

自然免疫系における相反的な核酸応答制御機構の解明

東京大学 医科学研究所 感染遺伝学分野

福井 竜太郎

< 1. 背景 >

TLR (Toll-like receptor)は自然免疫系に属する受容体であり、病原体に共通する構造を認識して免疫応答を惹起する役割を担っている。ほ乳類のTLRは約10種類のファミリーから構成されており、主に細胞表面で脂質やタンパク質を認識するグループと、細胞内で核酸を認識するグループとに分類することができる。このうち後者のグループはウイルスや細菌に由来する核酸を認識するが、核酸の構造は病原体と宿主との間で類似性が高いことから、宿主由来の核酸をも内因性のリガンドとして認識することが知られている。こうした内因性リガンドに対する過剰な応答は自己免疫疾患などの要因となるため、核酸認識系TLRの応答は適切に制御されなくてはならない(1, 2)。

我々はこれまでに、核酸認識系TLRの応答制御機構としてUnc93B1 (Unc93 homolog B1)がTLR7 (RNAなどを認識)とTLR9 (DNAを認識)の応答性を相反的に制御することを明らかにした(3)。この機能はUnc93B1のN末端側に依存的なものであり、34番目のアスパラギン酸 (D34)を中心とした部位が重要である。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の応答性が亢進し、TLR9の応答性が減弱したことから、Unc93B1は定常時においてTLR9優位な応答性を保ちつつ、TLR7の過剰な応答を抑制していることが示唆された。

さらに、Unc93B1をコードする遺伝子にD34A変異を持つマウス (D34Aマウス)を作製し、生体内におけるTLR7/TLR9応答制御の意義を検討したところ、D34Aマウスは肝炎、脾腫、血小板減少、糸球体腎炎、骨髄増殖性異常などを自然発症し、1年以内に半数以上が死亡した。このことから、Unc93B1によるTLR7/TLR9バランスの制御は生体の恒常性維持に必須の機能であることが明らかとなった(図1)(4)。こうした知見をふまえ、本研究では以下の点について検討を行った。

1. TLR7の過剰な応答を基盤として多彩な表現型を誘発する調節因子の探索

2. 核酸認識系TLRの応答制御に関わる新規分子の探索と解析

すなわち、核酸認識系機構の応答制御に関して、分子および生体のレベルから解明を進めていくことを目的として研究を進めた。前者についてはD34Aマウスの表現型について系統間での差を検討し、後者についてはshRNAライブラリとレポーターアッセイによる探索を行った。

< 2. 方法 >

2-1. 各種遺伝子背景を持つD34Aマウスの作製：D34Aマウスは当初129系統のES細胞で作製されたものであり、これをB6 (C57BL/6)系統およびBALB/c系統に戻し交配した。戻し交配の回数は最低で8回、主なデータは12回以上行ったものを示した。12回の戻し交配を終えた時点でMITマーカーを用い、各遺伝子領域が戻し交配を行った系統由来のものに置換されていることを確認した(理研BRCにて実施)。

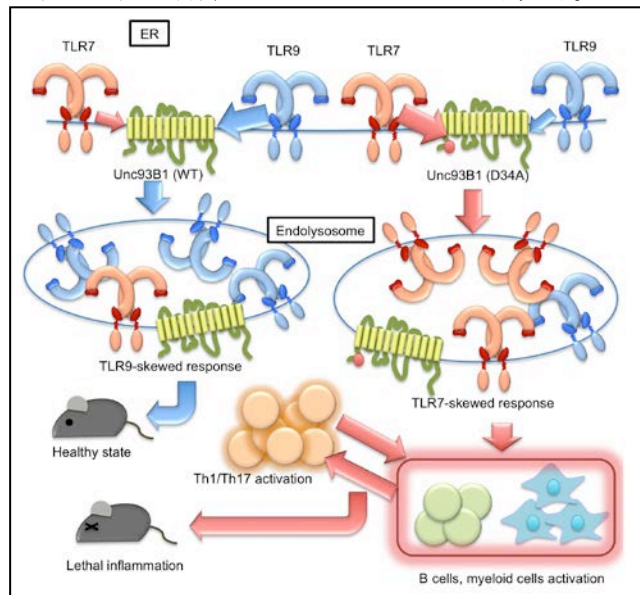


図1：TLR7/TLR9 バランスの破綻は致死的な炎症を誘導する

2-2. D34Aマウスの表現型確認：各系統のD34Aマウスは尾静脈から採血して血球計算を行い、白血球、赤血球、血小板などの値を測定した。また、解剖を行って臓器を摘出後、ホルマリン固定して薄切し、H&E（ヘマトキシリン&エオシン）染色して組織学的解析を行った。

