

**Toll-like receptor (TLR)会合分子である
PRotein Associated with Tlr4(PRAT4A)
の免疫応答制御における役割**

柴田 琢磨

目次

	頁
概要	1
序論	5
材料と方法	21
結果	35
考察	73
謝辞	87
引用文献	88

概要

免疫システムは自己から非自己を見分けて排除する役割を担っており、多細胞生物が生命を維持する為に必須のシステムである。全ての多細胞生物は免疫システムを有し、脊椎動物では獲得免疫と自然免疫の両輪により免疫システムが構成される。自然免疫応答は病原体レセプターを用いて侵入抗原を認識し、サイトカイン（IL6、IL-12p40、TNF- α など）やケモカイン（RANTES など）の産生、および補助刺激分子リガンド（CD86）の発現上昇を引き起こす。その結果、適切な自然免疫応答および獲得免疫応答が誘導され、侵入病原体は排除されることとなる。

細胞膜に分布する Toll Like Receptor (TLR) ファミリーは最初に発見された病原体レセプターであり、細胞外の様々な病原体構造や自己因子（TLR リガンド）を各々の TLR が特異的に認識している。これまでに TLR は様々な病原体に対する感染防御において必須であることが判明している。更に、TLR が自己免疫疾患の発症、創傷治癒、腫瘍の転移などの生体内における広範な免疫現象に関与していることも判明してきている。これらの知見は、多くの疾患における TLR をターゲットとした治療の可能性を示唆している。しかし、TLR のリガンド認識機構には未だ不明な点が多く、TLR を介した免疫応答を正確に制御する為にも TLR のリガンド認識を制御する機構を正確に理解していくことが求められる。

最近の研究より、TLR のリガンド認識には様々なアクセサリー分子（MD-2, CD14, UNC93B, HMGB-1, gp96 など）が必要であることが判明してきた。アクセサリー分子は様々な機能により TLR を制御しており、

これら分子の解析および機能同定が TLR を介した免疫応答に対する理解を飛躍的に進展させると考えられる。

本論文において、私は TLR4 のアクセサリー分子として発見された PRotein Associated with Tlr4 (PRAT4A)が複数の TLR の免疫応答を統合的に制御する分子であることを PRAT4A ノックアウトマウスの解析を通じて明らかにする。

PRAT4A ノックアウト (PRAT4A KO) マウスより得られた骨髄由来樹状細胞 (BM-DC)、骨髄由来マクロファージ (BM-M ϕ)、脾臓 B 細胞、マウス胚線維芽細胞 (MEF) では、細胞表面に分布する TLR4、TLR1、TLR2 および TLR 関連分子である RP105 の細胞表面発現が消失または減少していた。TLR ファミリー以外の分子の細胞表面発現には全く影響が認められなかった。一部の PRAT4A KO 細胞では、TLR2、TLR4、および RP105 の細胞表面分布が残存することより、TLR の細胞表面への移行は PRAT4A を含めた複数の分子により制御されていると考えられる。

これらの現象に伴い、PRAT4A KO BM-DC、BM-M ϕ および MEF では、細胞表面 TLR (TLR1/2, TLR2/6, TLR4) のリガンド刺激に伴うサイトカイン産生などが消失、もしくは顕著に低下していた。また、PRAT4A KO 脾臓 B 細胞においても、それらリガンド刺激により誘導される B 細胞増殖や CD86 の発現上昇が顕著に抑制されていた。この事実は、細胞表面 TLR の細胞表面における分布がリガンド認識において重要であることを示している。

一方、TLR1 や TLR4 の細胞表面発現が完全に消失している PRAT4A KO 細胞において、これらの TLR リガンドに対する一部の免疫応答が

残存もしくは全く影響を受けないという現象が認められた。この事実は、細胞表面がリガンド認識の場であると考えられている細胞表面 TLR が細胞内でもリガンドを認識し得ることを強く示唆するものである。特に細胞表面における TLR4 の分布が消失している PRAT4A KO BM-M ϕ の解析より、マクロファージの細胞内 TLR4 は特に TRIF 依存的な免疫応答を選択的に活性化することが強く示唆された。

細胞表面 TLR の免疫応答に加え、全ての PRAT4A KO 細胞では細胞内 TLR (TLR7, TLR9) の免疫応答も完全に消失していた。細胞内に分布する TLR9 も小胞体からリソソームへ移行することが知られており、この細胞内移行がリガンド認識に必須である。RAW 細胞を用いて PRAT4A 欠損が TLR9 の細胞内移行に与える影響を解析したところ、PRAT4A ノックダウンにより GFP 標識 TLR9 (TLR9GFP) の小胞体からリガンド認識の場であるリソソームへの移行が消失し、TLR9GFP がリガンドと出会うことが出来なくなっていた。この結果より、細胞表面 TLR に加えて細胞内 TLR の細胞内分布にも PRAT4A が必須であることが示された。一方で、TLR3 リガンドに対する免疫応答は PRAT4A 欠損による影響を受けていなかった。

in vitro の結果より、複数の TLR における免疫応答が PRAT4A により統合的に制御されていることが示された。実際の病原体は複数の TLR リガンドを有しており、PRAT4A の欠損は病原体に対する免疫応答を顕著に消失させることが予測される。Heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* や Heat-killed *Escherichia coli* に対する PRAT4A KO BM-DC の応答性を解析した結果、全てのサイトカイン産生が有意に低下していた。一方、これらバクテリアにより誘導される共刺激分子リガンドの誘導、即ち樹状細胞の成熟は全く影響を受けていなかった。また OVA

を *M.tuberculosis* 含有フロイント完全アジュバントと共に PRAT4A KO 骨髄キメラマウスの皮下に接種したところ、OVA に対する免疫応答は認められたものの、TLR を介して誘導される Th1 偏向の免疫応答が完全に消失していた。これらの結果は、PRAT4A が主にサイトカイン産生のバランスを制御することで獲得免疫応答の質を変化させていることを示唆している。

更に、P PRAT4A の mRNA レベルでの発現量は、様々な TLR リガンド刺激に伴って顕著に減少していた。この事実は、PRAT4A の発現量が増えることで TLR の応答が制御されている可能性を強く示唆するものである。実際、PRAT4A KO キメラマウスは LPS で誘導されるエンドトキシンショックに対して完全に抵抗性であり、PRAT4A の消失が生体内における過剰な免疫応答を抑制し得ることが示された。

以上の結果より、PRAT4A は TLR の細胞内分布を制御する分子であり、TLR3 を除く複数の TLR(TLR1/2、2/6、4、5、7、9)の免疫応答に必須の分子であることが判明した。また PRAT4A の欠損に伴う TLR 応答の変化は生体内における自然免疫応答および獲得免疫応答に多大な影響を与えることが示され、TLR アクセサリー分子の一つである PRAT4A の発現制御を介する新たな TLR 制御機構の存在が示唆された。

序論

生物に要求される最も基本的な機能は自己同一性の維持である。免疫は自己から非自己を見分けて排除する役割を果しており、生命を維持する上で必要不可欠なシステムである。全ての多細胞生物は免疫システムを備え、脊椎動物では自然免疫系と獲得免疫系の両輪により免疫システムが構成されている。

19 世紀後半から 20 世紀初頭における Paul Ehrlich による「抗原抗体反応」という概念の提唱以来、歴史的に免疫学は獲得免疫を中心に理解されてきた。獲得免疫は T 細胞の有する T 細胞レセプターおよび B 細胞の産生する抗体により担われる。T 細胞レセプターと B 細胞レセプター（抗体）における遺伝子再編成の結果、T 細胞と B 細胞には多様な抗原を認識する無数のレパートリーが存在する(1)。抗原の侵入により、これらレパートリーの中から同抗原を特異的に認識するものがクローン増殖を起こし、一週間前後で侵入病原体に対する最適な獲得免疫応答が誘導される(1)。また、増殖したクローン細胞の一部が記憶細胞として残ることで長期的な免疫記憶が生じることも獲得免疫の大きな特徴である(1)。この獲得免疫の特徴を効果的かつ有効に利用したものがワクチネーションであり、多くの感染症の抑圧に多大な貢献をしてきた。

一方、獲得免疫応答の誘導は T および B 細胞のみでは誘導されないことが判明している（図 1）。最も重要な役割を果すのが樹状細胞を中心とする抗原提示細胞（Antigen-Presenting cell : APC）である(1, 2)。APC は感染局所において侵入病原体を捕獲・貪食し、所属リンパ節へと抗

原を運搬する役割を果す。その後、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞に対して CD80 や CD86 などの共刺激分子リガンドと共に MHC Class II を用いた抗原提示を行う(2, 3)。その結果、活性化されたナイーブ CD4 陽性 T 細胞がエフェクターCD4 陽性 T 細胞となる。このエフェクターCD4 陽性 T 細胞は、産生するサイトカインの種類やその後に誘導する獲得免疫応答の特徴から Th1、Th2、そして Th17 という 3 種類のサブセットに分類されている(4)。Th1 細胞は Interferon- γ (IFN- γ)、IL-2、TNF- α の産生に特徴付けられ、マクロファージの活性化や細胞傷害性 CD8 陽性 T 細胞の増殖誘導、および B 細胞における強いオプソニン効果を有する IgG2a/2c へのクラススイッチの誘導を引き起こす(1, 4, 5)。Th1 偏向の免疫応答は、細胞内寄生病原体(ウイルス、*Mycobacterium Tuberculosis*、*Toxoplasma gondii* など)に対する免疫応答に重要であり、遅延型過敏反応(Ⅳ型過敏反応)の原因としても知られる(1, 5)。Th2 細胞は IL-4、IL-5、IL-13、および IL-25 の産生に特徴付けられ、B 細胞における IgG1 や IgE へのクラススイッチと抗体産生の誘導、好酸球の遊走を引き起こす(1, 5)。Th2 偏向の免疫応答は、細胞外寄生病原体(細胞外寄生細菌、寄生虫など)に対する免疫応答に重要であり、過度の Th2 偏向の免疫応答はアレルギーの原因となる(1, 5)。近年、新たに発見された Th17 細胞は IL-17(IL-17A, IL-17F)、IL-6、Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF)の産生に特徴付けられ、好中球の遊走に伴う局所炎症の誘導に重要である(4-7)。Th17 偏向の免疫応答はグラム陰性菌(*Klebsiella pneumoniae*、*Bacteroides fragilis* など)への抵抗性に重要であり、更にヒトや動物における慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) およびコラーゲン誘導性関節炎などの自己免疫疾患への関与が強く示唆されている(4, 6-9)。

これらの獲得免疫応答の偏向は、APC による抗原提示に伴う様々なサイトカイン刺激により制御されることが示されていたが (図 1)、サイトカイン産生や共刺激分子リガンドの誘導を引き起こすメカニズムに関しては長らく不明であった。

自然免疫は獲得免疫系を有する脊椎動物を含めた全ての多細胞生物に普遍的に存在する免疫応答である(10)。その発見は、Paul Ehrlich による抗体の提唱と同時代の 19 世紀末から 20 世紀初頭、Ilya Mechnikov (Elie Metchnikoff) による食作用の発見、および Jules Bordet による補体の発見にまで遡ることができる。自然免疫は、貪食細胞 (樹状細胞、マクロファージ、好中球など) による侵入病原体の貪食、および貪食した病原体の分解に伴う病原体のクリアランスに特徴付けられる(11, 12)。これらの現象は病原体の侵入直後から誘導され、最も基本的かつ不可欠な生体防御反応である。自然免疫の重要性は、獲得免疫を持たない非脊椎動物でも十分な免疫機能が誘導されることより明白である。しかし、一般的に自然免疫応答は獲得免疫応答が誘導されるまでの一時しのぎの現象であると考えられ、獲得免疫応答のように特異的認識機構が存在するか否かに関しては全く不明であった。

既知の自然免疫応答の理解において礎となったのは、1989 年に Janeway CA, Jr が提唱した病原体に特徴的な構造 (pathogen-associated microbial patterns : PAMPs) を病原体レセプター (Pattern Recognition receptors : PRRs) が認識することで自然免疫応答が活性化されているという概念である(13, 14)。

この提唱から 7 年後の 1996 年、胚発生における背腹軸の決定を司る

Toll 分子がショウジョウバエで真菌感染を感知する機能を有することが報告され、自然免疫系において実際に病原体レセプターが存在することが明らかにされた(15)。その翌年、Charles A. Janeway, Jr と Ruslan Medzhitov は Toll のホモログである Toll-like receptor 4 (TLR4) がヒトにおいても存在することを報告し、この TLR4 を介して様々なサイトカイン産生や共刺激分子の誘導が引き起こされることを証明した(16)。1998 年には、病原体構成成分である LPS に不応答であることが知られていた C3H/HeJ マウスと C57BL/10ScCr マウスにおいて TLR4 遺伝子に変異していることを Bruce Beutler らが示した(17)。また 1999 年には、審良 静男らも TLR4 ノックアウトマウスが LPS に不応答であることを示した(18)。これらの発見により、免疫細胞が実際に病原体レセプターを介して細胞外の病原体因子を認識していることが証明された。

その後、Bruce Beutler らによる ENU (N-ethyl N-nitrosourea) ミュータジェネシスにより得られた変異マウスの解析、および審良 静男らによる TLR ファミリー及び TLR 関連分子のノックアウトマウスの解析を通じて、TLR ファミリーが生体において様々な免疫応答の制御に関与していることが明らかとなっている(19, 20)。

これらの発見に加え、三宅 健介らは 1994 年に TLR4 の Homolog である RP105 を先行して発見している(21, 22)。同分子は TLR4 とは異なり、シグナル伝達領域を持たず、その細胞表面発現に RP105 と会合する MD-1 が必要である(23)。その後、三宅らは MD-1 の Homolog として MD-2 を発見し、同分子が TLR4 における LPS 認識において必須の分子であることを示した(24)。現在では、結晶構造解析の結果より、MD-2 と LPS の直接結合が TLR4 の活性化に必須であることが証明されている(25, 26)。この発見は、TLR の応答にアクセサリー分子が必須の

機能を持つことを初めて示したものであり、TLR 応答を理解する上でこれら分子の理解は必要不可欠である。

細胞外の病原体因子を認識する Toll-like receptor ファミリーの発見以来、TLR 以外にも複数の病原体レセプター群が報告されており、現在では細胞外病原体因子を認識する C-type lectin ファミリー、細胞内病原体因子を認識する NLR (Nucleotide-binding oligomerization domain and leucine rich repeat containing family)ファミリーや RIG-I (Retinoic acid inducible gene I)ファミリー、および DAI (DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors)などが知られている(27-32)。

Toll-like receptor (TLR) ファミリーは1回膜貫通型タンパク質であり、構造上の特徴として細胞外にxLxxLxLxx (xは任意のアミノ酸。L: Leucine) を含む24~29アミノ酸配列であるLeucin-rich repeat (LRR) の tandem repeatsを19~25個持つこと、および細胞質内にIL-1レセプターシグナル伝達ドメインに相同性を有するTIR (Toll/IL-1 Receptor) ドメインを持つことが挙げられる(20)。またTLR4と類似したLRRの tandem repeatsを細胞外に持つRadioprotective 105 (RP105)の存在も知られており、同分子はシグナル伝達に必要な細胞内TIRドメインを持たない。RP105は、特にB細胞におけるTLR応答の制御に重要であることが示されている(33, 34)。

TLRファミリーは自然免疫担当細胞であるマクロファージや樹状細胞において高発現している(20, 35)。また、主に獲得免疫担当細胞であると考えられているB細胞でもその発現が認められており(33, 34)、非免疫系細胞であるマウス胚線維芽細胞 (Mouse Embryonic Fibroblast, MEF) においても複数のTLRの発現が確認されている(36)。

現在までにヒトで 10 種類 (TLR1～TLR10)、マウスで 12 種類 (TLR1～TLR9, TLR11～TLR13) の TLR ファミリーが発見されており、ヒトとマウスに共通する TLR1～TLR9 では特異的な病原体リガンドが判明している (表 1) (20, 27, 37)。認識できる病原体由来リガンドは核酸、脂質、タンパク質の 3 つに大きく分類され、核酸を認識する TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 は細胞内コンパートメント (小胞体、リソソーム) に、脂質を認識する TLR4、TLR1/2 複合体、TLR2/6 複合体およびタンパク質を認識する TLR5 は細胞表面に局在して機能すると考えられている (図 3) (38)。また、TLR にはリガンド検索の過程で数多くの生体由来リガンド (内因性リガンド) の存在も報告されており、TLR が感染察知に加えて細胞死などを察知する機能を有することも推察されている (図 3) (39, 40)。

一般的にこれらの TLR は病原体因子を特異的に認識するように進化してきたと考えられている (41)。常在菌や自己に対する免疫応答は腸炎や自己免疫疾患を誘導する危険性があり、獲得免疫応答と同様にこうした応答は基本的に抑制されているはずである。こうした観点から、TLR の応答性も厳密に制御されている必要があると考えられる。その一つの例として、核酸認識 TLR の細胞内への分布が挙げられる。細胞内に分布する TLR9 は人工的に細胞表面に発現させることで自己の DNA に対して免疫応答を誘導し得ることが報告されており (41)、核酸認識 TLR が細胞内に分布するのは自己因子への応答を回避する為であると考えられる。一方で、病原体因子を素早く感知する為に細胞表面に発現すると考えられている細胞表面 TLR にも、自己因子がリガンドと成り得ることが報告されている (表 1)。現在のところ、自己に応答する危険性のある TLR が細胞表面に発現する理由、およびその発現制御機構などは全く不明である。このように、TLR の細胞内分布の意義

には未だ謎が多く、細胞内における TLR の発現量や細胞内局在を解析することは、TLR による自己と病原体の識別機構を理解することにもつながると私は考える。

これら TLR リガンドにより誘導されるシグナル伝達は、MyD88 依存性シグナルと MyD88 非依存性シグナルの 2 つに分けられ、TIR ドメインを有する 2 つのアダプター分子、myeloid differentiation factor 88 (**MyD88**) と TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- β (**TRIF**) がそれぞれの応答を司る (図 3) (27, 42)。TLR3 を除く TLR1~TLR9 は MyD88 を介したシグナル伝達経路を持つ。MyD88 経路に誘導される応答は、転写因子 NF- κ B の活性化に伴う炎症性サイトカイン (IL-6, IL-12, TNF 等) の産生、plasmacytoid Dendritic cell でのみ認められる転写因子 Interferon Regulatory factor-7 (IRF-7) を介した TLR7 と TLR9 による IFN- α の産生である。また p38 や ERK (Extracellular signal regulated kinase)、JNK (Jun N-terminal kinase) などの MAP (Mitogen activated protein) キナーゼ経路の活性化を誘導することも知られている(27, 42)。一方、TRIF を介したシグナル伝達は TLR4 と TLR3 のみで認められる。TRIF 経路では、IRF-3 の活性化に伴う IFN- β の産生が特徴的である(27, 42)。また MyD88 経路で起こらない共刺激分子の強い誘導やインターフェロン誘導性遺伝子 (IP-10, MCP-1 等) の誘導が起こることも特徴である(43, 44)。

TLR はリガンドを認識すると、様々な炎症性サイトカイン (IL6, TNF- α など) や炎症性ケモカイン (RANTES など) の産生を誘導し、局所において適切な自然免疫応答を引き起こす (図 1)。また、サイトカインバランスの制御や抗原提示細胞における補助刺激分子リガンドの発現調節を介することで適切な獲得免疫応答 (Th1/Th2/Th17) を誘導す

る（図 1）(45-50)。これらの TLR を介した免疫応答は生体防御において必要不可欠であり、TLR 応答に関連する分子の欠損は様々な病原体による易感染を引き起こすこととなる(51-53)。しかし一方で、過剰な TLR 応答はエンドトキシンショックや自己免疫疾患を引き起こすことも知られており(40, 54-56)、TLR による免疫応答は厳密に制御される必要がある。

