

No.	22-3064	
研究課題名	疾患発症におけるTLRを介した免疫応答の関与の解明	
研究代表者	高村 祥子（愛知医科大学・教授）	
研究組織	受入教員	三宅 健介（東京大学医科学研究所・教授）
	分担者	高木 秀和（愛知医科大学医学部 感染・免疫学講座・准教授（特任））
	分担者	乾 匡範（愛知医科大学医学部 感染・免疫学講座・講師）
	分担者	山崎 達也（愛知医科大学医学部 感染・免疫学講座・講師）
	分担者	伴野 勸（愛知医科大学医学部 感染・免疫学講座・助教）
	分担者	福井 竜太郎（感染遺伝学分野・特任准教授）
	分担者	三宅 健介（感染遺伝学分野・教授）

**東京大学医科学研究所国際共同利用・共同研究拠点事業
共同研究報告書 (年次終了・研究完了)【国内】**

共同研究報告 (年次終了)

Toll-like Receptor(TLR)を介する免疫応答はあらゆる細胞活性化を誘導し、急性炎症や慢性炎症の原因となって様々な疾患発症につながることを示唆されているが、その機構に関してはまだ不明な点も多い。われわれはこれまでTLR会合タンパクや脂質などを切り口として、どのような免疫活性化及び制御機構が誘導され疾患発症及び制御につながるのか、個体レベルでの解明に努めてきた。これまで東大医科学研究所・感染遺伝学分野の協力のもとに行ってきた共同研究の結果、われわれは以下の3つの小課題を計画した。

- (1) 肝細胞の生存・死滅を左右する免疫応答の関与と決定因子の同定
- (2) RP105のヒト免疫細胞における機能解明
- (3) 脂質によるTLR免疫応答制御機構とシグナル制御

<2022年度の計画>

- (1) のLPS+D-galactosamine投与による劇症肝炎を制御する機構の解明の中で、特にin vitroでの解析を進める。またアセトアミノフェン誘導性肝炎に関するin vivo解析も行う。
- (2) の培養条件の同定をLC/MS解析などで進めるとともに、ヒトB細胞での抗体産生解析の確立を行う。
- (3) の脂質によるTLR免疫応答制御機構に関して、どのようなシグナルなのか、主にin vitro解析を通じて明らかにしていく。

<2022年度の報告>今年度は主に(1)及び(2)に関して結果が得られた。

(1)：われわれは抗マウス TLR4 モノクローナル抗体である Sa15-21 を作製し、Sa15-21 をあらかじめマウスに投与することで、LPS/D-ガラクトサミンによる劇症肝炎発症を阻止できることを以前報告した。この阻止機構は免疫反応の制御ではなくむしろ増強するものであった。そこで今回さらにこの機構を明らかにするために、炎症応答の惹起に重要であるマクロファージにおける Sa15-21 の TLR4 シグナルに与える効果を検討した。マウス骨髄細胞から誘導したマクロファージに Sa15-21 を添加しても炎症性サイトカイン産生は見られないが、その3時間後にさらに LPS を添加すると、コントロール抗体添加群に比べ TNF- α , IL-6 などの炎症性サイトカイン産生が有意に増強し、抗炎症性サイトカインである IL-10 産生が有意に減少した。またこの産生増強は LPS の代わりに他の TLR リガンド刺激でも認められた。この Sa15-21 によるサイトカイン産生増強は MD-2 欠失マウス由来マクロファージでは認められなかった。以上より Sa15-21 は TLR4/MD-2 依存的にマクロファージの質的変化、すなわち M1 型マクロファージへの変化を誘導することが示唆された。さらにわれわれは Sa15-21 刺激細胞および LPS 刺激細胞におけるシグナル解析を経時的にウエスタンブロットで調べた。その結果 LPS 刺激では NF- κ B および IRF3 双方の活性化が誘導されるのに対して、Sa15-21 刺激では NF- κ B の活性化は誘導するものの、IRF3 活性化は認められないことがわかった。また NF- κ B-GFP リポータープラスミドや TLR4/MD-2 などを発現させた Ba/F3 細胞では、LPS 刺激による NF- κ B 活性化は経時的に低下していくのに対して、Sa15-21 刺激では NF- κ B 活性化が持続し続けることがわかった。またマクロファージの TLR4 細胞表面発現レベルは LPS 刺激で減少するのに対し Sa15-21 刺激では変わらなかった。これは Sa15-21 では LPS 刺激時のような TLR4 の細胞内移行は誘導されず、このため IRF3 活性化も誘導されないことが考えられた。

