

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「免疫難病・感染症等の先進医療技術」
研究課題「自然免疫とヒト難治性免疫疾患」

研究終了報告書

研究期間 平成13年12月～平成19年3月

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)

1. 研究実施の概要

免疫増強作用をもつ微生物成分をアジュバントと総称し、抗がん免疫、ワクチンなどの補強剤としてヒトにも実用されてきた。長い間アジュバントの作用機序は分子レベルで科学的解析がなされなかった。近年、自然免疫の微生物認識の分子機構の研究から細胞性免疫の起動には抗原以外に微生物特有のパターン分子による活性化シグナルが必要なことが判明してきた。Janeway らがパターン分子のレセプター、Toll-like receptor (TLR)をパターン認識レセプターと同定した 1997 年の報告がきっかけとなった。アジュバントの細胞性免疫起動の分子機構を解明すれば免疫関連の難治性疾患の制御機構の解明に大きく寄与することが期待された。本研究はアジュバントの作用機序を解明し、難治性免疫疾患の治療に適用することを目指して開始した。我々のグループは独自の系でマイコプラズマの免疫賦活化因子をM161Agとして同定し(1997 年)、これがTLR2リガンドであることを証明してきた(2001 年)。また、ヒトに使われてきたアジュバントBCGの細胞骨格(CWS)のpeptidoglycan (PGN) がTLR2/4のリガンドであることも証明した(2000 年)。即ちアジュバントはTLRアゴニストである。本企画の開始時点(2002 年)、自然免疫のパターン認識レセプターの機能同定が KO マウスを使った審良研によってなされ、凄まじい研究潮流の勢いが世界を席卷していた。報告者はヒト樹状細胞のToll-like receptor (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。自然免疫が如何にして免疫増強のアウトプットをもたらすかを分子論的に推敲し、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。以下に要点を統括する。

1-1. ヒトTLRの局在と分布

抗原提示の促進とNK 活性化が細胞性免疫の主な活性化発現で樹状細胞の成熟が発端となる。樹状細胞のTLRと活性化の関連を理解するため、樹状細胞のTLRレパトワを解析する必要があった。開始時点でヒトTLRの特異抗体は開発されていなかった。我々は各ヒトTLRの単クローン抗体を作製することに着手した。ヒトTLR1, TLR2, TLR3, TLR6, TLR7, TLR8 の抗体を作製した(表 1)。TLR4, TLR9 は他のグループで作製された。TLR5 は樹状細胞に殆ど検知できなかったのでウサギのポリクローナル抗体を作製した。ヒト樹状細胞は骨髄性(mDC)とplasmacytoid (pDC)がsubset の代表である。ヒトmDC はTLR2 subfamily (TLR1, 2, 6), TLR4 を細胞表面に発現し、TLR3, TLR7, TLR8 を細胞質内オルガネラに発現した(表 2)。ヒトpDCはTLR7, TLR9 を細胞内に発現した。この時点でTLR7, 9 は核酸認識TLRでpDCのtype I interferon (IFN) 応答を誘起することが報告された。また、pDCはIFN 誘導の主役であるが、抗原提示能は極めて弱いことが報告された。抗原提示は概ね mDCによって果たされる。我々はmDCのTLR分布(表2)からTLR2/4, TLR3 のアゴニストをmDCの刺激剤として選択し、mDCの活性化機構を比較解析することを企画した。

1-2. IFN を誘導するTLR シグナル

2001 年からTLR3 がdsRNAのレセプターとしてIFN 誘導に関与すること、MyD88とは別なアダプターがTLR3 シグナルをサポートすることが当研究室で明らかになった。我々はTLR2/4 はMyD88 アダプターのシグナル系を使って樹状細胞を活性化するが、TLR3は異なったアダプターとシグナル系で樹状細胞を異なった活性化状態に導くと仮定し、このアダプターを同定することを企画した。Yeast two-hybrid 系を立ち上げ、TLR3 の細胞内ドメインに結合する蛋白質を同定し、TICAM-1 と名付けた。TICAM-1 は単独強制発現でもtype I IFN を誘導した。また、TLR3 のpolyI:C 刺激によるIFN 誘導を完全に説明した。しかし、TLR4 の細胞質内ドメインにTICAM-1 は結合せず、TLR4のIFN 誘導活性はTICAM-1のみで説明できなかった。TLR4結合性のアダプターを探索し、TICAM-2を得た。TLR2 はMyD88アダプターのみを使うのでIFN を誘導できないのに対し、TLR3はTICAM-1 アダプターを、TLR4はMyD88 経路以外にTICAM-2/TICAM-1 アダプターを使い、そのためにIFN を誘導することが判明した。

1-3. 各種アジュバントによる樹状細胞の成熟化の多様性

TLR3 のアジュバント、polyI:CとTLR2/4 のアジュバントBCG-PGN はそれぞれTICAM-1 経路、MyD88 経路を使って樹状細胞を活性化する。では、これらの経路は如何なる性質の樹状細胞を誘導するのか？これ以降の分子論的展開はヒトのマテリアルでは不可能のため遺伝子欠損マウスの系を用いた。MyD88 欠損マウスは審良研から恵与を受けた。TICAM-1 欠損マウスは新規に作製した。マウスはback-cross を>10 代行い、C57BL/6 の背景に統一した。他にPKR $-/-$ 、IFN- β $-/-$ 、IFNAR $-/-$ のC57BL/6 マウスは谷口維紹研より恵与を受けた。In vivo で移植腫瘍系とウイルス感染系を取り入れてアジュバントによる樹状細胞の変調機構を解析した。また、結果をin vitro の細胞傷害アッセイで確認した。担がんマウスの移植腫瘍系の結果が先行したので、完成度の高い「樹状細胞TLRと抗がん免疫」の仕事を記載する。

BCG-CWSは担がんマウスにがん特異的CTLを誘導する。しかし、MyD88 欠損マウスはBCG-CWSの腫瘍にたいするCTL誘導に不応答となった。MyD88 遺伝子導入した樹状細胞はCTL誘導と抗がん活性を強く誘起したため、樹状細胞のMyD88がCTL誘導を起動すると結論した。

一方、polyI:Cは担がんマウスに抗がんCTLを誘導する。TICAM-1 欠損マウスはpolyI:Cの抗がん活性に不応答となった。TICAM-1 欠損の樹状細胞はNK 活性化能を著しく損なった。TICAM-1 の遺伝子導入によって樹状細胞は抗がんNKの活性化を指向した。以上から樹状細胞のTICAM-1 がNK 活性化を起動すると結論した。2重鎖RNAの認識レセプターは細胞質内にもRIG-I/MDA5 を含めて複数あるが、TLR3-TICAM-1 のエンドソームdsRNA認識はNKと(Reis e Sousa らによって報告された)CTLの誘導に寄与する点で細胞性免疫の起動のために特殊化したものと云える。

表1. ヒトTLRとその単クローン抗体

huTLR	Amino acids	Mr. Wt.	mAb	Adapters	Ligands	Modes	Chrom
TLR1	786	85 kDa	TLR1. 136	M-1/M-2	triacyl BLP	M-type	4p14
TLR2	784	82 kDa	TLR2. 45	M-1/M-2	PGN, BLP	M-type	4q32
TLR3	904	110 kDa	TLR3. 7	T-1 (M-1)	dsRNA	T/M-type	4q35
TLR4	839	95 kDa	HTA125	M-1/M-2 T-1/T-2	LPS, Taxol RSV-F	M/T-type	9q32
TLR5	858	95 kDa	-	M-1	flagellin	M-type	1q41
TLR6	796	89 kDa	TLR6. 127	M-1/M-2	diacyl BLP	M-type	4p14
TLR7	1049	118 kDa	TLR7. 99	M-1	ssRNA	M/T-type	Xp22
TLR8	1059	112 kDa	TLR8. 360	M-1?	ssRNA	M/T-type	Xp22
TLR9	1032	120 kDa	-	M-1	CpG DNA	M/T-type	3p21

M-1, MyD88; M-2, Mal/TIRAP; T-1, TICAM-1; T-2, TICAM-2; M-type, MyD88-dependent NF- κ B activation pathway; T-type, IRF-3/IRF-7-mediated type I IFN inducing pathway.

表2. 単クローン抗体によるヒトTLRの分布解析

DC subsets ³⁾	monoclonal antibodies against:							
	TLR1 ²⁾	TLR2 ²⁾	TLR6 ²⁾	TLR4 ²⁾	TLR3 ¹⁾	TLR7 ¹⁾	TLR8 ¹⁾	TLR9 ¹⁾
Mon-derived	+	++	+	+	++	-	++	-
Plasmacytoid	-	-	+	-	-	++	-	++
Neutrophil	+	+++	+	+	-	-	-	-

1) 核酸認識性 TLRは細胞内に分布する

2) 微生物産物認識性TLRは原則的に細胞外に分布する

3) TLRsは T and NK 細胞にも分布するが、その機能は不明である

1-4. TLR系の分子進化と動物モデルの開発

自然免疫はハエからヒトまで存在し、普遍的な生体防御機構と位置づけられてきた。TLRによるNF- κ Bの活性化機構は種を越えて保存されるらしい。しかし、type I IFNの分布は脊椎動物に限られる。TLRの原型 (prototype) をゲノムの分かった動物の分子進化から遡って調べた。ヒト型のTLRとアダプターはサカナと無顎類まで遡って同定できた。しかし、無脊椎動物にはヒト型の機能が推定されるTLRを同定できなかつた。TLRの生体防御機構をハエなどのモデル系で構築できるかを考察した論文は多い。だが、LRR + TIRの分子構造を持つ微生物認識系は多細胞生物種の分子進化の中でスポラディックに現れる。たまたま双翅類と哺乳類に現れたTLRが共通の分子構造と機能を持った可能性が高い。パターン認識の分子機構は両者で相同ではない。ヒトのTLR系はゲノム解析から脊椎動物の祖先に原型が宿ったと理解するのが妥当である。我々はサカナでTLR-樹状細胞が起点となる感染系を構築する可能性を考えることにした。

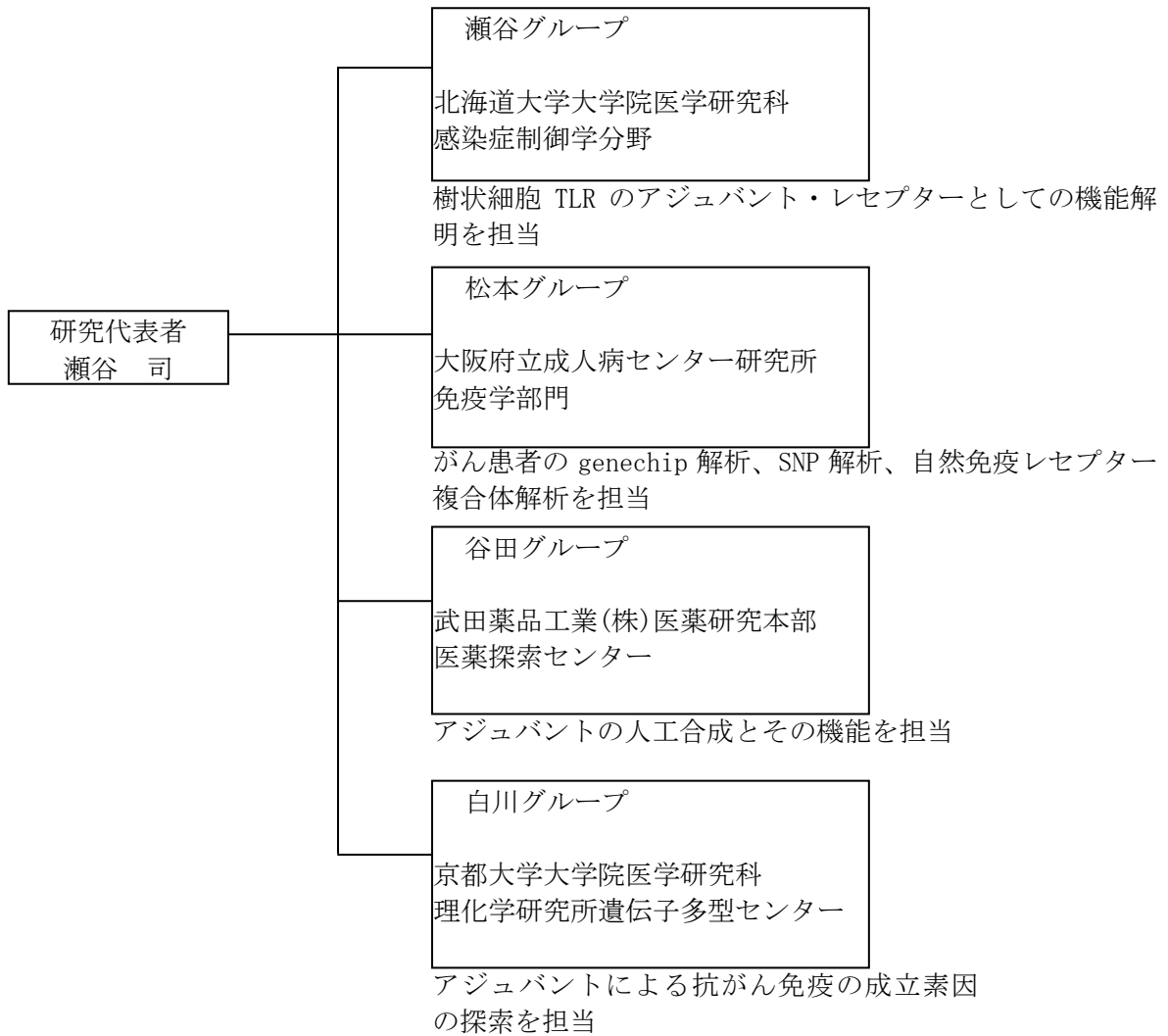
2. 研究構想と実施体制

2-1. 研究構想

本研究の基本構想は: a. 自然免疫の分子機構を解明する, b. これを生体防御機構の中で獲得免疫とともに位置づけ, ヒトの病態解明, 健康の保持にフィードバックする, ことである。この構想に合わせてがん, ウイルス疾患, アレルギーなどを微生物成分のレセプター応答として解析し, 病態解明への貢献を目指した。また, 抗がん活性を持つとされるアジュバントの作用機序を解明することを目指して研究を開始した。