近年の研究より、TLR ファミリーの免疫応答が様々なアクセサリー分子により制御されていることが判明してきた(表 2)。多くのアクセサリー分子ではその作用機構は不明であるが、それらアクセサリー分子の欠損により TLR 応答が消失または減弱することが変異マウスおよびノックアウトマウスを用いて示されている(19, 57)。一方、一部のアクセサリー分子ではその作用機構が明らかとなっており、TLR3,7,9 の応答に必須である小胞体タンパク質の UNC93B では、同分子が TLR9 のリガンド認識の場であるリソソームへの移行を制御していることが示されている(58)。実際、変異型 UNC93B 遺伝子をホモ接合性に持つヒトでは単純ヘルペス 1 型による脳炎を発症し易いことが報告されており、TLR 応答における TLR アクセサリー分子の重要性を示す好例ともなっている(59)。こうした事実は、未だ部分的にしか判明していない TLR 会合分子の機能解明が TLR 応答の制御に対する理解を飛躍的に進展させる可能性を示唆するものである。

私の所属する感染遺伝学分野(以下、当分野)では以前、TLR4 による LPS 認識において必須の役割を果たす MD-2 を報告してきた(24)。また、MD-2 が MEF 細胞において TLR4 の細胞表面への分布を制御すること

も報告してきた(24)。しかし、その後の研究より MD-2 ノックアウトマウス由来の樹状細胞でも TLR4 の単独表面発現が認められるという結果が得られ、MD-2 以外に TLR4 の細胞内局在を制御する分子の存在が示唆された(60)。そこで当教室では、免疫沈降法により TLR4 の共沈分子を検索し、TLR4 の新規アクセサリ分子である PRotein Associated with Tlr4 A (**PRAT4A**)の存在を明らかにした(60)。

PRAT4A は既知のモチーフおよびドメインを有さず、N 末端の 37 アミノ酸のシグナルシーケンスおよび種間で保存された 6 箇所のシステイン配列を特徴とするタンパク質である(図 4A)。同分子は種間で広く保存されており、ヒトとマウス、ゼブラフィッシュ、線虫、更にはショウジョウバエにまで Orthologs の存在する小胞体(ER)タンパク質である(図 4B)。マウスにおいて、PRAT4A は Thymus や Spleen などの免疫組織で高発現する一方で、神経系や生殖器を含む全身諸臓器においても高発現している(図 4C)。

細胞株を用いた解析より、PRAT4A は TLR 応答を制御する分子であることが強く示唆され、その機能として以下の事実が判明している。B 細胞系列の BaF/3 細胞における同分子のノックダウンでは、TLR4 の細胞表面発現が消失し(60)、同様の現象がマクロファージ系列の RAW 細胞でも認められた。また RAW 細胞における PRAT4A のノックダウンでは、TLR4 リガンドのみならず TLR1/2 や TLR9 リガンドに対するサイトカイン産生が抑制されるという結果も得られていた。これらの結果は、PRAT4A が TLR4 に加えて複数の TLR の応答制御を担っている可能性を強く示唆するものであった。

本研究において、私は PRAT4A ノックアウト (KO) マウスを用い、① TLR の分布制御における PRAT4A の役割、② 複数種の TLR 応答における PRAT4A の役割、③ TLR を介した生体内の自然・獲得免疫応答

における PRAT4A の役割を示す。また、PRAT4A の Paralog であり、以前に TLR4 の細胞表面への分布を制御する分子として報告されている PRotein Associated with Tlr4 (PRAT4B)のノックアウトマウスの作製・解析も試みたので報告する。

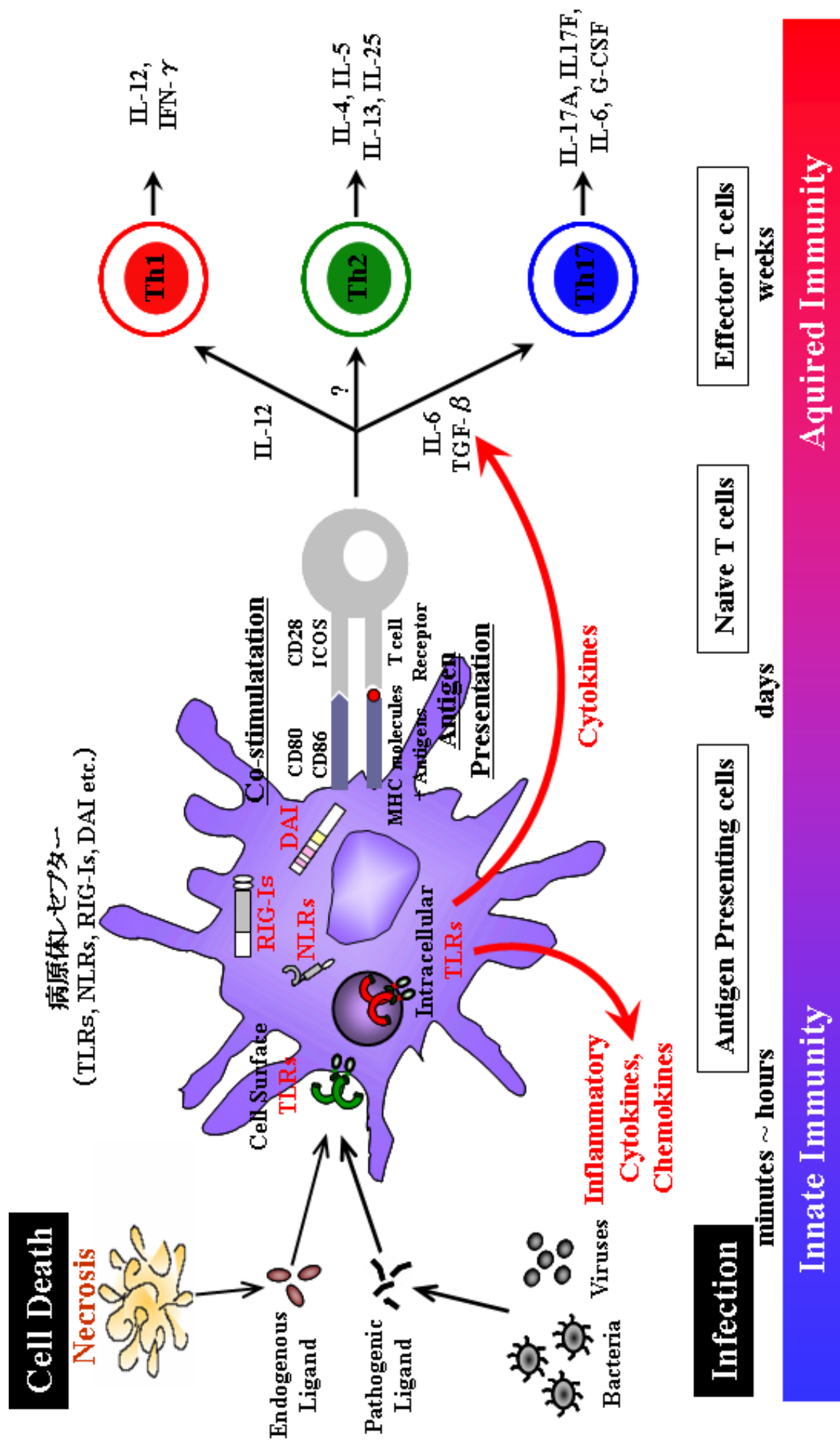


図 1: 自然免疫応答と獲得免疫応答

病原体レセプターの発見により、自然免疫応答と獲得免疫応答が一連の免疫応答であることが明らかとなってきた。病原体レセプターは病原体因子の認識に伴い、迅速に局所炎症を引き起こすと共に、適切な獲得免疫応答の誘導をも司る。

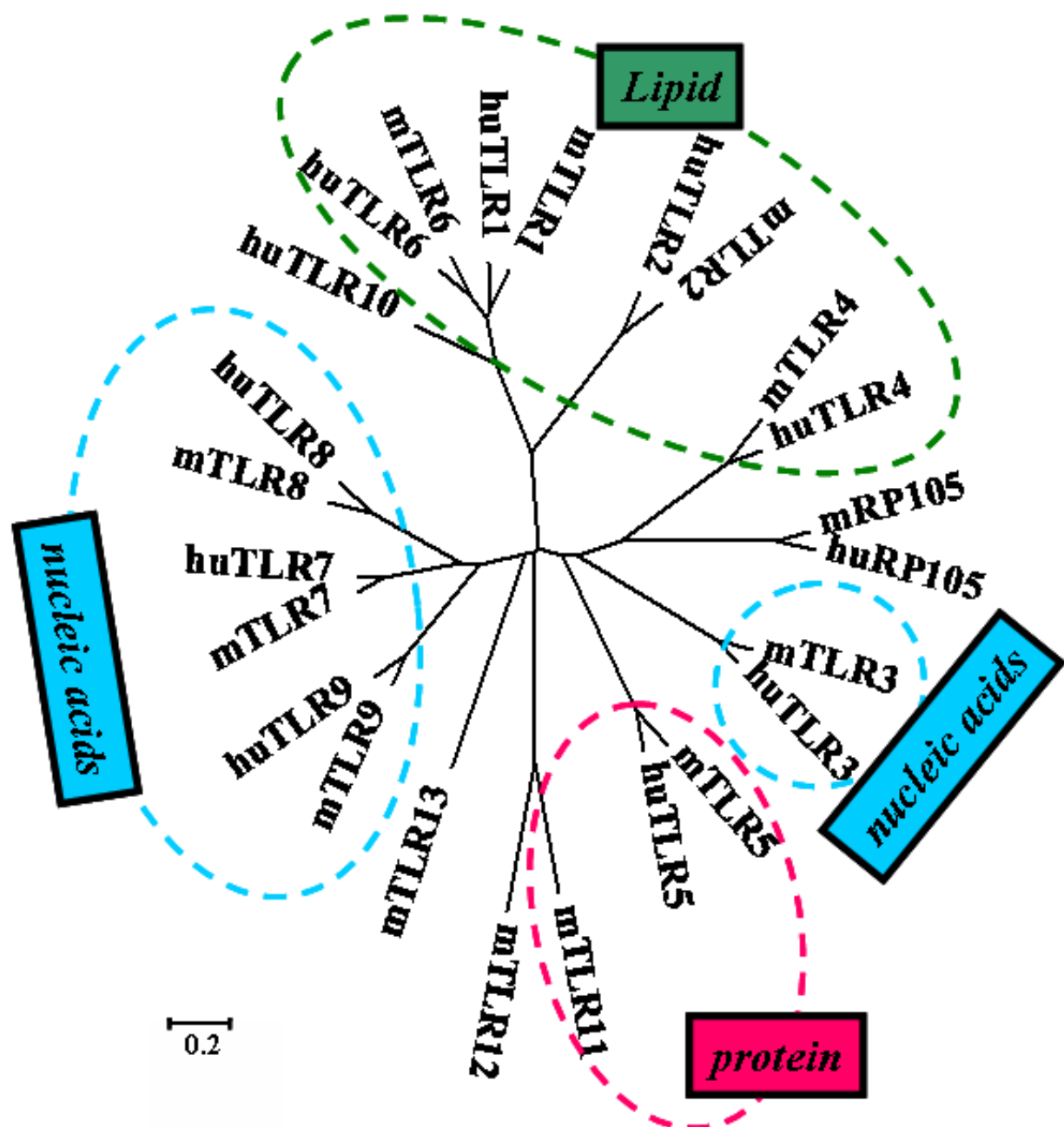


図2：マウス及びヒトTLRファミリーの無根系統樹

マウス及びヒトTLRの無根系統樹を示す。TLRは認識する病原体リガンドにより大きく3種類に分類される。脂質を認識するTLRは.....、タンパク質を認識するTLRは.....、および核酸を認識するTLRは.....で囲む。

TLRファミリーの進化は、マウス及びヒトTLRのアミノ酸配列をalignmentした結果をNeighbor-Joining methodを用いることで推察した。無根系統樹の枝の全長は10.56760013として示し、枝の長さは進化距離を反映している。進化距離の算出はMaximum Composite Likelihood methodにより行い、系統樹の描画にはMEGA4を使用した(93)。以下、使用したTLRファミリーのAccession Numberを示す。mouseTLR1 NM_030682、humanTLR1 NM_003263、mouseTLR2 NM_011905、humanTLR2 NM_003264、mouseTLR3 NM_126166、humanTLR3 NM_003265、mouseTLR4 NM_021297、humanTLR4 NM_138554、mouseTLR5 NM_016928、humanTLR5 NM_003268、mouseTLR6 NM_011604、humanTLR6 NM_006068、mouseTLR7 NM_133211、humanTLR7 NM_016562、mouseTLR8 NM_133212、humanTLR8 NM_138636、mouseTLR9 NM_031178、humanTLR9 NM_017442、mouseTLR11 NM_205819、mouseTLR12 NM_205823、mouseTLR13 NM_205820、mouseRP105 NM_008533、humanRP105 NM_005582。

TLRs	病原体由来リガンド ^(20,27)	内因性リガンド ^(40,41, 94-96)
TLR2	Peptidoglycan (グラム陽性菌) Lipoteichoic acid (グラム陽性菌) Zymosan (真菌)	HMGB-1 Heat Shock Protein (HSP) 70
TLR1/2	Triacyl-lipopeptide (Mycobacteria, 細菌) Pam ₃ CSK ₄ (Synthetic)	N.D.
TLR2/6	Diacyl-lipopeptide (Mycoplasma) FSL-1 (Synthetic)	N.D.
TLR4	Lipopolysaccharide (LPS : 活性中心はLipid A) (グラム陰性菌)	HMGB-1 S100A8 HSP60, 70 S100A9 Defensins Fibrinogen serum amyloid A 3
TLR5	Flagellin (グラム陽性菌、グラム陰性菌)	N.D.
TLR11	Profilin-Like Protein (<i>Toxoplasma gondii</i>)	N.D.
TLR3	Double-stranded RNA (ウイルス) Poly(I:C) (Synthetic)	mRNA ?
TLR7	Single-stranded RNA (ウイルス) Loxoribine (Synthetic) Imiquimod, R848 (Synthetic)	N.D.
TLR8	Single-stranded RNA (ウイルス) R848 (Synthetic)	N.D.
TLR9	Unmethylated CpG containing DNA (バクテリア、ウイルス) CpG-ODNs (CpG-A, CpG-B) (Synthetic)	Genomic DNA

表 1: TLRリガンド

報告されているTLRの病原体由来リガンドおよび内因性リガンドを示す。

■ は脂質を認識するTLR。■ はタンパク質を認識するTLR。■ は核酸を認識するTLRを示す。N.D. : Not Detected

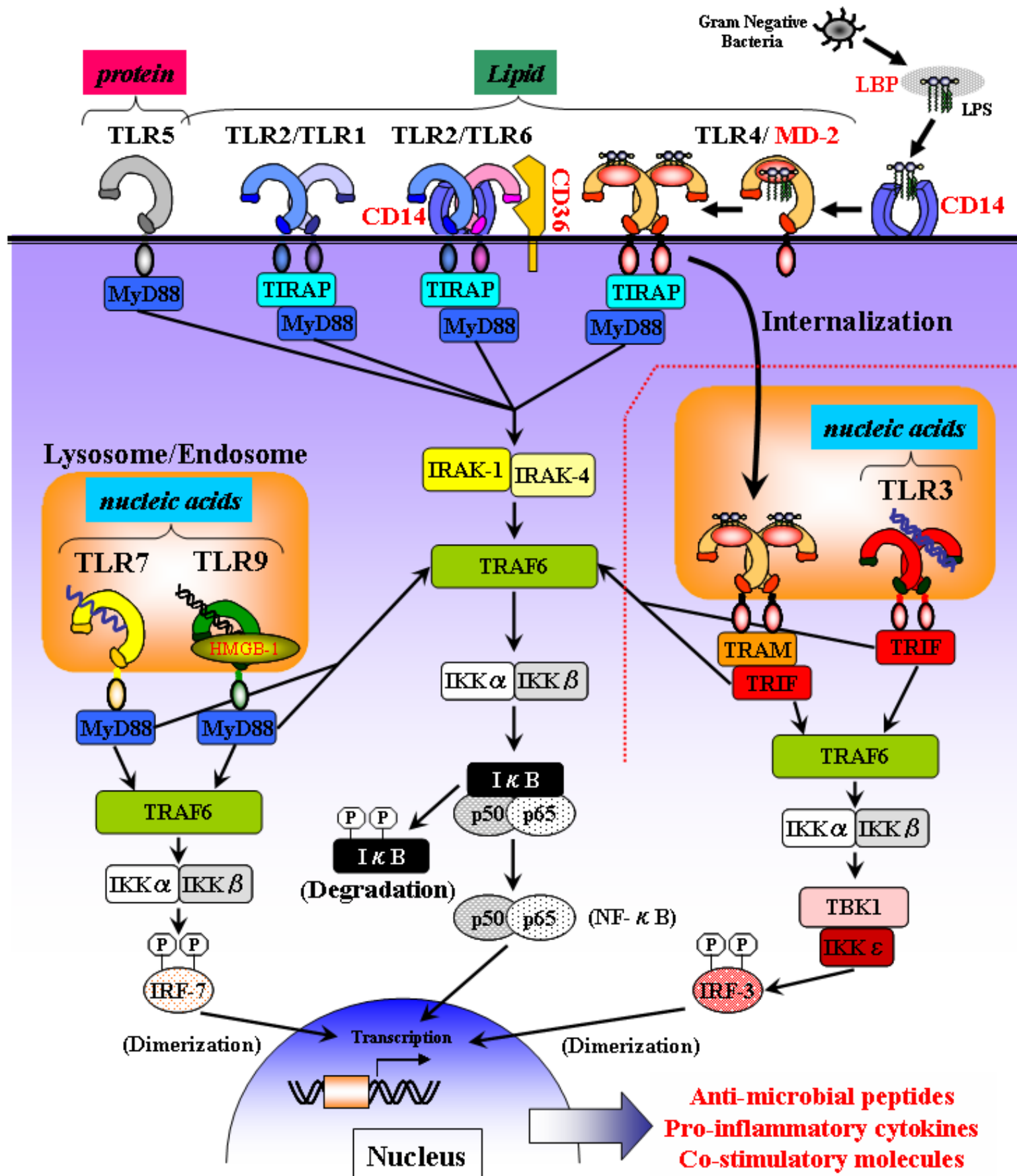


図3 : TLRの細胞内分布とシグナル伝達

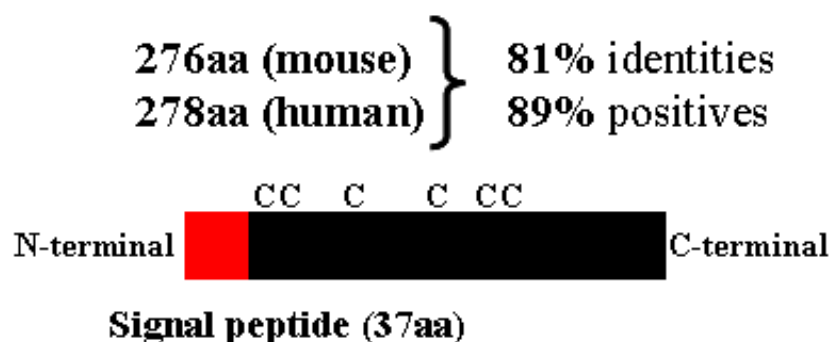
TLRは認識する病原体因子により、リガンドの認識・応答の場が異なる。脂質とタンパク質を認識するTLRは主に細胞表面に、核酸を認識するTLRは主に細胞内に局在すると考えられている。また、シグナル伝達経路にはMyD88依存性およびTRIF依存性の両経路が存在する。