【考察及び結論】今回個体レベルでの Sa15-21 による免疫賦活作用を細胞レベルで示すこと

ができた。Sa15-21 は TLR4/MD-2 を介して M1 型マクロファージに変化させかつ NF-κB 活性化を持続させるが TLR4 の局在変化は誘導せず、このため IRF3 も活性化しないことから、LPS とは異なる TLR4 活性化様式であることが分かった。以上の解析結果は細菌感染に対する新たな制御方法開発に寄与する可能性がある。

(2) 【背景】

Radioprotective105(RP105;CD180)は Toll-like Receptor 4(TLR4)と構造的によく似た I 型膜貫通分子であり、可溶性糖タンパク質の MD-1 (Ly86) と会合して細胞表面に発現している。抗 RP105 抗体が B 細胞の強力な活性化や、感染予防のワクチンアジュバント作用を生じること、また SLE 患者での RP105 陰性 B 細胞が自己抗体を産生していたり、この RP105 陰性 B 細胞が病勢に応じて増加し病勢のマーカーになることなどから、臨床的にも注目されている。しかしどうして RP105 陰性の B 細胞が増加するのか、そのメカニズムは不明である。本研究ではこのメカニズムを解析する前段階として、まずはどうやって MD-1 依存的に RP105 が細胞表面に発現するようになるのか、その仕組みを糖鎖修飾に着目して検討した。

【方法】

解析に必要な変異体は PCR 法で作製し、発現ベクターに組み込んで 293T 細胞やヒト B 細胞株に発現させた。フローサイトメトリーやウエスタンアッセイ、免疫沈降法などにより解析を行った。

【結果】

MD-1 の存在下では RP105 は 2 種類のサイズのバンドとして検出された (U フォーム:90kD および L フォーム:75kD と名付けた)。MD-1 非存在下では L フォームのみが検出され、抗ヒト RP105 抗体 (MHR73) での免疫沈降では U フォームのみが検出された。N 型糖鎖付加の阻害剤であるツニカマイシン処理を行うと RP105 のどちらのフォームも消失したことや、RP105 の 2 か所の N 型糖鎖がこの 2 つのフォームの形成や RP105 の細胞表面発現に必要なことなどから、N 型糖鎖付加は RP105 の細胞表面発現にとって重要であることがわかった。いっぽう MD-1 は N 型糖鎖依存的に 3 つのサイズのバンドとして検出されるが、MD-1 の N 型糖鎖付加に重要な 2 か所のアミノ酸が変異した変異体存在下では、MD-1 はサイズの最小なバンドのみとなり RP105 の細胞表面発現も消失すること、また既に RP105 が発現した後ではこれらの変異体強制発現による影響は見られないこと等がわかった。

【考察・結論】

MD-1 とその N 型糖鎖は、RP105 の細胞表面発現にとって重要であることが分かった。なお、ほかの脊椎動物における MD-1 のアミノ酸配列のアライメント結果から、MD-1 の 2 か所の糖鎖修飾サイトは (N96 および N156) 哺乳類のみに保存されていた。将来的に MD-1 の N 型糖鎖付加部位の SNPs に関する情報は、RP105 陰性 B 細胞の発現機構やその除去方法開発などの新たな知見につながる可能性がある。

以上の結果はそれぞれ論文発表も行った。