2-3. NF- κ Bレポーター領域下流でGFPを発現する細胞の作製：Ba/F3細胞にpNF- κ B-GFP遺伝子（ハイグロマイシン耐性遺伝子付き、Stratagene社）をエレクトロポレーションによって導入し、ハイグロマイシンを含む培地で培養して選択を行った。選択された細胞をTLR2リガンド（Pam3CSK4）によって刺激し、FACS Ariaを用いてGFPが発現した細胞をソーティングすることでNF- κ B-GFPの安定発現株を得た。得られたBaF/NF- κ B-GFP細胞にマウスTLR7遺伝子、マウスTLR9遺伝子、マウスCathepsin L遺伝子を導入し、TLR7およびTLR9のリガンドに反応してGFPを発現する細胞を作製した。なお、これらの遺伝子を導入する際にはpMXベクターとPlat-Eパッケージング細胞によるレンチウイルス法を用いた。

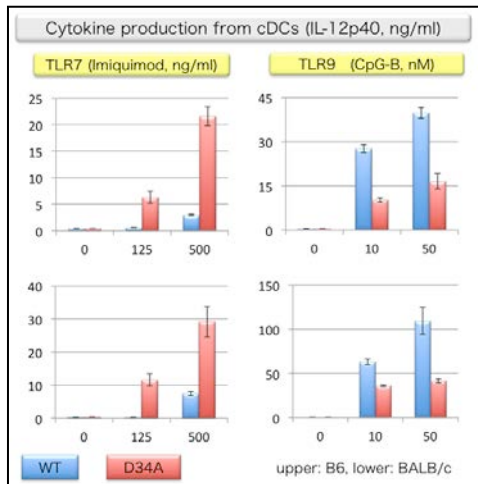


図2：各系統のD34AマウスにおけるTLRの応答性

2-5. shRNAライブラリの作製と導入：shRNAライブラリ用ベクターとしてCollecta Pooled Bar-Coded Lentiviral shRNA Librariesを用いた。このライブラリをpMD2.GベクターおよびpsPAX2ベクターと同時にLenti-X HEK293T細胞に導入し、VSV-Gエンベロップを持つレンチウイルスを作製した。このレンチウイルスを「2-4」で作製した細胞に感染させ、72時間後にTLR7リガンド（Gardiquimod）で刺激をした。その後、FACS AriaによってGFPが強く誘導された細胞をソーティングした。

2-6. ノックダウンされた遺伝子の同定：「2-5」で選択された細胞からゲノムDNAを抽出し、shRNAベクターの配列に特異的なプライマーを用いてPCRを行った。増幅された領域を再度ベクターに導入して単離し、シーケンシングを行ってshRNAがプライミングする配列を決定した。この配列をBlastN（NCBI）で検索し、該当する候補遺伝子を同定した。

< 3. 結果 >

3-1. 各系統間におけるD34Aマウスの表現型

B6系統およびBALB/c系統のD34Aマウスから骨髓を採取して樹状細胞に分化誘導後、各種TLRリガンドで刺激したところ、どちらの系統においてもTLR7の応答性が亢進し、TLR9の応答性が減弱していた（図2）。このことからUnc93B1のD34A変異によるTLR7/TLR9応答バランス制御の破綻には系統差のないことが示されたが、表現型は以下に記すとおり各系統によって異なるものであった。

