

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 自然免疫とヒト難治性免疫疾患

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名

研究代表者

瀬谷 司（北海道大学大学院先端生命科学研究院 教授）

主たる共同研究者

松本 美佐子（北海道大学大学院医学研究科 助教授）

谷田 清一（京都市地域結集型共同研究事業 新技術エージェント）

白川 太郎（京都大学、理化学研究所 教授 平成 16 年 3 月研究終了）

3. 研究内容及び成果：

### 内容

ヒト樹状細胞は CTL や NK を誘導するように特化して成熟化する、この成熟化機序に TLR シグナルが関与する、という作業仮説を証明する。我々のグループは免疫増強作用をもつ微生物成分(アジュバント)の作用機序と細胞性免疫起動の分子機構を解明してきた。ヒトに適用できるアジュバントは抗がん免疫、ウイルスワクチンなどの補強剤として需要が高い。しかし、免疫活性化(樹状細胞の成熟化、CTL や NK の活性化)の分子機構は未定である。我々は独自の系でマイコプラズマの免疫賦活化因子 M161Ag (1997 年 Nat Med)、BCG の細胞骨格(CWS)の peptidoglycan (PGN)(2000 年 Infect Immun)、polyI:C を TLR アゴニストと同定し、アジュバント機能を樹状細胞 TLR 応答として明らかにしてきた。本研究では TLR とアダプターの分布・機能と細胞応答系の連携を単クローン抗体、RNAi、DNA chip などで解析した。得られた結果をがん、ウイルス感染などの樹状細胞応答に反映させ、難治性免疫疾患の病因・病態の解明に反映させることを目指した。

### 成果

#### (1) ヒト TLR に対する単クローン抗体の作製

研究開始当時、Flow cytometer や免疫沈降を行なえるヒト TLR に対する抗体は開発されておらず、これらの局在・分布が RT-PCR の情報のみであった。本研究ではヒト TLR1、TLR2、TLR3、TLR6、TLR7、TLR8 の単クローン抗体を作製した。これらの抗体を用いてヒト樹状細胞(骨髄性(mDC)と plasmacytoid (pDC))の TLR の分布と局在を明らかにした。TLR1、2、3、6 の抗体は機能を阻害したのでこれらの抗体をヒト TLR のリガンド認識プロフィールの同定に用いた。ヒト TLR はマウス TLR と同様の特性を持つことが判明した。抗体をプローブとして TLR 活性部位のマッピングを行なっている。

#### (2) IFN 誘導性の TLR アダプター分子の同定

TLR3 が dsRNA のレセプターとして IFN 誘導に関与することが判明していた。当時アダプター分子は MyD88、Mal/TIRAP 以外知られていなかった。我々は TLR3 のアダプター分子として TICAM-1 を同定し、IFN 誘導機能を明らかにした。さらに TLR4 のアダプター分子として TICAM-2 を同定し、TLR4 の IFN 誘導性アダプター分子が TICAM-2/TICAM-1 複合体であることを証明した。

TICAM-1 の下流分子を yeast two-hybrid、免疫沈降、differential display、genechip などで同定を試みた。TICAM-1 は N 末部位に NAPI1、TRAF2 が、C 末部位に RIP1 が結合することが判明した。TICAM-1 下流分子として TRAF6、TRAF3、FADD などの報告もあり、アポトーシス経路との関連も示唆された。これらの分子情報か

ら TICAM-1 のエフェクター誘導経路の探索を行なっている。

### (3) TLRs による CTL, NK 誘導性の樹状細胞成熟化

各種 TLR アゴニスト(アジュバント)、樹状細胞とマウスを用いて以下のことを明らかにした。mDC の MyD88 経路を活性化するアジュバントとして BCG-CWS、TICAM-1 経路を活性化するアジュバントとして polyI:C を用い、アジュバントの抗がん活性査定系を確立した。既成物の他、これらの合成物で毒性の少ないものも開発した(特許申請済)。BCG-CWS は TLR2/4-MyD88 依存性に担がんマウスにがん特異的 CTL を誘導した。一方、polyI:C は TLR3-TICAM-1 依存性に担がんマウスに抗がん NK を誘導した。以上の結果と樹状細胞の dsRNA 認識は CTL 誘導に必要な(Reis e Sousa らによって報告された)cross-priming を誘起する、という報告を総合すると TICAM-1 の下流経路を解析すると樹状細胞成熟化(CD83/86 発現上昇)、樹状細胞依存性の NK 活性化、CTL の誘導の分子機構が明らかになる。この分子機構を解明すればエフェクター特異性を持ったアジュバント開発が可能になる。がん・感染症対策に樹状細胞のワクチンアジュバントは必須である。特異性・目的性の高いアジュバントを開発し、臨床応用を目指す。

### (4) ウイルス感染と RNA 応答

2 重鎖 RNA はウイルス特有のパターン分子であり、樹状細胞に直接感染すると RIG-I/MDA5-IPS-1 に検知される。ウイルス感染による RIG-I/MDA5-IPS-1 依存性の NK 活性化は強くない。NK 活性化を強く誘導するには他細胞の 2 重鎖 RNA が樹状細胞に取り込まれて TICAM-1 経路を活性化する必要がある、と結論した。2 重鎖 RNA の認識レセプターは細胞質内も含めて複数あるが、TLR3-TICAM-1 のエンドソーム系は細胞性免疫の起動のために特殊化したものと云える。