TLR 関連分子	関連するTLR	TLRとの会合
TLR1	TLR2 ^(27,97)	○ ⁽⁹⁷⁾
TLR6	TLR2 ^(27,98)	○ ⁽⁹⁸⁾
MD-2	TLR4 ^(24,89,99)	○ ^(89,99)
CD14	TLR2/TLR6 ⁽¹⁰⁰⁾	—
	TLR4 ⁽¹⁰⁰⁻¹⁰²⁾	—
	TLR3 ⁽¹⁰³⁾	○ ⁽¹⁰³⁾
CD36	TLR2/TLR6 ⁽¹⁰⁴⁾	—
HMGB-1	TLR9 ^(105,106)	○ ^(105,106)
PRAT4B	TLR4 ⁽⁶⁵⁾	○
UNC93B	TLR3,7,9 ^(59,107,108)	○ ⁽¹⁰⁷⁾
	TLR13 ⁽¹⁰⁷⁾	○ ⁽¹⁰⁷⁾
gp96	TLR1/TLR2, TLR2/TLR 6 TLR4,5 ^(74,109)	○(TLR1,2,4のみ) ⁽⁷⁴⁾
	TLR7,9 ⁽⁷⁴⁾	○(TLR9のみ) ⁽⁷⁴⁾

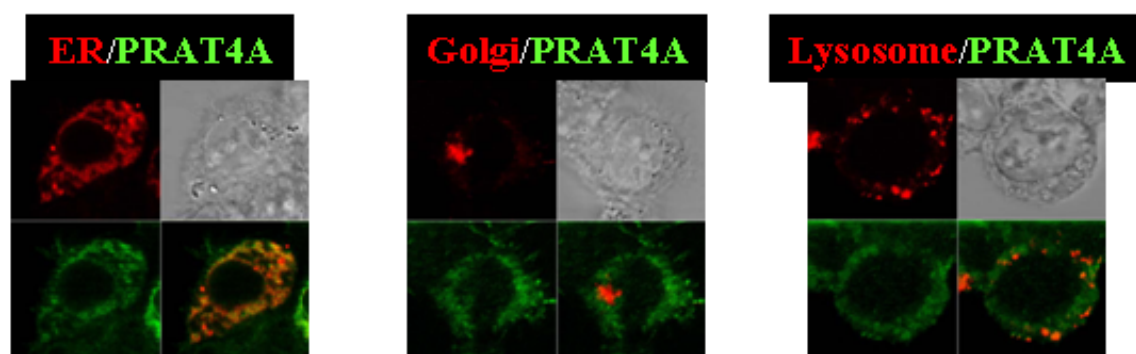
表2：TLRアクセサリー分子群

TLRの免疫応答を制御することが報告されているTLRアクセサリー分子群を示す。
■は細胞表面TLRを、■は細胞内TLRを表す。TLRとの会合は、免疫沈降法によりTLRと会合が認められているTLRアクセサリー分子を○とした。参考文献は右上の○内に記す。

A



B



C

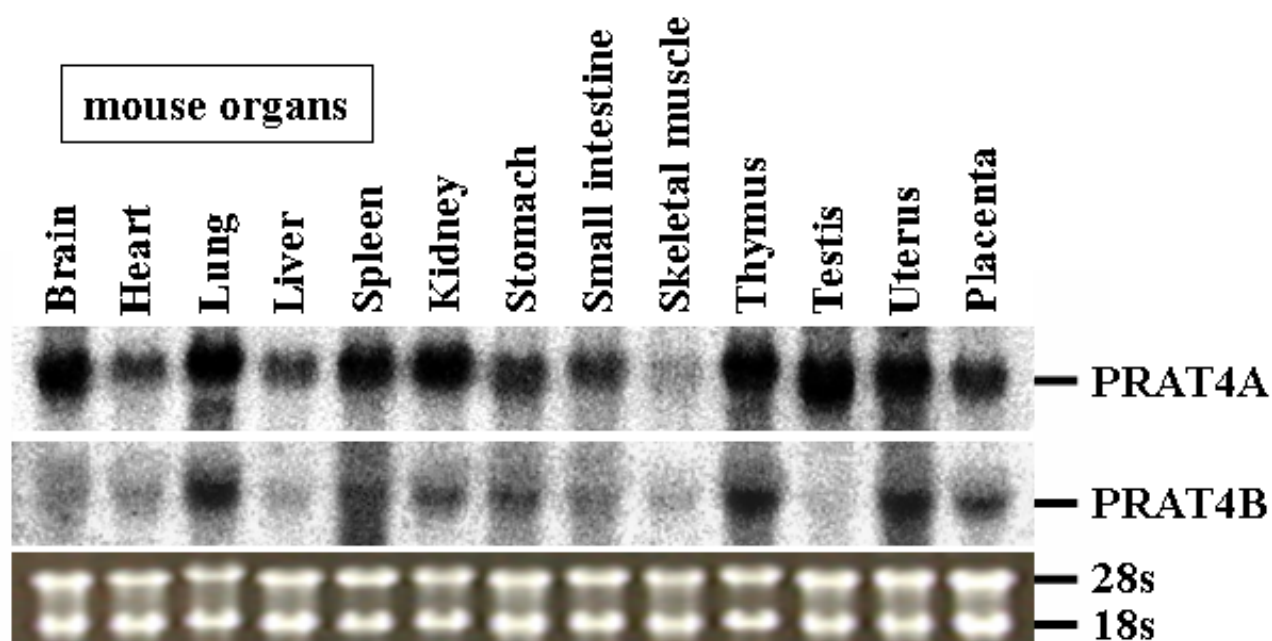


図4 : A Protein associated with Toll-like receptor 4 (PRAT4A)

(A) PRAT4Aタンパク質の構造。aaはamino acidsを示す。(B) ERマーカー、Golgiマーカー、およびLysosomeマーカーを発現させたHEK293細胞にPRAT4A-GFPを発現させ、共焦点レーザー顕微鏡により解析した結果。(C) ノーザンプロット法によりマウス臓器におけるPRAT4AおよびPRAT4Bの発現量を解析した結果。(B)、(C)は Wakabayashi Y, et al. J. Immunol 2007 177(3); 1772-1779、Konno K, et al. BBRC 2006, 339(4); 1076-1082、Takahashi K, Shibata T, Akashi-Takamura S, et al. JEM 2007 204(12); 2963-2976より引用。

材料と方法

PRAT4A 遺伝子欠損マウスの作製

PRAT4A ノックアウトマウスの作製において、キメラマウスおよび PRAT4A Hetero マウスは Unitech により作製された(61)。

以下、Unitech による PRAT4A 遺伝子の欠損法の概要を述べる。PRAT4A 遺伝子はマウスゲノムの 17 番染色体に存在する。ターゲッティングベクターは PRAT4A 遺伝子のエクソン 1 を含む約 1.7kb の領域を相同組換えによりネオマイシン耐性遺伝子に置き換えるように構築された (図 6A)。ターゲッティングベクターの 3' 端にはジフテリア毒素の A フラグメント(DT-A)が組み込まれ、ネガティブ選択が可能となっている。同ターゲッティングベクターを用いて C57BL/6 マウス由来の ES 細胞にトランスフェクションを行い、G418 によるポジティブ選択が行われた。得られたクローンより DNA を抽出し、PCR 法を用いて Targeted Allele を検出することで相同組換え体の候補が同定されている (図 6B)。候補クローンのゲノムは更に Southern Blot 法に供され、5' 側および 3' 側の External Probe を用いて相同組み換え体であることが確認されている。得られた相同組換え体を Balb/c マウスの胚盤胞に注入することでキメラマウスが作製され、同キメラマウスを C57BL/6 マウスと交配することで C57BL/6 Background の PRAT4A ヘテロ接合型マウスが得られた。

私は、Wild type Allele を検出する Primer を作製し (図 6B)、PRAT4A ヘテロ接合型マウス同士を交配することで得られたマウスの遺伝子型を PCR 法により解析した。その結果、ホモ接合型(PRAT4A KO, -/-)マウス、ヘテロ接合型(PRAT4A Hetero, +/-)マウスおよび 野生型(Wild type ,

+/-)マウスが得られ、これらのマウスを解析に供した。また、C57/BL6 Background の PRAT4A Hetero マウスを Balb/c マウスに 6 回バッククロスした後に得られた Balb/c PRAT4A KO マウスも同様に解析に供した。

PRAT4B 遺伝子欠損マウスの作製

PRAT4B 遺伝子はマウスゲノムの 5 番染色体に存在する。PRAT4B 遺伝子のエクソン 1 を含む約 3.2kb の領域を相同組換えによりネオマイシン耐性遺伝子に置き換えられるようにターゲティングベクターを構築した (図 21A)。ターゲティングベクターの 5' 端には単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ (HSV-tk) を組み込み、ネガティブ選択を行えるようにした。同ターゲティングベクターを 129 系統マウス由来の ES 細胞 (EB3 細胞) にトランスフェクションした後、G418 によるポジティブ選択とガンシクロビル (核酸類似体) によるネガティブ選択を行った。得られた ES 細胞クローンより DNA を抽出し、Southern Blot 法を用いて相同組換え体の候補を同定した (図 21B)。得られた相同組換え体を C57BL/6 マウスの胚盤胞に注入してキメラマウスを作製し、C57BL/6 と交配をすることで PRAT4B ヘテロ接合型 (PRAT4A Hetero, +/-) マウスを得た。マウスの遺伝子型は PCR 法により同定した (図 21C)。

Southern Blot analysis

ES 細胞およびマウス尻尾より精製した DNA を制限酵素処理し、0.8% アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。その後、20×SSC を用い

た Salt Transfer によりナイロンメンブラン (GENESCREEN, Perkin Elmer)に DNA を転写した。DNA 転写済みのナイロンメンブランに 0.4N NaOH によるアルカリ固定および 0.2M Tris-HCl pH7.5/1×SSC による中和を施し、更に UV Crosslinker を用いて UV 固定を行った。Probe は図 21A に示すものを使用し、 $[^{32}\text{P}]$ dCTP と Rediprime II Random Prime Labelling System (GE Healthcare)を用いたランダムプライミングにより Probe を放射性標識した。その後、illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns (GE Healthcare)を用いて Probe の精製を行い、同 Probe を Hybridization に供した。ナイロンメンブランへの Probe の Hybridization は、 10^6 cpm/ml の Probe を含有する Hybridization Buffer (ULTRAhyb, Ambion)中で行った。

骨髄キメラマウスの作製

骨髄キメラマウスは、9.5 Gy (950 rad) のX線を照射した6~7週齢の C57BL/6マウス (レシピエントマウス) にPRAT4A HeteroまたはPRAT4A KOマウス由来の骨髄を 5×10^5 個/mouseで経静脈注入することで作製した(61)。X線照射直後から一週間、レシピエントマウスには 2 mg/mlの neomycin sulfateを添加した飲み水を与えた。実験には、骨髄導入後 6~10 週間が経過したレシピエントマウスを用いた。血球細胞のキメリズムは、B220陽性の脾臓B細胞におけるTLR2およびRP105の細胞表面発現量の低下により確認した。

OVA による骨髄キメラマウスの免疫とサンプルの回収

OVA による免疫実験には骨髄キメラマウスを用いた。Complete Freund's Adjuvant (CFA)と OVA を 1:1 で混合して乳化させたものを免疫原(OVA 終濃度 : 2mg/ml)として用い、同免疫原を骨髄キメラマウスの左右後肢フットパッドに皮下免疫した(61)。免疫後 8 日目に所属リンパ節(膝下リンパ節、単径リンパ節)と血清を回収して実験に供した。免疫後血清のコントロールには、OVA 免疫前の骨髄キメラマウスから回収した血清を用いた。

B リンパ球の精製

CD43 は休止期や通常の末梢 B 細胞には発現しない。このことを利用し、CD43 Negative の脾臓細胞分画を回収することで脾臓 B 細胞を精製した(34)。PRAT4A Hetero および PRAT4A KO マウスより脾臓を摘出し、スライドガラスを用いて脾臓組織より細胞を単離した。溶血処理後、脾臓細胞に CD43 MicroBeads (Miltenyi Biotec 株式会社)を加え、4℃で 15 分間混和した。1×PBS にて 2 回洗浄した後、AutoMACS の deplete program で CD43 Negative の分画を分離した。

Thymidine Uptake Assay

細胞増殖能は細胞への³H] thymidine 取り込み量を測定することで定量した。脾臓細胞より精製した B 細胞および所属リンパ節細胞を 1×10⁵ 個/well となるように 96 穴平底プレートに播種し、複数種の TLR リガンドまたは OVA で刺激を加えた。72 時間刺激後に³H] thymidine

1 μ Ci / ml 存在下で更に 6 時間培養し、セルハーベスタシステム(Inotech)を用いて細胞内に取り込まれた [3 H] thymidine 量を測定した(34)。

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

96 穴平底プレートに 1×10^5 個/well となるように細胞を播種し、複数種の TLR リガンドおよび OVA を添加した。24 時間後の培養上清をサンドイッチ ELISA に供し、TNF- α 、IL-6、IL-12、RANTES および IFN- γ の濃度を ELISA Kit (R&D Systems)により測定した(61)。

血清中の OVA 特異的抗体価の測定は以下の ELISA system を用いて測定した(61)。ELISA Plate に OVA 濃度 10 μ g/ml の 1 \times PBS を 100 μ l/well で添加し、室温で一晩静置した。1% BSA 含有 1 \times PBS による 1 時間の Blocking の後、血清サンプルを希釈して各 well に添加した。OVA に結合した血清中抗体のアイソタイプは、ペルオキシダーゼを結合するアイソタイプ特異的抗体(Southern Biotech)を用いて決定した。

マウス抗 PRAT4A 抗体の作製

私は今回の実験において、抗マウス PRAT4A 抗体 (4A3, 4A9, 4A10) を樹立した。

免疫動物には C57BL/6 バックグラウンドの PRAT4A KO マウスを Balb/c マウスへ 4 回戻し交配をして得られた Balb/c バックグラウンドの PRAT4A KO マウスを用いた。抗原には、Flag-His6 エピトープを付加した PRAT4A (PRAT4A-FH)を Transduction した Ba/F3 細胞が培養上清中に分泌する PRAT4A-FH を Anti-FLAG M2 Agarose (SIGMA)を用いて

免疫沈降および精製したものを使用した。

免疫は、免疫原をマウスの腹腔内に投与することで行った。免疫初日に CFA と混合した抗原を、免疫 16 日目に IFA と混合した抗原を、更に免疫 25 日目と 35 日目に 1×PBS で希釈した抗原を免疫した。最終免疫日から 4 日目に脾臓を回収し、得られた脾臓細胞をマウスミエローマ由来の SP2/O 細胞と細胞融合させた。得られた Hybridoma 細胞の中から抗マウス PRAT4A 抗体を産生するものを選択し、抗マウス PRAT4A 抗体を産生するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株を樹立した。

抗体スクリーニングは、FACS 解析により行った。スクリーニング用細胞として、N 末端に Myc 抗原、C 末端に Transmembrane 領域を付加したマウス PRAT4A およびマウス MD-1 を Ba/F3 細胞に導入することで得られた Ba/F3 /mPRAT4A_TM_Myc と Ba/F3 /mMD-1_TM_Myc を用いた。これらの細胞は抗 Myc 抗体を用いた細胞表面染色の FACS 解析の結果より、マウス PRAT4A またはマウス MD-1 を細胞表面に発現していると考えられる (図 5A)。同細胞を用い、細胞表面 PRAT4A を特異的に認識する抗体を培養上清中に産生するハイブリドーマのクローンを選択した (図 5A)。得られた 3 つのクローン(4A3, 4A9, 4A10)のアイソタイプは全て IgG1 であり (図 5B)、これらの抗体は脾臓細胞の内因性マウス PRAT4A を免疫沈降することが可能であった (図 5C)。これらの事実は、樹立した 3 つのハイブリドーマ株(4A3, 4A9, 4A10)が PRAT4A 特異的抗体を産生していることを示す。

細胞培養

RPMI1640 (GIBCO)および DMEM (GIBCO)に 9% Fetal Bovine Serum (FBS)、100units/ml Penicillin、100 μ g/ml Streptomycin、50 μ M 2-Mercaptoethanol (2-ME)を添加して細胞培養に用いた。脾臓細胞、リンパ節細胞、および B 細胞の培養には RPMI1640 を使用した。BM-DC、BM-M ϕ 、および RAW264 細胞の培養には DMEM を使用した。全ての細胞培養は、Incubator 内において 37°C、5%CO₂ の条件下で行った。

発現ベクターとノックダウンベクターの作製、および細胞への導入

マウス PRAT4A cDNA の C 末端に Flag-His6 エピトープを付加したものの(PRAT4A-FH) は Neomycin 耐性遺伝子導入済みのレトロウイルスベクターである pMX-neo に組み込んだ。また、マウス TLR9 cDNA の C 末端に GFP を付加したもの (TLR9GFP)は puromycin 耐性遺伝子導入済みのレトロウイルスベクターである pMX-puro に組み込んだ。

マウス PRAT4A の発現を抑制する為、ショートヘアピン RNA (shRNA)および Hygromycin B 耐性遺伝子を発現するレトロウイルスベクターである pSSCH ベクターを用いた(62)。同ベクターは東京大学医科学研究所・宿主寄生体学分野の伊庭英夫教授より分与して頂いた。ターゲット配列である 5'- gag ttt gaa gag gtg att gag -3'に対する shRNA を pSSCH に導入し、マウス PRAT4A ノックダウンベクターとして使用した(61)。

レトロウイルスベクターのレトロウイルス粒子への取り込みにはパッケージング細胞である PLAT-E 細胞を用いた。レトロウイルスベクターを FuGENE6 transfection reagent と共に PLAT-E 細胞に Transfection し、

培養上清に産出されたウイルスを細胞への遺伝子導入に用いた。ウイルス含有培養上清は DOTAP transfection reagent と混合し、未分化骨髄細胞または RAW 細胞の培養上清に添加することで遺伝子導入を行った。遺伝子導入後、pMX-neo を transduction した細胞には G418 (Sigma) 400 μ g/ml、pMX-puro を transduction した細胞には puromycin (Sigma) 4 μ g/ml、pSSCH を transduction した細胞には Hygromycin B (Wako) 0.5mg/ml を添加することで遺伝子導入細胞の選択を行った。

骨髄由来マクロファージ(BM-M ϕ)と樹状細胞(BM-DC)の誘導

マウスの大腿骨・脛骨より採取した骨髄細胞を直接 BM-M ϕ や BM-DC の誘導に用いた。BM-M ϕ の誘導は、径 10cm のバクテリアシャーレ中に 1×10^7 個の骨髄細胞を播種し、100ng/ml mouse M-CSF (R&D systems)を含む DMEM 培地で 7 日間培養することで行った。BM-DC の誘導は、24-well Plate 内に 1×10^6 個/well となるように骨髄細胞を播種し、10ng/ml の mouse GM-CSF (R&D systems)を含む DMEM 培地で 7 日間培養することで行った(43)。BM-DC の誘導では、途中 2、4、6 日目に上記培養液を半量ずつ新たな GM-CSF 含有 DMEM 培地に交換した。

骨髄誘導樹状細胞への遺伝子導入

5-fluorouracil (5-FU) 5mg を PRAT4A KO および PRAT4A Hetero 骨髄キメラマウスの腹腔内に投与し、4 日後に骨髄細胞を採材した。骨髄細胞を Stem Cell Medium (100ng/ml 幹細胞成長因子、10ng/ml IL-6、10ng/ml IL-3 を添加した DMEM)を用いて培養し、48 時間後および 72 時間後に

