

論文の内容の要旨

論文題目 Toll-like receptor 7 の局在と機能の連関についての解析

氏 名 _____ 菅野 敦夫 _____

背景と目的

免疫系は自己と非自己を認識し、非自己を選択的に排除する役割を持った生体機能である。免疫系は獲得免疫系と自然免疫系が備わっている。獲得免疫系は遺伝子再構成により多くの非自己に対する抗原を認識することが可能である。一方、自然免疫系は抗原の構造をパターン認識する免疫担当分子で構成され、無脊椎動物からヒトを含む脊椎動物まで保存された生体防御機構である。この自然免疫担当受容体のうち、Toll-like receptor(以下、TLR)は重大な発見であった。

哺乳類の TLR は約 10 種類からなり、認識するリガンドの種類と局在により TLR の分布が大きく異なる。TLR3,TLR7,TLR8,TLR9 は細胞内部に局在しているとされており、ウイルスや病原体由来の核酸を認識する。しかし、これら TLR は外来病原体の感染を防御する一方で、自己に由来する物質が内因性リガンドとなり慢性的な炎症を引き起こす可能性が指摘されている。実際に、全身性エリテマトーデス(以下、SLE)モデルマウスの病変は核酸タンパク複合体が TLR7 や TLR9 を活性化させ、核酸に対する自己抗体の過剰な産生が要因とされている。また、SLE モデルとして知られている MRL^{lpr/lpr} マウスを TLR7 欠損させた場合、抗核抗体の 1 つである抗 Sm 抗体の産生量が減弱し、脾腫も改善することが報告されている。このように生体は相同性の高い核酸を認識する TLR を厳密に制御する必要がある。

TLR7 の応答性は RNase や Unc93 homolog B1(以下、Unc93B1)、cathepsin によって適切に制御されている。しかし、TLR7 応答の制御機構は細胞株に強制発現もしくは TLR7 欠損マウスを用いた報告が大多数であり、内在性 TLR7 がどのように応答性を制御されているのか解析されていない。

本研究において私は内在性 TLR7 を検出するために、抗 TLR7 モノクローナル抗体の作製を試みた。そして、私は世界で初めて実用的な抗 TLR7 抗体を 2 クローン樹立した。これら樹立した抗 TLR7 抗体は内在性 TLR7 をフローサイトメトリーや免疫沈降で検出でき、共焦点顕微鏡による観察もできる。この特性をもつ抗 TLR7 抗体により、以下のような新たな TLR7 の機能と分布を明らかにした。さらに、TLR7 を標的とする臨床応用への新たな可能性を示した。

(1) ジスルフィド結合を有した TLR7 は切断され、その切断が TLR7 応答に重要である

(2) 内在性 TLR7 は細胞表面にも分布している

(3) 樹立した抗 TLR7 抗体は TLR7 応答を抑制する

以下、上記 3 点の結果と考察を示す。

結果と考察

(1) ジスルフィド結合を有した TLR7 は切断され、その切断が TLR7 応答に重要である

樹立した抗 TLR7 抗体は TLR7 の N 末端アミノ酸領域を認識する。しかし、抗 TLR7 抗体で免疫沈降した内在性 TLR7 は切断型 TLR7 の N 末端タンパク質だけではなく、C 末端タンパク質も検出された。そこで、私は TLR7N 末端側フラグメントと TLR7C 末端側フラグメントの結合に関わる要素としてジスルフィド結合の可能性を検討し、非還元処理下による TLR7 検出を行った。その結果、切断型 TLR7 は検出されなかった。したがって、内在性 TLR7 が TLR7N 末端タンパク質と C 末端タンパク質でジスルフィド結合していることが示唆された。ジスルフィド結合のシステイン残基を精査するために、4 つのシステイン残基(C98、C445、C475、C722)を候補として挙げ、これらシステイン残基をセリン残基に置換した変異体(C98S、C445S、C475S、C722S)を作製した。その結果、C98S および C475S では切断型 TLR7 は検出されず、その TLR7 応答も消失した。しかし、これらシステイン変異型 TLR7 の細胞内分布は野生型 TLR7 と比較して差はみられなかった。したがって、C98S および C475S がタンパク分解酵素に抵抗性をもつ可能性が示唆された。

この抵抗性の要因は TLR7 の立体構造の変化が推測される。つまり、C98 および C475 が本来の TLR7 の立体構造を保持するための重要なアミノ酸であり、これらシステイン残基を変異させた TLR7 は本来の立体構造を維持することができないためにタンパク分解酵素の認識を免れている可能性が考えられる。また、切断型 TLR7 と TLR7 応答の関連性に焦点をあてた場合、私は TLR7 の切断アミノ酸領域を欠損させた変異型では、切断型 TLR7 は消失し、相関して TLR7 リガンド刺激による応答性も欠失することを見出した。上述したように、C98S および C475S はタンパク分解酵素に耐性をもっている可能性があり、その応答性は消失している。つまり、細胞外ドメイン領域内の TLR7 切断は TLR7 の機能に必須な役割であることが示された。