ウイルス感染で dsRNA 産生が IFN を誘導する可能性を検討した。麻疹ウイルス(negative-strand RNA virus)で TICAM-1 経路ではなく、RIG-I/MDA5-IPS1 経路で type I IFN 誘導が起きた。この IFN 誘導は感染後 3h 以内(複製開始前)であった。IFN はウイルス複製時の dsRNA に起因するのではなく、ウイルス粒子が標的細胞と融合するときに持ち込まれる因子によって誘導される。この因子を同定したところ、defective interference (DI) RNA であった。Laboratory-adapted/vaccine strains は DI RNA を持つために IFN を誘導して弱毒性となり、wild-type strains はこれを持たないために病原性であると推定した。この点を CD46/CD150 TG「はしかにかかると」マウスで検討する予定である。他に RSV ウイルス、インフルエンザウイルス(mononegavirus)と IFN と病原性の関係も解析している。

### (5) サカナ TLR の検討

本報告ではサカナ(フグ、ニジマス、メダカ)が基本的にはヒトと極めて近い TLR 系を保持し、モデル動物として使用可能なことを提唱した。モデル系があれば微生物環境と生体防御機構の関係を集団で解析できる。分子論的解析はマウスで確認する必要があるが、サカナ TLR の解析系を立ち上げる基礎資料を用意した。

### (6) TLR 刺激と genechip, SNP 解析

各種 TLR アゴニストを用いて個々の TLR 特有の樹状細胞応答をパネル化している。まだ、解析が完成していない。IFN-inducible genes 以外に TLR3、TLR2 に特有な遺伝子群が樹状細胞の特異応答と関与するというデータを集積中である。

白川らは TLR 系の SNP 解析を行ない、自然免疫のアレルギーとの関係を data base 化する企画を提唱したが、3 年で中断した。谷田らは放線菌由来の微生物パターン分子 TAN(lipopeptides)を合成し、ヒトへ適用できるアジュバントの開発を目指した。これらは BCG-CWS より副作用(皮膚糜爛)が軽く MyD88 依存性の CTL 誘導を

十分高く誘導する。担がんマウスにも有効であった。TAN の臨床応用への展開を考えている。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

本研究では、1)ヒトTLRに対する各種モノクローナル抗体の作製とそれを用いたヒトTLRの解析、2)TLRアダプター分子(TICAM1、TICAM2)の発見とそれによるシグナル選別、3)新規アジュバントによるNK、CTL 活性化型樹状細胞(DC)の誘導および腫瘍退縮効果など、大きなブレイクスルーには至らなかったが着実に成果を挙げてきた。有効ながんのアジュバント免疫療法の開発には、解決すべき課題は多く、今後の研究の進展を期待したい。

これらの研究成果は、論文発表(海外90件、国内40件)、口頭発表(ポスター発表を含む:海外32件、国内112件)、招待講演(海外21件、国内12件)として発表している。Nat Immunol、Proc Natl Acad Sci USA. 等の質の高い国際誌や国際会議で優れた成果を発表している。特許は国内6件、海外3件を出願した。

下記はその中の特筆すべきものである。

- 1) TLR経路のうち2重鎖RNA認識に関与するアダプターと分子情報系を中心に樹状細胞の誘導する細胞性免疫応答を解析し、樹状細胞によるNK活性化はTLR3/TICAM-1(TRIF)経路に起因することを明らかにした。
- 2) ヒト自然発生がんに対するアジュバント免疫療法の確立を目指した。その結果、①ワクチンアジュバントとして副作用が少なく簡便に投与できる免疫活性化因子の開発、②アジュバントとして抗体産生、CTL誘導、NK活性化などを選択的に誘導できる合成物の開発、③がん、ウイルス感染など疾患に適用できる低毒性のTLR stimulator、などを提示することができた。
- 3) BCG-CWSがMyD88経路のみを活性化するアジュバントなのでNK細胞を活性化しない。この点を補完したアジュバントとして核酸組成のアジュバントを開発した。

##### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

本研究では、アジュバントを用いての腫瘍退縮効果をTLR3、TLR2/4のリガンドを用いて解析し、NK、CTL 活性化型樹状細胞の誘導など、着実に成果を挙げた。自然免疫がNK活性化も支配することを初めて解明した。CTL、Treg、抗体産生などの獲得免疫の他にNKも樹状細胞のTLRによって活性化される。この経路にTICAM-1(TRIF)が関与し、RIG-I/MDA5-IPS-1は主に内因性のRNA複製のセンサーとしてtype I IFN誘導に関与することを明らかにした。

この研究成果を踏まえ、がんのアジュバント免疫療法、樹状細胞療法への応用を目指して進められている。現在、BCG-CWSの問題点であるNK細胞を活性化しない点を補完したアジュバントを開発し、近く臨床試験が計画されている。特許はTLRアゴニストのアジュバント開発についての案件をまとめた。現在ヒトに用いて有効なアジュバントが無い場合、ワクチン療法、抗がん免疫療法などに限界がある。ヒトに有効なアジュバントの開発が求められる所以である。有効ながんのアジュバント免疫療法の開発には、解決すべき課題は多いが、本研究で得た成果が社会還元できるように今後の応用に向けた研究が進展することを期待したい。

##### 4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

自然免疫を題する国際シンポジウムとして2006年「第26回札幌国際がんセミナー」を企画、主催した。瀬谷は2004年2月、大阪府立成人病センター研究所から北海道大学大学院医学研究科に赴任した。受賞関係で特記すべきことはない。