PRAT4AFH pMX-puro ベクターを用いて作製したウイルスによる Transduction を行った。その後、GM-CSF 10ng/ml を加えて樹状細胞に誘導した。同時に G418 400 μ g/ml を加え、PRAT4AFH 導入細胞の選択を行った。遺伝子導入後、2 日に一度ずつ半量のメディウムを交換し、10 日から 2 週間後に誘導されてきた樹状細胞を解析に供した(61)。

マウス胚線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast : MEF) の作製

C57BL/6 バックグラウンドの PRAT4A Hetero マウス同士を交配することで得られた胎齢 12.5 日の Wild type および PRAT4A KO マウスを用いて MEF を作製した。頭部および肝臓を除去した胎仔をハサミで細断し、ピペッティングにより更に断片を細分化した。同サンプルを 10cm シャーレ内で培養し、増殖した細胞を MEF として用いた。

細胞内シグナル伝達の解析と Western Blot analysis

脾臓細胞における PRAT4A の発現量、および樹状細胞における細胞内シグナル伝達は Western Blot 法により解析した。

PRAT4A KO および PRAT4A Hetero マウスより採材した脾臓をスライドガラスにより単細胞化し、HBSS にて数回洗浄した。それぞれ同数の脾臓細胞を氷冷 Lysis Buffer (150mM NaCl, 50mM Tris/HCL pH7.4, 2mM MgCl₂, 10 μ g/ml Aprotinin, 10 μ g/ml Leupeptin, 1mM Phenyl methyl surfonyl fluoride, and 1% Triton-X 100)で溶解し、Sample Buffer を加えた後に SDS-PAGE に供した。

シグナル伝達の解析には、PRAT4A KO および PRAT4A Hetero マウス

由来の BM-DC を用いた。BM-DC を 1×10^6 /well となるように 24 穴プレートに播種し、半日のプレインキュベーションの後に各々の刺激を加えた。刺激開始後 10 分、30 分、60 分、120 分、180 分に HBSS で洗浄した BM-DC を Sample Buffer で溶解して SDS-PAGE に供した。

Western Blot analysis には、一次抗体として各種タンパク質に対する特異的抗体を用い、二次抗体として Goat anti-mouse IgG-alkaline phosphatase conjugate (American Qualex, San Clement, CA), Goat anti-rat IgG-alkaline phosphatase conjugate (American Qualex, San Clement, CA), および Goat anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase conjugate (Bio Rad)を用いた。発色にはアルカリホスファターゼの発色基質である NBT (nitro-blue tetrazolium chloride) と BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphatase *p*-Toluidine salt) を使用した。

定量的 PCR (Real Time PCR)

細胞からの RNA の抽出には RNeasy mini kit (QIAGEN)を用いた。抽出した RNA 1 μ g を ReverTra Ace- α (TOYOBO)により cDNA へと逆転写し、サンプルとして使用した。定量的 PCR は 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)により行い、TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems)を PCR 産物の定量に用いた。使用した TaqMan プローブはマウス PRAT4A (Mm00511161)、マウス IFN- β (Mm00439546)、そしてマウス β -actin (Mm00607939) である。各々のサンプルより得られた結果は、 β -actin の平均値を用いて正規化した(61)。

フローサイトメトリー

フローサイトメトリーには FACS Callibur system (BD Bioscience)を用いた。解析に供する細胞を Staining Buffer (1×PBS、2.5% FBS、0.1% Sodium Azide)で洗浄した後、染色に供した。染色時は全ての過程で Staining Buffer を使用した。

anti-TLR4/MD-2 monoclonal Antibody (mAb) (MTS510)、anti-RP105 mAb (RP/14)、anti-CD14(Sa14-2)、anti-TLR1 mAb (TR23)は感染遺伝学分野ですでに樹立されていたものをビオチン化して用いた。anti-MHC Class I 抗体は BD より、anti-TLR2、anti-CD11c、anti-CD11b、anti-D11b、anti-IgM、anti-IgD、anti-CD19、anti-CD40、anti-CD86 抗体は eBioscience より購入したものを使用した。2nd Reagent として用いた Streptavidin-RPE は SouthernBiotech より購入した。また、モノクローナル抗体のアイソタイプ決定に用いた PE labeled goat anti-mouse Ig(multiple absorption), PE Conjugated anti-mouse IgM, PE Conjugated anti-mouse IgG1, FITC Conjugated anti-mouse Ig2a, FITC Conjugated anti-mouse Ig2b は BD Pharmingen より購入した。

共焦点レーザー顕微鏡

RAW 細胞を Poly-L-Lisine (SIGMA)でプレコーティングした glass-bottom dish (Matsunami)に播種し、鏡頭に供した。細胞の刺激には 1 μ M CpG-B DNA または 1 μ M Rhodamine 標識 CpG DNA (北海道システムサイエンス社) を用いた。2 時間刺激の後、サンプルを共焦点レーザー顕微鏡 (LSM5 PASCAL ; Carl Zeiss, Inc.) を用いて観察した(61)。

小胞体の染色には ER-Tracker Red (Invitrogen)、リソソームの染色には

LysoTracker Red DND-99 (Invitrogen)を使用した。それぞれを $1\ \mu\text{M}$ または 500nM の濃度で DMEM に溶解し、同培地液中で細胞を 30 分間培養することで各々の細胞小器官を染色した。

試薬

S. minnesota (Re-595) 由来の Lipid A と *E. coli* (O55:B5) 由来の LPS は Sigma-Aldrich より購入した。Pam₃CSK₄ と FSL-1 は EMC Microcollections より購入した。CpG-B (TCCATGACGTTCTGATGCT) DNA と CpG-A (GGGGTCAACGTTGAGGGGGG) DNA は Hokkaido System Science に合成を依頼した。Poly(I:C) と Loxoribine (7-allyl-7,8-dihydro-8-oxo- guanosine) は InvivoGen より購入した。

マウスの維持と管理

C57BL/6 マウスと BALB/c マウスは日本 SLC 株式会社より購入した。MyD88 KO マウスは大阪大学微生物研究所の審良静男博士より分与して頂いた(63, 64)。マウスの維持・管理は東京大学医科学研究所実験動物施設内において Specific Pathogen Free (SPF)の環境下で行った。全ての動物実験は東京大学医科学研究所の「動物実験に関する指針」に法り、科学的小および動物福祉の観点から適正に行った。

統計処理

PRAT4A KO マウスとコントロールマウス間におけるデータの有意

差検定は Student の t 検定により算出した。t 検定における危険率が 0.05 以下の時、比較群間の差が優位であると判定した。

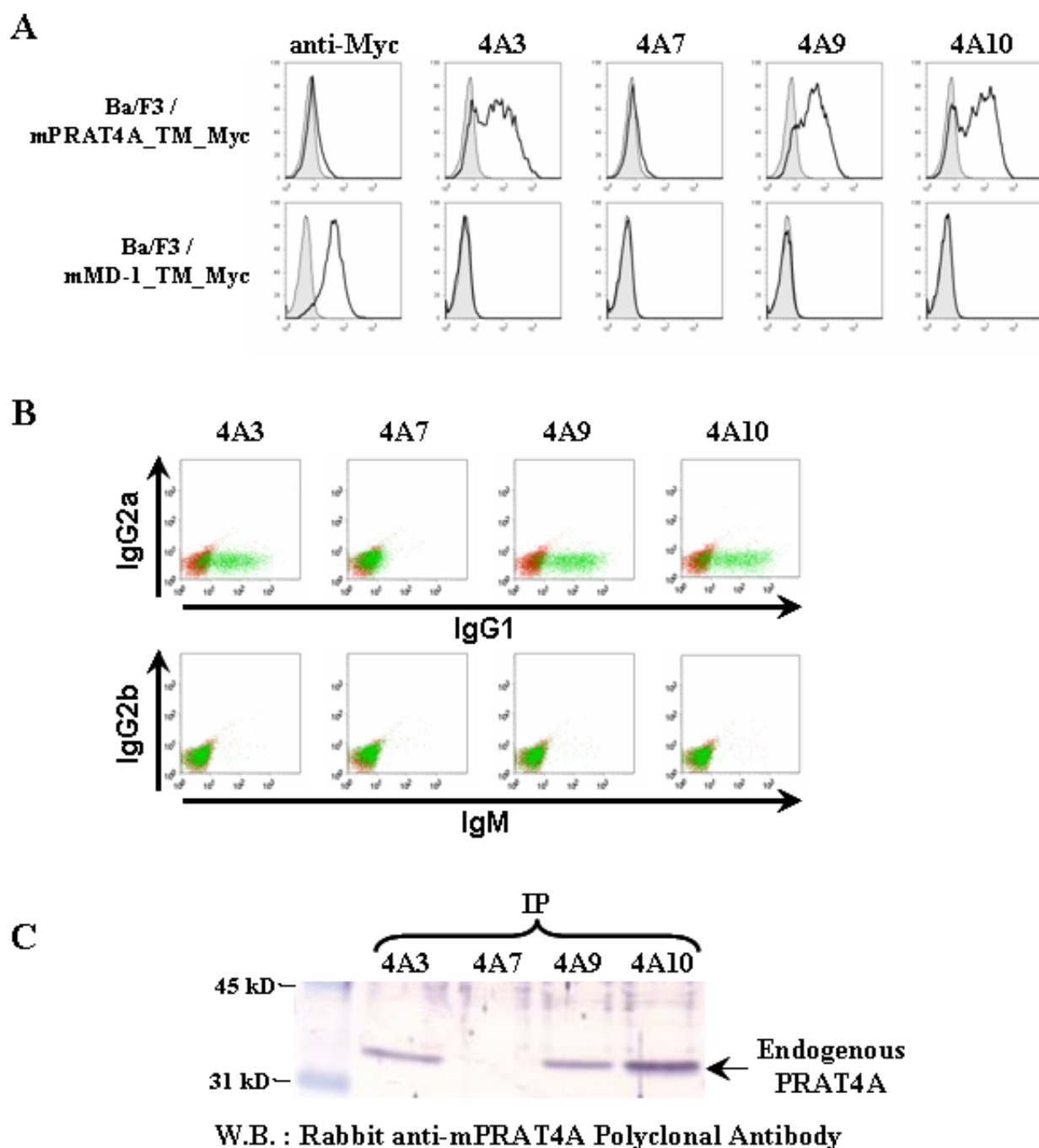


図5 : 抗マウスPRAT4A抗体の作製。

抗マウスPRAT4A抗体の作製法を示す。(A) Ba/F3細胞にMyc抗原およびtransmembrane領域を付加したマウスPRAT4AまたはマウスMD-1を導入し、細胞表面におけるマウスPRAT4AまたはマウスMD-1の発現を抗Myc抗体により確認した。同細胞を用い、細胞表面PRAT4Aを特異的に認識する抗体を産生するハイブリドーマのクローンを選択した。黒線ヒストグラムが抗体による染色、灰色ヒストグラムは2nd Reagentのみによる染色で得られたコントロールを示す。(B) 各クローンにおけるアイソタイプの決定。各抗体でBa/F3 / mPRAT4A_TM_Mycを染色後、図示した二次抗体で同細胞を染色した。

(C) 各モノクローナル抗体を結合したビーズを用い、wild type C57BL/6マウスより得られた脾臓細胞のLysateを免疫沈降した。得られたサンプルをWestern Blot解析に供し、ウサギ抗マウスPRAT4Aポリクローナル抗体を用いて内因性PRAT4Aタンパク質の検出を行った。

結果

PRAT4A ノックアウトマウスの表現型。

当分野では、以前に TLR4 の細胞表面発現を制御する新規分子として PRAT4A の存在を明らかとしてきた(65)。私は、生体内における PRAT4A の機能的な意義を明らかにする為、PRAT4A ノックアウトマウス (PRAT4A KO マウス) の解析を行った。

PRAT4A KO マウスは方法に示した手法で作成され、PCR 法および Southern Blot Analysis により相同遺伝子組換えが適切に起こっていることが Unitech により確認されている (図 6A, B)。私は PRAT4A Hetero マウスどうしのかけ合わせにより得られた PRAT4A KO マウスにおいて PRAT4A 遺伝子が欠損していることを PCR 法により確認した (図 6C)。また、同マウスにおいて PRAT4A の messenger RNA (mRNA) とタンパク質が存在しないことをそれぞれリアルタイム PCR とウェスタンブロッティング法により確認した (図 6D, E)。

作出した PRAT4A KO マウスの出生率は 17/156 であり、期待されるメンデル比よりも著しく低かった。また成長にも著しい障害が認められ、離乳期までに半数以上 (10/17) が死亡した (図 7A)。離乳期に当たる 4~5 週齢における PRAT4A KO の体重は、PRAT4A Hetero マウスや Wild マウスに比して 1/3 程度であった (図 7B, C)。この体重増加の異常は生後直後から始まり、特に PRAT4A Hetero マウスや Wild マウスで起こる生後 20 日前後からの急激な体重増加の消失が顕著であった (図 7D)。この他、恒常的な振戦を伴う神経系の異常、脂肪組織の顕著な減少が肉眼所見として認められた。また、C57BL/6 バックグラウンドの PRAT4A KO 雄マウスを Wild マウスの雌と一ヶ月にわたり交配したが、

仔マウスを得ることはできなかった。成長不良や神経症状などの身体的欠陥が原因であることは否定しきれないが、不妊であることも示唆された。PRAT4A KO 雌マウスに関しては体格的に妊娠が困難と考えられた為 (図 7B, C)、交配による不妊の確認は行っていない。

私の実験において、*ex vivo* での免疫細胞の解析は 4~6 週齢の PRAT4A KO マウスを用いて行った。しかし、PRAT4A が免疫系以外の制御にも必須の役割を担う遺伝子であるという事実から (図 7)、*in vivo* を中心とする PRAT4A の機能解析には PRAT4A KO マウスより作製した骨髄キメラマウスを用いた。これは成長障害などの非免疫系で認められたフェノタイプが免疫応答に与える影響を出来る限り排除する為であり、PRAT4A を発現しない血球系細胞の生体内における機能の解析を行った。

骨髄由来樹状細胞 (BM-DC) の様々な TLR リガンドに対する免疫応答には PRAT4A が必要である。

私は最初に、マウス骨髄より誘導した BM-DC を用いて PRAT4A の TLR 応答における機能を解析した。GM-CSF 存在下での分化と増殖、CD14、MHC class I、CD11c などの細胞表面分子の発現に関して、PRAT4A KO BM-DC と PRAT4A Hetero BM-DC との間に違いは認められなかった。一方、細胞表面における TLR4/MD-2 の発現量は完全に、TLR2 と TLR 関連分子である RP105 の発現量も顕著に低下していた(図 8A)。

様々な TLR リガンド刺激における TNF- α 、IL-6、IL-12p40、Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES)の産生量を ELISA 法により測定したところ、PRAT4A KO BM-DC では TLR4/MD-2

の細胞表面発現が消失していたにも関わらず、TLR4/MD-2 リガンド (Lipid A) 刺激による全てのサイトカイン産生が残存していた。また、TLR2/TLR6 リガンド(FSL-1)による刺激でも TNF- α 産生が一部残存していた(図 8B)。TLR1/TLR2 リガンド(PCSK)や TLR9 リガンド(CpG-B, CpG-A)刺激によるサイトカイン産生は完全に消失していた。一方、TLR3 リガンド (Poly(I;C)) 刺激における PRAT4A KO BM-DC の RANTES 産生に変化は認められなかった(図 8B)。

また、PRAT4A KO BM-DC の Lipid A 刺激による IFN- β mRNA 量の上昇も有意に低下はしていたが残存していた。一方、CpG-B による IFN- β mRNA 量の上昇は完全に消失していた。Poly(I;C)刺激による IFN- β mRNA 量の上昇に変化は認められなかった(図 8C)。

続いて骨髓キメラマウスより誘導した BM-DC を TLR4/MD-2 リガンド (Lipid A)、TLR1/TLR2 リガンド (PCSK)、TLR2/TLR6 リガンド (FSL-1)、TLR9 リガンド(CpG-B)、TLR3 リガンド (Poly(I;C)) で刺激し、CD86 の up-regulation を解析した (図 9A)。その結果、Lipid A および Poly(I;C) 刺激ではコントロール BM-DC と同様に PRAT4A KO BM-DC においても強い CD86 の up-regulation が認められた。FSL-1 刺激でもコントロール BM-DC と同様に PRAT4A KO BM-DC において弱い CD86 の up-regulation が認められた。PCSK および CpG-B 刺激ではコントロールにおいて非常に弱い CD86 の up-regulation が認められたが、PRAT4A KO BM-DC では認められなかった。

また私は、TLR4/MD-2 リガンド (Lipid A)、TLR1/TLR2 リガンド (PCSK)、そして TLR9 リガンド(CpG-B)刺激により誘導される骨髓キメラマウス由来の BM-DC におけるシグナル伝達経路の活性化を解析

した(図 9B)。Lipid A 刺激では、PRAT4A KO BM-DC における NF- κ B 経路の I κ B- α 分解はほとんど消失していた。しかし、IRF-3 や MAP キナーゼ (Erk1/2, p38, JNK1/2) のリン酸化は減弱してはいるものの PRAT4A KO BM-DC において残存していた。PCSK 刺激では、PRAT4A KO BM-DC において Erk1/2 および p38 のリン酸化が遅れて認められ、JNK1/2 のリン酸化は消失していた。一方、CpG-B 刺激における I κ B- α の分解や MAP キナーゼのリン酸化は PRAT4A KO BM-DC において完全に消失しており、Lipid A や PCSK 刺激とは明らかに異なっていた。

更に、これら TLR リガンドに対する免疫応答の低下が PRAT4A の欠損により引き起こされていることを示す為、Flag-His6 エピトープを付加した PRAT4A (PRAT4A_{fH}) 遺伝子を導入した PRAT4A KO BM-DC の解析を行った。解析に当たり、導入された PRAT4A 遺伝子から PRAT4A タンパク質が発現していることを確認した。得られた BM-DC が少数であった為に細胞を用いた解析は行えなかったが、細胞培養上清中に分泌されている PRAT4A タンパク質を免疫沈降することでその発現が確認された (図 10A)。

コントロールベクターの導入を行った未分化骨髄細胞より誘導した Wild type BM-DC では細胞表面 TLR4 を検出できなかった為、細胞表面分布が認められた TLR2 の発現解析を行ったところ、PRAT4A を導入した PRAT4A KO BM-DC において細胞表面における TLR2 の発現量が回復することが確認された (図 10B)。また、TLR4/MD-2 リガンド (Lipid A) や TLR9 リガンド(CpG-B)刺激によるサイトカイン産生量の回復も認められた (図 10C, D)。これらの結果より、PRAT4A KO BM-DC で認められた TLR リガンドに対する応答性の低下は PRAT4A の欠損に起因

していると考えられる。

また、Lipid A 刺激による IL-12 産生や CpG-B 刺激による IL-6 産生は MyD88 依存性に起こるが(64, 66, 67)、これらのサイトカイン産生では部分的な回復が認められた。一方で、TRIF 依存性に起こる Lipid A 刺激による RANTES 産生は完全に回復していた。こうした事実は PRAT4A が MyD88 経路と TRIF 経路のバランス調整に寄与している可能性を暗示しているのかもしれない。