各研究の作業仮説と具体的な対応を記載する。1. アジュバントに固有のレセプター (TLR) が存在し, 樹状細胞の発現する TLR のレパトワによって応答性が決まること。この検証のためにヒト TLR の単クローン抗体を作製し, 分布と局在を明らかにした (Review 9)。2. シグナルと細胞応答の選択には TLR 下流のアダプター分子が鍵になること。特に type I interferon (IFN) 誘導性のアダプター分子, TICAM-1 (TRIF) と TICAM-2 (TRAM) を最初に同定し, 機能を明らかにしてきた (Review 6)。3. アジュバントはエフェクター誘導の選択性に深く関与すること。In vivo アッセイ系として担がんマウスの腫瘍退縮系でアジュバントに応じたエフェクター (NK, CTL) の誘導と腫瘍の退縮が起きるかを検討した (Review 10)。さらに外因性に投与したがん抗原ペプチドとアジュバントに対し, 樹状細胞が CTL を誘導する in vitro の系を作成して確認した。抗原提示樹状細胞 (mDC) の TLR2/4 刺激が樹状細胞の MyD88 依存性に cross-priming と CTL 誘導に必要な因子を活性化すること, mDC の TLR3 刺激は 樹状細胞 TICAM-1 依存性に抗がん NK 活性化を誘起すること, を示してきた。これらの系を用いてがん, ウイルス疾患で mDC の抗原提示-cross-priming に関与する TLR 経路と NK 活性化の TLR 経路が異なるシグナル系 (異なった分子カスケード) を選択することを検証しつつある。4. TLR 機能解析のためにマウス以外の動物モデルが必要なこと。TLR 系の起源は脊椎動物の祖先に遡り, サカナに原型が保存される (31)。無脊椎動物には哺乳類のモデルとしての生体防御系 (TLR 系, 獲得免疫, IFN 誘導経路) は無い。サカナでモデルができれば感染環境や発がん頻度が定量化できる。個室に近いケージで飼うマウスでは自然発生がんや感染症と環境因子の関係・頻度は見る研究に限度がある。また, サカナを使えばシステムバイオロジーの手法を導入でき, ウイルス dsRNA 認識の細胞内レセプター (RIG-I, MDA5) と TLR3 の dsRNA 認識経路の機能的相違の解析も焦点化する。がんの種類, ウイルスの種類によって如何なる相違が見られるかも検討できる。本研究では手技として, モノクローナル抗体の作成 (抗ヒト TLR) とそれらを用いた分子複合体の解析法, yeast two-hybrid, siRNA を用いた knockdown 法 (ヒト細胞), cDNA subtraction, differential display, genechip などを採用した。対象は主に樹状細胞, 分野としては分子生物学, 蛋白生化学, 免疫学, bioinformatics の知識と方法論を駆使した。また, パターン認識レセプターとしては TLR 以外に貪食レセプター (lectin, ウイルスレセプター, 補体レセプターなど) も視野に入れた。

(2)実施体制



3 研究実施内容及び成果

3-1. 瀬谷グループ、松本グループ

3-1-1. 研究実施内容及び成果

3-1-1-1. ヒト TLR 単クローン抗体の作成と分布、機能阻害

ヒト TLR の抗体を作成し(表 1)、各細胞の分布を FACS、Confocal で染色解析した。TLR4, 9 のみは市販抗体を用いた。Monocyte-derived DC (mDC), plasmacytoid DC (pDC)について表 2 の結果を得た。これまで TLR は message のみの推測結果であったが、本研究でヒト樹状細胞における各 TLR 蛋白質の発現と局在を証明できた。mDC において TLR1, 2, 4, 6 は主に細胞表面に分布したが、TLR3, 8 は細胞内のオルガネラに局在した。pDC はこれら TLR を発現せず、代わって TLR7, 9 を細胞内に発現した。即ち、核酸認識性の TLR (3, 7, 8, 9)は細胞内のオルガネラに局在すること、他の微生物産物認識性の TLR (1, 2, 4, 6)は細胞表面に大部分が局在することが判明した(表 2)。樹状細胞はサブセット特異的な TLR の発現プロフィールをもつ。

TLR3 は抗原提示樹状細胞、mDC が発現する核酸認識 TLR の代表である。抗体による分布検索では mDC の他に上皮細胞が TLR3 を発現した(20,35)。PolyI:C またはある種の RNA 誘導体(特許出願済)がその人工リガンドになりうることを判明した。樹状細胞 TLR3 の局在をオルガネラマーカーとともに共焦点レーザー顕微鏡で調べた(図 1)。TLR3 は一部が early endosome マーカーと共局在することが判明した(42)。TLR3 は細胞表面には発現しておらずリガンド認識の場は endosome であると推定した。この点を経時観察可能なヒト上皮系の細胞で確認した。胆管上皮 (BEC-3), 気道上皮 (MRC5), Hela cell (図 1,2)で TLR3 は endosome の他に細胞表面にも発現していた(59)。TLR3 と polyI:C は細胞内 endosome に共局在した(図 3)。予想に反して、細胞表面の TLR3 はこの polyI:C 認識には関与しなかった。以上の結果は polyI:C を細胞表面で補足し、endosome TLR3 に運ぶ TLR とは別のレセプターが存在することを強く示唆する(54)。このレセプターを同定して始めて外因性の dsRNA の TLR3 認識経路が完成する、と考えている。また、上皮系の表在性 TLR3 の役目も今後の研究に委ねられる。

TLR2 は抗原提示樹状細胞、mDC が発現する細菌成分認識 TLR の代表である。TLR2 は TLR6 と共に diacyl lipoprotein を、TLR1 と共に triacyl lipoprotein を認識することが KO マウスの解析から報告された。ヒト樹状細胞 TLR1, 2, 6 は全て細胞表面でリガンド認識を行なった。ヒト TLR1, 2, 6 に対する抗体は全て機能阻害抗体であったので、TLR の組み合わせによる lipoprotein 認識を抗体阻害で調べた。阻害効果は TNF- α , IL-6 などサイトカイン誘導、樹状細胞成熟化 (CD83, CD86) で査定した。阻害結果は KO マウスの結果に一致し、ヒト TLR2, 6 で diacyl lipoprotein (MALP-2) を、TLR2, 1 で triacyl lipoprotein (Pam3) を認識することが判明した(47)。共焦点と免疫沈降の実験から TLR2 は TLR1 または TLR6 と細胞表面でクラスターを作りリガンド認識を行なうことが判明した(図 4)。一方、peptidoglycan (PGN) は

TLR2 の発現のみで(TLR1, 6 の有無に拘らず)樹状細胞を成熟化することが判明した(図 5)。ヒト末梢血細胞の抗体検索を行うと種々のリンパ球、マクロファージなどが TLR2 とともに TLR1, 6 を発現していた。

マウス TLR4 は LPS 認識のレセプターである。LPS 刺激によって転写因子 NF- κ B と IRF-3 が活性化すると報告された。ヒト TLR4 は LPS 刺激で同様に 2 つの転写因子を活性化した。しかし、TLR2/4 のリガンド BCG-PGN は IRF-3 を殆ど活性化せず、樹状細胞でも type I IFN の誘導も起こさなかった(50)。後に lipopolysaccharide-binding protein (LBP) が TLR4 と複合体を作ることが IRF-3 の活性化に必要と判明した。LPS は LBP と複合体形成するが、BCG-PGN は LBP と複合体形成しないから IRF-3 を活性化できない。ヒト末梢血細胞の抗体検索を行うと種々のリンパ球、マクロファージなどが TLR4 陽性であった。

他の TLR については特異抗体を用いて現在解析を続けている。

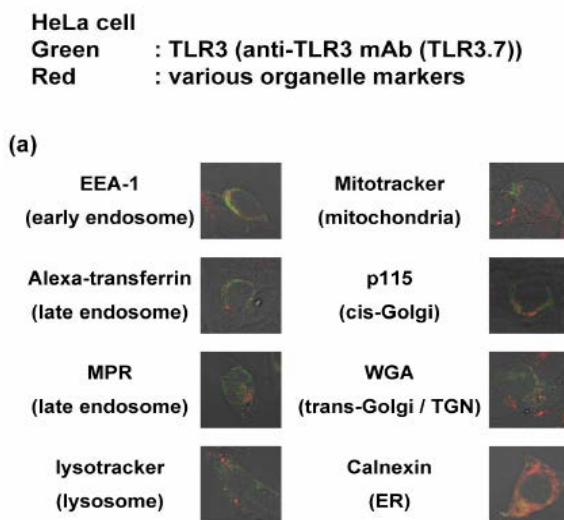


図 1. 内在性ヒト TLR3 の局在

ヒト TLR3 の抗体(TLR3.7)を緑(FITC)標識し、各オルガネラマーカー(赤)と共局在を見た。EEA-1 と部分マージが見られた。

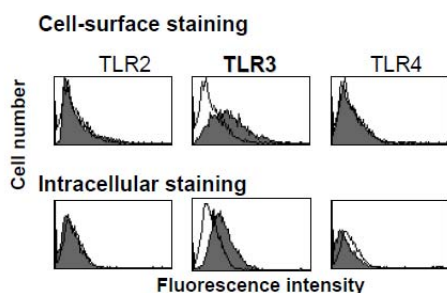


図 2. ヒト上皮細胞における TLR3 の発現

ヒト上皮系細胞 MRC-5 は FACS で細胞表面(上パネル)と細胞内(下パネル)に TLR3 を発現した。BEC3 (胆管上皮細胞)、FS4 (気道上皮細胞)、HeLa でも同様の結果を得た。ヒト樹状細胞は細胞内に分布した。

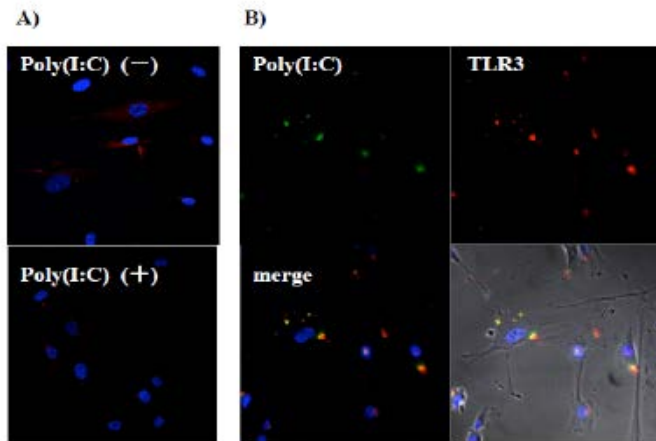


図3. ヒト TLR3 と polyI:C の共局在
ラベルした polyI:C は TLR3 と同一の endosome に搬入されている。細胞は気道上皮細胞。

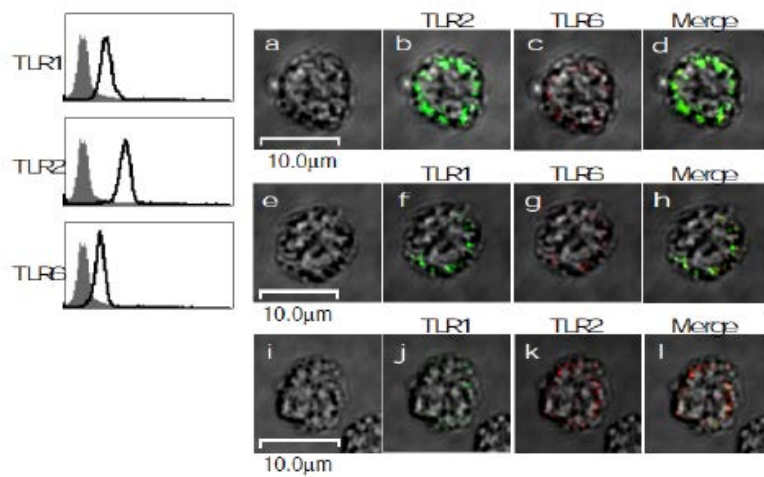


図4. ヒト TLR2 ファミリーの細胞膜上の局在
HEK293 細胞に TLR2, TLR6(上パネル)、TLR1, TLR6(中パネル)、TLR1, TLR2(下パネル)を発現させて共焦点レーザー顕微鏡で局在を見た。それぞれが膜上でクラスターを形成し、部分マージすることが判明した。左は FACS の細胞表面の発現解析。

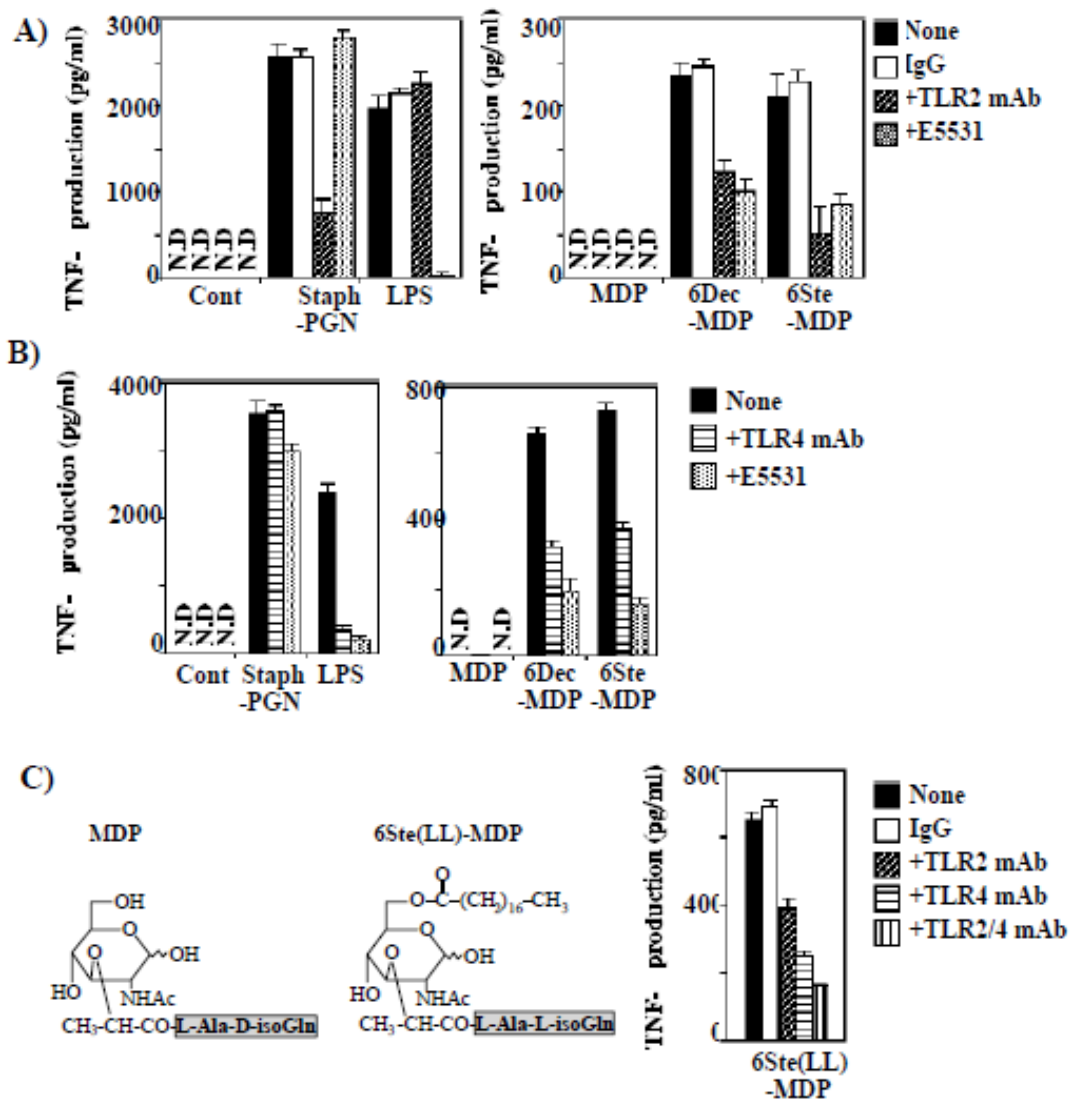


図5. ヒト TLR2 阻害抗体による PGN とのそ活性中心の機能阻害

パネル A: ヒト樹状細胞を Staph (Staphylococcus) PGN または LPS で刺激すると TNF- α が分泌され、TLR2 抗体または LPS 阻害剤 E5531 でそれぞれ阻害された(左図)。BCG の TLR 活性中心、Monoacyl MDP(6Dec-, 6Ste-MDP, パネル C 参照) は TLR2, E5531 両者によって阻害された。パネル B: Staph PGN は TLR4 抗体、E5531 どちらも TNF- α 誘導活性は阻害を受けず LPS は両方で阻害を受けた。Monoacyl MDP も両方で部分阻害を受けた。パネル C: Monoacyl MDP の L 体の抗体機能阻害も確認した。

