

微生物の感染が誘導するヒト樹状細胞遺伝子群の網羅的解析

●瀬谷 司、松本美佐子、野村みどり

所属（当時）：大阪府立成人病センター研究所

研究の目的と進め方

微生物に特有の成分（PAMP）を認識するレセプター（Toll-like receptors, TLR）がハエからヒトまで普遍的に備わることが判明した。ヒトTLRは10種類のファミリーから構成され、微生物のパターン分子の認識レセプターである。これらは抗原提示樹状細胞に高く発現するが全てgermline-encodedである。従ってSNPを含めて遺伝し、種間の比較対応も可能である。本研究ではヒト樹状細胞に備わる微生物パターン認識レセプター、特にTLR群の構造・機能・細胞応答を解析し、感染による宿主変調と難治性疾患・病態の関連を分子レベルで明らかにすることを目的とする。2年間の目標は各TLRに対するモノクローナル抗体を整え、TLRのリガンド同定、分子集合体解析、樹状細胞におけるTLRの局在、分布、微生物成分との反応性を解析する。微生物応答は種間で異なるので、Genome projectの情報を基にTLRの種間の比較を行い、感染のtropismを考察する。ヒトTLRと樹状細胞応答、宿主免疫変調との関連をDNA chip, protein chip, cDNA subtractionなどの解析法で解析し、病態へのinnate immunityの関与を検討する。これらの試行をとおして疾患への創薬化を検討していく。

研究開始時の当初計画

1. 各ヒトTLRに対するモノクローナル抗体を作製し、樹状細胞上のTLR分子複合体の組成を明らかにする。方法は免疫沈降、immunoblotting, confocal analysis, 免疫電顕などを併用する。新規リガンド（PAMP）として細菌成分の他、ウィルス成分にも注目する。
2. 阻害抗体を用いてリガンド特異性、リガンド結合部位などを解明する。各TLRの発現細胞株を樹立し、レポーター遺伝子アッセイでNFκB, MAPKなどの活性化を査定する。微生物成分（PAMP）がどの応答を優位に促進するかを検索する。
3. 樹状細胞の応答には個体差が見出され、時にがん、アレルギーなどの免疫関連疾患では応答は相違しやすい。これらは患者検体を用いて解析していく必要がある。細胞生物学的な解析の他にDNA chip, cDNA subtraction, differential display, protein chipなどで解析中である。
4. TLRの種間比較を行い、相違点と微生物感受性を対比する。

研究期間の成果（できるだけ当初計画と対応させて）

1. ヒトTLR1, TLR2, TLR3, TLR6の単クローン抗体を作製した。TLR4の抗体は三宅博士（東大医科研）より恵与された。各TLRの相互関係とリガンド応答性の機能解析を行った。TLR3がウィルスのdsRNAをPAMPとして認識し、type I IFNを誘導することが判明した。樹状細胞TLR3は細胞内小器官に発現することが抗体染色で判明した。一方、TLR1, 2, 6は樹状細胞表面に局在し、細菌成分の認識によってNF-κBを活性化した。抗原提示樹状細胞にはTLR3を多く発現する population, TLR2・

4を多く発現する population が存在し、subset-specificのTLR発現プロファイルが示唆された。この結果は樹状細胞が一様の細胞群ではなく、微生物認識において多様性をもつ subsets の集合であること、RT-PCRなど従来の報告は蛋白発現と相違していることを示唆した。なお、その後TLR7, 9の抗体も作製したが、これらはリンパ球様樹状細胞に分布し、抗原提示樹状細胞には局在しないことが判明した。

2. HEK293 cellを用いた reporter gene assayでTLR2/4はNF-κB, MAPKの pathwayを優位に活性化した。一方、TLR3はIRF-3 pathwayを活性化した。PAMP/TLRの組み合わせで活性化経路が異なることが示された。TLR2/4のアダプター分子はMyD88と同定されていたが、TLR3のアダプター分子は当時同定されていなかった。その後の研究で我々はTLR3のアダプター分子を同定し、TICAM-1 (TRIF)と名付けた。TLR3がdouble-stranded RNAを認識してtype I IFNを誘導するのはTICAM-1によるIRF-3活性化を反映する。
3. 個体差についてgene chipで解析を行った。樹状細胞TLR2/4をBCG-cell wall skeletonで刺激し、BCGに特有な遺伝子を同定した (BCG-inducible genes)。TLR3をpolyI:Cで刺激し、dsRNAに特有な遺伝子を同定した (IFN-inducible genes)。12人の健常人と20人の肺がん患者でこれらのcluster解析を行った。健常人とがん患者では明確な差の出るclusterがあることが判明した。まだ、個体差を議論できるまでに至っていない。
4. Genome projectsが終了したニワトリ、サカナ（フグ）、ホヤ（カタユウレイホヤ）、センチュウについてTLRのhomology searchを行った。ヒト型のTLRはサカナに至って初めて現れ、ホヤ、センチュウには僅かのTLRしかないことが判明した。トリ、サカナのTLRがヒトTLRのfunctional orthologsに相当するかを検討中である。