骨髄由来マクロファージ (BM-M ϕ) の様々な TLR リガンドに対する免疫応答には PRAT4A が必要である。

私は続いて C57BL/6 バックグラウンドの PRAT4A KO BM-M ϕ の解析を行った。BM-DC と同様に、PRAT4A KO BM-M ϕ でも CD14、MHC class I、および CD11b などの細胞表面分子の発現に変化は認められなかった。一方、細胞表面における TLR1 の発現量は完全に、RP105 の発現量は部分的に低下していた。また、TLR2 の細胞表面発現はわずかではあるが減少していた。BM-DC とは異なり、PRAT4A KO BM-M ϕ の細胞表面 TLR4/MD-2 は顕著に減少してはいるものの、残存が認められた(図 11A)。様々な TLR リガンド刺激における TNF- α 、IL-6、IL-12p40、RANTES の産生量を ELISA 法により測定したところ、TLR4/MD-2 リガンド (Lipid A) 刺激によるサイトカイン産生は TNF- α と RANTES において部分的に残存していたが、IL-6 の産生は完全に消失していた(図 11B)。また、TLR7 リガンド (Loxoribine) 刺激による TNF- α 、IL-6、IL-12p40、そして RANTES の産生が PRAT4A KO BM-M ϕ において完全に消失していたことより、PRAT4A は TLR7 の機能も制御していることが示唆された(図 11B)。BM-DC と同様、PRAT4A KO BM-M ϕ にお

いても TLR3 リガンド(Poly(I;C))刺激によるサイトカイン産生は全く影響を受けていなかった (図 11B)。

また BM-DC と同様に、PRAT4A KO BM-M ϕ では、Lipid A 刺激に伴う IFN- β mRNA 量の発現上昇は残存していたが、Poly(I;C)刺激による IFN- β mRNA 量の発現上昇は全く影響を受けていなかった (図 11C)。

私は更に、Balb/c バックグラウンドの PRAT4A KO BM-M ϕ の解析も行った。細胞表面 TLR の発現およびサイトカインの産生は、基本的に C57BL/6 バックグラウンドの PRAT4A KO BMM ϕ と同様であった (図 12A, B)。しかし、C57BL/6 バックグラウンドとは異なり、Balb/c バックグラウンドの PRAT4A KO BM-M ϕ では TLR2/TLR6 リガンド(FSL-1) 刺激によるサイトカイン産生の残存が認められた (図 12B)。またマクロファージの活性化シグナル伝達に必要な細胞表面 CD40 の発現上昇を解析したところ(68)、TLR1/TLR2 リガンド(PCSK)および TLR2/TLR6 リガンド(FSL-1)刺激による CD40 の発現上昇が PRAT4A KO BMM ϕ において明らかに残存していた (図 12C)。

BM-DC では TLR5 リガンド (Flagellin) に対する免疫応答は認められなかった為(35)、Balb/c バックグラウンドの BM-M ϕ を用いて Flagellin に対する免疫応答の解析を行った。PRAT4A KO BM-M ϕ では Flagellin 刺激による RANTES 産生が完全に消失しており(図 12B)、Flagellin 刺激により誘導される細胞表面 CD40 の発現上昇も完全に欠損していた(図 12C)。Flagellin には細胞質内に Ipaf と呼ばれる病原体レセプターが存在することが知られているが、PRAT4A KO BM-M ϕ では TLR5 のシグナル伝達分子である MyD88 依存的に引き起こされる免疫応答が完全に消失していた(図 12C) (27, 69)。この結果より、解析した

BM-M ϕ における Flagellin 応答は TLR5 依存的であると考えられ、TLR5 の制御にも PRAT4A が必須であることが強く示唆された。

Balb/c バックグラウンド骨髄由来マクロファージ (BM-M ϕ) の TLR4 リガンドに対する免疫応答における PRAT4A の役割。

B6 バックグラウンドの BM-M ϕ では、TLR4/MD-2 の細胞表面発現は残存しており、同細胞において TLR4/MD-2 の細胞表面発現を制御する他の分子の存在が示唆された。一方、Balb/c バックグラウンドの PRAT4A KO BM-M ϕ では、FACS 解析において細胞表面 TLR4 の発現がほぼ消失していた(図 13C)。

マクロファージの TLR4 リガンド認識では、細胞表面 TLR4 におけるリガンド認識が MyD88 依存的応答を引き起こし、その後の細胞表面 TLR4 の Internalization が細胞内における TRIF 依存的応答を引き起こすと考えられている(図 26)(38)。そこで私は、細胞表面 TLR4/MD-2 を欠損した Balb/c バックグラウンドの PRAT4A KO BM-M ϕ を用い、同細胞が TLR4 リガンド (Lipid A) に対する応答を欠損し得るのかを検討した。

最初に細胞表面において MyD88 依存的に引き起こされる TNF- α および IL-6 の産生を ELISA 法により測定したところ、低濃度 Lipid A 刺激では完全に、高濃度 Lipid A 刺激でもほとんどのサイトカイン産生が消失していた (図 13B)。一方、TRIF 依存的に引き起こされることが知られる RANTES 産生では(70)、低濃度 Lipid A 刺激ではその産生が完全に消失していたが、高濃度 Lipid A 刺激ではコントロールと同様にその産生が認められた (図 13B)。BM-M ϕ における CD40 の細胞表面発現の上昇は、低濃度 Lipid A 刺激では MyD88 依存的に引き起こされ、高

濃度 Lipid A 刺激では TRIF 依存的にも引き起こされていた (図 13C)。PRAT4A KO BM-M ϕ における CD40 の細胞表面発現の上昇は、低濃度 Lipid A 刺激では完全に消失していたが、高濃度 Lipid A 刺激では MyD88 KO BM-M ϕ と同様に認められた (図 13C)。一方、細胞表面 TLR4 の Internalization 後に TRIF 依存的に引き起こされる IFN- β 産生では(38)、TNF- α や IL-6 の産生と同様、PRAT4A KO BM-M ϕ においてその産生はほとんど消失していた (図 13C)。

これらの結果は、BM-M ϕ において細胞内 TLR4 が Lipid A 認識に関与していることを強く示唆するものである。

脾臓由来B細胞の様々なTLRリガンドに対する免疫応答にはPRAT4Aが必要である。

B 細胞は抗体産生を介して主に獲得免疫応答に寄与する。しかし、抗体産生の誘導には CD4 陽性 T ヘルパー細胞による B 細胞活性化のみでは不十分であり、B 細胞における TLR を介した病原体因子の認識が重要であることが報告されている(71)。また、T 細胞非依存的に引き起こされる自然抗体の産生においても TLR が関与しているという報告がある(33)。そこで私は、脾臓 B 細胞の TLR 応答における PRAT4A の機能を解析した。

細胞表面における IgM と IgD の発現パターンより、脾臓における B 細胞の分化に PRAT4A の有無は影響しないと考えられた (図 14A)。PRAT4A KO 脾臓 B 細胞において、CD19、CD40、IgM、IgD などの細胞表面分子の発現量に変化は認められなかった (図 14B)。一方、TLR2 と RP105 の細胞表面における発現量はそれぞれ完全または部分的に低下していた (図 14B)。BM-DC や BM-M ϕ と異なり、B 細胞では細胞

表面における TLR4/MD-2 の発現は認められなかった。

骨髓キメラマウスの脾臓より分離した CD43 陰性の B 細胞を様々な TLR リガンドで刺激したところ、PRAT4A 欠損 B 細胞では TLR3 リガンド(Poly(I;C))以外の複数の TLR リガンドにより誘導される細胞増殖が完全に抑制されていた。RP105 の細胞表面発現は部分的な減少であったにも関わらず、抗 RP105 抗体により誘導される増殖は完全に消失していた。一方、抗 IgM 抗体と抗 CD40 抗体により引き起こされる B 細胞レセプターを介した増殖誘導に PRAT4A の影響は認められなかった。BM-DC や BM-Mφ における Poly(I;C)刺激では PRAT4A の影響は認められなかったが、Poly(I;C)刺激で誘導される B 細胞の増殖は一部残存していた (図 14C)。

また、PRAT4A KO B 細胞における様々な TLR リガンド刺激に伴う共刺激分子リガンドである CD86 の発現増強は、TLR4/MD-2 リガンド (Lipid A)、TLR2/TLR6 リガンド(FSL-1)、TLR9 リガンド(CpG-B)刺激で完全に消失しており、TLR1/TLR2 リガンド(PCSK)刺激では部分的に残存していた (図 14D)。TLR3 リガンド(Poly(I;C))、抗 RP105 抗体、抗 IgM 抗体と抗 CD40 抗体による刺激に伴う CD86 の発現増強に PRAT4A はほとんどまたは全く影響を及ぼさなかった。

マウス胚線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast : MEF) の様々な TLR リガンドに対する免疫応答にも PRAT4A が必要である。

これまでの結果より、免疫細胞における TLR 応答に PRAT4A が必要であることが明らかとなった。しかし、TLR は免疫細胞以外の非免疫細胞にも発現することが知られている(20)。そこで、私は非免疫細胞の一つである MEF 細胞の解析を行った。

PRAT4A KO MEF では細胞表面の CD138 (syndecan-1)の発現量に顕著な低下は認められなかったが、細胞表面 TLR2 の発現が完全に消失していた (図 15A)。細胞表面 TLR4/MD-2 の発現は認められなかった。

様々なTLR リガンド刺激における IL-6 と RANTES の産生量を ELISA 法により測定したところ、TLR2/TLR6 リガンド(FSL-1)刺激と TLR3 リガンド (Poly(I;C))刺激以外の TLR 刺激ではサイトカイン産生が完全に消失していた (図 15B)。一方、細胞表面における TLR2 の発現が完全に消失していたにも関わらず、FSL-1 刺激によるサイトカイン産生は残存していた (図 15B)。特に高濃度 FSL-1 刺激における RANTES 産生が顕著に残存していた。BM-DC や BM-Mφ と同様、PRAT4A KO MEF においても Poly(I;C)刺激によるサイトカイン産生は全く影響を受けていなかった (図 15B)。

以上を示してきたように、様々な細胞において複数の TLR を介した免疫応答の誘導は PRAT4A により制御されていることが判明した。これまでに得られた結果を表 3 にまとめる。

PRAT4A は TLR9 の小胞体からリガンド認識の場であるリソソームへの移行に必要である。

解析した全ての細胞では細胞表面 TLR の発現量が低下し、それらリガンドに対する応答は顕著に低下していた(表 3)。これらの結果より、PRAT4A は TLR の細胞表面分布を制御することで細胞表面 TLR の応答を制御していると考えられた。一方、PRAT4A は細胞内に分布する TLR7 や TLR9 のリガンド認識にも不可欠の分子であった(表 3)。TLR9 のリガンド認識には TLR9 の小胞体からリソソームへの移行が必須であることが知られている(58, 66)。私は PRAT4A が TLR9 の細胞内分布の制御に関与している可能性を考え、PRAT4A ノックダウン細胞における TLR9 の細胞内分布を解析した。

解析には、マウスの TLR9-GFP を発現するマクロファージ系列の RAW 細胞 (RAW/TLR9-GFP 細胞) に PRAT4A ノックダウンベクター (shPRAT4A) を導入したものをを用いた。Real Time PCR による解析では、同細胞における PRAT4A のノックダウン効率は 80%以上であった(図 16A)。PRAT4A KO BM-M ϕ の結果と一致して、PRAT4A をノックダウンした細胞では、細胞表面における TLR4 と RP105 の発現量がそれぞれ消失または減少していた(図 16B)。

無刺激時において、コントロール RAW 細胞では多くの TLR9GFP が ER マーカーと共局在していたが、小胞体マーカーとは共局在しない TLR9GFP の凝集塊も認められた(図 16C)。一方、shPRAT4A RAW 細胞では TLR9-GFP は完全に小胞体マーカーと共局在し、TLR9GFP の凝集塊は認められなかった。

TLR9 リガンド (CpG-B) による刺激時において、コントロール RAW 細胞では Rhodamine 標識 CpG-ODN およびリソソームマーカーと凝集

した TLR9-GFP との共局在が認められた(図 16C)。しかし、shPRAT4A RAW 細胞では TLR9-GFP は Rhodamine 標識 CpG-ODN およびリソソームマーカーとは全く共局在せず、無刺激時と同様に ER マーカーと共局在していた(図 16C)。Rhodamine 標識 CpG-ODN の細胞内への取り込みに関しては、コントロール RAW 細胞と shPRAT4A RAW 細胞との間に差は認められなかった。

これらの結果より、TLR9 の小胞体からリソソームへの移行、即ち TLR9 のリガンド認識の場への移行が PRAT4A により制御されていることが示された。

PRAT4A は *Escherichia coli* (*E.coli*) に対する免疫応答に必要である。

各 TLR リガンドを用いた結果より、PRAT4A が複数の TLR における免疫応答に必須であることが判明した。しかし、病原体は複数の TLR リガンドを有しており、実際の免疫応答における PRAT4A の機能を知る為には PRAT4A KO 細胞の病原体に対する免疫応答を解析する必要がある。そこで私は、PRAT4A KO キメラマウスを用いて Heat-killed *E.coli* や Heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* に対する in vitro および in vivo での免疫応答を解析した。

最初に TLR2、TLR4、TLR9 リガンドを有する *E.coli* に対する免疫応答を解析した(72)。コントロール BM-DC では Heat-killed *E.coli* 刺激により顕著に IL-6、IL-12p40、TNF- α 、RANTES の産生を引き起こした(図 17A)。しかし、PRAT4A KO BM-DC ではこれら全てのサイトカイン産生が有意に低下しており、特に少量の *E.coli* 刺激におけるサイトカイン産生の低下が顕著であった(図 17A)。一方、サイトカイン産生とは異なり、Heat-killed *E.coli* 刺激による CD86 の up-regulation は PRAT4A KO

BM-DC とコントロール BM-DC の両方で同様に認められた(図 17B)。また、骨髄キメラマウスに Heat-killed *E.coli* 3×10^8 個/mouse を腹腔内投与し、投与後 3 時間における血中サイトカイン濃度を測定した。その結果、PRAT4A KO キメラマウスでは IL-6、IL-12p40、RANTES の産生量が有意に低下していた(図 17C)。特に血中の Th1 サイトカインである IL-12p40 の産生量が顕著に低下していたことは興味深い。

PRAT4A KO 骨髄キメラマウスでは Th1 偏向の獲得免疫応答誘導が顕著に抑制される。

続いて私は、TLR2、TLR9 リガンドを有する *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tuberculosis*) に対する免疫応答を解析した(73)。PRAT4A KO BM-DC では、Heat-killed *M.tuberculosis* 刺激による IL-6、IL-12p40、TNF- α 、RANTES の産生量が部分的ではあるが有意に低下しており、特に IL-6 の産生量低下が顕著であった(図 18A)。Heat-killed *M.tuberculosis* 刺激による CD86 の up-regulation では、Heat-killed *E.coli* 刺激と同様、PRAT4A KO BM-DC でもコントロール BM-DC と同様に CD86 の up-regulation が認められた。(図 18B)

以前の報告より、*M. tuberculosis* を含有するフロイント完全アジュバントと OVA の混合物による皮下接種は TLR を介した OVA に対する Th1 偏向の免疫応答を誘導する(45)。私は TLR を介した Th1 偏向の免疫応答における PRAT4A の機能を解析する為、PRAT4A KO 骨髄キメラマウスを用いて同手法による解析を行った。PRAT4A KO 骨髄キメラマウスを免疫し、免疫後 8 日目に所属リンパ節と血清を回収した。所属リンパ節細胞を OVA で刺激したところ、PRAT4A KO 骨髄キメラマウスでは OVA により誘導される細胞増殖能が非常に弱かった(図 19A)。この結果に一致して、所属リンパ節細胞を

OVA 刺激して得られた培養上清中の IFN- γ 量も顕著に抑制されていた(図 19B)。また血清中の抗 OVA 抗体のサブクラスを ELISA 法により解析したところ、OVA 特異的な IgM 抗体の血中量に差は認められなかったが、PRAT4A KO 骨髄キメラマウスでは OVA 特異的な IgG1 抗体と IgG2a/c 抗体の血中量が有意に減少していた(図 19C)。特に Th1 偏向で産生が強く誘導される IgG2a/c の血中量の減少が顕著であった。

これらの結果は、TLR を介して誘導される Th1 偏向の獲得免疫応答において PRAT4A が必須の役割を担うことを示唆している。

PRAT4A mRNA は様々な TLR リガンド刺激により減少する。

これまでの結果より、*in vitro* および *in vivo* における様々な TLR 応答において PRAT4A が必要不可欠の分子であることが判明した。しかし、PRAT4A が細胞の TLR 応答を実際に制御し得る分子であるか否かに関しては不明である。私は様々な TLR リガンド刺激に伴う PRAT4A mRNA 量の変化を Real Time PCR により解析し、PRAT4A が TLR 応答においてフィードバック機構を司る分子である可能性を探った。

C57BL/6 マウスの骨髄由来 BM-DC を様々な TLR リガンドで刺激して PRAT4A の mRNA 量を測定したところ、解析した全ての TLR リガンドで PRAT4A の mRNA 量が顕著に低下していた(図 20A)。特に Lipid A による PRAT4A mRNA 量の低下が顕著であった。一方、TLR 特異的なシャペロン分子として報告されている gp96 の mRNA 量に顕著な変化は認められなかった(74) (図 20B)。

PRAT4A KO キメラマウスはLPSに誘導されるエンドトキシンショックに抵抗性である。

生体にとって致命的となる過剰な自然免疫応答のマウスモデルとして、TLR4 リガンド (LPS) により引き起こされるエンドトキシンショックが知られている。このエンドトキシンショックの系では、致死量の LPS に先行した非致死量の LPS 投与が、LPS に対する抵抗性を誘導する (Tolerance) (75)。Tolerance は LPS 刺激のフィードバックとして誘導される短期間の LPS に対する不応答状態により引き起こされると考えられている。私は PRAT4A KO 細胞における状態が LPS により引き起こされる不応答の状態を再現している可能性があると考え、PRAT4A KO 骨髄キメラマウスがエンドトキシンショックに対して抵抗性を示すか否かを解析した。

コントロールの骨髄キメラマウスは LPS 投与後 4 日以内に全てが死亡した。一方、PRAT4A KO 骨髄キメラマウスは LPS 投与に完全に抵抗性であった(図 21A)。LPS 投与後半日までの臨床症状(下痢、不動化、食欲不振など)に関しては、PRAT4A KO 骨髄キメラマウスとコントロール骨髄キメラマウスとの間に大きな違いは認められなかったが、PRAT4A KO 骨髄キメラマウスは LPS 投与後 1~2 日目において首を挙げる、歩き始めるといった状態の好転が認められ、LPS 投与後 3 日目にはほぼ正常な状態に戻った。一方、コントロール骨髄キメラマウスは一度も状態が好転することなく、徐々に衰弱して死亡した。これら臨床症状の差は LPS 投与後の体重の変化にも反映されている(図 21B)。また、LPS を投与したマウスの血清を回収して血中サイトカイン濃度を ELISA により測定したところ、TNF- α 、IL-6、IL-12、RANTES の産生量において部分的ではあるが有意な血中濃度の減少が認められた(図

21C)。

以上の結果より、LPS 投与直後のサイトカイン産生には顕著な差が認められないにも関わらず、臨床症状および致死率に明確な相違が生じることが判明した。そこで致死率の原因が明確に TNF- α 産生に起因することが証明されている D-Galactosamine と LPS により引き起こされるエンドトキシンショックの系を解析した(76, 77)。その結果、PRAT4A KO 骨髄キメラマウスとコントロール骨髄キメラマウスは共に LPS 投与後 12 時間以内に全てが死亡した(図 22)。

TLR リガンド刺激に伴う PRAT4A の発現量変化。

図 4B に示すように PRAT4A は小胞体中存在する。しかし、様々な解析の過程で細胞に PRAT4A を過剰発現させることで PRAT4A が培養上清に分泌されるという予想外の PRAT4A の動態が発見された(図 10A)。そこで私は、抗 PRAT4A モノクローナル抗体を作製し (図 5)、内因性 PRAT4A の動態を解析した。