3-1-1-2. TICAM-1, TICAM-2 の IFN 誘導シグナル

TLR3 は polyI:C 刺激によって type I IFN を誘導する。Type I IFN の起点はその当時不明であった。IRF-3 が転写因子として IFN- β のプロモーターを活性化することが報告されていた。我々は TLR3 の下流に IRF-3 を活性化する経路があると考え、下流分子を yeast two-hybrid で収集することを試みた。TLR3 の細胞内ドメインを bait にしてヒトの肺細胞のライブラリーから結合分子の cDNA を釣り上げた。Yeast で再テストして残ったクローンは TLR3 のみに結合し、他の TLR には結合しなかった。完全長の cDNA を RACE 法で補完して 1 次構造を決定した。この分子は TIR (Toll-IL-1 homology domain) を含む 712 アミノ酸の細胞内蛋白質であった。我々はこの分子を TIR-containing adapter molecule-1 (TICAM-1) と名付けた(30)。同時期に報告された TRIF と同じものであった。TICAM-1 はこれまで報告された MyD88, Mal/TIRAP のいずれとも構造的に異なる TLR3 に特有のアダプター分子と推定された(図 6)。TICAM-1 はヒト上皮細胞に単独発現で高い IFN- β を誘導した(図 7)。また、polyI:C による TLR3 の IFN- β 誘導を増強した。TICAM-1 発現、polyI:C 刺激ともに IRF-3 の活性化に帰結した(30)。このことは TLR3-TICAM-1 の経路が TLR の IFN- β 誘導の起点になることを示唆した。

TLR4 も LPS 刺激で type I IFN を誘導することが知られていた。LPS 依存性の IFN 誘導も TICAM-1 の発現で増強することが判明した。しかし、TLR4 の細胞内ドメインに TICAM-1 は結合しなかった。TLR4 結合性のアダプターを yeast で検討したところ、別な未報告の TIR を持つ分子が同定できた(36)。この分子を TICAM-2 と名付けた(図 6)。TICAM-2 は 235 アミノ酸からなるアダプター分子で TLR4 のみに結合した。TLR4-TICAM-1 の結合は証明できなかったが TICAM-2-TICAM-1 結合は免疫沈降で証明できた。TICAM-1 発現、TICAM-2 発現 + LPS で IRF-3 の活性化が増強した。以上から TLR から IFN- β 誘導に向かう経路に 2 つのアダプターが関与し、ともに既報の 2 つのアダプター、MyD88, Mal/TIRAP とは異なった構造を有し、type I IFN の誘導に関与することが判明した(36)。TICAM-2 は同時期に報告された TRAM と同じ分子である。

これまで TLR2, TLR4 結合性のアダプター分子 MyD88, Mal/TIRAP が NF- κ B の活性化を強く誘導することが判明していた。これらの KO マウス解析の結果、TLR2 においては NF- κ B の活性化がほぼ完全に消失するのに TLR4 では late-inducing の NF- κ B 活性化が残存することから MyD88 非依存性経路の存在が予測されていた。この経路は Mal/TIRAP でも補完されず TICAM-1 で説明されることになった(図 7)。TLR4 のアダプター系は 4 つあり、Mal/TIRAP と TICAM-2 が橋渡しアダプターとして働き、MyD88, TICAM-1 が機能アダプターとして下流分子に連携することが予測できた。アダプター分子のシグナル系は異なるがどれも樹状細胞の活性化を強く誘導する。その責任経路は未だ不明である。

TICAM-1 の下流分子を yeast two-hybrid, 免疫沈降で同定することを試みた(Review 8)。TICAM-1 の N 末部位に NAP1, TRAF2 が、C 末部位に RIP1 がリクルートすることが判明した(図 8)。他のグループの報告は TICAM-1 下流分子として TRAF6, TRAF3, FADD などを明らかにした。我々は TRAF2, NAP1, RIP1 と TLR3, TICAM-1 の分子集合解析を共焦点顕微鏡で行なった(Funami et al., manuscript in preparation)。強制発現の系では tag 付きの分子を

抗体で検知して、ヒト樹状細胞における内在性分子の同定には特異抗体を用いた。HeLa cell 強制発現系でヒト TLR3 は endosome に局在し、TICAM-1 は細胞質にパッチ状に分布した (図 9)。樹状細胞 TLR3 の内在性の発現は僅かに確認できたが、内在性 TICAM-1 は特異抗体によっても確認できなかった。TICAM-1 を微量に発現させるとパッチ状の発現は確認できたが 6 時間以内に細胞死 (apoptosis) が観察された。Apoptosis 阻害剤と短時間の蛍光観察で TLR3-TICAM-1 会合を追跡した。しかし、TLR3 と TICAM-1 は強制発現でも会合を証明できなかった。TICAM-1 はパッチの状態では IFN 誘導活性を発揮するので TICAM-1 は TLR3 と早い時期に離れてシグナルソームにパッチを作ると考えられる。後に C 末のみを削った TICAM-1 (N 末 TICAM-1) が細胞死を誘起しないことが報告された。細胞死を起こさない観察系が組めればこの仮説と分子の会合、解離が確認できるので、N 末 TICAM-1 を用いて検討中である。

TICAM-1 と NAP1 について直接結合は確認できなかったが、NAP1 のドミネガを加えると polyI:C の IFN 誘導が抑制された (45)。また、免疫沈降で両者の共沈が確認された。後に NAP1 は共焦点で TICAM-1、IPS-1 とそれぞれ部分会合することが判明した (図 10)。TICAM-1 は NAP1 と N 末で間接結合する。IPS-1 は NAP1 と共焦点で融合する (63)。従ってパターン認識レセプターからの IFN 誘導シグナルは NAP1 で収束する。一方、NF- κ B のシグナルは TICAM-1 の C 末 RHIM domain に結合する RIP1 が規定する (図 11)。共焦点で RIP1 は TICAM-1 のパッチの中に所在しており、TICAM-1 の RHIM domain を破壊するとパッチ状の局在が崩れて大きく変化する。RHIM domain はシグナルソーム形成に重要な場を提供するかもしれない。以上から TICAM-1 シグナルは N 末、C 末のドメインから分担して異なる樹状細胞機能に到ることが推定された。これらの分子と個々の細胞応答の対応性は今後の検討課題である。

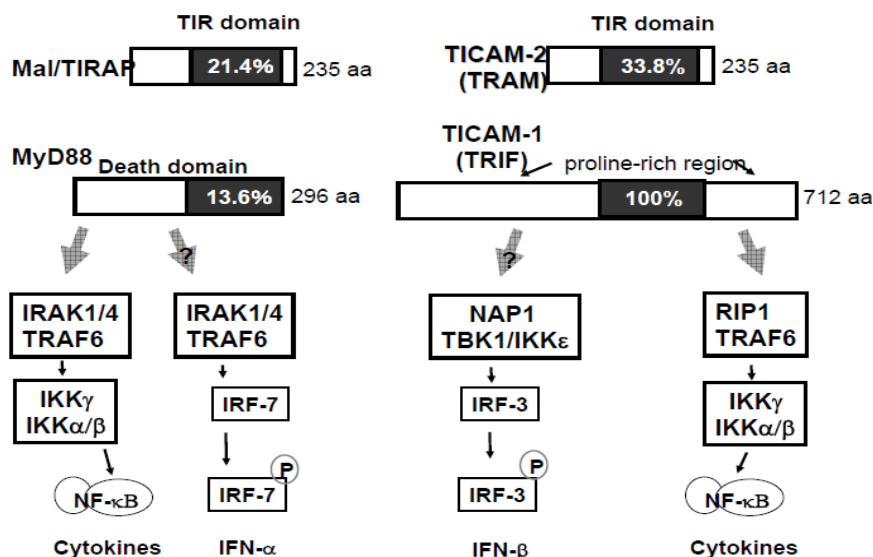


図 6. TLR のアダプター分子ファミリー

本研究で TICAM-1、TICAM-2 が IFN 誘導性の TLR アダプターと同定され、TIR を持つアダプター蛋白が 4 種存在することが判明した。TICAM-1 TIR を基準としたときの TIR の%homology を示した。アミノ酸数を右記した。推定されるシグナル伝達経路を下記した。

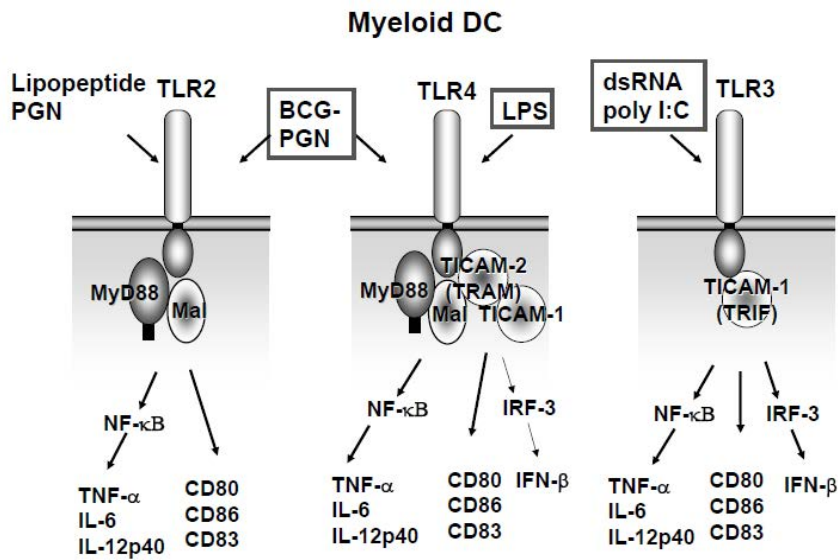


図7. TLR2, 3, 4のシグナル系の選別
アダプター分子の選択により下流シグナルはそれぞれのTLRで異なる。各TLRの代表的なリガンドを上記した。

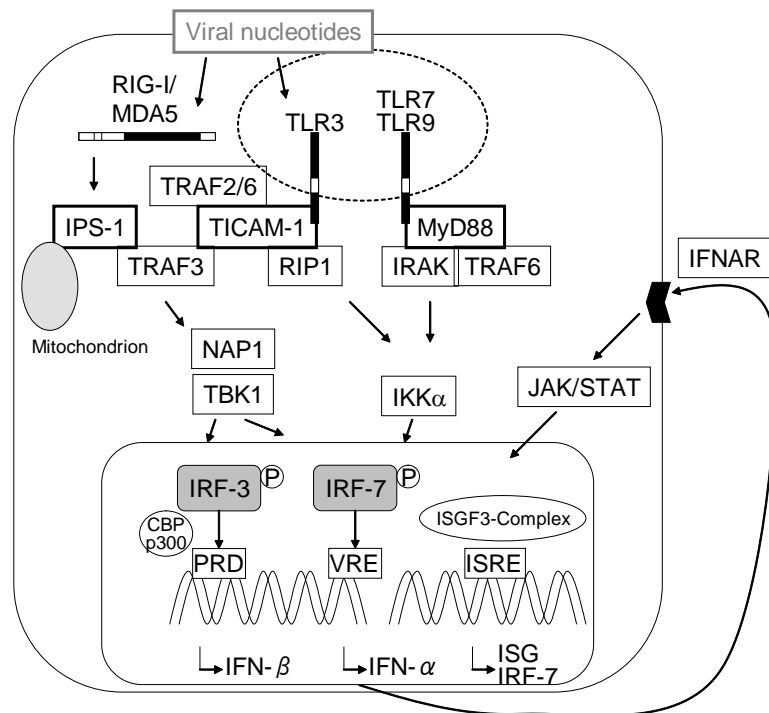


図8. ウイルス核酸認識とIFN誘導の分子機構
ウイルスの複製過程で生じるdsRNAは代表的なパターン分子でendosome TLR3, cytoplasmic RIG-I/MDA5, PKR, などで認識されてNAP1-virus-activated kinaseを経てIRF-3の活性化に到る。経路によりアダプターは異なるがNAP1で収束してIFN誘導を惹起する。CpG DNAはTLR9, ssRNAはTLR7によって認識されるがこれらは異なった経路を選別する。一旦少量のtype I IFNが誘導されればIFNレセプター(IFNAR)を介したフィードバック経路がIFN誘導を増幅する。

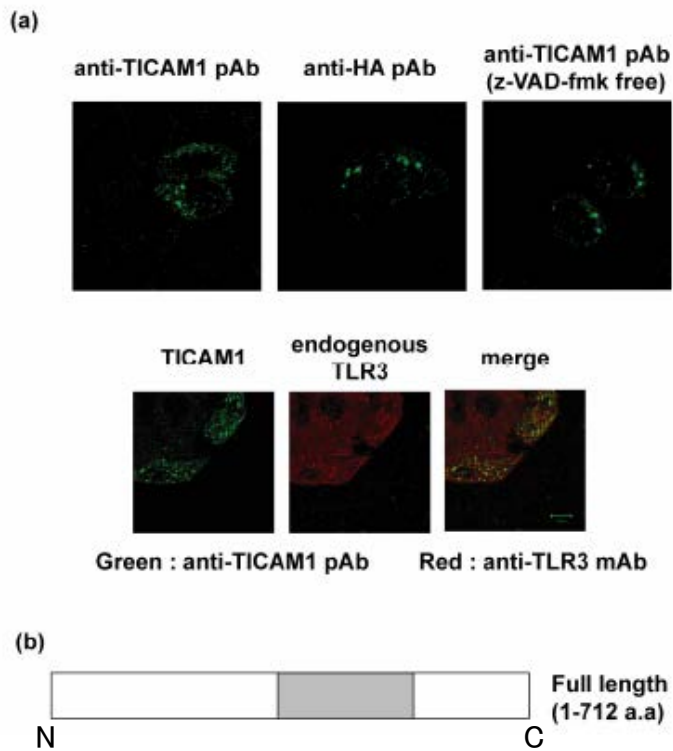


図 9. TICAM-1 と TLR3 は共局在しない

パネル a) HeLa 細胞: TICAM-1 の抗体で染めた TICAM-1 局在(上図)。左図はアポトーシス阻害剤 (z-VAD-fmk) 存在下、中図は tag 染色、右図はアポトーシス阻害剤なしで 6 h 以内に観察した。上左図の条件で内在性 TLR3 を共染色した(下図)。マージはしない。パネル b) C 末、N 末を除去した TICAM-1 分子を作製したが C 末に局在決定とアポトーシス誘導の責任部位 (RHIM domain) が存在した。

