

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670189

研究課題名(和文) 全身性エリトマトーデスの発症に関わるTLR7リガンドの同定

研究課題名(英文) Identification of an internal TLR7 ligand related to the onset of Systemic Lupus Erythematosus

研究代表者

齋藤 伸一郎 (Saitoh, Shin-Ichiroh)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：90361625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々が同定したsmall G proteinはTLR7刺激による1型インターフェロンの産生に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。TLR7と1型インターフェロンはどちらも全身性エリトマトーデス(SLE)の発症に関わると報告されていることから、SLEの発症モデルマウスMRL-lprでsmall G proteinノックアウトマウスの解析を行ったところ、SLEの発症が認められなかった。この結果はTLR7欠損マウス、1型インターフェロン受容体欠損マウスよりも非常に効果的に抑制されることから、我々が同定したsmall G proteinはSLEの発症に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We revealed that a small G protein we identified play a role for type 1 Interferon expression via TLR7 activation. Because it is reported that both TLR7 and type 1 Interferon are related to Systemic Lupus Erythematosus (SLE). We analyzed small G protein deficient SLE model mice, MRL-lpr. As a result, they could not be found the onset of SLE. This result is more significantly inhibited than TLR7 deficient or type 1 interferon receptor deficient MRL-lpr mice. These results indicate that small G protein we identified has an important role for the onset of SLE.

研究分野：免疫学

キーワード：全身性エリトマトーデス Toll-like receptor 7 pristane 内在性リガンド SLEモデルマウス

### 1. 研究開始当初の背景

我々は人口の約5%の人が苦しんでいるとされる自己免疫疾患の原因の解明を目指している。自己免疫疾患は、関節炎、腎炎、肝炎など様々な症状がある。それぞれにおいて根治療法が殆ど無いため、原因の解明が急務である。本研究ではマウスの腹腔へのプリスタン投与による全身性エリトマトーデス(SLE)様症状の発症に注目する。非環状イソプレノイドであるプリスタンはモノクローナル抗体の大量作製時にマウスの腹腔に投与する免疫賦活剤として使われてきた。プリスタンを腹腔に投与すると、数か月後に腎炎が起こることが報告されており、その原因は抗核抗体(抗dsDNA抗体、抗SM抗体)などの自己抗体の腎臓系球体への沈着であった。初期、プリスタン投与後2週間の時点で腹腔に炎症性の細胞Ly6C<sup>high</sup>monocyteが誘導され集積する。この初期の炎症反応において、TLR7と1型インターフェロンの産生が重要だと報告されている。我々はTLR7に特異的に会合して複合体を形成しているAr18bと呼ばれるsmall G proteinが、TLR7の機能を調節していることを研究してきた(Cellに投稿中)。プリスタン投与において見られるLy6C<sup>high</sup>monocyteの集積もTLR7ノックアウトマウス(TLR7KOマウス)、1型インターフェロン受容体ノックアウトマウス(IFN $\alpha$ 1RKOマウス)同様にAr18bKOマウスにおいても低下していた。我々の解析では形質細胞様樹状細胞がLy6C<sup>high</sup>monocyteの集積に重要な役割を果たしていることから、形質細胞様樹状細胞上のTLR7が、何に反応して1型インターフェロンを産生しているのかということが疑問となる。そして、このTLR7の反応にAr18bが重要な役割を果たしている。TLR7は、一本鎖RNAの他にadenine analogやimidazoquinoline compoundなどの比較的分子量の小さい核酸成分も認識する。それらTLR7リガンドの中で、我々の解析ではAr18bKOマウスの形質細胞様樹状細胞がRNAに対して全く反応しないことから、SLEの発症原因となるTLR7リガンドはRNAではないかと予想している。

### 2. 研究の目的

全身性エリトマトーデス(SLE)は原因の解明が必要な自己免疫疾患の一つである。症状としては抗核酸抗体の産生、腎炎などはじめとする全身性の炎症が認められる。SLEの実験モデルとして、非環状イソプレノイドであるプリスタンを腹腔に投与することにより自己免疫性腎炎を発症する系が用いられている。我々はこのモデルを用いて、SLE発症に関わる初期の炎症に形質細胞様樹状細胞が重要な役割を果たしていることを明らかにした。このモデルでは病原体の核酸成分を認識する受容体Toll-like

Receptor 7(TLR7)、1型インターフェロンが重要な原因分子として報告されている。しかし腹腔内のTLR7リガンドが何かは解っていない。本研究ではこのモデルで腹腔内のTLR7リガンドを明らかにし、SLEの原因解明の突破口とすることを目的とする。

