化され、慢性の炎症を誘導してしまう危険性がある。したがって感染性、非感染性に関わらず、慢性炎症疾患における炎症病態に TLR が深く関わっていることが明らかになりつつある。TLR の活性が如何に制御されているのか、その制御が破綻すると、どのような病態をきたすのか、これらの点を明らかにすることができれば、TLR を標的とする新たな炎症制御法の開発が期待できる。

2. 研究の目的

樹状細胞などの免疫細胞では複数の Toll 様受容体 (TLR, Toll-like receptor) が発現し、互いに相乗的に、あるいは拮抗的に作用しあう。TLR は病原体に加えて、自己成分にも応答し、その制御破綻は様々な炎症病態を誘導する。複数の TLR が如何に制御されているのか、まだ明らかではない。本研究では、TLR 制御の分子基盤として、TLR ロジスティックス (免疫細胞は TLR の物流を制御することで、その活性を制御している) という概念を提案する。具体的には、Unc93B1 という分子に焦点を絞る。Unc93B1 は、核酸認識 TLR (TLR3/7/8/9) に会合し、それらの輸送、局在を一手に制御する分子である。Unc93B1 が複数の核酸特異的 TLR の細胞内局在を制御している分子基盤を解明し、応答性との関係を解析することで、TLR ロジスティックスの分子基盤の一端を解明する。

3. 研究の方法

TLR7、TLR9 の局在制御機構を解析するために、TLR7、TLR9 を輸送する Unc93B1 に会合する分子の検索、同定、解析を進める。すでに GTPase である Arl8b の同定に成功しており、その解析を中心に進める。Arl8b は TLR7、Unc93B1 と複合体を形成しており、IFN 産生に重要であることが分かっている。そこで、その自己免疫疾患における役割を、Arl8b 遺伝子欠損マウスを用いて解析する。これらの解析を通して、TLR の局在制御による活性制御機構の分子基盤を解明する。

4. 研究成果

Unc93B1 に会合する分子については、質量分析を進めたが、結果として、Arl8b、Arl8a の 2 つについて解析を進めることとなった。Arl8b、Arl8a については、Conditional

Knockout マウスを作成し、Arl8b の Gene Trap マウスも含めて解析を進めた。現在、TLR7 の細胞内移行における Arl8b の役割についての解析を進めている。また、Arl8a の KO マウスにおいても、TLR7 の応答に異常があることもわかり、解析を進めている。

これらの解析に加えて、TLR9、TLR3 のプロセッシングについての解析も進めた。これまで、TLR9 については、細胞外ドメインのアミノ末端がリソソームに移行し、切断されて除去されることが、DNA 応答に重要であると報告されていた。我々は、TLR9 に対するモノクローナル抗体を作成し、TLR9 のアミノ末端の断片は切断されても C 末端断片に会合しており、TLR9 の DNA に対する応答に必須であることを報告した (1)。TLR3 についても、切断されるが、アミノ末端の断片は会合していることを報告している (6)。

さらに、TLR9 の DNA に対する応答には、DNA がリソソームの DNA 分解酵素である DNase II によって分解・プロセッシングされる必要があることも報告した (7)。この結果は最近の核酸認識についての Review でも取り上げられており、他の研究者にも認められている。

TLR7 の細胞内移行を制御する分子 Unc93B1 に D34A 変異を導入すると全身性炎症が誘導される。I 型インターフェロン (IFN) が B 細胞における TLR7 の発現を誘導することで、この炎症の誘導・維持に重要であることを報告 (12)。また、この病態には TLR7 が必須であるが、TLR7 に対するモノクローナル抗体を用いることで、この病態を制御しうることを示した (9)。

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 14 件)

1. 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.
2. ***Miyake K**, Onji M. Endocytosis-free DNA sensing by cell surface TLR9 in neutrophils: Rapid defense with autoimmune risks. *Eur J Immunol.* 2013, 43:2006-2009. doi: 10.1002/eji.201343882.
3. 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.* 2014, 26:307-314. doi:

- 10.1093/intimm/dxt071.
4. Motoi Y, Shibata T, Takahashi K, Kanno A, Murakami Y, Xiaobing L, Kasahara T, ***Miyake K**. Lipopeptides are signaled by Toll-like receptor 1, 2, and 6 in endolysosomes. *Int Immunol*. 2014. 26:563-573. doi: 10.1093/intimm/dxu054.
 5. ***Miyake K**, *Kaisho T. Homeostatic inflammation in innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 2014 30C:85-90. doi: 10.1016/j.coi.2014.08.003.
 6. Murakami Y, Fukui R, Motoi Y, Kanno A, Shibata T, Tanimura N, Saitoh SI, ***Miyake K**. Roles of the Cleaved N-Terminal TLR3 Fragment and Cell Surface TLR3 in Double-Stranded RNA Sensing. *J Immunol*. 2014 193:5208-5217. doi: 10.4049/jimmunol.193:5208-5217.
 7. Chan MP, Onji M, Fukui R, Kawane K, Shibata T, Saitoh SI, Ohto U, Shimizu T, Barber GN, ***Miyake K**. DNase II-dependent DNA digestion is required for DNA sensing by TLR9. *Nat Commun*. 2015 6:5853. doi: 10.1038/ncomms6853.
 8. Li X, Saitoh SI, Shibata T, Tanimura N, Fukui R, ***Miyake K**. Mucolipin 1 positively regulates TLR7 responses in dendritic cells by facilitating RNA transportation to lysosomes. *Int Immunol*. 2015. 27:83-94. doi: 10.1093/intimm/dxu086.
 9. Kanno A, Tanimura N, Ishizaki M, Ohko K, Motoi Y, Onji M, Fukui R, Shimozato T, Yamamoto K, Shibata T, Sano S, Sugahara-Tobinai A, Takai T, Ohto U, Shimizu T, Saitoh S, ***Miyake K**. Targeting cell surface TLR7 for therapeutic intervention in autoimmune diseases. *Nat Commun*. 2015. 6:6119. doi: 10.1038/ncomms7119.
 10. Tanji H, Ohto U, Shibata T, Taoka M, Yamauchi Y, Isobe T, **Miyake K**, Shimizu T. Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA. *Nat Struct Mol Biol*. 2015. 22:109-15. doi: 10.1038/nsmb.2943.
 11. Ohto U, Shibata T, Tanji H, Ishida H, Krayukhina E, Uchiyama S, **Miyake K**, Shimizu T. Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9. *Nature*. 2015, 520: 702–705. doi: 10.1038/nature14138.
 12. Fukui R, Kanno A, **Miyake K**. Type I IFN Contributes to the Phenotype of Unc93b1^{D34A/D34A} Mice by Regulating TLR7 Expression in B Cells and Dendritic Cells. *J Immunol*. 2016 196:416-27. doi: 10.4049/jimmunol.1500071.
 13. Shibata T, Ohto U, Nomura S, Kibata K, Motoi Y, Zhang Y, Murakami Y, Fukui R, Ishimoto T, Sano S, Ito T, Shimizu T, **Miyake K**. Guanosine and its modified derivatives are endogenous ligands for TLR7. *Int Immunol*. 2016 28:211-222. doi: 10.1093/intimm/dxv062.
 14. Tanji H, Ohto U, Motoi Y, Shibata T, Miyake K, Shimizu T. Autoinhibition and relief mechanism by the proteolytic processing of Toll-like receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Feb 29. pii: 201516000. [Epub ahead of print]
- [学会発表](計 7件)
1. 三宅健介、Mechanisms Regulating Nucleic Acid Sensing Toll-like Receptors, The 58th annual meeting of Japanese College of Rheumatology, April 24 2014, International symposium, Tokyo, Japan
 2. 三宅健介、Mechanisms Regulating Nucleic Acid Sensing Toll-like Receptors. The 9th International Symposium of the Institute Network, Molecular Targets for Diseases and Structural Life Science, Jun 19-20 2014, Osaka, Japan.
 3. 三宅健介、Mechanisms Regulating Nucleic Acid Sensing Toll-like Receptors. The 13th biennial meeting for the International Endotoxin and Innate Immunity Society, Oct 23-25 2014, Salt Lake City, Utah, USA.
 4. 三宅健介、Mechanisms Regulating Nucleic Acid Sensing Toll-like Receptors. The 11th Nikko International Symposium 2014, Inflammation, Cancer, and Microenvironment. Oct 30 2014, Jichi Med. School, Tochigi, Japan
 5. 三宅健介、Mechanisms Regulating Nucleic Acid Sensing Toll-like Receptors. China-Japan Laboratory Workshop 2014, Pathogenesis, Gene Regulation, and Signal

Transduction, 10-Year Anniversary
of Collaboration, Nov 15 2015,
Beijing, China

6. 三宅健介、Nucleic acid recognition
by Toll-like receptors, Innate
Immunity Day, May20 2015, Univ
Massachusetts 1 , Worcester, USA
7. 三宅健介、The Role of Nucleic Acid
Processing in Nucleic Acid
Sensing by Toll-like Receptors,
Toll 2015, Marbella, Spain, Sep
30-Oct 3, 2015

〔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 2002-130964
出願年月日：平成 25 年 4 月 22 日
国内外の別：国内

取得状況(計 0 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

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/kanseniden/index.html>

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
60229812

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

斉藤 伸一郎 (SAITOH, Shin-Ichiroh)
東京大学・医科学研究所・助教
90361625