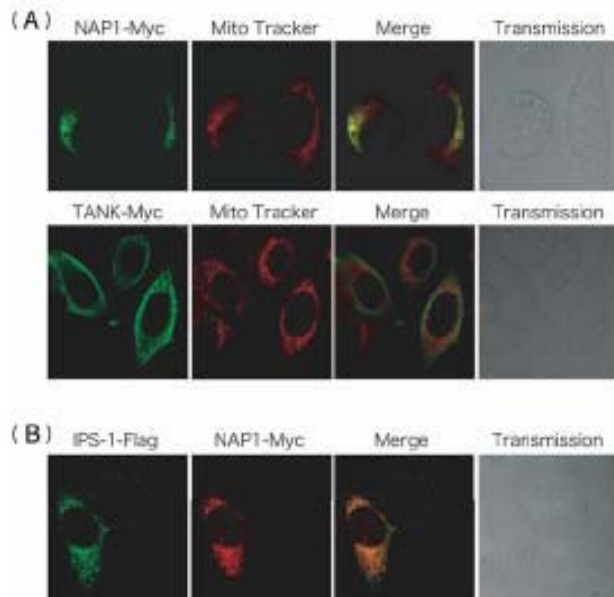


図 10. IPS-1 と NAP1 は共局在する

IPS-1 は mitochondria に局在する。NAP1とそのファミリーの TANK は mitochondria マーカーとマージしない。しかし、IPS-1 と NAP1 は共局在する。

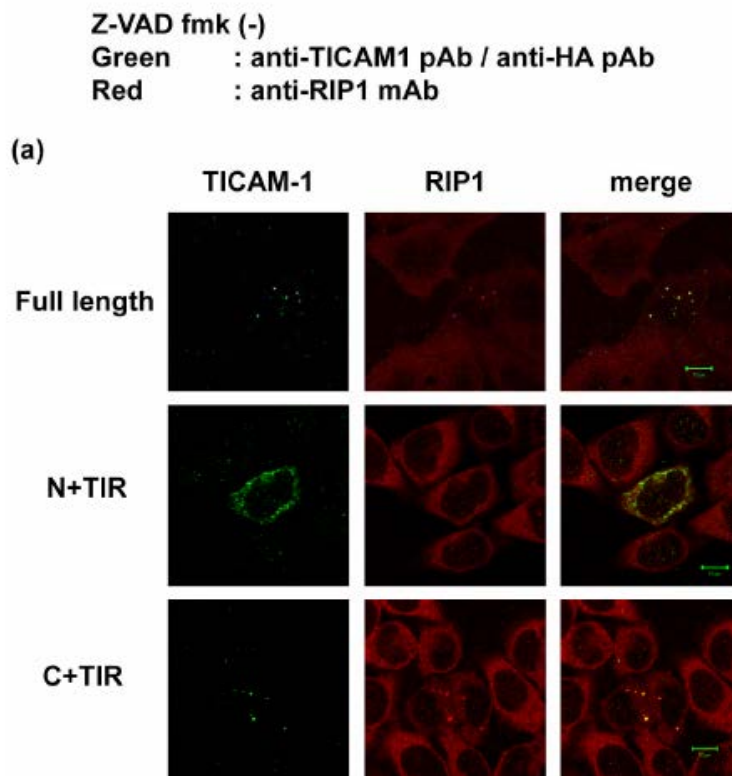


図 11. TICAM-1 と RIP1 は共局在する

TICAM-1 の斑点状の分布に一致して RIP1 も共局在する(上図)。C 末を削ると TICAM-1 と一致した局在は示さなくなる(中図)。N 末を削っても局在に変化は無い(下図)。C 末の RHIM domain がこの斑点状分布に必須の働きをしていることが現在判明している。

3-1-1-3. 抗がん免疫誘導における樹状細胞 TLR の役割

抗原提示は mDC が成熟化して執行する。mDC の成熟化には TLR の先行刺激が必須であり、このために感染症では TLR 刺激、抗原提示が効率よく誘起される。ただし、TLR の如何なるシグナルが樹状細胞を成熟化に導くかは未だ不明である。がんでは抗原はあるが TLR 刺激はなく、mDC は成熟化しない。炎症シグナルが加わって始めてがんは退縮する(danger signal 仮説)。ヒトまたはマウス mDC を用いてこの仮説の証明を試みた。ヒト mDC において、TLR2,4 は BCG 細胞骨格成分(CWS)に応答して NF- κ B を効率よく活性化した。Genechip 解析でもこの TLR2/4 刺激は BCG-inducible genes を誘導することが示された(40)。BCG-CWS は TLR4 のリガンド活性をもつにも拘らず IRF-3/IFN- β promoter を活性化しない(33)。一方、TLR3 は polyI:C、ウイルス dsRNA を外因性に認識し、樹状細胞を成熟化する。Reis e Sousa らによるとこれらはヒト mDC において強い CTL inducer となる。事実、mDC を polyI:C (dsRNA analogue) で刺激すると CD83/CD86 の発現上昇に続いてリンパ球増殖が誘導された(35,38)。TLR2/4-MyD88 と TLR3-TICAM-1 は IFN- β 以外にも異なったアウトプットが推定できる。我々は主要な抗原提示細胞の mDC が dsRNA, BCG 成分で異なった成熟状態に誘導される

と仮定した。以下に研究内容を述べるが、一般に mDC は TLR3-IRF-3 活性化経路で NK 活性化能の高い mDC に、TLR2/4-NF- κ B 活性化経路で CTL 活性化能の高い mDC に分化する(39)。即ち TLR とそのリガンドは mDC の細胞応答をアダプター選別によって変調する。

MyD88 経路は B16 melanoma の移植系で BCG-CWS による C57BL/6 抗がん活性の誘導に必須である(39)。BCG-CWS は TLR2/4 を活性化する(Tsuji et al., 2000)。MyD88 KO mice では B16 melanoma に対する BCG-CWS 依存性の CTL 誘導が阻害され、MyD88+/+ の樹状細胞投与によって CTL 誘導が回復する(39)。B16 は MHC class I 陰性だが、移植がんの MHC class I は陽転しており TLR2/4 から IFN- γ 誘導が起きることが判明した。IFN- γ の誘導には樹状細胞以外にリンパ球のレセプターが関与するかもしれない。とにかく MyD88 経路には樹状細胞 cross-priming を誘起する機能がある(図 12)。

一方、TICAM-1 経路の機能は polyI:C 投与 TICAM-1 KO マウスで検討する。B16 (class I 陰性)と EL4 (class I 陽性) C57BL/6 移植がんの系で TICAM-1 の役割を調べると B16 の場合 NK が強く誘導された(64)。CTL の誘導は見られなかった。CTL 不応答の状況ではがんの完全退縮も無かった。Class I 陽性の EL4 では polyI:C によって NK, CTL 両方が誘導され、がんの完全寛解が誘導された。NK については B16 の結果を確認できた。CTL 誘導は TLR3、TICAM-1 いずれかを KO することで損なわれた。PKR, IFN- β , IFN- α の KO マウスでは損なわれなかった。IFNAR KO では部分阻害を受けた。がんの rechallenge 実験を追加中であるが、CTL 誘導には TLR2/4 か TLR3-TICAM-1 経路が関与する(図 12)。他の IFN 誘導系と産物としての IFN は mDCs の cross-priming と CTL 誘導に必須ではない。TICAM-1 経路は恐らく NK 活性化を始動できる点で特殊である。NK 誘導性樹状細胞の分子基盤を検討することが重要な視点になる。

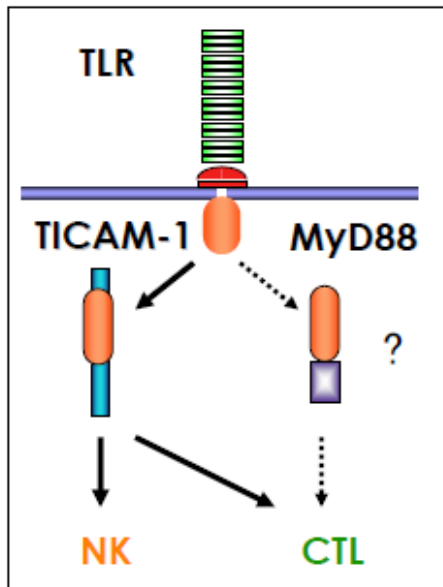


図 12. TICAM-1 経路と MyD88 経路

2つの TLR 経路は異なったシグナル系で樹状細胞を成熟化する。結果は TICAM-1 が NK 指向性を樹状細胞に与え、MyD88 が CTL 指向性を樹状細胞に与える。TICAM-1 には cross-priming 誘導活性があると報告されており、これも TICAM-1 の特徴である。これらの結果は当研究室の担がんマウスの移植腫瘍系で検討できることが分かっている。

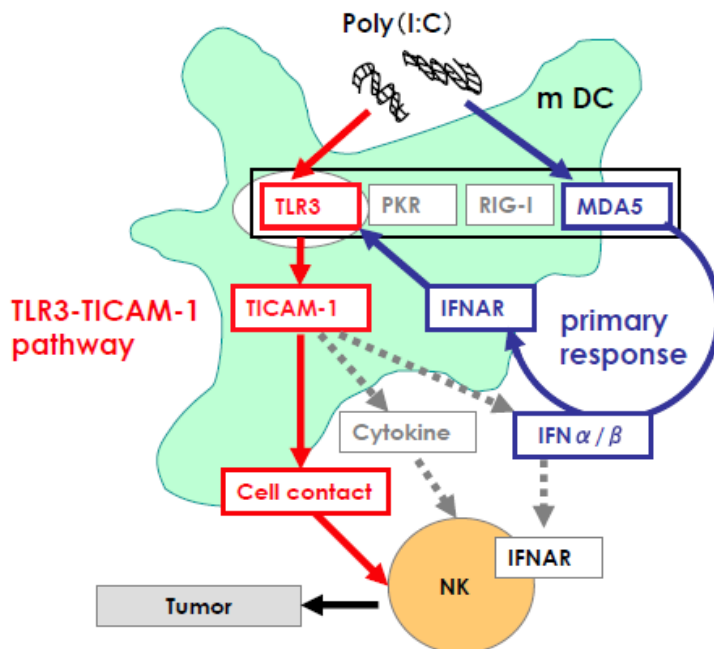


図 13. 樹状細胞 TLR3-TICAM-1 経路の NK 誘導のメカニズム

TLR3 アゴニストとして polyI:C を *in vivo* 投与した場合の抗がん応答の模式図。TICAM-1 は未知の NK 活性化リガンドを提示して NK を活性化する。マウス樹状細胞は IFN 誘導性に TLR3 が発現するので IFN 誘導経路の先行的活性化も必要になる。

3-1-1-3. 抗原提示樹状細胞における抗ウイルスの TLR 応答

本研究遂行中に KO マウスのウイルス感染実験から TLR7, 9 は G/U-rich なウイルス RNA を認識することが報告された。pDC が強い IFN- α 誘導活性をもつのは TLR7, 9 の IRF-7/IFN- α 誘導活性による。我々はウイルスの tropism を考慮してヒト mDC (抗原提示細胞)、上皮細胞のウイルス応答と抗原提示樹状細胞を標的とするウイルス感染株の確立も目指した。これらから演繹する抗ウイルスの TLR 応答を解析していく予定である。

麻疹ウイルス (negative-strand RNA virus) の馴化株が樹状細胞を標的とすることが判明したので、「はしかにかかる」マウスを確立した。即ち、麻疹ウイルス感染実験では CD46/CD150 をヒト型に発現する TG (C57BL/6) mouse を確立した。両者とも BAC clone (~40 kB) を TG して始めてヒトに特有な CD46/CD150 発現プロファイルをもつマウスが得られた。この TG マウスは麻疹ウイルス接種で膨大な量の IFN- β を mDC から誘導し、結果としてウイルス複製は 8 h 以内に鎮静化した。CD46+/CD150+/IFNAR- のマウスを作成すると麻疹感染の phenotype が得られた。ウイルスは初期感染で mDC によって運搬され、所属リンパ節でリンパ球に伝搬し感染が拡大することが in vivo で観察された (53)。また、ヒト細胞と siRNA を使った標的分子の解析から mononegavirus の標的は NAP1 の上流分子、または NAP1/IKK \cdot (IKKi)/TBK1 の複合体形成に必須な分子であることが判明した。後に藤田らが細胞内の dsRNA のセンサーとして RIG-I/MDA5 を見出し、その下流のアダプター分子 IPS-1 も審良研などで報告された。NAP1 は TICAM-1 と IPS-1 の両経路にまたがる分子であることが判明した (63)。

ウイルス感染で dsRNA 産生が IFN を誘導するかを次に検討した。麻疹ウイルス馴化株は TICAM-1 経路ではなく、RIG-I/MDA5-IPS1 経路で type I IFN を誘起した。この IFN 誘導は感染後 6 h 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可能性がある。この点を 1. CD46/CD150 TG 「はしかにかかる」マウスと 2. mDC, pDC などの樹状細胞で検討する予定である。他の RNA ウイルスについても IFN と病原性の関係を解析している。

ウイルス感染で CTL が誘導される場合、抗原提示細胞は cross-priming を誘起する場合としない場合がある。TLR3 は cross-priming を誘起するレセプターであるが、ウイルスが細胞内で複製した場合 cross-priming は必須でない。抗原提示の分子機構を解明するために、TLR3-TICAM-1-IRF-3 経路で誘導される分子群とウイルスが TICAM-1 非依存性に IRF-3 を活性化する際に誘導される分子群を比較解析中である。ウイルスには TICAM-1 を標的にして IFN 系を抑えるものがある。この阻害系はウイルス RNA が外因性に細胞を活性化する状況を検知するのかも知れない。ウイルスによる TICAM-1 経路の阻害と抗ウイルス NK, CTL 誘導への影響は今後の検討課題である。

3-1-1-4. 自然免疫関連遺伝子群の収集と genechip による病態解析

免疫系では各細胞群が独自の働きをするとともに免疫ネットワークを組んでおり、各細胞群でどのような遺伝子が発現するかを把握する必要がある。我々は自然免疫関連の遺伝子を BCG-CWS-stimulated vs. unstimulated の樹状細胞から differential display, cDNA subtraction などで網羅的に収集してきた(40,49)。既知のものは affimetrix の gene chip で追加分定中である。総数は 200 余なので micro-array などで正常と患者樹状細胞の差をパターン化できる(49)。がんの予後診断, 投薬の免疫系への有効性, 各種感染における誘導遺伝子の相違などを database 化する。この場合、RIG-I/MDA5 経由の IFN 誘導の最終応答を主に見ている可能性が高い。BCG 生菌は膀胱がんの FDA 認可の治療法として確立している。BCG-CWS は間もなく phase I/II study が開始される可能性がある。術後免疫療法の実用化に向けて予後診断の確立と治療へ貢献する期待がもてる。

将来的には理研の SNP の database, 各細胞群の遺伝子発現状況 (profile) database と連動して簡便、迅速なマーカー整備とがんの予後診断への貢献を目指す。

3-1-1-5. TLR の起源と動物モデルの開発

無脊椎動物の genome project の情報が公表されつつある。これらを駆使して機能未知のヒトの自然免疫関連因子群の機能解析を行うことを企画する。免疫系の成立と感染の抗争史を evolutionary な視点から概観する。Genome project が完了または推進中の生物の情報を駆使して微生物-宿主間の“病原性”の意義を一般化する。これらは遠大だが、人獣共通感染症、ヒト疾患のモデル動物, 発症の分子機構などを類推するうえで貴重なヒントを提供する。

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(31)、異なる点を挙げると 1. TLR4 を欠き LPS endotoxin shock を起こしにくい。2. TLR5 には可溶型があり、flagellin 刺激を膜型 TLR5 と共に増幅して shock を起こす(44)。3. 新規の TLR family (TLR21, 22) を発現する (Matsuo et al., Manuscript in preparation)。これらはそれぞれ NF- κ B, IRF-3 を強く活性化する。の3点である。これらについても言及する。