(2) 内在性 TLR7 は細胞表面にも分布している

核酸認識系 TLR は定常状態で小胞体に分布していると考えられている。しかし、私は骨髄細胞

から誘導した骨髄系樹状細胞（以下、BM-cDC）の内在性 TLR7 が小胞体外に局在していることを観察した。そこで、私は抗 TLR7 抗体で内在性 TLR7 の発現および分布を種々の細胞群で検討した。その結果、従来では、小胞体に局在しているとされていた TLR7 が正常な脾臓の形質細胞様樹状細胞や骨髄系樹状細胞、骨髄細胞から誘導したマクロファージ（以下、BM-MΦ）、RAW264.7 細胞株で細胞表面に発現していることが検出された。

細胞表面に発現した TLR7 は細胞内部と同様に機能しているのだろうか。私は正常な BM-MΦ の細胞表面に発現した TLR7 が切断されていることを検出している。TLR7 応答には TLR7 が切断されることが必須なため、細胞表面に発現した TLR7 が機能を持ち合わせている可能性が推測される。近年、病原体センサーの認識機構の解明が進むにつれて、病原体センサーは自己由来の内因性リガンドにも応答し、恒常的な炎症反応を誘導している可能性が考えられている。このような概念に基づいた場合、細胞内部のみならず細胞表面に発現した TLR7 も外来病原体由来のリガンド認識だけではなく、定常状態において自己核酸を内因性リガンドとして認識し、生体内の恒常性を保っているのかもしれない。

また、細胞表面に発現した TLR7 は切断されているため、エンドライソソームに存在している cathepsin の影響を受けていることが推測される。そのため、小胞体に局在した TLR7 はエンドライソソームへ移行した後に細胞表面へ分布していると考察される。私は核酸認識系 TLR を小胞体からエンドライソソームへ移行させる Unc93B1 や Protein associated with TLR4 (以下、PRAT4A) が細胞表面の TLR7 発現に依存していることを見出している。これらの分子が TLR7 をエンドライソソームから細胞表面へ分布させているのだろうか。抗 PRAT4A 抗体により PRAT4A は BM-MΦ の細胞表面に発現しないことが報告されている。そのため、直接的に TLR7 をエンドライソソームから細胞表面へと運搬している可能性は低いと考えられる。また、抗 Unc93B1 モノクローナル抗体は樹立されていないため、細胞表面に Unc93B1 が分布しているのか明らかにされていない。一方、Unc93B1 が細胞表面に発現した TLR7 と関連していない可能性も考えられる。TLR7 が細胞表面へ分布するための機構を解明するために、私は RAW264.7 細胞の cDNA ライブラリーを TLR7 が細胞表面に存在しない細胞株に遺伝子導入し、TLR7 が細胞表面へ移行した細胞株を単離することで得られる分子をクローニングしようと考えている。

(3) 樹立した抗 TLR7 抗体は TLR7 応答を抑制する

近年、臨床応用としてモノクローナル抗体による抗体医薬分野が盛んに研究されている。そこで、私は抗 TLR7 抗体による TLR7 応答の抑制効果について検討した。その結果、抗 TLR7 抗体は BM-MΦ、BM-cDC や骨髄細胞から誘導した形質細胞様樹状細胞で TLR7 リガンド刺激によって産生される IL-6、TNF α 、RANTES および I 型 IFN を特異的に抑制し、脾臓 B 細胞の TLR7 応答増殖活性も抑制した。さらに、私は生体への抗 TLR7 抗体による影響を確かめるために、TLR7 応答依存的な病態増悪を引き起こす MRL^{lpr/lpr} および Unc93B1 D34A 変異マウス（以下、D34A 変

異マウス) へ抗 TLR7 抗体を投与した。その結果、MRL^{lpr/lpr} マウスの表現型である抗 Sm 抗体の産生量が抗 TLR7 抗体投与群において減少する傾向が示唆された。また、私は血小板減少を呈した D34A 変異マウスへの抗 TLR7 抗体投与を実施し、コントロール抗体と比較して有意な血小板減少の改善を認めている。

なぜ今回樹立した抗 TLR7 抗体は TLR7 応答を阻害できるのだろうか。阻害効果を抗体の観点から考察すると、抗 TLR7 抗体の認識部位が重要になるだろう。抗 TLR7 抗体のエピトープは TLR7N 末端アミノ酸配列であることから、TLR7 応答を特異的に阻害するためには、抗体が TLR7 の N 末端アミノ酸配列を認識する必要性が考えられる。

細胞表面に TLR7 が存在していることが細胞あるいは生体にとってどのような生物学的な意義をもつか、あるいは、抗 TLR7 抗体による TLR7 応答の阻害と細胞表面の TLR7 発現がそれぞれどのように関与しているのか解明されていない。今後、私はこれらを研究課題として有用な知見を得ていく。