私はまず、無刺激の状態で Wild type BM-DC や Wild type BM-M ϕ における細胞表面 PRAT4A の検出を試みたが、PRAT4A は検出できなかった。しかし、Wild type BM-M ϕ を様々な TLR リガンドで刺激することで細胞表面に PRAT4A が発現した(図 23A)。この染色は PRAT4A KO BM-M ϕ では全く検出されず、アイソタイプコントロール (ビオチン化 mouse IgG1) でも Wild type BM-M ϕ 表面が染色されなかったことより Fc レセプターによる非特異的な結合でもないと考えられた (図 23A)。一方、Wild type BM-DC ではどの TLR リガンド刺激を加えても細胞表面の PRAT4A は検出されなかった。(図 23B)

**PRAT4A の Paralog である PRotein Associated with Tlr4 (PRAT4B)の
ノックアウトマウスは致死性である。**

PRAT4A KO 細胞を用いた解析より、細胞表面 TLR の細胞表面発現は完全には PRAT4A 依存的でないことが判明した(表 3)。この事実は、細胞表面 TLR の発現が PRAT4A 以外の分子により制御されていることを示しており、PRAT4A と同様の機能を有する他分子の存在が推察された。

当分野では以前、TLR4 の細胞表面発現を制御する新たな分子として PRAT4B の存在を報告してきた(65)。この分子は PRAT4A とタンパク質レベルで 38%の一致、および 54%の相同性を持つ分子であり、PRAT4A では説明しきれない TLR の細胞内分布制御を司る可能性が高いと考えられた。私は PRAT4B ノックアウトマウスの作製を行い、同分子の TLR 細胞内分布に及ぼす影響の解析を試みた。

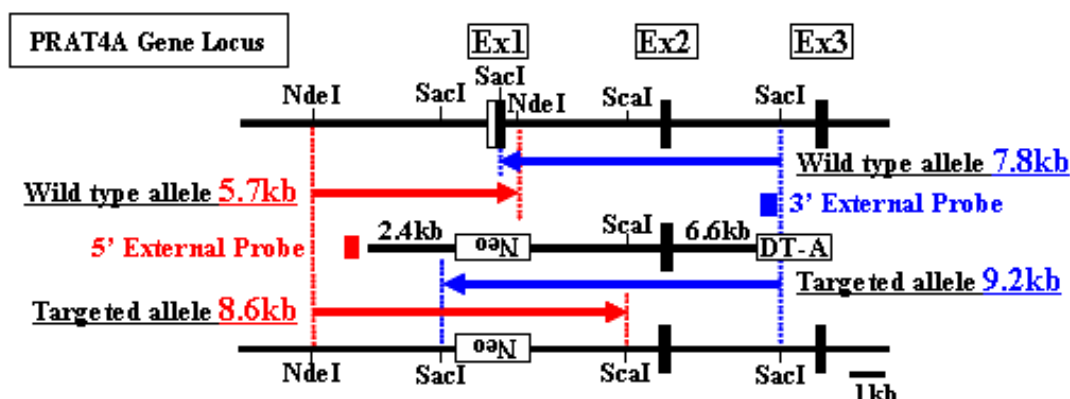
PRAT4B KO マウスは方法に示した手法で作成し、Southern Blot Analysis により相同遺伝子組み換えが適切に起こっていることを確認した(図 24A, B)。また PRAT4B Hetero マウス間の交配で得られたマウスの Wild type Allele および Targeted Allele は PCR 法により検出した(図 24C)。

PRAT4B Hetero マウス間の交配で得られた 73 匹のマウスの遺伝子型を解析したが Wild : Hetero : KO = 28 : 45 : 0 であり、PRAT4B KO を得ることはできなかった(図 24D)。この結果より PRAT4B ノックアウトマウスは胎性致死であると考えられる。

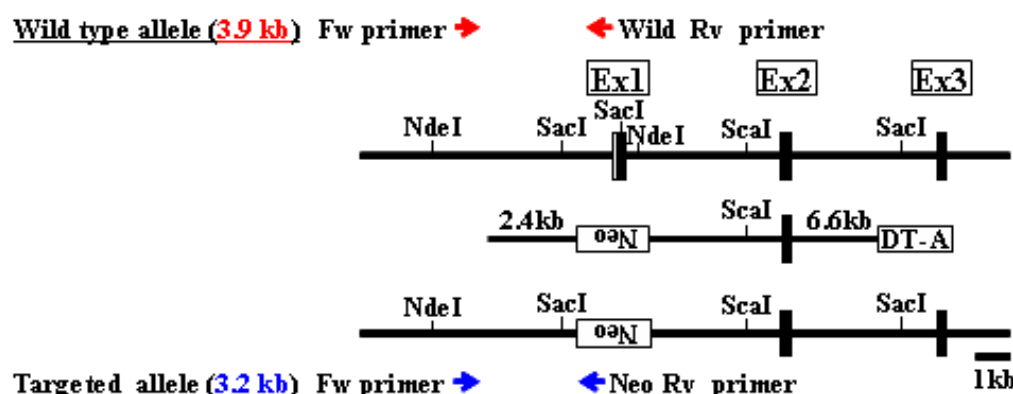
更に、胎齢 12.5 日前後の胎児 39 匹の遺伝子型を解析したが、PRAT4B KO マウスの存在を確認することはできなかった。骨髓キメラ作製に必要な十分量の造血幹細胞が存在する胎児肝細胞を得られるのは 12.5 日齢以降であり、PRAT4B KO 骨髓キメラマウスの作製を行うこともできなかった。Wild

マウスと PRAT4B Hetero マウスより得られた脾臓 B 細胞、BM-DC、そして BM-M ϕ における細胞表面 TLR ファミリーの発現および TLR リガンドに対する免疫応答を解析したが、顕著な表現型の差は認められなかった。

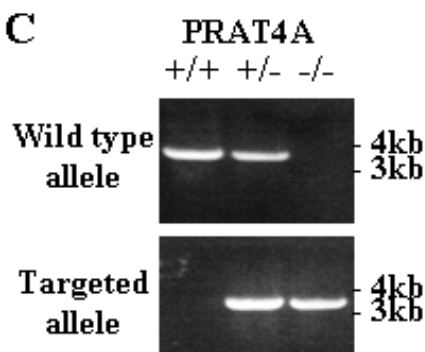
A



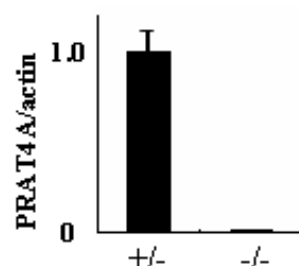
B



C



D



E

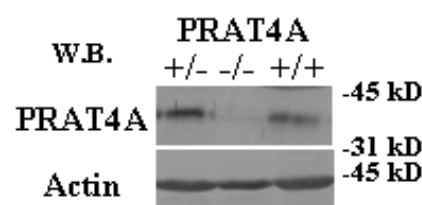


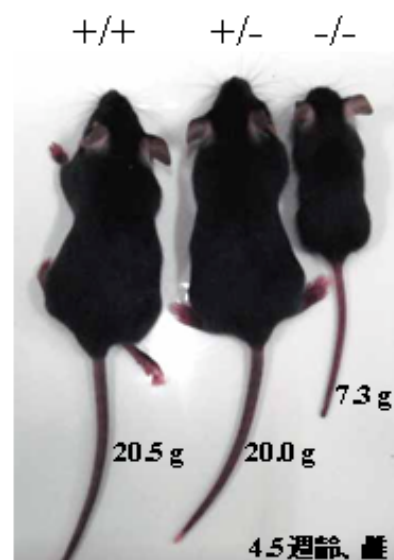
図6：PRAT4A遺伝子欠損(PRAT4A KO)マウスの作製。

マウスPRAT4A遺伝子欠損法を示す。(A) 5'側及び3'側のExternal Probeを用いたSouthern Blot解析によるTargeted Allele検出法。模式図はマウスPRAT4A遺伝子の構造、PRAT4A Targeting Vector、変異後のPRAT4A遺伝子の構造、そして制限酵素サイトの分布を表す。黒塗りのExon (Ex)領域はCoding Exon。Homologous Recombinationを起こしたES細胞のTargeted Alleleの確認はUnitechにより行われた。(B) PCR法によるTargeted Allele検出法を示す。模式図の内容は(A)と同様。(C) Wild type (+/+), PRAT4A Hetero (+/-), PRAT4A KO (-/-)マウスの尻尾から抽出したゲノムDNAを(B)に示したPrimerペアを用いてPCR解析に供した結果。(D) PRAT4A KOおよびPRAT4A Heteroマウスの肝臓より得られたmRNAを用い、PRAT4A mRNAの相対量をReal Time PCRを用いて解析した。PRAT4A mRNA量は β -actin mRNA量を用いて標準化した。(E) Wild type, PRAT4A Hetero, PRAT4A KOマウスより得られた脾臓細胞をWestern Blot解析に供し、ウサギ抗マウスPRAT4Aポリクローナル抗体を用いてPRAT4Aタンパク質の検出を行った。コントロールとしてアクチンの発現量を示す。

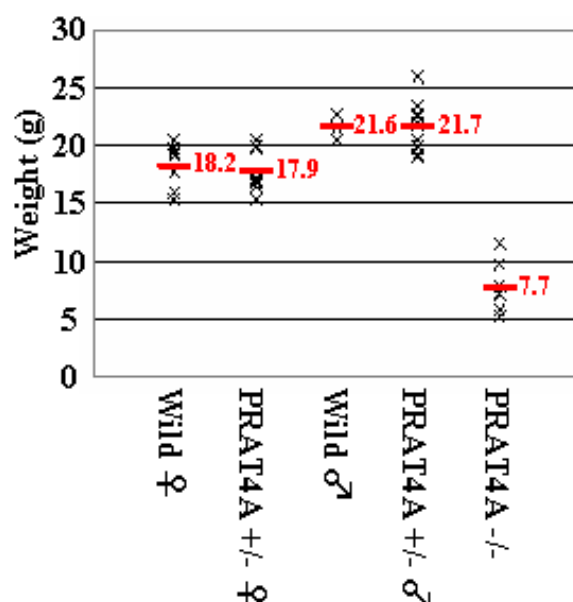
A

遺伝子型	+/+	+/-	-/-
出生数	45 (45)	94 (94)	17 (7)
出生率 (%)	28.8	60.3	10.9

B



C



D

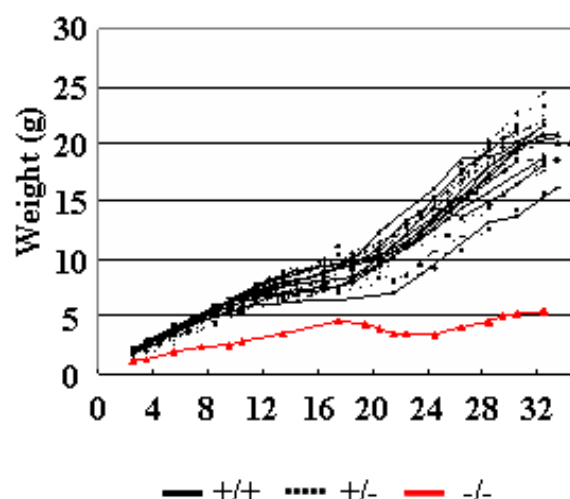


図7：PRAT4A遺伝子欠損(PRAT4A KO)マウスの免疫系組織以外で認められた表現型。

(A) 雌雄PRAT4A Heteroマウス同士の交配により得られた仔マウスの遺伝子型。Wild type (+/+), PRAT4A Hetero(+/-), PRAT4A KO(-/-)マウスの出生数と出生率を示す。出生数における()内は、離乳食を与えた条件下で4週齢まで生存した数。(B) 4.5週齢におけるB6/バックグラウンドのWild type (+/+), PRAT4A Hetero(+/-), PRAT4A KO(-/-)マウスの写真。写真下にそれぞれの体重を示す。(C) 4~5週齢におけるPRAT4A KOマウスとその同腹仔の体重。赤で示す横棒と数字が平均値を表す。解析したマウス数はWild type ♀ (n=8), PRAT4A Hetero ♀ (n=9), Wild type ♂ (n=3), PRAT4A Hetero ♂ (n=12), PRAT4A KO ♀と♂ (n=8)。(D) Wild type (+/+) ♂ (n=10), PRAT4A Hetero(+/-) ♂ (n=17), PRAT4A KO(-/-) ♂ (n=1)の生後2日齢から32日齢における成長曲線。

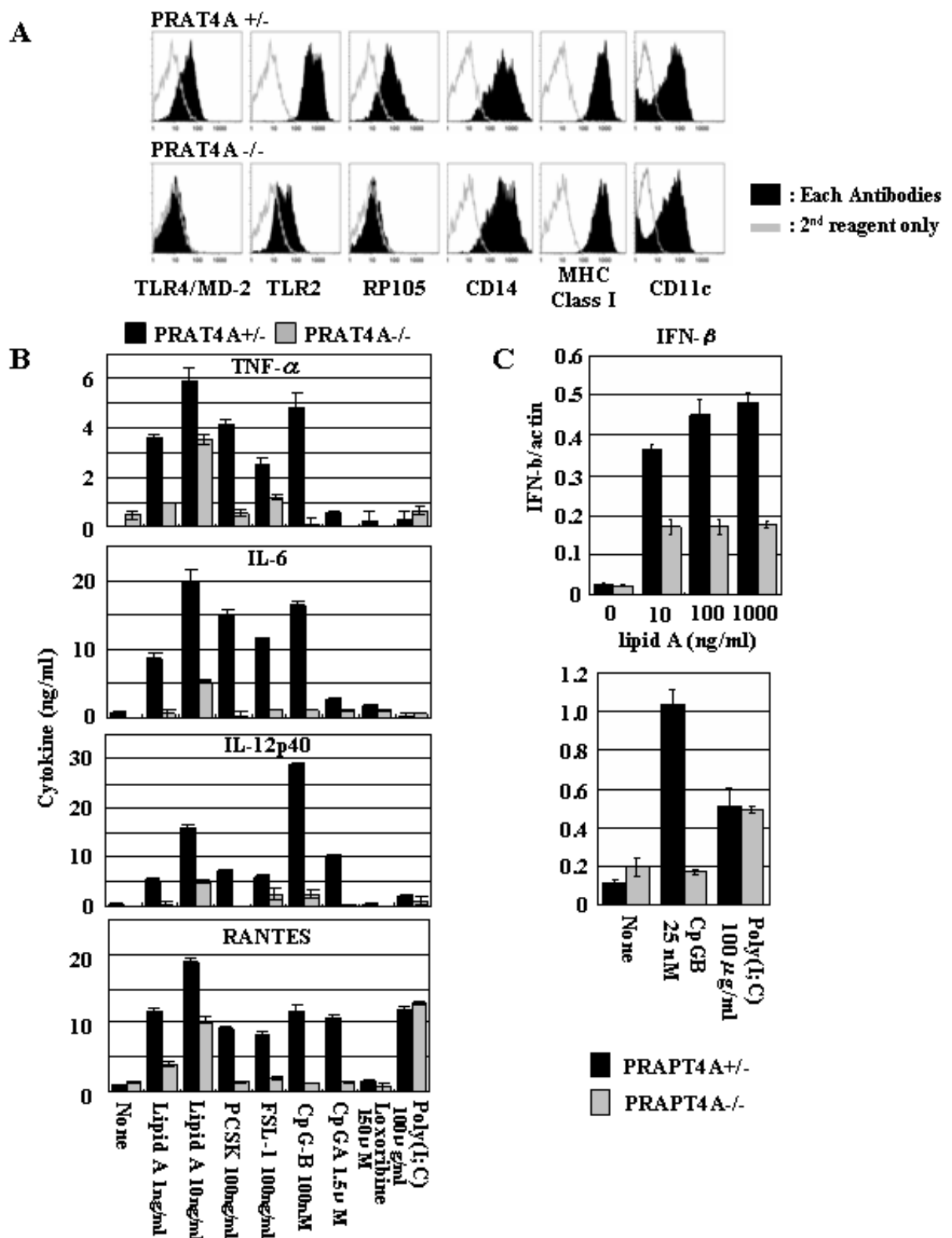


図8：骨髄由来樹状細胞(BM-DC)の様々なTLRリガンドに対する免疫応答にはPRAT4Aが必要である。

PRAT4A HeteroマウスおよびPRAT4A KOマウスの骨髄よりBMDCを誘導し、以下の解析を行った。(A) 図に示す細胞表面分子をそれぞれのビオチン化抗体とPE conjugated streptavidin (2nd Reagent) により標識し、FACSを用いて解析した。黒いヒストグラムがそれぞれの分子の細胞表面発現量を表す。2nd Reagentのみによる染色で得られたコントロールは灰色のヒストグラムで示す。(B) はELISA、(C) はReal Time PCRの結果。棒グラフは様々なTLRリガンド刺激に伴いBM-DCより産生されたサイトカイン量を表す。データはそれぞれ triplicateの平均値と標準誤差で示す。実験は3回以上行い、全てで同様の結果が得られた。

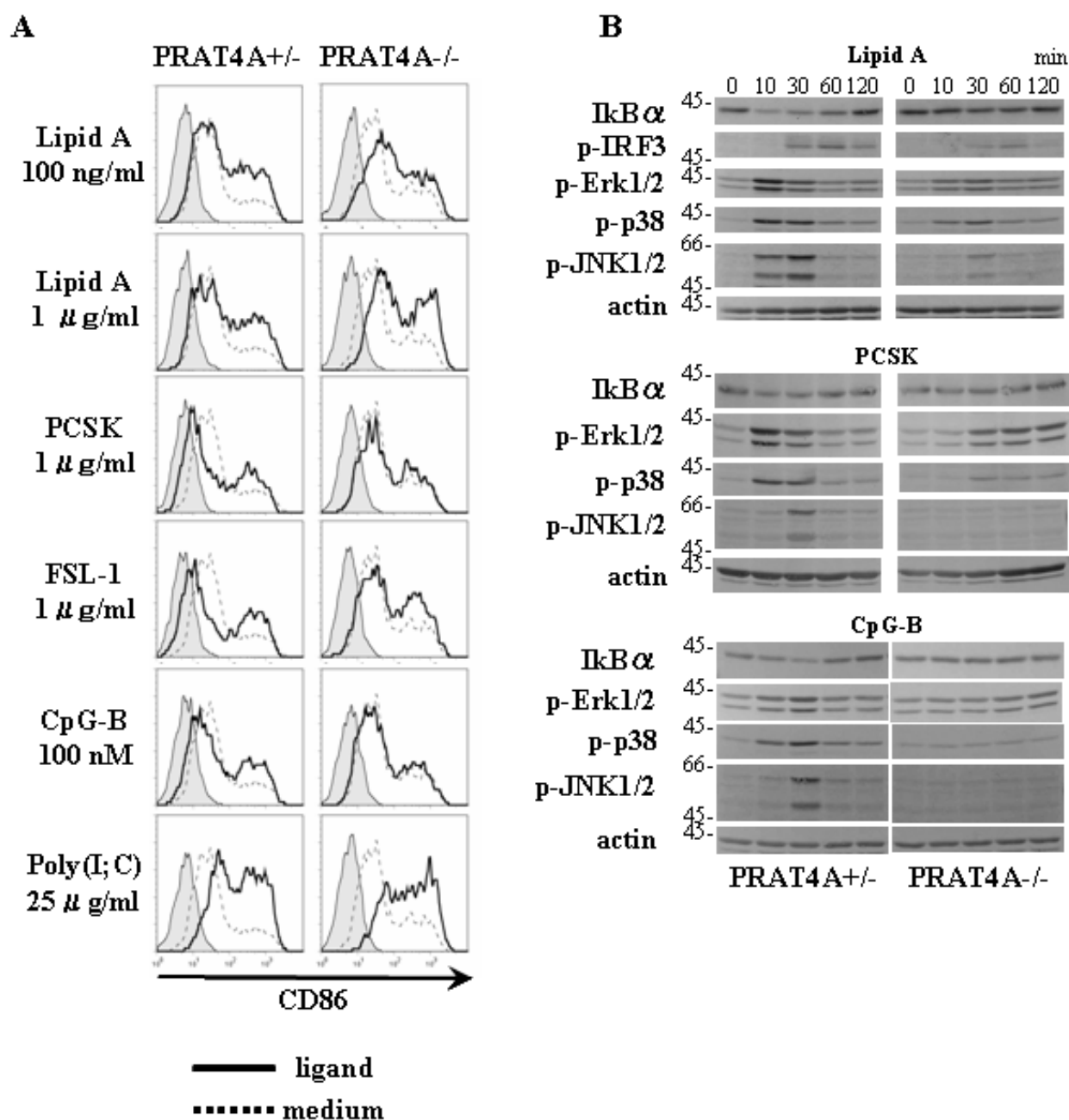


図9：BM-DCにおけるPRAT4A非依存的なTLRリガンドに対する免疫応答。

PRAT4A HeteroおよびPRAT4A KOキメラマウスの骨髄よりBM-DCを誘導し、以下の解析を行った。(A) BM-DCを様々なTLRリガンドで刺激し、24時間後における細胞表面CD86のup-regulationをFACSにより解析した。黒線ヒストグラムが刺激後、点線ヒストグラムが無刺激時のCD86の発現量を表す。また灰色ヒストグラムは2nd Reagentのみによる染色で得られたコントロールを表す。(B) BM-DCにおけるシグナル伝達の解析。Lipid A (1 μg/ml)、PCSK (1 μg/ml)、Cp G-B (1 μM)で刺激した後、図示した時間にBM-DCをLysis Bufferで溶解した。サンプルをSDS-PAGEに供した後、Western Blot分析によりそれぞれのタンパク質を特異的抗体により検出した。全ての実験は3回以上行い、全てで同様の結果が得られた。