国内外での成果の位置づけ

独創性の高い仕事として国内外で高い評価をうけてきた。2002年2月のkeystone meeting, 2004年の国際免疫学会では招聘講演となり、本邦のこの領域でのactivityの高さを十分に位置づけたと考えている。

達成できなかったこと、予想外の困難、その理由

細胞内発現性のTLRについて抗体阻害はできないことが判明した。当初の企画は遂行できなかった。

倫理委員会の設定などが手間取り、ヒト樹状細胞を匿名化して調整するルートを確認するのに手間取った。現在はクリアできたが、個体差検索、疾患や診断検索の遅れはそのためである。

今後の課題

1. 抗ヒトTLR抗体は大部分が機能阻害抗体である。これらは難治性疾患の治療に使えるかも知れない（国際特許申請2件）。
2. TICAM-1の過剰発現は大量のIFN-β発

現誘導に結果する。抗がん、抗ウイルスの治療に有効かもしれない（国際特許申請1件）。3. 個体間の樹状細胞応答の差、疾患と樹状細胞/TLRの関連をデータベース化する企画を進めている。このデータベースは樹状細胞の初期感染応答がその後の獲得免疫・アレルギーなどの病態修飾を左右すること、疾患対策に樹状細胞の応答解析が重要であることを示唆する。魚類以下のリンパ球をもたない動物でも感染・がんが多発しないのはTLRなどの自然免疫識別系が十分な生体防御機能を担っていることを反映する。4. Genome project からサカナがヒト型のTLR系を持つことを示したが、相違点もある。ヒトの病原微生物がサカナと異なる理由を解明する一助となるかも知れない。

成果公表リスト (2001-)

