

論文の内容の要旨

論文題目 Unc93B1 による Toll-like receptor(TLR)7 及び TLR9 の応答制御機構の解析

氏名 山本 千香子

Toll 様受容体(Toll-like receptor, TLR)は、最初に同定された生体シグナル系を担う病原体センサーで外来微生物由来の分子構造を認識し、細胞内シグナルを伝達することで自然免疫応答を誘導する。TLR ファミリーのなかでも、TLR7 は一本鎖 RNA を、TLR9 は非メチル化 CpG 配列を持つ DNA を認識する。Unc93B1 (Unc93 homolog B1)は、これらの TLR の局在を制御することで応答性を制御する分子である。Unc93B1 の 34 番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した変異体(D34A 変異体)は TLR7 応答を増強し、TLR9 応答を抑制する。その結果、Unc93B1 D34A 変異体ノックインマウスは、TLR7 依存的な全身性致死性の炎症病態を示す。これらのことから、Unc93B1 は TLR7 及び TLR9 の応答を相反的に制御することで、免疫系の恒常性を維持していると考えられる。しかしながら、その分子基盤については不明な点が多い。本研究では Unc93B1 D34A 変異体が TLR7 の応答性を増強し、TLR9 の応答性を減弱させる分子機序を明らかにすることを目的とした。

Unc93B1 は TLR7 及び TLR9 の応答に会合することから、まず野生型と D34A 変異体の Unc93B1 間で、TLR7 及び TLR9 との会合について比較した。その結果、TLR7 は野生型と D34A 変異体間で Unc93B1 との会合能に変化が見られなかった。一方、TLR9 は野生型に比較して D34A 変異体の Unc93B1 との会合は著明に減弱していた。さらに、Unc93B1 D34A 変異体共発現下では、切断型の TLR9 が減少していた。この結果から、Unc93B1 D34A 変異体での TLR9 応答性の減弱は、TLR9 と Unc93B1 の会合が減弱することで TLR9 が切断されなくなることが原因であると考えられる。しかしながら、切断され

ないTLR9の応答への影響は分かっていないため、切断されないTLR9変異体を作製しての応答への影響について比較することにした。

切断されないTLR9変異体を作製するために、TLR9の切断領域461～469番目のアミノ酸配列を469番目のアミノ酸からN末寄りに8～13個欠失させた変異体を作製し切断されない変異体を探索した。その結果、455～469番目のアミノ酸を欠失した変異体(d13変異体)ではTLR9の切断が検出されなかった。そのため、d13変異体と455～469番目のアミノ酸をアラニンに置換したAla13変異体を発現するTLR9ノックインマウスを作製し、TLR9応答への影響について解析した。

まず、個体レベルでのTLR9リガンドへの応答について比較した。TLR9ノックアウトマウス、野生型マウス、TLR9変異体(d13及びAla13)ノックインマウスそれぞれにTLR9リガンドCpG-B1668を静脈投与し、応答を比較した。刺激依存的なサイトカイン産生について解析したところ、TLR9刺激依存的な応答について、野生型マウスに比較してTLR9変異体(d13及びAla13)ノックインマウスで優位に抑制された。

次に、マウス由来細胞を用いて免疫細胞毎のTLR9応答能について比較した。細胞は骨髄細胞誘導性cDC (conventional dendritic cells)、Macrophage、pDC (plasmacytoid dendritic cells)及び脾臓由来B細胞を利用した。それぞれの細胞をTLR9リガンドCpG-A1585及びCpG-B1668で刺激し、TLR9応答について比較した。その結果、MacrophageとcDCにおいては、TLR9変異体ノックインマウスで応答が優位に抑制された。一方、pDCと脾臓由来B細胞においては、TLR9応答の有意な抑制が認められない条件もあった。

さらに、マウス由来細胞中のTLR9の切断について比較した。その結果、すべての細

胞種において TLR9 変異体ノックインマウスで、切断型 TLR9 の量が野生型マウス由来細胞に比較して減弱していた。TLR9 変異体ノックインマウス由来 Macrophage については切断型 TLR9 の量が減弱していただけでなく、切断されていない TLR9 の量が増加していた。そのため、TLR9 変異体ノックインマウス由来 Macrophage での TLR9 応答抑制は、TLR9 の切断型の割合の減弱によるものと示唆された。しかし、cDC、pDC、脾臓細胞では、切断型 TLR9 の量だけでなく免疫沈降できた TLR9 の量も減少していたため、TLR9 応答抑制の原因が TLR9 の切断型の割合の減弱によるものと結論付けることはできなかった。本研究では完全に切断されない TLR9 変異体は作製できなかったが、TLR9 の切断が TLR9 応答に重要である可能性が示唆された。

次に、Unc93B1 が TLR7 と TLR9 のどの分子構造を識別して応答を制御しているのか検討した。そこで、TLR7 と TLR9 を 3 つの機能ドメイン、LRR (leucine rich repeat)・膜貫通領域・細胞質領域に分け、それぞれを入れ替えた TLR7・9 キメラを作製し、解析することで Unc93B1 によって識別される領域を特定することを試みた。

まず、TLR7・9 キメラと野生型及び D34A 変異体の Unc93B1 の会合を比較した。その結果、TLR7 の膜貫通領域と細胞質領域を TLR9 に置換した T799 では、TLR9 と同様に野生型 Unc93B1 に比較して Unc93B1 D34A 変異体で会合量が減弱し、TLR9 の膜貫通領域と細胞質領域を TLR7 に置換した T977 や TLR9 の細胞質領域を TLR7 に置換した T997 では、野生型 Unc93B1 と Unc93B1 D34A 変異体の間で会合量にほとんど差が見られず、切断型 TLR の量にも変化が見られなかった。この結果から、Unc93B1 は、TLR9 の細胞質領域及び膜貫通領域を TLR7 と識別して、TLR9 との会合を制御していることが示唆された。

次に Unc93B1 による TLR7 及び TLR9 の応答の相反的制御が TLR7 と TLR9 のどの分子構造に依存するのか検討した。TLR7 の細胞質領域を TLR9 に置換した T779 では、TLR9 のように野生型 Unc93B1 発現下に比較して Unc93B1 D34A 変異体発現下でリガンド刺激依存的な NF- κ B 活性化が減弱した。TLR9 の細胞質領域を TLR7 に置換した T997 では、野生型 Unc93B1 発現下に比較して Unc93B1 D34A 変異体発現下でリガンド刺激依存的な NF- κ B 活性化が TLR7 と同様に亢進した。この結果から、Unc93B1 による TLR7 及び TLR9 の応答の相反的制御は、それぞれの TLR の細胞質領域を識別することで制御されていることが示唆された。

TLR の過剰応答は自己免疫疾患などの原因となるため、TLR は自己免疫疾患のあらたな創薬標的分子になる事が期待されている。一方で、TLR の応答欠失も感染症などの原因となるため過剰な応答抑制は副作用になる危険もある。本研究の成果のさらなる発展によって、Unc93B1 D34 の変異依存的な TLR7 の過剰応答や TLR9 の応答抑制の制御機構を明らかにすることが、Unc93B1 D34 の変異非依存的な TLR7 の過剰応答や TLR9 の応答抑制の制御機構の解明のきっかけになる可能性があると考えられる。これらの成果から、TLR 応答をすべて抑制するのではなく過剰な応答を特異的に抑制するメカニズムを見出すことが、TLR を標的とした創薬において重要である。