また、最近ヤツメウナギが TLR に類似した分子群 (VLR) でリンパ球の抗原認識の多様性をカバーするという事実が判明したがヤツメウナギにはこれとは独立したサカナに近い TLR family が備わる(62)。

フグ (Takifugu rebripes) ゲノムから TLR を抽出し、機能解析を遂行中であるがフグは分類上メダカに近く、両者はほぼ相同の TLR セットを持つ。TLR5S (可溶型), TLR14, TLR21, TLR22, が水棲動物(サカナ、両生類)特有の TLR と同定された(66)。このうち、TLR5S は flagellin 鞭毛蛋白の TLR5 (膜型) 増幅応答系に必須の因子として報告した(44)。TLR14 は円口類と硬骨魚類にあり、トリ、哺乳類には無い。水棲の微生物を認識すると仮定してリガンドを探索中である(63)。TLR21 は細菌の lipopeptides を認識する(報告中)。TLR2 とは別個の単独認識で lipopeptide を認識する系が水棲動物に存在する。TLR2, TLR1 は別個に見出せるがリガンドは lipopeptide と異なるようである。TLR22 は dsRNA を認識する(報告中)。TLR3 の局在は腸な

どに限られるが、TLR22 はほぼ全身に発現する。さらに両者の認識する dsRNA の性状は異なるし、細胞内局在も異なる。これらは哺乳類に進化する過程で失われた遺伝子であるが、病原体への免疫応答は各論的に強力である。これらを発現させて哺乳類のアジュバント応答を増強するかは治療戦略として興味あるが、ここでは触れない。サカナはヒトと概ね共通の TLR 系を持つことが理解の範囲に入ったので、マウス以外の動物モデルとして成立するかが次期の課題になる。

BCG-CWS によって誘導される遺伝子群のうち、endosome で高発現が誘導される metal-transporter などの分子は cross-priming との関係で今後マウス、サカナでの平行解析の対象となる(24)。mDC 活性化(cross-priming)と連動している因子は病態の根本に関連するかもしれない、疾患と細胞応答を抽出系とともに複雑系(in vivo)で見る努力もしたい。

サカナはヒトと同様に抗体産生系、NK, CTL などの細胞性免疫を持つ。サカナにヒトと類似の自然免疫があることは判明したがこれらが獲得免疫とリンクするか、発がんや感染の対策に有利な表現型をもたらすかは今後の問題として残される。TLR22 TG マウスを作製して dsRNA の検知機能への寄与を明らかにする企画も推進したい。

3-1-2. 研究成果の今後期待される効果

TLR によって駆動される免疫系の統合解析は多く今後に残される。例えば、CTL 誘導が TLR-樹状細胞で priming される分子機構、TLR による樹状細胞活性化は CD83/86 を指標にしてきたがこれらを発現上昇する分子機構は不明である。成熟樹状細胞が CTL, NK を選別して活性化する分子機構も分かっていない。応用としても病態、とくにウイルス感染やがん TLR のシグナル分配がどのような修飾を受けるか、ヒトに応用できる微生物由来のアジュバントの開発など今後に残される。

本研究から敷衍しうる今後の課題は 1. 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、2. TLR2/4, TLR3 によって特異誘導される遺伝子群と CTL 誘導、NK 活性化誘導の分子機構の解析、3. RNA ウイルスによる感染樹状細胞の機能抑制とエフェクター誘導阻害の解析、などである。

項目 1 について報告者は 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 と臨床応用などを特許化し、アジュバント開発の目的に提供している。項目 3 について「ウイルスに感染するマウス」による in vivo の感染動態解析は TLR と他のパターン認識レセプターからの解析ができるので感染防御機構の詳細に大きい breakthrough をもたらすことが期待できる。Mononegavirus は dsRNA の産生を待たずに DI RNA によって IRF-3 依存性の IFN 誘導を誘起する。DI RNA は弱毒因子としてアジュバントに使えるはずであり、ワクチンの作製に応用できるかも知れない。項目 2 は今後の基礎研究課題として残される。TICAM-1 に結合する分子や機能未知の IFN-inducible genes のいくつかは cross-priming や抗原提示に関与する可能性がある。すでに報告した SIMPLE, BIGM103 は興味ある分子例である(2)。

SIMPLE は NED4 と細胞内で結合し、ユビキチン化を促進する。BIGM103 は LIV1 family で、TNF- α で up-regulate し、イオントランスポーターとして機能する(24)。機能未知の IFN-inducible genes のいくつかは cross-priming や抗原提示に関与する可能性がある。他に RNA editing enzyme, chemokines などが同定されており、これらの TICAM-1 下流の分子から RNAi の手法などで CTL, NK 誘導に関与する候補分子を同定していく仕事が残されている。

本研究で得られた 1. TLR の抗がん免疫起動活性, 2. TLR による樹状細胞のウイルス運搬と成熟化誘導, 3. Genechip 解析で病態と関連のある機能未知遺伝子群, 4. 各病原体の動物モデルの確立、などは当初の予想より複雑で今後の解明が待たれる。1, 2 はともかく成果に結びついたが 3 はまだデータベースの段階である。この中から病態解析に有望な分子が同定できることを期待している。4. はウイルス疾患で特に重要である。機会を得てさらに発展させたい。麻疹は免疫抑制が強く2次感染で乳幼児には致死的になる。ウイルス性の免疫抑制は種々あるがモデルマウスを使えば樹状細胞の関与する免疫抑制の機構にはアプローチできるかもしれない。これらは本企画の2次成果として期待できる。

3-2. 白川グループ

3-2-1. 研究実施内容及び成果

3-2-1-1. TLR によるアレルギー応答

ヒト TLR1-10 およびその関連分子である CD14, Myd88, RP105, MD-1, MD-2, IL-12 における遺伝子を探索し、新規 SNP を含む遺伝子内の主要な SNP のリストを世界で初めて作成するとともに、免疫関連の疾患である喘息を代表としてこれらの SNP を用いて患者—対照者における解析を行ない、以下の結果を得た。

- a. ヒト TLR1-10 及びその関連分子を含む遺伝子内の全ての SNP を発見した。このうち蛋白質の変異を伴うものは、16 個見出された。
- b. 上記の SNP に関して喘息症例 (小児喘息 346 例、成人喘息 386 例) 及び正常対照者 680 例を用いて関連研究を行なったところ、小児喘息と TLR3, IL-12B に強い関連を認めた。
- c. 小児喘息ではウイルス感染に引き続いて引き起こされる症例が多いことが疫学的に知られており、TLR3 とウイルス感染の関連が示唆された。さらに TH1 誘導における IL-12 の重要性が知られているが、その点においても小児喘息患者は IL-12 の誘導に問題があることが判明した
- d. TLR3 の発現と誘導される IFN を測定すると TLR3 の発現に比例して IFN 産生が増強した。IL-12nomRNA の安定性が喘息患者群で低かった

以上の結果は、RNA ウイルス由来の dsRNA 刺激により気道上皮における TLR3 の発現が調節され、それにより抗ウイルス作用を持つ IFN が誘導されることを示したもので、喘息患者ではこの機能が SNP により弱まり、さらに TH1 誘導因子である IL-12 が十分産生されないことから、気道における炎症が遷延し、気道の過敏性を獲得するものと予想される。

3-2-2. 研究成果の今後期待される効果

本研究の責務はアジュバント刺激の樹状細胞による変動遺伝子と個体別の有効性の特性を解析する目的で始められた。しかし、3 年間の業績が目的に逸れたものであったため、中間評価で削除が決定された。

TLR と樹状細胞の応答を genechip の結果から絞り込みの段階に入っている。PolyI:C 刺激樹状細胞の profiling にはすでに報告された RIG-I, MDA5 が入っており、TLR3 も LPS-inducible に遺伝子として抽出に成功している。TLR の発見から 9 年が経過し、微生物の認識プロフィールも大方は決まった。これには日本の審良研の果たした役割が大きい。これまでの免疫研究の対象 (cytokine, 接着因子, シグナル系などリンパ球の機能と連動した個々の因子、事象) から微生物と自然免疫担当細胞の間の事象がこの 3 年間に飛躍的に国内外で研究が進んだ。しかし、目覚ましい新知見は続出しているわけではない。

TLR の位置づけは微生物認識の多様性という観点よりも樹状細胞の機能モジュレーターとして細胞内応答、cross-priming, 抗原提示への関わりがテーマになるであろう。pDC ではウイルスの IFN 応答が主だが mDC へ変換する可能性も提出された。各 TLR の KO マウスが作成さ

れ、シグナル系の解析は間もなくドラフトが提示されよう。自然免疫は獲得免疫との連動のもとに語られる領域に入ってきた。網羅的解析から次の飛躍に繋がる息吹が得られれば参加の意義もある。システムバイオロジー的な理解へ向けてデータベースを作製する努力を続ける予定である。

3-3. 谷田グループ

3-3-1. 研究実施内容及び成果

武田薬品工業で合成した微生物由来の物質から本企画に合うものをluciferase レポーターアッセイ(NF- κ B, IFN- β promoter)で抽出した。TLR2, 3, 4 発現 HEK293 細胞を用いた。放線菌由来のNF- κ Bを上げる活性物質を検知した。この物質はlipopeptide で TAN1151 と名付けられた。このlipopeptide をベースに合成したTANシリーズの中にTLR2 依存性に NF- κ Bの活性を上げる物質を同定した。TAN12d は triacylated lipopeptide でTLR2/TLR1 の活性化剤として使えることが判明した。TAN27とTAN33は diacylated lipopeptide でTLR2/TLR6 で強くNF- κ Bを活性化した。TAN12dは骨髄細胞増殖活性と好中球の遊走活性があり、GM-CSFとENA-78によることを検証した。TAN12dは担がんマウスで強い抗がん活性を示し、MyD88 KO マウスで抗がん効果は消失した。TAN12dはマウスを使った毒性試験で 1 μ g/head 腹腔内投与まで異常が見られなかった。TAN12dはTLR2 のアゴニストとして CTL 誘導剤に使える可能性がある。特に造血活性が強く出るのでがん患者の造血抑制の解除にも有望である。

3-3-2. 研究成果の今後期待される効果

TLR2 アゴニストをアジュバントに用いた研究は Mycoplasma 由来の MALP-2、FSL-1, 他に Pam3, apolipoprotein A-1, などで試行されてきた。我々も M161Ag (*M. fermentans*) を用いた免疫療法を提唱してきた。しかし、いずれも実用化に至っていない。一方、TLR2/4 アゴニストの BCG-CWS は多数のがん患者に使われてきた。BCG-CWS の副作用は皮膚の局所糜爛と発熱である。TLR2 アゴニストはマウスに使う限り顕著な副作用は見られない。ヒトに用いて CTL 誘導活性と副作用の点で BCG-CWS よりよい結果が得られるかがこれら TLR2 アゴニストの実用化の試金石になる。

4 研究参加者

①瀬谷グループ

(樹状細胞 TLR のアジュバント・レセプターとしての機能解明を担当)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
瀬谷 司	北海道大学大学院先端生命科学研究院 先端生命科学部門(感染症制御学)	教授	PAMP の機能同定と探索、ヒト自然免疫解析の総括	平成 13 年 12 月～ 平成 19 年 3 月
松本 美佐子	北海道大学大学院医学研究科 感染症制御学分野	助教授	ウイルスレセプター、貪食・補体レセプターの同定・解析	平成 13 年 12 月～ 平成 19 年 3 月
新開 大史	北海道大学大学院医学研究科 感染症制御学分野	CREST 研究員	ウイルス感染と TLR 応答解析	平成 15 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
舟見 健児	北海道大学大学院医学研究科 感染症制御学分野	CREST 研究員	機能未知遺伝子、貪食・補体レセプターの同定・機能解析	平成 16 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
石井 秋宏	北海道大学大学院先端生命科学研究院 先端生命科学部門(感染症制御学)	博士研究員	ヒト疾患モデル動物の開発	平成 16 年 3 月～ 平成 19 年 3 月
辻田 忠志	奈良先端科学技術大学院大学	修了	魚類を使った自然免疫解析、ヒト疾患モデル動物としての魚類	平成 14 年 11 月～ 平成 16 年 3 月
笹井 美和	奈良先端科学技術大学院大学	D3	TLR, レセプター複合体の分子解析	平成 15 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
奥田 優	奈良先端科学技術大学院大学	修了	PolyI:C と誘導体の機能解析	平成 15 年 4 月～ 平成 16 年 9 月
松尾 綾	北海道大学大学院医学研究科 感染症制御学	D2	PolyI:C と誘導体の機能解析	平成 16 年 9 月～ 平成 19 年 3 月

	分野			
海老原 敬	北海道大学大学院医学研究科 感染症制御学分野	CREST 研究補助員	ウイルス感染と TLR 応答解析	平成 17 年 1 月～ 平成 19 年 3 月
樋口 恵	北海道大学大学院先端生命科学研究院 先端生命科学部門（感染症制御学）	研究補助員	ウイルス感染及び培養の補助	平成 16 年 12 月～ 平成 18 年 9 月
高田 詠子	北海道大学大学院先端生命科学研究院 先端生命科学部門（感染症制御学）	研究補助員	タンパク発現系の開発補助	平成 17 年 8 月～ 平成 19 年 3 月
松田 正	北海道大学大学院薬学研究科 衛生化学分野	教授	自然免疫解析の動物モデル作製	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
畑中 道代	神戸常盤短期大学	教授	ウイルス感染のレセプター同定	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
関口 真麻子	北海道大学大学院医学研究科 感染症制御学分野	CREST 研究事務員	事務 研究報告・資料作製	平成 17 年 4 月～ 平成 17 年 7 月

②松本グループ

(がん患者の genechip 解析、SNP 解析、自然免疫レセプター複合体解析を担当)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
松本 美佐子	大阪府立成人病センター研究所	特別研究員	ウイルスレセプター、 貪食・補体レセプターの 同定・解析	平成 13 年 12 月～ 平成 19 年 3 月
赤澤 隆	大阪府立成人病センター研究所	研究員	動物実験系の確立、 CTL, NK の活性化機構 の解析	平成 14 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
石井 一夫	大阪府立成人病センター研究所	CREST 研究員	Genechip 及び SNP 解析	平成 15 年 2 月～ 平成 16 年 3 月
新開 大史	大阪府立成人病センター研究所	CREST 研究員	ウイルス感染と TLR 応答解析	平成 15 年 4 月～ 平成 16 年 9 月
舟見 健児	大阪府立成人病センター研究所	CREST 研究員	機能未知遺伝子、貪食・ 補体レセプターの同定・ 機能解析	平成 16 年 4 月～ 平成 16 年 9 月
信田 京子	大阪府立成人病センター研究所	CREST 研究補助員	分子生物学的的方法論 による研究補助	平成 14 年 4 月～ 平成 16 年 9 月
谷口 光恵	大阪府立成人病センター研究所	CREST 研究補助員	細胞生物学的的方法論 による研究補助	平成 14 年 5 月～ 平成 16 年 9 月
圓地 葉子	大阪府立成人病センター研究所	CREST 研究事務員	事務 研究報告・資料作製	平成 14 年 1 月～ 平成 16 年 7 月
押海 裕之	大阪府立成人病センター研究所	CREST 研究員	CTL, NK の活性化機構 の解析、下等動物の 自然免疫解析	平成 14 年 4 月～ 平成 15 年 3 月
田辺 真佐子	大阪府立成人病センター研究所	CREST 研究員	未知遺伝子機能解析	平成 14 年 6 月～ 平成 15 年 3 月
上堀 淳二	大阪府立成人病センター研究所	CREST 研究補助員	BCG-CWS の構造、機能 解析、アジュバントの 活性解析	平成 15 年 6 月～ 平成 16 年 3 月
白鳥 行大	大阪府立成人病センター研究所	修了	PolyI:C と誘導体の 機能解析	平成 14 年 11 月～ 平成 15 年 3 月