1. Inoue, N., A. Fukui, M. Nomura, M. Matsumoto, K. Toyoshima, and T. Seya. 2001. A novel chicken membrane-associated complement-regulatory protein: Molecular cloning and functional characterization of a chicken membrane SCR protein. *J. Immunol.* 166: 424-431.
2. Nishiguchi, M., M. Matsumoto, T. Takao, M. Hoshino, Y. Shimonishi, S. Tsuji, N. A. Begum, O. Takeuchi, S. Akira, K. Toyoshima, and T. Seya. 2001. Mycoplasma fermentans lipoprotein M161Ag-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2: Role of N-terminal hydrophobic portion in its multiple functions. *J. Immunol.* 166: 2610-2616.
3. Nomura, M., K. Matsumiya, M. Kitamura, A. Okuyama, M. Matsumoto, K. Toyoshima, and T. Seya. 2001. Gnostic analysis of ideopathic infertile patients with sperm-specific depletion of CD46. *Exp. Clin. Immunogen.* 18: 42-50.
4. Moriwaki, Y., N. A. Begum, M. Kobayashi, M. Matsumoto, K. Toyoshima, and T. Seya. 2001. Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin and its cell wall complex induce a novel lysosomal membrane protein, SIMPLE, that bridges the missing link between lipopolysaccharide and p53-inducible gene, LITAF (PIG7), and estrogen-inducible gene, EET-1. *J. Biol. Chem.* 276: 23065-23076.
5. Tsuji, S., J. Uehori, M. Matsumoto, Y. Suzuki, A. Matsuhisa, K. Toyoshima, and T. Seya. 2001. Human intelectin is a novel soluble lectin that recognizes galactofranose in carbohydrate chains of bacterial cell wall. *J. Biol. Chem.* 276: 23456-23463.
6. Fukui, A., N. Inoue, M. Matsumoto, M. Nomura, Y. Matsuda, K. Toyoshima, and T. Seya. 2001. Molecular cloning and functional characterization of chicken Toll-like receptors: a single chicken Toll covers multiple molecular patterns. *J. Biol. Chem.* 276: 47143-47149.
7. Shiratori, I., S. Tsuji, M. Matsumoto, M. Nomura, K. Toyoshima, and T. Seya. 2001. Molecular cloning and functional characterization of guinea pig IL-12. *Int. Immunol.* 13: 1129-1139.
8. Matsumoto, M., S. Kikkawa, M. Kohase, K. Miyake, and T. Seya. 2002. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293: 1364-1369.
9. Nomura, M., M. Kurita-Taniguchi, K. Kondo, N. Inoue, M. Matsumoto, K. Yamanishi, M. Okabe, and T. Seya. 2002. Mechanism of host cell protection from complement in murine cytomegalovirus (CMV) infection: Identification of a CMV-responsive element in the CD46 promoter region. *Eur. J. Immunol.* 32: 2954-2964.
10. Begum, N. A., M. Kobayashi, Y. Moriwaki, M. Matsumoto, K. Toyoshima, and T. Seya. 2002. Mycobacterium bovis BCG cell wall and LPS induce a novel gene, BIGM103, whose main frame encodes a 7-TM protein: identification of a new protein family having Zn-transporter and Zn-metalloprotease signatures. *Genomics* 80: 630-645.
11. Hazeki, K., H. Masuda, K. Funami, N. Sukenobu, M. Matsumoto, S. Akira, O. Takeuchi, T. Seya and O. Hazeki. 2003. TLR-mediated tyrosine phosphorylation of paxillin via MyD88-dependent and - independent pathways. *Eur. J. Immunol.* 33: 740-747.
12. Inoue, N., M. Ikawa, T. Nakanishi, M. Matsumoto, M. Nomura, T. Seya, and M. Okabe. 2003. Disruption of the mouse CD46 caused an accelerated spontaneous acrosome reaction in sperm. *Molec. Cell. Biol.* 23: 2614-2622.
13. Oshiumi, H., M. Matsumoto, K. Funami, and T. Seya. 2003. A novel adapter molecule that participates in Toll-like receptor-mediated interferon-beta induction. *Nature Immunol.* 4: 161-167.
14. Oshiumi, H., T. Tsujita, K. Shida, M. Matsumoto, K. Ikeo, and T. Seya. 2003. Prediction of the prototype of the human Toll-like receptor gene family from the Pufferfish Fugu. rubripes genome. *Immunogenetics* 54: 791-800.
15. Uehori, J., S. Tsuji, M. Matsumoto, C. Kawata, T. Takeuchi, S. Akira, I. Azuma, K. Toyoshima, and T. Seya. 2003. Simultaneous blocking of human Toll-like receptor 2 and 4 suppresses myeloid dendritic cell maturation induced by Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin (BCG)-peptidoglycan (PGN). *Infect. Immun.* 71: 4238-4249.
16. Matsumoto, M., K. Funami, M. Tanabe, H. Oshiumi, M. Shingai, Y. Seto, A. Yamamoto, and T. Seya. 2003. Subcellular localization of human Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J. Immunol.* 171: 3154-3162.
17. Oshiumi, H., K. Shida, M. Sasai, T. Fujita, M. Matsumoto, and T. Seya. 2003. Identification of the