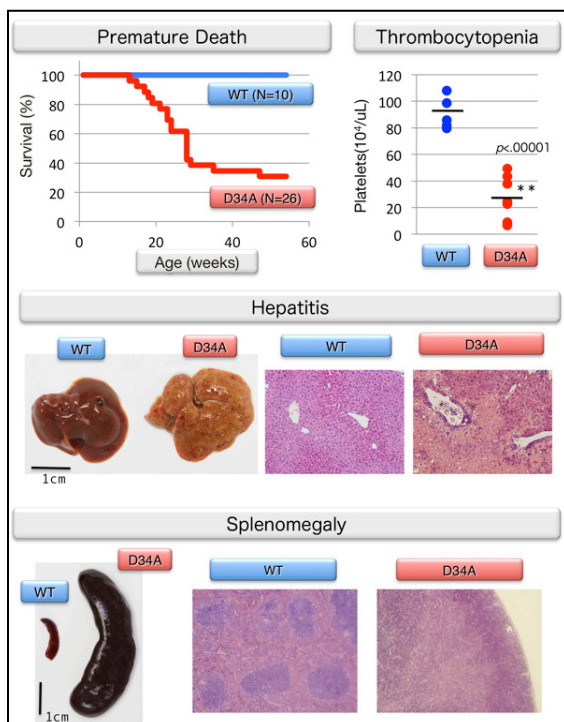


図3：B6-D34Aマウスの表現型

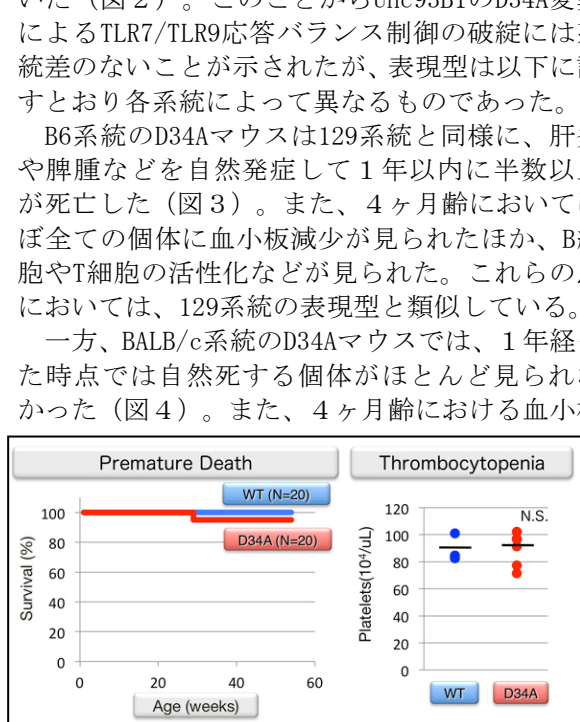


図4：BALB/c-D34Aマウスの表現型

B6系統のD34Aマウスは129系統と同様に、肝炎や脾腫などを自然発症して1年以内に半数以上が死亡した（図3）。また、4ヶ月齢においてほぼ全ての個体に血小板減少が見られたほか、B細胞やT細胞の活性化などが見られた。これらの点においては、129系統の表現型と類似している。

一方、BALB/c系統のD34Aマウスでは、1年経った時点では自然死する個体がほとんど見られなかった（図4）。また、4ヶ月齢における血小板

減少も起こらず、B6のように各種細胞の増殖・活性化も見られなかった。これらのことから、TLR7/TLR9バランス制御の破綻によるTLR7の過剰な応答と各種表現型の間には、系統依存的な調節因子の存在が示唆された。

3-2. TLR7の応答抑制に関わる新規分子の探索

Unc93B1のN末端側に位置する細胞質ドメインはdisorder regionと呼ばれる可塑性に富んだ部位であると推測されており、他の様々な分子と相互作用を持つと考えられる。D34はdisorder region内に位置しており、アラニン置換した場合には近隣のdisorder scoreが減少することから、D34A変異体は未知のTLR7抑制分子と結合できなくなるためにTLR7の応答性が亢進するのではないかと仮説を立てた。