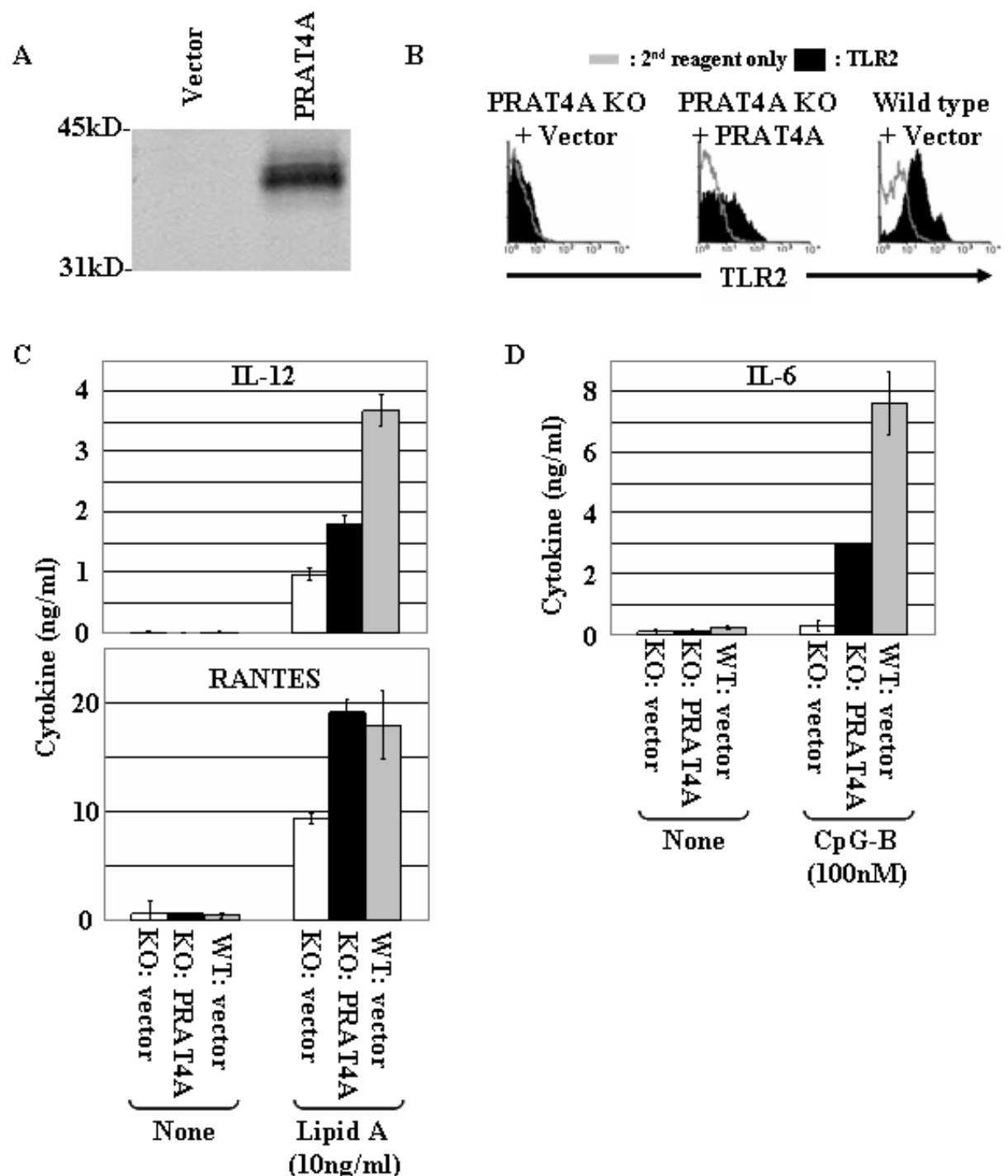


図10 : PRAT4A KO BM-DCではPRAT4Aの強制発現によりTLRリガンドに対する応答性が回復する。

PRAT4A KO BM-DCにC末端にflagエピトープを付加したマウスPRAT4A遺伝子を導入し、同細胞のTLRリガンドに対する応答性の変化を解析した。コントロールとして、PRAT4A KOおよびWild Type BM-DCにネオマイシン耐性遺伝子を有するレトロウイルスベクターのみを導入した細胞の応答性を示す。(A) PRAT4A遺伝子を導入したPRAT4A KO BM-DCにおけるPRAT4Aタンパク質発現の確認。anti-flagモノクローナル抗体を用い、培養上清中に分泌されたPRAT4Aタンパク質の免疫沈降とWestern Blot解析を行った。(B) PRAT4Aを強制発現させたPRAT4A KO BM-DCにおける細胞表面TLR2の発現量をFACSにより解析した。黒いヒストグラムがTLR2の発現量、灰色ヒストグラムが2nd Reagentのみによる染色で得られたコントロールを表す。(C)(D) 樹状細胞を図示したTLRリガンドで刺激し、刺激後24時間の培養上清中のサイトカイン濃度をELISA法により定量した。データはそれぞれtriplicateの平均値と標準誤差で示す。

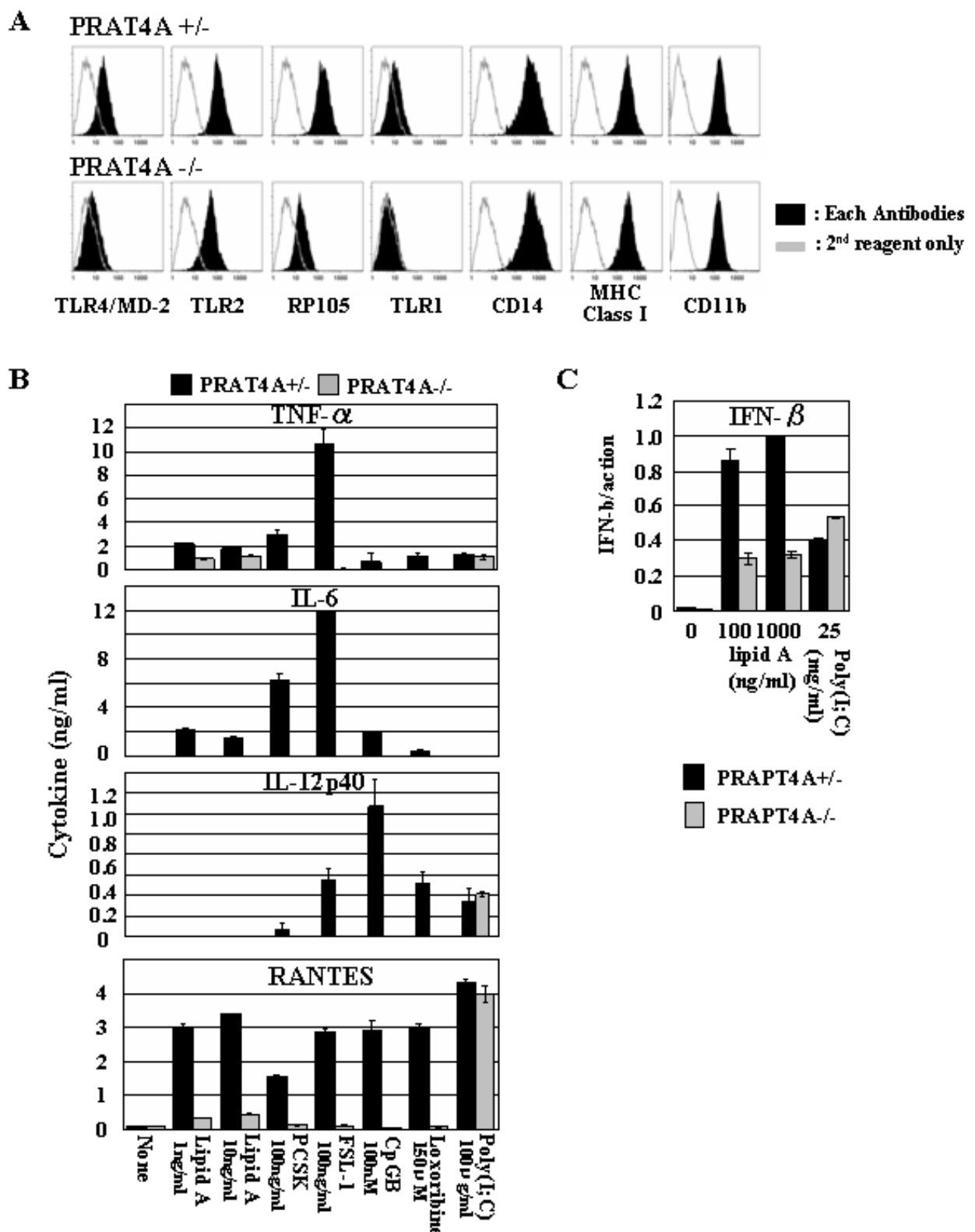


図11 : B6 Background BM-M ϕ の様々なTLRリガンドに対する免疫応答にはPRAT4Aが必要である。

B6 BackgroundのPRAT4A HeteroマウスおよびPRAT4A KOマウスの骨髄よりBM-M ϕ を誘導し、以下の解析を行った。(A) 図に示す細胞表面分子をそれぞれのビオチン化抗体とPE conjugated streptavidin (2nd Reagent) により標識し、FACSを用いて解析した。黒いヒストグラムがそれぞれの分子の細胞表面発現量を表す。2nd Reagentのみによる染色で得られたコントロールは灰色ヒストグラムで表す。(B) はELISA、(C) はReal Time PCRの結果。棒グラフは様々なTLRリガンド刺激に伴いBM-M ϕ より産生されたサイトカイン量を示す。データはそれぞれtriplicateの平均値と標準誤差で示す。実験は3回以上行い、全てで同様の結果が得られた。

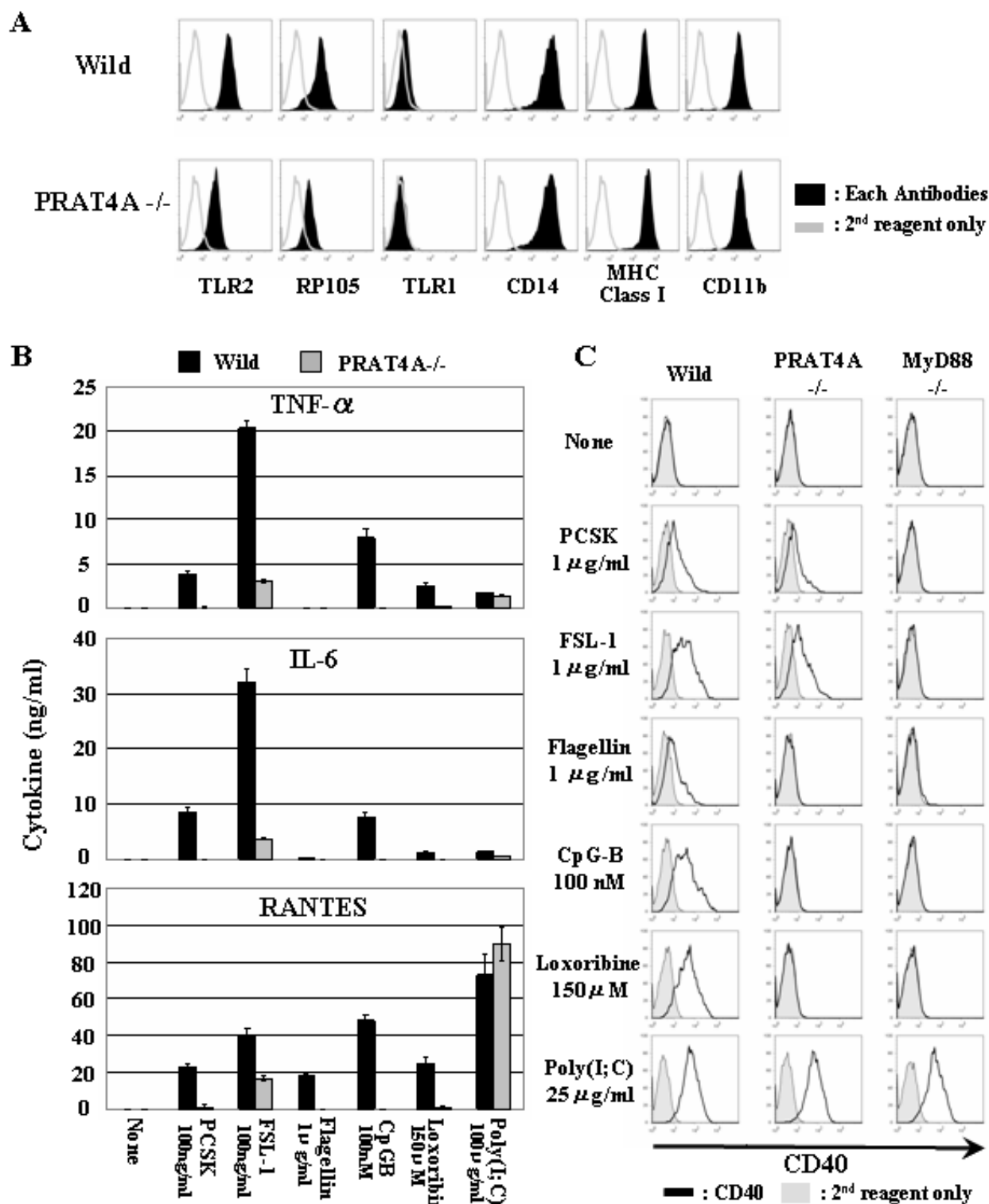


図12 : Balb/c Background BM-Mφの様々なTLRリガンドに対する免疫応答にはPRAT4Aが必要である。

Balb/c BackgroundのWild typeマウスおよびPRAT4A KOマウスの骨髄よりBMMφを誘導し、以下の解析を行った。(A)図に示す細胞表面分子をそれぞれのビオチン化抗体とPE conjugated streptavidin(2nd Reagent)により標識し、FACSを用いて解析した。黒いヒストグラムがそれぞれの分子の細胞表面発現量を表す。2nd Reagentのみによる染色で得られたコントロールは灰色ヒストグラムで示す。(B)はELISAの結果。棒グラフは様々なTLRリガンド刺激に伴いBM-Mφより産生されたサイトカイン量を示す。データはそれぞれtriplicateの平均値と標準誤差で示す。実験は2回行い、全てで同様の結果が得られた。(C) 様々なTLRリガンド刺激を加え、24時間後における細胞表面CD40のup-regulationをFACSにより解析した。黒線ヒストグラムがCD40の発現量を示す。灰色ヒストグラムは2nd Reagentのみによる染色で得られたバックグラウンドを示す。

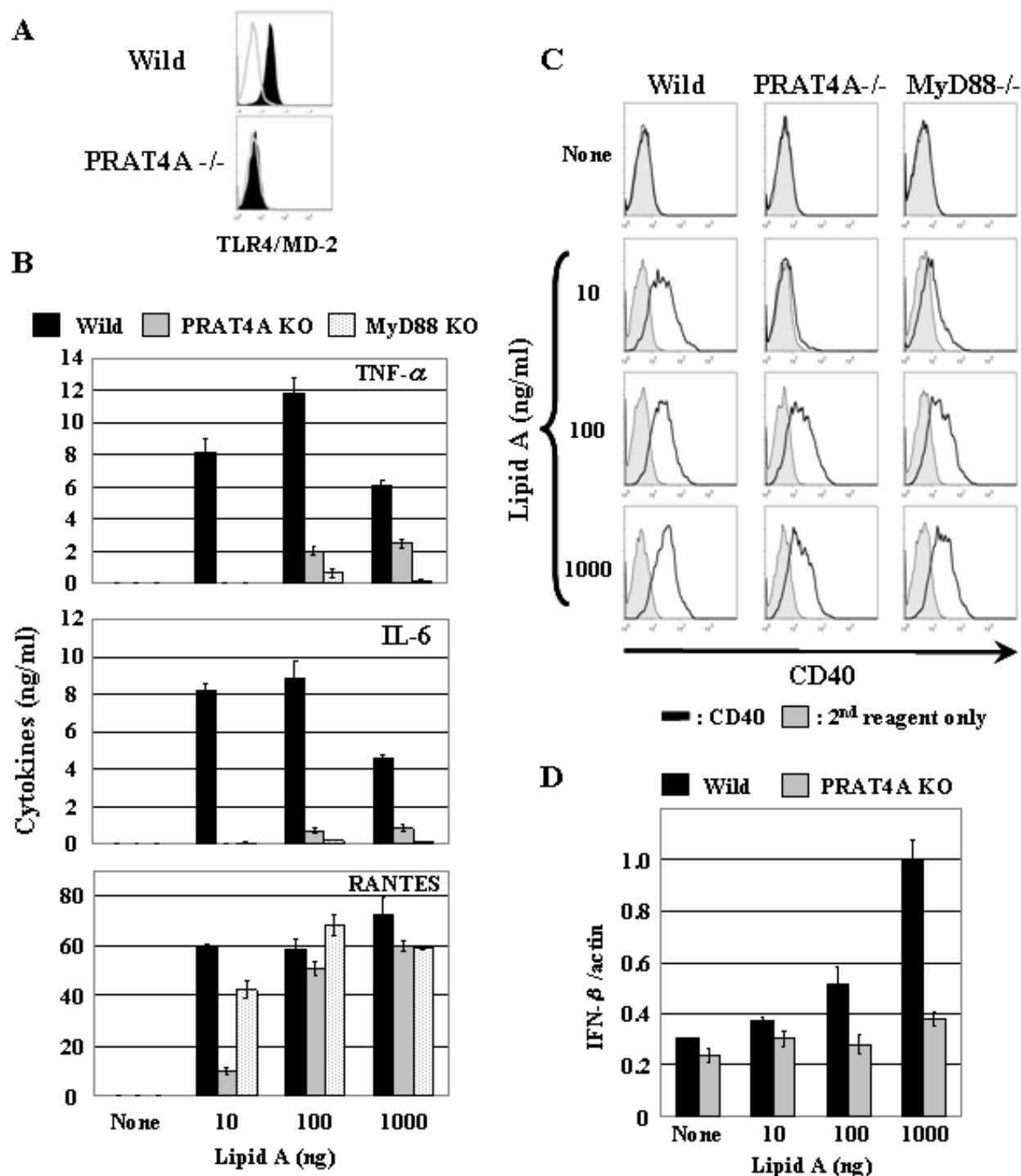


図13 : Balb/c Background BM-MφにおけるPRAT4A非依存的なTLR4リガンドに対する免疫応答の存在。

Balb/c BackgroundのWild typeおよびPRAT4A KOマウスの骨髄よりBM-Mφを誘導し、以下の解析を行った。(A)細胞表面TLR4/MD-2をビオチン化抗TLR4/MD-2抗体とPE conjugated streptavidin(2nd Reagent)を用いて標識し、FACSにより解析した。黒いヒストグラムがTLR4/MD-2の細胞表面発現量を表す。2nd Reagentのみによる染色で得られたコントロールは灰色ヒストグラムで示す。(B)はELISA、(D)はReal Time PCRの結果。棒グラフは図示した濃度のLipid Aで刺激した際に産生されたサイトカイン量を表す。データはそれぞれtriplicateの平均値と標準誤差で示す。(C)様々なTLRリガンドで刺激し、24時間後における細胞表面CD40のup-regulationをFACSにより解析した。黒線ヒストグラムが刺激後における細胞表面CD40の発現量を示す。また灰色ヒストグラムは2nd Reagentのみによる染色で得られたコントロールを示す。全ての実験は2回以上行い、全てで同様の結果が得られた。