③谷田グループ

(アジュバントの人工合成とその機能を担当)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
谷田 清一	武田薬品工業 (株)医薬研究本部	主席部員	各種微生物由来の Toll-like receptor 刺激因子 (PAMP) の調製	平成 13 年 12 月～ 平成 19 年 3 月
河本 朋広	武田薬品工業 (株)医薬研究本部	主任研究員	PAMP の誘導体、機能 の総合評価、高次構造 解析	平成 13 年 12 月～ 平成 19 年 3 月

④白川グループ

(アジュバントによる抗がん免疫の成立素因の探索を担当)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
白川 太郎	京都大学 理化学研究所	教授	BCG-CWS 投与による遺 伝子発現の機能との 相関解析	平成 13 年 12 月～ 平成 16 年 3 月
山崎(大津) 暁子	京都大学	助手	BCG-CWS 投与による遺 伝子発現の機能との 相関解析	平成 13 年 12 月～ 平成 16 年 3 月
福田 早苗	京都大学	助手	統計学的処理と関連 の同定	平成 15 年 4 月～ 平成 16 年 3 月
玉利 真由 美	理化学研究所	研究員	統計学的処理と関連 の同定	平成 13 年 12 月～ 平成 16 年 3 月
松尾 洋	理化学研究所	研究員	BCG-CWS の応答性決定	平成 15 年 4 月～ 平成 16 年 3 月
長谷川 耕 一	理化学研究所	研究生	SNP 遺伝子の発現量同 定	平成 13 年 12 月～ 平成 14 年 4 月
程 雷	京都大学	CREST 研 究補助員	患者の DNA サンプル 抽出 遺伝子解析	平成 14 年 1 月～ 平成 16 年 3 月
佐藤 一郎	京都大学	CREST 研 究補助員	遺伝子解析 マイクロアレイ分析	平成 14 年 1 月～ 平成 16 年 3 月
竹内 勝之	京都大学	CREST 研 究補助員	遺伝子解析	平成 14 年 4 月～ 平成 15 年 3 月
中島 加珠 子	京都大学	CREST 研 究補助員	データの解析	平成 14 年 4 月～ 平成 16 年 3 月
竹内 覚	京都大学	CREST 研 究補助員	遺伝子解析 マイクロアレイ分析	平成 15 年 4 月～ 平成 16 年 3 月

5 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Douglas T. Fearon (Cambridge University, Professor)	Discussion	Osaka Medical Center	Apr 12-13, 2003
Lewis L. Lanier (UCSF, Professor)	Discussion	Osaka Medical Center	Apr 13, 2003
Ruslan Medzhitov (Yale University, Associate Professor)	Discussion	Hokkaido Univ.	Oct 12-13, 2004
Akiko Iwasaki (Yale University, Assistant Professor)	Discussion	Hokkaido Univ.	Oct 12-13, 2004
Andrew Bowie (Trinity College, Lecturer)	Discussion	Hokkaido Univ.	July 21-23, 2006
Katalin Kariko (Senior Investigator, Univ. Pencilvania)	Discussion	Hokkaido Univ.	July 21-23, 2006
Roberto Cattaneo (Director, Mayo graduate school)	Discussion	Hokkaido Univ.	July 21-23, 2006
Hermann Wagner (Professor, Univ. Munch)	Discussion	Hokkaido Univ.	July 21-23, 2006
Gabriel Nunez (Professor, Univ. Michigan)	Discussion	Hokkaido Univ.	July 21-23, 2006
Rashu B. Seth (Post-Doc, Southwestern Medical Center)	Discussion	Hokkaido Univ.	July 21-23, 2006
Alan Ciechanover (Technion-Israel Institute of Technology)	Discussion	Hokkaido Univ.	Feb 10, 2005

6 成果発表等

(1)原著論文発表 (国際誌 90 件、国内誌(記載は省略)40 件)

6-(1)-1. 瀬谷グループ

1. Fukui, A., N, Inoue, M. Matsumoto, M. Nomura, Y, Matsuda, K. Toyoshima, and T. Seya. Molecular cloning and functional characterization of chicken Toll-like receptors. *J. Biol. Chem.* 276: 47143-47149, 2001.
2. Moriwaki, Y., N. A. Begum, M. Kobayashi, S. Tsuji, M. Nomura, M. Matsumoto, K. Toyoshima, and T. Seya. 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, 2001.

3. Tsuji, S., J. Uehori, M. Matsumoto, Y. Suzuki, A. Matsuhisa, K. Toyoshima, and T. Seya. Human intelectin is a novel soluble lectin that recognizes galactofranose in carbohydrate chains of bacterial cell wall. *J. Biol. Chem.* 276: 23456–23463, 2001.
4. Seya T. (one of the 96 authors). Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection. The RIKEN Genome Exploration Research Group Phase II Team and the FANTOM Consortium. Functional annotation meeting. *Nature* 409: 685–690, 2001.
5. Shiratori, I., S. Tsuji, M. Matsumoto, M. Nomura, K. Toyoshima, and T. Seya. Molecular cloning and functional characterization of guinea pig IL-12. *Int. Immunol.* 13: 1129–1139, 2001.
6. Shida K., H. Koizumi, M. Matsumoto, I. Shiratori, S. Kikkawa, S. Tsuji, N. A. Begum, K. Toyoshima, and T. Seya. High serum levels and additional species of IL-18 may participate in suppressing IgE levels in patients with atopic dermatitis. *Immunol. Lett.* 79: 169–175, 2001.
7. Matsumoto, M., T. Seya, S. Kikkawa, S. Tsuji, K. Shida, M. Nomura, M. Kurita-Taniguchi, H. Ohigashi, H. Yokouchi, H. Takami, A. Hayashi, I. Azuma, T. Masaoka, K. Kodama, and K. Toyoshima. IFN γ -producing ability in blood of patients with lung cancer: production of IL-12 p40 and IL-18 in response to BCG-CWS. *Int. Immunopharmacology* 1: 1559–1569, 2001.
8. Shida, K., M. Matsumoto, S. Kikkawa, H. Okamura, S. Tsuji, Y. Fukumori, K. Toyoshima, and T. Seya. An alternative form of human IL-18 in human blood plasma: complex formation with IgM defined by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 166: 6671–6679, 2001.
9. Nishiguchi, M., M. Matsumoto, T. Takao, M. Hoshino, Y. Shimonishi, S. Tsuji, O. Takeuchi, S. Akira, K. Toyoshima, and T. Seya. *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, 2001.
10. Inoue, N., A. Fukui, M. Nomura, M. Matsumoto, K. Toyoshima, and T. Seya. A novel chicken membrane-associated complement-regulatory protein: Molecular cloning and functional characterization of a chicken membrane SCR protein. *J. Immunol.* 166: 424–431, 2001.
11. Kikkawa, S., M. Matsumoto, K. Shida, Y. Fukumori, K. Toyoshima, and T. Seya. Human macrophages produce dimeric forms of IL-18 which can be detected with monoclonal antibodies specific for inactive IL-18. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281: 461–467, 2001.
12. Nomura, M., K. Matsumiya, M. Kitamura, A. Okuyama, M. Matsumoto, K. Toyoshima, and T. Seya. Gnostic analysis of ideopathic infertile patients with sperm-specific depletion of CD46. *Exp. Clin. Immunogen.* 18: 42–50, 2001.

13. Soldan S. S., A. Fogdell-Hahn, M. B. Brennan, B. B. Mittleman, L. Massacesi, T. Seya, and S. Jacobson. Elevated serum and CSF levels of soluble HHV-6 cellular receptor, membrane cofactor protein (MCP; CD46), in patients with multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 50: 486-493, 2001.
14. Koizumi, H., K. Sato-Matsumura, H. Nakamura, K. Shida, S. Kikkawa, M. Matsumoto, K. Toyoshima, and T. Seya. Distribution of IL-18 and IL-18 receptor in human skin: various forms of IL-18 are produced in keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 293: 325-333, 2001.
15. Tsujimura, A., K. Nunoue, N. Inoue, K. Shida, M. Kurita-Taniguchi, M. Matsumoto, M. Nomura, T. Takeya, and T. Seya. Three soluble form messages of murine CD46 are produced through alternative mRNA splicing. *J Biochem (Tokyo)*. 130: 841-848, 2001.
16. Hirahashi, T., M. Matsumoto, K. Hazeki, Y. Saeki, M. Ui, and T. Seya. Activation of the human innate immune system by spirulina: Augmentation of interferon gamma production and NK cytotoxicity by oral administration of spirulina. *Int. Immunopharmacology*. 2: 423-434, 2002.
17. Kurita-Taniguchi, M., K. Hazeki, N. Murabayashi, A. Fukui, S. Tsuji, M. Matsumoto, K. Toyoshima, and T. Seya. Molecular assembly of CD46 with CD9, alpha3-beta1 integrin and protein tyrosine phosphatase SHP-1 in human macrophages through differentiation by GM-CSF. *Molec. Immunol.* 38: 689-700, 2002.
18. Murakami H, H. Nagashima, Y. Takahagi, S. Miyagawa, T. Fujimura, K. Toyomura, R. Nakai, M. Yamada, T. Kurihara, T. Shigehisa, M. Okabe, T. Seya, R. Shirakura, and T. Kinoshita. Transgenic pigs expressing human decay-accelerating factor regulated by porcine MCP gene promoter. *Mol. Reprod. Dev.* 61: 302-311, 2002.
19. Masuda H., Y. Saeki, M. Nomura, T. Hirahashi, M. Matsumoto, M. Ui, L. L. Lanier, and T. Seya. High levels of RAE-1 isoforms on mouse tumor cell lines assessed by the anti-pan-Rae-1 polyclonal antibody confers tumor cell cytotoxicity on mouse NK cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290: 140-145, 2002.
20. Matsumoto, M., S. Kikkawa, M. Kohase, K. Miyake, and T. Seya. 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, 2002.
21. Murabayashi, N., M. Kurita-Taniguchi, M. Ayata, H. Ogura, M. Matsumoto, and T. Seya. Susceptibility of human dendritic cells to measles virus depends on their activation stages in conjunction with the level of CDw150: role of Toll stimulators in DC maturation and MV amplification. *Microbes Infect.* 4: 785-794, 2002.
22. Mori, Y., T. Seya, H. L. Huang, P. Akkapaiboon, P. Dhepakson, and K. Yamanishi. Human herpesvirus 6 variant A but not variant B induces fusion-from-without in a variety of human cells through a human herpesvirus 6 entry receptor, CD46. *J. Virol.* 76: 6750-6761, 2002.

23. Nomura, M, M. Kurita-Taniguchi, K. Kondo, N. Inoue, M. Matsumoto, K. Yamanishi, M. Okabe, and T. Seya. 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, 2002.
24. Begum, N. A., M. Kobayashi, Y. Moriwaki, M. Matsumoto, K. Toyoshima, and T. Seya. *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, 2002.
25. Hirano, A., M. Kurita-Taniguchi, Y. Katayama, M. Matsumoto, T. C. Wong, and T. Seya. Isoform-specific ligation of human CD46 enhances interferon gamma-dependent nitric oxide production in macrophages. *J. Biochem (Tokyo)*. 132: 83-91, 2002.
26. Fukui, A., T. Yuasa, Y. Murakami, K. Funami, N. Kishi, T. Matsuda, T. Fujita, T. Seya, and S. Nagasawa. Mapping the sites responsible for factor I-cofactor for cleavage of C3b and C4b on human C4b-binding protein by deletion mutagenesis. *J. Biochem (Tokyo)*. 132: 719-728, 2002.
27. Kato, H., T. Inoue, N. Ishii, Y. Murakami, M. Matsumura, T. Seya, and Pi-Chao Wang. A novel simple method to purify recombinant soluble complement receptor type 1 (sCR1) from CHO cell culture. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* 7: 67-75, 2002.
28. Hazeki, K., H. Masuda, K. Funami, N. Sukenobu, M. Matsumoto, S. Akira, O. Takeuchi, T. Seya and O. Hazeki. Toll-like receptor-mediated tyrosine phosphorylation of paxillin via MyD88-dependent and -independent pathways. *Eur. J. Immunol.* 33: 740-747, 2003.
29. Inoue, N., M. Ikawa, T. Nakanishi, M. Matsumoto, M. Nomura, T. Seya, and M. Okabe. Disruption of the mouse CD46 causes an accelerated spontaneous acrosome reaction in sperm. *Molec. Cell. Biol.* 23: 2614-2622, 2003.
30. Oshiumi, H., M. Matsumoto, K. Funami, T. Akazawa, and T. Seya. TICAM-1, an adapter molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nature Immunol.* 4: 161-167, 2003.
31. Oshiumi, H., T. Tsujita, K. Shida, M. Matsumoto, K. Ikeo, and T. Seya. Prediction of the prototype of the human Toll-like receptor gene family from the Pufferfish *Fugu. rubripes* genome. *Immunogenetics* 54: 791-800, 2003.
32. Takeuchi, J., E. Watari, E. Shinya, Y. Norose, M. Matsumoto, T. Seya, M. Sugita, S. Kawana, and H. Takahashi. Down-regulation of Toll-like receptor expression in monocyte-derived Langerhans cell-like cells: implications of low-responsiveness to bacterial components in the epidermal Langerhans cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306: 674-679, 2003.

33. Uehori, J., S. Tsuji, M. Matsumoto, C. Kawata, T. Takeuchi, S. Akira, I. Azuma, K. Toyoshima, and T. Seya. 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, 2003.
34. Shingai, M., M. Ayata, H. Ishida, I. Matsunaga, Y. Katayama, T. Seya, H. Tatsuo, Y. Yanagi, and H. Ogura. Receptor use by vesicular stomatitis virus pseudotypes with glycoproteins of defective variants of measles virus isolated from brains of patients with subacute sclerosing panencephalitis. *J. Gen. Virol.* 84: 2133-2143, 2003.
35. Matsumoto, M., K. Funami, M. Tanabe, H. Oshiumi, M. Shingai, Y. Seto, A. Yamamoto, and T. Seya. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J. Immunol.* 171: 3154-3162, 2003.
36. Oshiumi, H., K. Shida, M. Sasai, T. Fujita, M. Matsumoto, and T. Seya. TIR-containing adapter molecule(TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to Toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J. Biol. Chem.* 278: 49751-49762, 2003.
37. Tanabe, M., M. Kurita-Taniguchi, K. Takeuchi, K. Funami, M. Matsumoto, M. Shingai, M. Ayata, H. Ogura, and T. Seya. Mechanism of up-regulation of human Toll-like receptor 3 secondary to infection of measles virus-attenuated strains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311: 39-48, 2003.
38. 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. 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, 2003.
39. Akazawa T., H. Masuda, Y. Saeki, M. Matsumoto, K. Takeda, S. Akira, I. Azuma, K. Toyoshima, and T. Seya. Adjuvant-mediated tumor regression and tumor-specific CTL induction are impaired in MyD88-deficient mice. *Cancer Res.* 64: 757-764, 2004.
40. Begum, N. A., M. Kobayashi, Y. Moriwaki, M. Matsumoto, I. Azuma, K. Toyoshima, and T. Seya. Identification of differentially expressed novel genes from BCG-stimulated human macrophages by cDNA subtraction and mRNA-differential display. *Infect. Immun.* 72: 937-948, 2004.
41. Ishida, H., M. Ayata, M. Shingai, I. Matsunaga, Y. Seto, Y. Katayama, N. Iritani, T. Seya, Y. Yanagi, O. Matsuoka, T. Yamano, and H. Ogura. Infection of different cell lines of neural origin with subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus. *Microbiol. Immunol.* 48: 277-287, 2004.
42. Funami, K., M. Matsumoto, H. Oshiumi, T. Akazawa, A. Yamamoto, and T. Seya. The cytoplasmic 'linker region' in Toll-like receptor 3 controls receptor localization and signaling. *Int. Immunol.* 16: 1143-1154, 2004.