そこで、Unc93B1のdisorder regionと相互作用を持ち、TLR7の応答性を制御する未知の分子を同定するために、shRNAライブラリによる網羅的なノックダウンを行った。まず、TLR7の刺激に応じてGFPを発現する細胞を用意し、shRNAライブラリを導入したのち、低濃度のTLR7リガンドで刺激を行った。この濃度においてGFPが強く発現する細胞をFACS Ariaでソーティングし、限界希釈によって細胞を単離した。なお、shRNAライブラリ用ベクターにはRFPをコードする領域が含まれているため、RFPとGFPを共発現する細胞を選択した（図5、赤枠のゲート）。この細胞からゲノムDNAを抽出し、シーケンシングによってノックダウンされた遺伝子を決定した。これらの遺伝子についてはターゲット配列をベクターに再度クローニングし、Ba/F-NF- κ B-GFP細胞に導入してTLR7の応答性を亢進させるか確認した。その結果、Gタンパク共役型受容体、サイトカインレセプター、small GTP-binding proteinなど7種類の遺伝子がTLR7の応答を抑制する候補遺伝子として同定された。

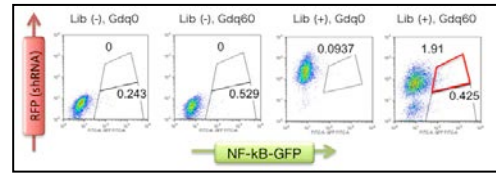


図5：shRNAライブラリを導入した細胞のソーティング

< 4. 考察と展望 >

系統依存的な表現型に関わる調節因子を探索する際には、連鎖解析などが用いられる。概要を説明すると、表現型が異なる系統同士を交配させてF1世代を作製し、F1世代を親世代の系統に戻し交配してN2世代を得る。このN2世代について各個体のDNAマッピングと表現型解析を行い、そのデータを統合して調節因子を探るというものである。本研究においても連鎖解析を開始したが、多くのマウスと長い時間を要するために調節因子の同定には至っていない。先行データとして親世代、F1世代、N2世代における末梢血中血小板数 ($10^4/\mu$ l) を測定したところ、BALB/c系統への戻し交配による血小板数の増加、B6系統への戻し交配による血小板数の減少が見られたことから、連鎖解析によって調節因子を同定できる可能性が期待される（図6）。

また、shRNAライブラリによる探索系については期待を上回る効果があったものの、今回使用したモジュールに含まれるターゲット遺伝子は5000程度であるため、他のモジュールを使用してゲノムワイドにスクリーニングすることが望まれる。今回同定された候補遺伝子については、ノックアウトマウスの解析やTLRとの相互作用などを検討することにより、TLRの応答制御に関わる機能を解明していくことが必要であると考えている。

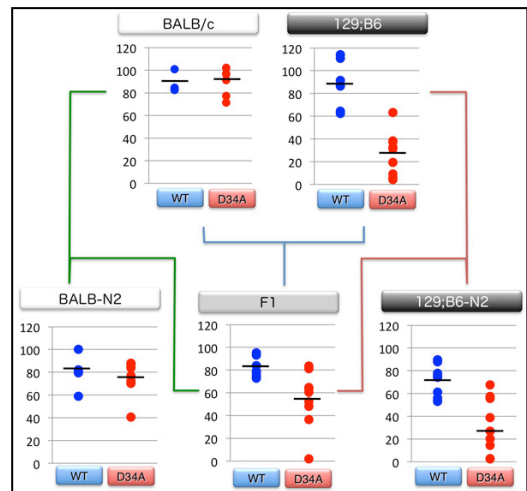


図6：連鎖解析のパイロットデータ

< 5. 参考文献 >

1. R. Fukui, K. Miyake, Controlling systems of nucleic acid sensing-TLRs restrict homeostatic inflammation. *Exp Cell Res*, (Apr 6, 2012).
2. A. L. Blasius, B. Beutler, Intracellular toll-like receptors. *Immunity* **32**, 305 (Mar 26, 2010).
3. R. Fukui *et al.*, Unc93B1 biases Toll-like receptor responses to nucleic acid in dendritic cells toward DNA- but against RNA-sensing. *J Exp Med* **206**, 1339 (Jun 8, 2009).
4. R. Fukui *et al.*, Unc93B1 restricts systemic lethal inflammation by orchestrating Toll-like receptor 7 and 9 trafficking. *Immunity* **35**, 69 (Jul 22, 2011).