- Toll-like receptor (TLR)-adapter that participates in TLR4-mediated interferon- β induction. *J. Biol. Chem.* 278: 49751-49762.
18. Tanabe, M., M. Kurita-Taniguchi, K. Takeuchi, K. Funami, M. Matsumoto, M. Shingai, M. Ayata, H. Ogura, and T. Seya. 2003. Up-regulation of a receptor for dsRNA, Toll-like receptor 3, in human myeloid dendritic cells via measles virus infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311: 39-48.
 19. Honda, K., S. Sakaguchi, C. Nakajima, A. Watanabe, H. Yanai, M. Matsumoto, T. Ohteki, T. Kaisho, A. Takaoka, S. Akira, T. Seya, and T. Taniguchi. 2003. Selective contribution of IFN- α / β signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 10872-10877.
 20. Akazawa T., H. Masuda, Y. Saeki, M. Matsumoto, K. Takeda, S. Akira, I. Azuma, K. Toyoshima, and T. Seya. 2004. Adjuvant-mediated tumor regression and tumor-specific CTL induction are impaired in MyD88-deficient mice. *Cancer Res.* 64: 757-764.
 21. Begum, N. A., M. Kobayashi, Y. Moriwaki, M. Matsumoto, I. Azuma, K. Toyoshima, and T. Seya. 2004. Identification of differentially expressed novel genes from BCG-stimulated human macrophages by cDNA subtraction and mRNA-differential display. *Infect. Immun.* 72: 937-948.
 22. Funami, K., M. Matsumoto, H. Oshiumi, T. Akazawa, A. Yamamoto, and T. Seya. 2004. The cytoplasmic 'linker region' in Toll-like receptor 3 controls receptor localization and signaling. *Int. Immunol.* 16: 1143-54.
 23. Kimura, Y., N. Inoue, A. Fukui, H. Oshiumi, M. Matsumoto, M. Nonaka, S. Kuratani, T. Fujita, M. Nonaka, and T. Seya. 2004. A short consensus repeat-containing complement regulatory protein of Lamprey that participates in cleavage of lamprey Complement 3. *J. Immunol.* 173: 1118-28.
 24. Tsujita, T., H. Tsukada, M. Nakao, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2004. Sensing Bacterial Flagellin by Membrane and Soluble Orthologs of Toll-like Receptor 5 in Rainbow Trout (*Onchorhynchus mikiss*). *J. Biol. Chem.* 279: 487588-48597.
 25. Sasai, M., H. Oshiumi, M. Matsumoto, N. Inoue, F. Fujita, M. Nakanishi, and T. Seya. 2005. Cutting Edge: NF- κ B-activating kinase-associated protein 1 participates in TLR3/Toll-IL-1 homology domain-containing adapter molecule-1-mediated IFN Regulatory Factor 3 activation. *J. Immunol.* 174: 27-30.
 26. Tsukada, H., A. Fukui, T. Tsujita, M. Matsumoto, T. Iida, and T. Seya. 2005. Fish soluble Toll-like receptor 5 (TLR5S) is an acute-phase protein with integral flagellin-recognition activity. *Int. J. Mol. Med.* 15: 519-525.
 27. Nakao, Y., K. Funami, S. Kikkawa, M. Taniguchi, M. Nishiguchi, Y. Fukumori, T. Seya, and M. Matsumoto. 2005. Surface-expressed TLR 6 Participates in the Recognition of Diacylated Lipopeptide and Peptidoglycan in Human Cells. *J. Immunol.* 174: 1566-1573.
 28. Oshiumi, H., K. Shida, Y. Kimura, J. Katoh, S. Ohba, Y. Tamaki, T. Hattori, N. Yamada, N. Inoue, M. Matsumoto, S. Mizuno, and T. Seya. 2005. The regulator of complement activation (RCA) locus in the chicken: Identification of the chicken RCA gene cluster and functional characterization of the RCA proteins. *J. Immunol.* 175:1724-1734.
 29. Ishii, K., M. Kurita-Taniguchi, M. Aoki, T. Kimura, Y. Kashiwazaki, M. Matsumoto, and T. Seya. 2005. Gene-inducing program of human dendritic cells in response to BCG cell-wall skeleton (CWS), which reflects adjuvancy required for tumor immunotherapy. *Immunol. Lett.* 98: 280-290.
 30. Uehori, J., K. Fukase, T. Akazawa, T. Uematsu, S. Akira, S. Funami, K. Shingai, M. Matsumoto, I. Azuma, K. Toyoshima, S. Kusumoto, and T. Seya. 2005. Dendritic cell maturation Induced by Muramyl Dipeptide (MDP) Derivatives: Monoacylated MDP confers TLR2/TLR4 activation. *J. Immunol.* 174: 7096-7103.
 31. Shingai, M., N. Inoue, M. Okabe, T. Akazawa, Y. Miyamoto, M. Ayata, K. Honda, M. Kurita-Taniguchi, M. Matsumoto, H. Ogura, T. Taniguchi, and T. Seya. 2005. A mouse model for wild-type measles virus infection: CD11c-positive dendritic cells are nidus for systemic viral spreading. *J. Immunol.* 175: 3252-3261.
 32. Okahira, S., F. Nishikawa, S. Nishikawa, T. Akazawa, T. Seya, and M. Matsumoto. 2005. Interferon- β induction through Toll-like receptor 3 depends on double-stranded RNA structure. *DNA Cell Biol.* 24: 614-623.
 33. Tsujita, T., A. Ishii, H. Tsukada, M. Matsumoto, F-S. Che, and T. Seya. 2005. Fish soluble Toll-like receptor (TLR)5 amplifies human TLR5 response via physical binding to flagellin. *Vaccine* (in press).
12. 研究成果を端的に表す図
各Toll-like receptor (TLR)と細胞応答の関係。TLR刺激で誘導される主な遺伝子のうち機能が判明したもののみを○で記載した。TLR2とMycoplasma lipoprotein, TLR2・4 とBCG peptidoglycan, TLR3とdsRNA は当研究室で解析した結果である。