43. Kimura, Y., N. Inoue, A. Fukui, H. Oshiumi, M. Matsumoto, M. Nonaka, S. Kuratani, T. Fujita, M. Nonaka, and T. Seya. A short consensus repeat-containing complement regulatory protein of Lamprey that participates in cleavage of lamprey Complement 3. *J. Immunol.* 173: 1118–1128, 2004.
44. Tsujita, T., H. Tsukada, M. Nakao, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. Sensing Bacterial Flagellin by Membrane and Soluble Orthologs of Toll-like Receptor 5 in Rainbow Trout (*Onchorhynchus mikiss*). *J. Biol. Chem.* 279: 487588–48597, 2004.
45. Sasai, M., H. Oshiumi, M. Matsumoto, N. Inoue, F. Fujita, M. Nakanishi, and T. Seya. 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, 2005.
46. Tsukada, H., A. Fukui, T. Tsujita, M. Matsumoto, T. Iida, and T. Seya. Fish soluble Toll-like receptor 5 (TLR5) is an acute-phase protein with integral flagellin-recognition activity. *Int. J. Mol. Med.* 15: 519–525, 2005.
47. Nakao, Y., K. Funami, S. Kikkawa, M. Taniguchi, M. Nishiguchi, Y. Fukumori, T. Seya, and M. Matsumoto. Surface-expressed TLR 6 Participates in the Recognition of Diacylated Lipopeptide and Peptidoglycan in Human Cells. *J. Immunol.* 174: 1566–1573, 2005.
48. 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. 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, 2005.
49. Ishii, K., M. Kurita-Taniguchi, M. Aoki, T. Kimura, Y. Kashiwazaki, M. Matsumoto, and T. Seya. 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, 2005.
50. 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. Dendritic cell maturation Induced by Muramyl Dipeptide (MDP) Derivatives: Monoacylated MDP confers TLR2/TLR4 activation. *J. Immunol.* 174: 7096–7103, 2005.
51. Xie, X., H. He, M. Colonna, T. Seya, T. Takai, and B. D. Croy. Pathways participating in activation of mouse uterine natural killer cells during pregnancy. *Biol. Reprod.* 73: 510–518, 2005.
52. Wali, A, P. J. Morin, C. D. Hough, F. Lonard, T. Seya, M. Carbone, and H. I. Pass. Identification of intelectin overexpression in malignant pleural mesothelioma by serial analysis of gene expression (SAGE). *Lung Cancer.* 48: 19–29, 2005.

53. 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. Wild-type measles virus infection in human CD46/CD150-transgenic mice: CD11c-positive dendritic establish systemic viral infection. *J. Immunol.* 175: 3252-3261, 2005.
54. Okahira, S., F. Nishikawa, S. Nishikawa, T. Akazawa, T. Seya, and M. Matsumoto. Interferon- β induction through Toll-like receptor 3 depends on double-stranded RNA structure. *DNA Cell Biol.* 24: 614-623, 2005.
55. Tsuji, Y., M. Hatanaka, T. Maeda, T. Seya, H. Takenaka, and A. Shimizu. Differential-expression and tyrosine-phosphorylation profiles of caveolin isoforms in human T cell leukemia cell lines. *Int J Mol Med.* 16: 889-893, 2005.
56. Tsujita, T., A. Ishii, H. Tsukada, M. Matsumoto, F-S. Che, and T. Seya. Fish soluble Toll-like receptor (TLR)5 amplifies human TLR5 response via physical binding to flagellin. *Vaccine* 24: 2193-2199, 2006.
57. Ii, M., N. Matsunaga, K. Hazeki, K. Nakamura, K. Takashima, T. Seya, O. Hazeki, T. Kitazaki, and Y. Iizawa. A novel cyclohexene derivative, TAK-242, selectively inhibits Toll-like receptor 4-mediated cytokine production through suppression of intracellular signaling. *Mol Pharmacol.* 69: 1288-1295, 2006.
58. Muromoto, R., K. Okabe, M. Fujimuro, K. Sugiyama, H. Yokosawa, T. Seya, and T. Matsuda. Physical and functional interactions between STAT3 and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded LANA. *FEBS Lett.* 580: 93-98, 2006.
59. Sakurai, F., S. Murakami, K. Kawabata, N. Okada, A. Yamamoto, T. Seya, T. Hayakawa, and H. Mizuguchi. Crucial role of the short consensus repeats 1 and 2, not the cytoplasmic domain, of human CD46 on infection of subgroup B adenovirus serotype 35. *J. Control Release* 113: 271-278, 2006.
60. Wrackmeyer, U., G. H. Hansen, T. Seya, and E. M. Danielsen. Intelectin: a novel lipid raft-associated protein in the enterocyte brush border. *Biochemistry* 45: 9188-9197, 2006.
61. Sasai, M., M. Shingai, K. Funami, M. Yoneyama, T. Fujita, M. Matsumoto, and T. Seya. NAP1 (NAK-associated protein 1) participates in both the TLR3 and the cytoplasmic pathways in type I interferon induction. *J. Immunol.* 177: 8676-8683, 2006.
62. Ishii, A., H. Sawa, T. Tsujita, K. Shida, A. Matsuo, M. Matsumoto, and T. Seya. Lamprey Toll-like receptors, which are distinctive from variable lymphocyte receptor, VLR. *J. Immunol.* 178: 397-406, 2007.
63. Niimi, K. K. Asano, Y. Shiraishi, T. Nakajima, M. Wakaki, J. Kagyo, T. Takihara, Y. Suzuki, K. Fukunaga, T. Shiomi, T. Oguma, K. Sayama, K. Yamaguchi, Y. Natori, M. Matsumoto, T. Seya, and A. Ishizaka. Toll-like receptor 3-mediated eotaxin-1 release from human bronchial smooth muscle cells. *J. Immunol.* 178: 489-495, 2007.

64. Akazawa T., M. Okuno, Y. Okuda, K. Tsujimura, T. Takahashi, M. Ikawa, M. Okabe, T. Ebihara, M. Shingai, N. Inoue, M. Tanaka-Okamoto, H. Ishizaki, J. Miyoshi, M. Matsumoto, and T. Seya. The TLR3-TICAM-1 (TRIF) pathway in myeloid dendritic cells participates in adjuvant-derived antitumor NK induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104: 252-257, 2007.
65. Sukenobu, N., K. Hazeki, K. Yoshikawa, T. Yamamoto, U. Kikkawa, M. Matsumoto, T. Seya, and O. Hazeki. Protein kinase Cd associates TIRAP/Mal and regulates NF-kB and mitogen-activated protein kinases in Toll-like receptor signaling. *Molec. Immunol.* (in press), Epub Dec 9, 2006.
66. Ishii, A., M. Kawasaki, M. Matsumoto, S. Tochinai, and T. Seya. Phylogenetic and expression analysis of amphibian *Xenopus* Toll-like receptors. *Immunogenetics*. (in press), 2007.
67. Azuma M., A. Matsuo, Y. Fujimoto, K. Fukase, K. Hazeki, O. Hazeki, M. Matsumoto, and T. Seya. Inhibition of lipid A-mediated type I interferon induction by Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (in press), 2007.
68. Ebihara, T., H. Masuda, T. Akazawa, M. Shingai, H. Kikuta, T. Ariga, M. Matsumoto, and T. Seya. NKG2D ligands are induced on human dendritic cells by TLR ligand stimulation and RNA virus infection. *Int. Immunol.* (in press), 2007.

Review

1. Seya, T., M. Matsumoto, I. Azuma, and K. Toyoshima. Structural-functional relationship of pathogen-associated molecular patterns: lessons from BCG-cell wall skeleton and Mycoplasma lipoprotein M161Ag. *Microbes Infect.* 4: 955-961 (review), 2002.
2. Seya, T., T. Akazawa, M. Matsumoto, N. A. Begum, I. Azuma, and K. Toyoshima. Innate immune therapy for cancer: application of BCG-CWS and spirulina to patients with lung cancer. *Anticancer Res.* 23: 4369-4376 (review), 2003.
3. Matsumoto M., K. Funami K., H. Oshiumi, and T. Seya. Toll-like Receptor 3: A Link between Toll-like Receptor, Interferon and Viruses. *Microbiol. Immunol.* 48: 147-154 (review), 2004
4. Seya, T., M. Matsumoto, T. Akazawa, and K. Toyoshima. Differential maturation of dendritic cells by TLR adapters: application to immunotherapy. Cancer Immunotherapy Ed. By K. Toyoshima, J. C. Barrett, E. Klein, Y. Hashimoto, and H. Wakasugi. Princess Takamatsu Cancer Research Fund. *Princess Takamatsu Symposia* 34: 12-15 (Synopsis), 2004.
5. Matsuo-Tanabe, M., T. Kawamoto, S. Tanida, M. Matsumoto, and T. Seya. Toll-like receptor 2 agonists with unique properties synthesized with reference to a product of

Streptosporangium. *Immunology* 2004 pp. 235-241 (review), 2004.

6. Seya, T., H. Oshiumi, M. Sasai, T. Akazawa, and M. Matsumoto. Molecules in Focus: TICAM-1 and TICAM-2: Toll-like receptor adapters that participate in induction of type 1 interferons. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37: 524-529 (review), 2005.
7. Seya T., M. Taniguchi, K. Funami, and M. Matsumoto. Antibodies against human Toll-like receptors (TLRs): TLR distribution and localization in human dendritic cells. *J. Endotoxin Res.* 11: 369-374 (review), 2005.
8. Sasai, M., M. Matsumoto, and T. Seya. The Kinase Complex Responsible for IRF-3-Mediated IFN- β Production in Myeloid Dendritic Cells (mDC). *J. Biochem (Tokyo)* 139: 171-175 (review), 2006.
9. Seya T., T. Akazawa, T. Tsujita, and M. Matsumoto. Role of Toll-like receptors in adjuvant-augmented immune therapies. *eCAM.* 3: 31-38 (review), 2006.
10. Seya, T., M. Matsumoto, T. Akazawa, J. Uehori, I. Azuma, and K. Toyoshima. Toll-like receptors and their adapters in immunotherapy for cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* (in press) (review), 2006.

6-(1)-2. 白川グループ

1. Shimada T, Cheng L, Ide M, Fukeda S, Enomoto T, Shirakawa T. Effect of lysed enterococcus faecalis FK-23 (LFK) on allergen-induced peritoneal accumulation of eosinophils in mice. *Clin. Exp. Allergy.* 2003;33:684-687.
2. Bottini N, Mao XQ, Borgiani P, Saccucci P, Stefanini L, Greco E, Fontana L, Hopkin JM, Shirakawa T: Genetic control of serum IgE level; a study of lowmolecular weight protein tyrosine phosphatase. *Clin. Genet.* 2003;63:228-231
3. Ouchi K, Suzuki Y, Shirakawa T, Kishi F. Polymorphism of SLC11A1(formerly NRAMP1) gene confers susceptibility to Kawasaki disease. *J. Infect Dis.* 2003;187:326-329.
4. Tanaka K, Roberts MH, Yamamoto N, Sugiura H, Uehara M, Mao X-Q, Shirakawa T, Hopkin JM: Genetic variants of the receptors for thromboxane A2 and IL-4 in atopic dermatitis.. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 292: 776-780.
5. Hirota T, Obara K, Matsuda A, Akahoshi M, Nakashima K, Hasegawa K, Takahashi N, Shimizu M, Sekiguchi H, Kokubo M, Doi S, Fujiwara H, Miyatake A, Fujita K, Enomoto T, Kishi F, Suzuki Y, Saito H, Nakamura Y, Shirakawa T, Tamari M. Association between genetic variation in the gene for death-associated protein-3 (DAP3) and adult asthma. *J Hum Genet.* 2004; 49: 370-375.
6. Akahoshi M, Ishihara M, Remus N, Uno K, Miyake K, Hirota T, Nakashima K, Matsuda A, Kanda M, Enomoto T, Ohno S, Nakashima H, Casanova JL, Hopkin JM, Tamari M, Mao XQ, Shirakawa T: Association between IFNA genotype and the risk of sarcoidosis. *Hum.*

Genet 2004;114:503-509.

7. Shao C, Suzuki Y, Kamada F, Kanno K, Tamari M, Hasegawa K, Aoki Y, Kure S, Yang X, Endo H, Takayanagi R, Nakazawa C, Morikawa T, Morikawa M, Miyabayashi S, Chiba Y, Karahashi M, Saito S, Tamura G, Shirakawa T, Matsubara Y: Linkage and association of childhood asthma with the chromosome 12 genes. *J. Hum. Genet.* 2004;49:115-122.
8. Nakajima T, Iikura M, Okayama I, Matsumoto K, Uchiyama C, Shiramkawa T, Yang X, Adra CN, Hirai K, Saito H: Identification of granulocyte subtype-selective receptors and channels by high-density oligonucleotide probe array. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004; 113:528-535.
9. Peisong G, Mao XQ, Enomoto T, Feng Z, Gloria-Bottini F, Bottini E, Shirakawa T, Sun D, Hopkin JM: An asthma-associated genetic variant of STAT6 predicts low burden of ascaris worm infestation. *Genes Immun.* 2004;5:58-62.
10. Fukuda S, Ishikawa H, Koga Y, Yaiba Y, Nakashima K, Cheng L, Shirakawa T. Allergy and serum antibodies against bacterial species of predominant commensal intestinal microflora in schoolchildren. *J. Adoles. Health.* 2004; 35: 156-158.
11. Kamada F, Suzuki Y, Shao C, Tamari M, Hasegawa K, Hirota T, Shimizu M, Takahashi N, Mao XQ, Doi S, Fujiwara H, Miyatake A, Fujita K, Chiba Y, Aoki Y, Kure S, Tamura G, Shirakawa T, Matsubara Y. Association of the hCLCA1 gene with childhood and adult asthma. *Genes Immun.* 2004; 5: 540-7.
12. Hasegawa K, Tamari M, Shao C, Shimizu M, Takahashi N, Mao XQ, Yamasaki A, Kamada F, Doi S, Fujiwara H, Miyatake A, Fujita K, Tamura G, Matsubara Y, Shirakawa T, Suzuki Y. Variations in the C3, C3a receptor, and C5 genes affect susceptibility to bronchial asthma. *Hum Genet.* 2004; 115: 295-301.