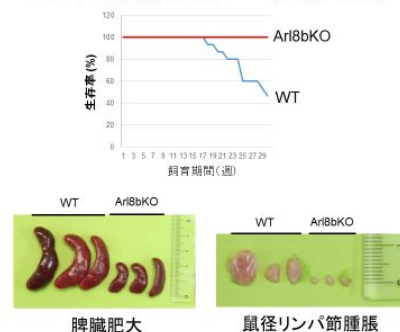
### 3. 研究の方法

我々の研究結果より、RNAがSLEの発症に重要な役割を果たしている可能性が高いので、25年度にプリスタン投与による初期の炎症反応にRNAが重要な役割を果たしているのかを検討する。腹腔内にプリスタンを投与すると同時にRNase、またはRNase inhibitorを投与したらどうなるかを検討する。そして、TLR7KOマウスにプリスタンを投与して2週間後に腹腔洗浄液を回収する。回収した腹腔洗浄液中にTLR7のリガンドが存在するのかどうかを確認し、存在していればTLR7に会合する分子の同定を質量分析法にて行う。この時、腹腔洗浄液にRNAが蓄積しているのかについても、質量分析にかけて検討する。26年度は原因となるRNA成分を同定した後、プリスタン投与後にそのRNA成分を特異的に除去、ないしは腹腔にRNA成分を投与することでSLEの発症を検討する。さらに、他のSLE発症モデルマウスでも同様のRNA成分の蓄積が起こるか検討する。

### 4. 研究成果

当初の目的であったプリスタン投与によるSLEの発症に関わるTLR7の内在性リガンドを同定することができなかった。しかし、今後も同定を続ける予定である。明らかにできた重要なことはAr18bと呼ばれるsmall G proteinがTLR7と特異的に会合するということと、Ar18b欠損マウスをSLEのモデルマウスであるMRL-lprと交配したところ、SLEが発症せず死ななかったということである(図

図1. SLEの発症モデルマウスMRL-lprマウスと交配後の生存率と脾臓肥大、リンパ節腫脹の検討



1)。さらにプリスタン投与によるSLEの発症の誘導を行っても、Ar18b欠損マウスでは全くSLEの誘導がかからなかった。つまりAr18bがSLEの発症に大きな役割を果たしているということである。

### 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 7 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.* 4: 1949, 2013.

2, Kanno A, Yamamoto C, Onji M, Fukui R, Saitoh SI, Motoi Y, Shibata T, Matsumoto F, Muta T, Miyake K. Essential role for Toll-like receptor 7 (TLR7)-unique cysteines in intramolecular disulfide bond, proteolytic cleavage, and RNA-sensing. *Int Immunol.* 25:413-422, 2013.

3, Tanimura N, Saitoh S, Ohto U, Akashi-Takamura A, Fujimoto Y, Fukase K, Shimizu T, and 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.* 26:307-314, 2014.

4, Murakami Y, Fukui R, Motoi Y, Kanno A, Shibata T, Tanimura N, Saitoh SI, and Miyake K. Roles of the Cleaved N-Terminal TLR3 Fragment and Cell Surface TLR3 in Double-Stranded RNA Sensing. *J Immunol.* 193:5208-5217, 2014.

5, Chan MP, Onji M, Fukui R, Kawane K, Shibata T, Saitoh SI, Ohto U, Shimizu T, Barber GN, and Miyake K. DNase II-dependent DNA digestion is required for DNA sensing by TLR9. *Nat. Commun.* 6:5853, 2015

6, Li X, Saitoh SI, Shibata T, Tanimura N, Fukui R, Miyake K. Muco1ipin 1 positively regulates TLR7 responses in dendritic cells by facilitating RNA transportation to lysosomes. *Int Immunol.* 27:83-94, 2015

7, 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 SI, and Miyake K. Targeting cell surface TLR7 for therapeutic intervention in autoimmune diseases. *Nat. Commun.* 6:6119, 2015

〔学会発表〕(計 2 件)

発表者：齋藤伸一郎  
日本免疫学会、幕張メッセ【千葉市】  
2013年12月11日 13日  
The Arf-like GTPase Arl8b drives TLR7

into type I interferon-mediated inflammation.

発表者：齋藤伸一郎  
第19回日本エンドトキシン・自然免疫研究会、ロイヤルオークホテル スパ&ガーデンズ 2013年12月6日 7日  
The Arf-like GTPase Arl8b drives TLR7 into type I interferon-mediated inflammation.

〔図書〕(計 1 件)

科学評論社：臨床免疫・アレルギー科  
第60巻6号596ページ【2013年】  
TLR7の反応による自己免疫の誘導とGTPase

〔産業財産権〕

出願状況(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：

取得状況(計 0 件)

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

〔その他〕

ホームページ等  
東京大学医科学研究所感染遺伝学分野  
<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/kanseniden/>  
東京大学医科学研究所 Annual report  
<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/jp/about/publication/annualreport/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者 齋藤 伸一郎  
(Saitoh, Shin-Ichiroh)  
東京大学医科学研究所・感染遺伝学・助教  
研究者番号：90361625

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：