(2)その他の著作物

5 件、記載は省略

(3)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 12 件、国際会議 21 件)

1. 瀬谷 司(北海道大学): アジュバントレセプターと免疫療法、第26回阿蘇シンポジウム(熊本) August 2, 2002(招待講演)
2. 瀬谷司(北海道大学): Activation of human Toll-like receptor 3 by double-stranded RNA induces interferon-beta via MyD88- and Nal/TIRAP-independent pathway. 第 32 回免疫学会総会(東京) November 26, 2002(シンポジウム)
3. 瀬谷司(北海道大学): ウイルスが誘起するヒト樹状細胞の免疫応答と Toll-like receptors. 「自然免疫と獲得免疫のクロストーク」千里ライフサイエンスセミナー, (大阪) Jan. 22, 2003

(招待講演)

4. 瀬谷司(北海道大学):Adapter molecules of human Toll-like receptor 3 and 4 that induce interferon-beta. 第 68 回日本インターフェロンサイトカイン学会、(東京) July 21, 2003(招待講演)
5. 瀬谷司(北海道大学):抗ウィルスの TLR アダプターとシグナリング、第 14 回日本生体防御学会 (京都) August 1, 2003(招待講演)
6. 瀬谷司(北海道大学):Toll-like receptor adapters participating in selection of pathways for anti-viral type 1 interferon induction.第 33 回日本免疫学会総会 (福岡) Dec. 9, 2003 (シンポジウム)
7. 瀬谷司(北海道大学):Double-stranded RNA/TLR3 依存性 type1 interferon 誘導の分子機構、第 51 回日本ウイルス学会 (京都) Oct. 10, 2003 (シンポジウム)
8. Seya T., Matsumoto M., Oshiumi H., Sasai M.: TICAM-1 and TICAM-2: Toll-like receptor adapters involved in anti-viral type 1 interferon induction. 10th International Conference on Lymphocyte Activation and Immune Regulation. Newport Beach, CA (USA) Feb. 5-8, 2004(シンポジウム)
9. Matsumoto M., Funami K., Seya T.: Toll-like receptor 3 senses dsRNA at intracellular compartment in DCs. 10th International Conference on Lymphocyte Activation and Immune Regulation. Newport Beach, CA (USA) Feb. 5-8, 2004(シンポジウム)
10. Seya T., Matsumoto M.: TICAM-2: a bridging adapter recruiting to Toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS. Montreal, Quebec (Canada) Jul. 18-23, 2004.(ワークショップ)
11. Seya T., Matsumoto M., Akazawa T.: TLRs and their adaptors in adjuvant immunotherapy for cancer. 8th Biennial Conference of the International ENDOTOXIN Society. (Kyoto) Nov. 15-18, 2004(招待講演)
12. 瀬谷司(北海道大学):糖鎖認識 Toll 様受容体:感染症・がん免疫療法の開発を旨として. 千里ライフサイエンスセミナー (大阪) Dec. 18-19, 2004(シンポジスト)
13. 瀬谷 司(北海道大学):ワクチンアジュバントによる免疫活性化の分子機構、第8回日本ワクチン学術集会(札幌)Oct. 9-10, 2004(招待講演)
14. 瀬谷 司(北海道大学):がんのアジュバント免疫療法有効性の分子基盤-微生物成分と Toll-like receptor (TLR)-、第7回日本補完代替医療学会学術集会 (金沢) Oct. 30, 2004 (招待講演)
15. Seya T., Akazawa T., Matsumoto M.: Role of TLRs and their adapters in immunotherapy for cancer.第34回日本免疫学会総会・学術集会札幌) Dec. 1-3, 2004(シンポジスト).

16. 瀬谷司(北海道大学): Toll 様受容体による I 型インターフェロン誘導と生体防御、第 8 回肝臓分子生物学研究会(京都) Jan. 18, 2005 (招待講演)
17. 瀬谷司(北海道大学): アジュバントの免疫応答とその分子機構、第 25 回福岡臨床免疫研究会(福岡) Jan. 29-30, 2005 (招待講演)
18. Seya T., Matsumoto M., Akazawa T: Participation of TLRs and their adaptors in CTL/NK induction for immunotherapy for cancer., Japan-USA Cancer Research (Sapporo), Aug. 19, 2005 (招待講演)
19. 松本美佐子(北海道大学)、岡平吏世、西川諭、瀬谷 司: Toll-like receptor 3 により認識される dsRNA 構造、第 70 回インターフェロン・サイトカイン学会(京都)、Jul. 20-21, 2005(シンポジウム)
20. 瀬谷 司(北海道大学): 抗がん免疫アジュバントの機能的多様性と選択適用の分子基盤、第 64 回日本癌学会学術総会(札幌)、Sep. 14-16, 2005 (ワークショップ)
21. 新開大史(北海道大学)、松本美佐子、海老原 敬、綾田 稔、小倉 壽、瀬谷 司: 麻疹ウイルス感染における CD11c 陽性樹状細胞の重要性～CD46/CD150 トランスジェニックマウスを用いた解析～、第 53 回日本ウイルス学会学術集会(横浜)、Nov. 20-22, 2005 (ワークショップ)
22. 新開大史(北海道大学)、松本美佐子、瀬谷 司: CD46/CD150 トランスジェニックマウスを用いた麻疹ウイルス感染モデル～麻疹ウイルス感染における CD11c 陽性樹状細胞の重要性～、第 28 回日本分子生物学会年会(福岡)、Dec. 7-10, 2005 (ワークショップ)
23. 松本美佐子(北海道大学)、笹井美和、舟見健児、瀬谷 司: Toll-like receptor 3-mediated signaling DCs、第 28 回日本分子生物学会年会(福岡)、Dec. 7-10, 2005 (ワークショップ)
24. Seya T., Matsumoto M., Shingai M., Ebihara T.: CD11c-positive dendritic cells with lesser type I IFN production are crucial in establishing wild-type measles virus infection in a mouse model., 35th Japan Immunology Society Meeting (Yokohama), Dec. 13-15, 2005(シンポジウム)
25. 瀬谷 司(北海道大学)、赤沢 隆、松本美佐子: TLR3-TICAM-1 シグナルは樹状細胞依存性 NK 活性化に必須である、第 71 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会(兵庫)、Jul. 7-8, 2006(ワークショップ)
26. T. Seya : Differential Effector Induction by Dendritic Cells in Response to TLR3 Adjuvants., The 26th International Symposium of the Sapporo Cancer Seminar Foundation “Innate Immunity in Cancer and Infectious Diseases”(Sapporo), Jul. 22-23, 2006 (招待講演)
27. 瀬谷 司(北海道大学)、石井秋宏、松尾 綾、松本美佐子: ヤツメウナギの補体制御因子と Toll 様受容体、日本比較免疫学会第 18 回学術集会(広島)、Aug. 23-25, 2006 (招待講演)

28. 瀬谷 司(北海道大学)、松本 美佐子、児玉 憲、赤沢 隆: Advance of adjuvant-augmented immune therapy for cancer、第 65 回日本癌学会学術総会(横浜)、Sep. 28-30, 2006(シンポジウム)
29. 児玉 憲(大阪府立成人病センター)、松本 美佐子、赤沢 隆、瀬谷 司: BCG-CWS 免疫アジュバント療法の分子基盤と臨床応用、第 44 回日本癌治療学会総会(東京)、Oct. 18-20, 2006(ワークショップ)
30. 瀬谷 司(北海道大学)、松尾 綾、松本美佐子、深瀬浩一、瀬谷 司: がんのアジュバント免疫療法の確立と開発、第 58 回日本気管食道科学会総会ならびに学術講演会(札幌)、Oct. 5-6, 2006(特別講演)
31. 瀬谷 司(北海道大学): 抗がんNK, CTLを誘導するアジュバント免疫療法の確立へ向けて、第 9 回日本補完代謝医療学会学術集会(大阪)、Oct. 28-29, 2006(特別講演)
32. 瀬谷 司(北海道大学): Toll-like receptors in myeloid dendritic cells that participate in switching on of the CTL- or NK-inducing pathway, 弘前国際医学フォーラム第 10 回学術集会(弘前)、Nov. 21-22, 2006(招待講演)
33. 瀬谷 司(北海道大学): ウイルス感染が誘起する樹状細胞活性化とエフェクター誘導、第 9 回リサーチフォーラム「ウイルスとヒト」(京都)、Dec. 2, 2006(招待講演)

② 口頭発表 (国内会議 84 件、国際会議 15 件)
記載は省略

③ ポスター発表 (国内会議 28 件、国際会議 17 件)
記載は省略

(4)特許出願

① 国内出願 (6 件)

1. 抗体および阻害剤並びにそれを用いた形質転換方法および形質転換キット、松本美佐子・瀬谷司、独立行政法人科学技術振興機構、2002 年 6 月 21 日、特願 2002-171952
2. 哺乳動物の Toll 様受容体 3 に結合する新規アダプタータンパク質およびその遺伝子、松本美佐子・瀬谷司・押海裕之、独立行政法人科学技術振興機構、2002 年 11 月 29 日、特願 2002-349015
3. 哺乳動物の Toll 様受容体 4 に結合しタイプ I インターフェロン誘導を媒介する新規アダプター分子およびその利用、松本美佐子・瀬谷司、独立行政法人科学技術振興機構、2003 年 6 月 30 日、特願 2003-188177
4. 抗 TLR 抗体およびその利用、瀬谷司・松本美佐子、北海道大学、2005 年 2 月 9 日、特願 2005-033629
5. 免疫応答を惹起するための新規アジュバントおよびその利用、瀬谷司・松本美佐子・辻田忠志、北海道大学、2005 年 2 月 10 日、特願 2005-035265
6. DI RNA を有効成分とする免疫治療用薬剤、瀬谷司・松本美佐子・新開大史、北海道大学、2006 年 11 月 30 日、特願 2006-323494

② 海外出願 (3 件)

1. 抗体および阻害剤並びにそれを用いた形質転換方法および形質転換キット、松本美佐子・瀬谷司、独立行政法人科学技術振興機構、2003 年 2 月 17 日、PCT/JP03/01673
2. 哺乳動物の Toll 様受容体3に結合する新規アダプタータンパク質およびその遺伝子、松本美佐子・瀬谷司・押海裕之、独立行政法人科学技術振興機構、2003 年 11 月 20 日、PCT/JP03/14854
3. 抗 TLR 抗体およびその利用、瀬谷司・松本美佐子、北海道大学、2006 年 2 月 8 日、PCT/JP2006/302169

(5)受賞等

①受賞

1. 瀬谷司、2001 年、高松宮妃、「微生物成分と自然免疫による抗がん免疫療法の確立に向けて」
2. 松本美佐子、2002 年、内藤記念科学振興財団、「ウイルス感染と Toll-like receptor」
3. 松本美佐子、2005 年 3 月、上原記念生命科学財団研究助成金、「ウイルス感染と Toll 様受容体」
4. 瀬谷司、2005 年 10 月、三菱財団自然科学研究助成、「生体防御の分子進化と機能拡散」
5. 瀬谷司、2006 年 9 月、武田科学振興財団一般研究奨励、「ウイルス感染回避の自然免疫分子機構」

②新聞報道

1. 2003 年 1 月 20 日、産経新聞、「インターフェロンを活性化“伝令”たんぱく質発見」
2. 2003 年 1 月 20 日、大阪日日、「抗ウイルス伝令発見」
3. 2003 年 1 月 20 日、毎日新聞、「「指令」たんぱく質発見」
4. 2003 年 1 月 20 日、読売新聞、「インターフェロン大量生成させるたんぱく質発見」
5. 2003 年 1 月 20 日、日経新聞、「免疫応答の関連たんぱく質発見」
6. 2003 年 3 月号、JST News、「ウイルスに対する免疫応答のシグナル伝達に関する新規たんぱく質(TICAM-1)の発見」
7. 2003 年 9 月号、日経トレンディ、「インターフェロンを大量生成させるたんぱく質について」
8. 2004 年 9 月 28 日、日経産業新聞、「がん免疫療法で新手法」
9. 2006 年 4 月 28 日、科学新聞、「難治性疾患の原因究明、治療 自然免疫機構からアプローチ」
10. 2006 年 6 月号、JST News、「新たな受容体の発見で進む 免疫の全体像の解明」

③その他

(6)その他特記事項

無し。

7 研究期間中の主な活動

(1)ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2005. 2. 10	アジュバント免疫療法 100周年記念シンポジウム(北大)	北海道大学	300人	TLRと免疫療法
2005. 3. 12	がんの免疫療法	大阪府立成人病センター	40人	BCG-CWSの機能と抗がん効果の研究打合わせ
2006. 7. 21 ～ 7. 23	The 26 th International Symposium of Sapporo Cancer Seminar “Innate immunity in cancer and infectious diseases”	北海道大学	150人	“微生物パターン認識レセプター”を中心に、抗感染・抗がん宿主応答の研究基盤を構築することを目的とする

8 結び

本企画は当初2年余大阪府立成人病センター研究所で立ち上げ、後の3年を北海道大学医学研究科で展開した。共同研究者は引っ越しの前後で研究の中断を余儀なくされたが、遅ればせながら企画の推進を全うできた。当グループの主題は基礎研究から臨床へのフィードバックに主眼を置いてスタートした。結果は樹状細胞TLRから細胞性免疫のエフェクター、NK, CTLが起動することを示し、かつTLRアダプターがこの指向性に深く関与することを示すことができた。一連の仕事から樹状細胞にNK-, CTL-指向性を与えるアダプター依存性の経路の存在が示唆される。樹状細胞の新規TLR経路が抗原提示やNK活性化に重要として、この経路を分子レベルで同定する仕事が残されている。樹状細胞特有の分子シグナルを追うことが難しいため、未だに免疫療法の科学基盤は裏付けが取れていないという実感が残った。今後、この研究領域を発展させる機会があれば、樹状細胞活性化の多様性の分子基盤を証明する基礎研究として再スタートさせる必要がある。その成果はヒトに用いて害のないアジュバントでがん・感染症の免疫療法や樹状細胞療法を確立することに貢献するであろう。

今後はこれらの成果を如何に疾患解明や病態の改善に応用していくかが問われるであろう。多くの健康食品、アジュバントは分子機構が未知のまま使われており、これらを自然免疫の観点から整備する中から次のヒントが生まれる可能性もある。自然免疫は国内外で昆虫学者、補体系研究者、レクチン研究者がよい仕事を手がけてきたが、ヒト疾患と自然免疫の関連研究は今後の体系化が待たれる。

国内外いずれにおいても本領域の重要性は認識されてきたが、境界領域に熟達した研究者、研究プロジェクトは十分とは言い難い。特に本邦における境界領域の研究体制は今後の指導層の才腕に求められ、国際的視野に立った独創性の高い研究体制の確立が求められる。

抗がん、抗感染症ワクチンのアジュバントは次世代の医薬品開発の際是非取り上げて欲しい項目として期待される。患者さんには高いQOLを望める。アジュバントが有効な遺伝子基盤を持った患者さんを選別して投与し、無効の患者さんには別の治療を施すという予後診断の確立を期待してBCG-CWSの応答性とSNP解析を平行して進めた。遺憾ながらアジュバントの有効性とSNPの関連を解析する企画は今後に残される。機会を改めて完成させる予定である。本 CRESTの研究期間に生まれた研究の芽をいかに育むかが今後の課題である。



研究室のメンバー(2006年3月時点)