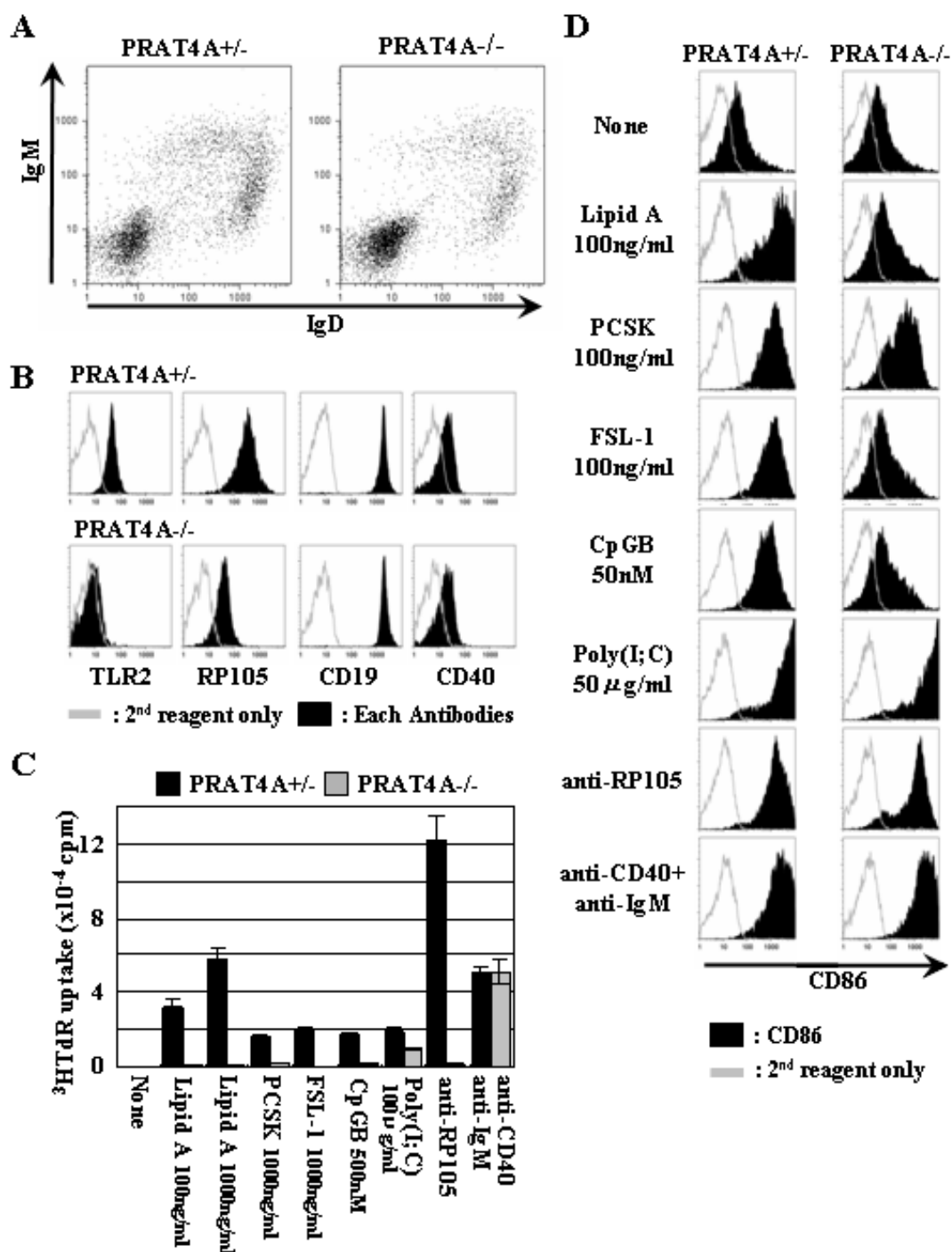


図14 : B細胞の様々なTLRリガンドに対する免疫応答にはPRAT4Aが必要である。

PRAT4A HeteroマウスおよびPRAT4A KOマウスの脾臓を採材し、以下の解析を行った。(A) 脾臓細胞の細胞表面に発現するIgMおよびIgDをDot Plotにより示した。(B) B220陽性脾臓B細胞の細胞表面分子をビオチン化抗体とPE conjugated streptoavidin (2nd Reagent) により標識し、FACSを用いて解析した。黒いヒストグラムがそれぞれの分子の細胞表面発現量を表す。2nd Reagentのみによる染色で得られたコントロールは灰色のヒストグラムで示す。(C) CD43陰性のB細胞分画を様々なTLRリガンドで刺激し、³HThymidineの取り込み量を測定することでB細胞の増殖を解析した。データはそれぞれtriplicateの平均値と標準誤差で示す。(D) 様々なTLRリガンド刺激に伴うB220陽性脾臓B細胞におけるCD86のup-regulationをFACSにより解析した。実験は3回以上行い、全てで同様の結果が得られた。

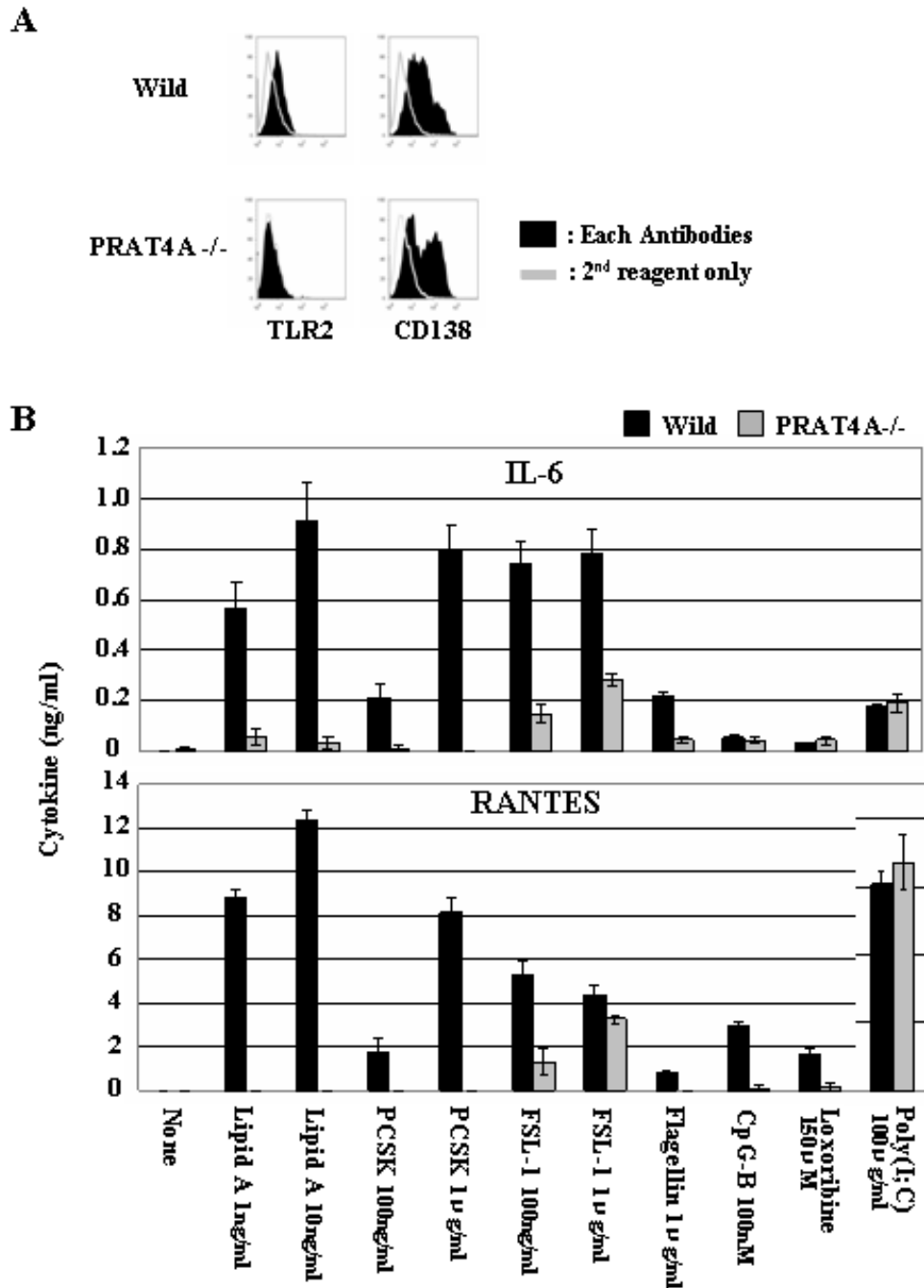


図15 : Mouse Embryonic Fibroblast (MEF) の様々なTLRリガンドに対する免疫応答にはPRAT4Aが必要である。

B6 BackgroundのPRAT4A Heteroマウス同士を交配して得られた胎齢12.5日のWild typeおよびPRAT4A KOマウスよりMEF細胞を作製し、以下の解析を行った。(A) 図に示す細胞表面分子をそれぞれのビオチン化抗体とPE conjugated streptoavidin (2nd Reagent) により標識し、FACSを用いて解析した。黒いヒストグラムがそれぞれの分子の細胞表面発現量を表す。2nd Reagentのみによる染色で得られたコントロールは灰色のヒストグラムで示す。(B) はELISAの結果。棒グラフは様々なTLRリガンド刺激に伴いMEFより産生されたサイトカイン量を示す。データはそれぞれtriplicateの平均値と標準誤差で示す。実験は2回以上行い、全てで同様の結果が得られた。

Cells TLRs	BM-DCs		BM-M ϕ s		B cells		MEFs	
	Cell Surface Expression	Immune Responses	Cell Surface Expression	Immune Responses	Cell Surface Expression	Immune Responses	Cell Surface Expression	Immune Responses
TLR1	(N.D.)	× (Cytokines)	×	× (Cytokines)	(N.D.)	× (Prolife- ration)	(N.D.)	×
TLR2	↓↓	↓ (Delayed Signal)	↓	↓ (CD40)	↓↓	↓ (CD86)	×	↓
TLR6	-	× (Cytokines) ↓↓ (TNF- α)	-	× or ↓ (Cytokines) ↓ (CD40)	-	×	-	↓ (RANTES) ↓↓ (IL-6)
TLR4	×	↓ (Cytokines) N.C. (CD86)	↓↓	↓↓ (Cytokines) N.C. (CD40, RANTES)	(N.D.)	×	(N.D.)	×
TLR5	-	(N.D.)	-	×	-	(N.D.)	-	×
	Immune Responses		Immune Responses		Immune Responses		Immune Responses	
TLR7	×		×		×		×	
TLR9	×		×		×		×	
TLR3	N.C.		N.C.		N.C. ↓ (Proliferation)		N.C.	

× : Lost ↓ : Slightly Decreased ↓↓ : Strongly Decreased N.C. : Not Changed
(N.D.) : Not Detected - : Not Tested

表3 : PRAT4A KO細胞において認められたTLRリガンドに対する免疫応答のまとめ。

PRAT4Aを欠損するBM-DC, BM-M ϕ , B cell, およびMEFにおいて認められたTLRリガンドに対する免疫応答の変化をまとめた。結果はコントロール細胞と対比した際の変化として示す。

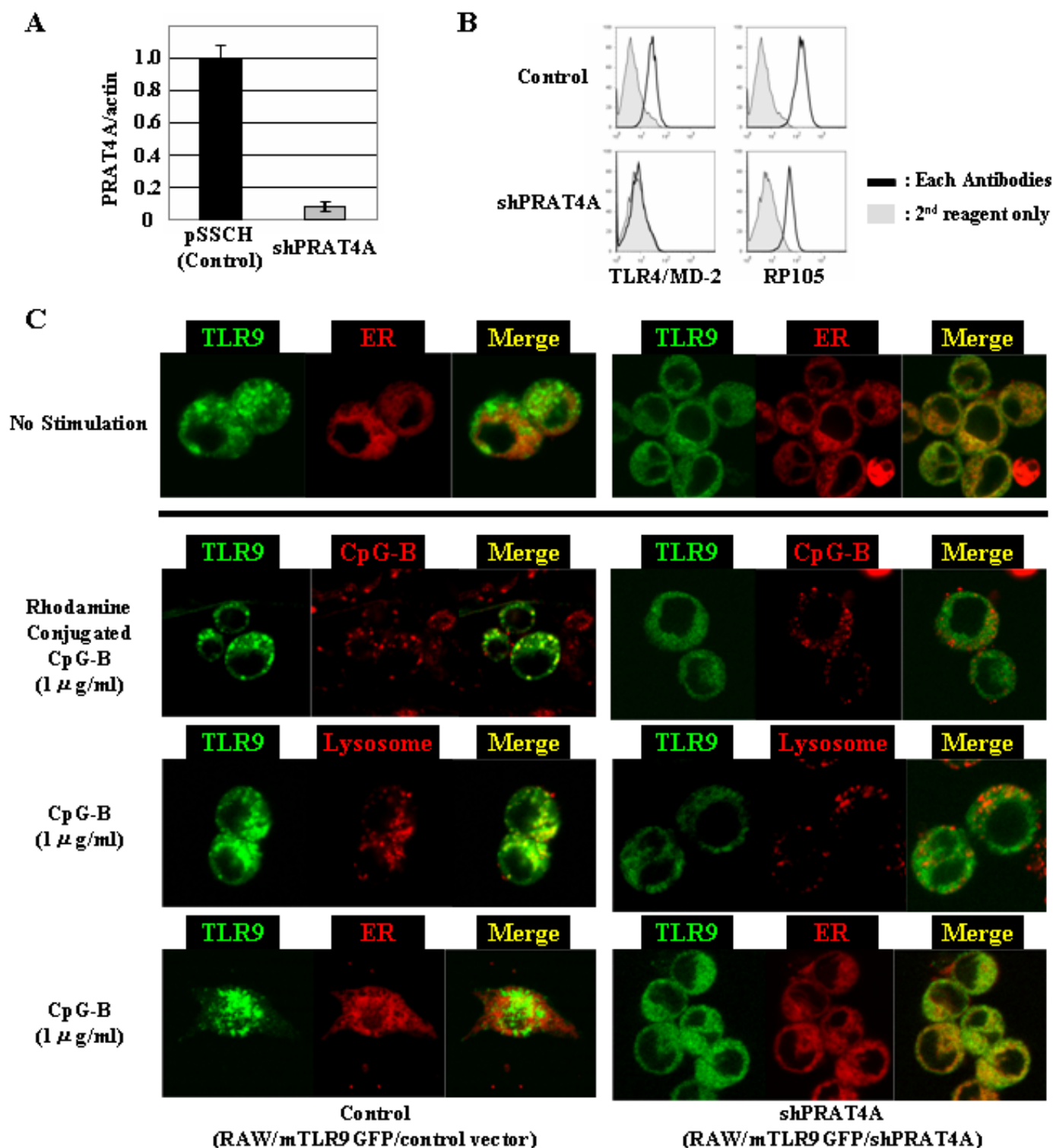
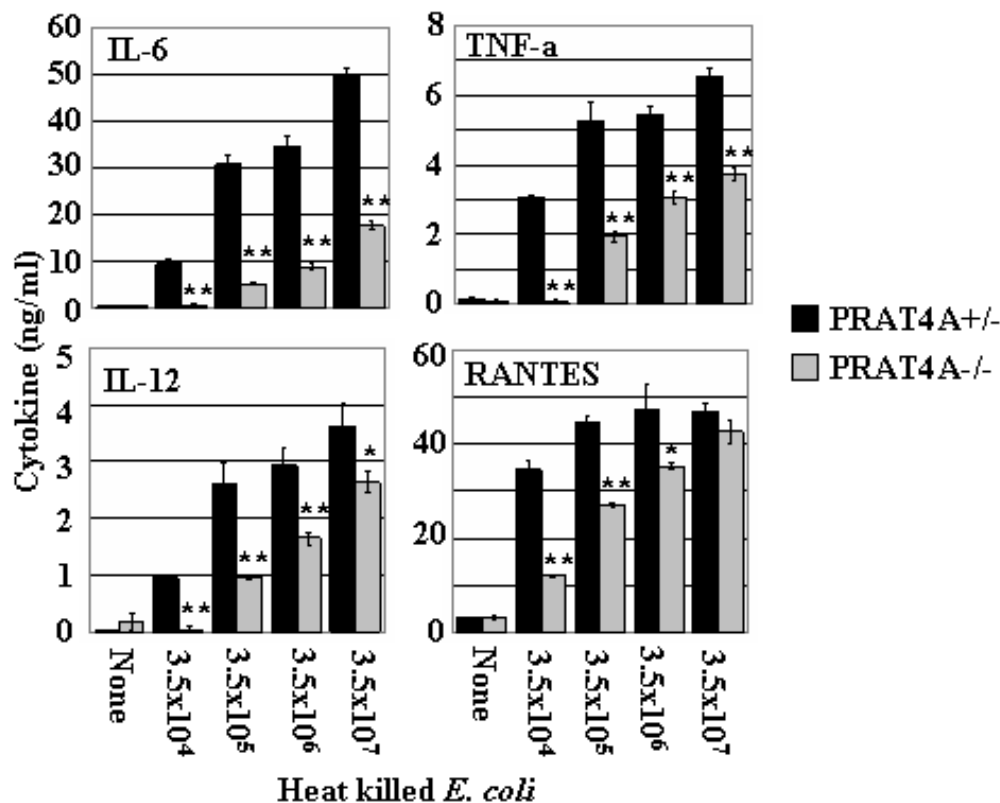


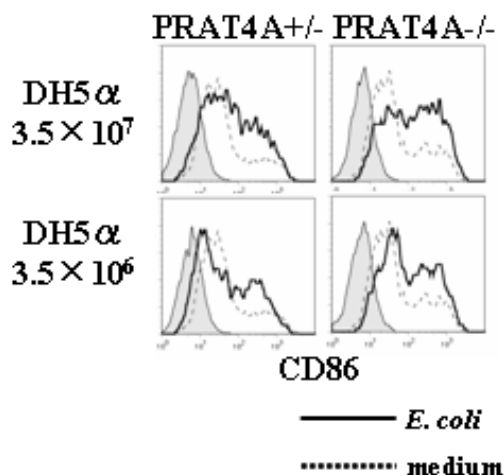
図16 : RAW細胞におけるTLR9のERからLysosomeへの細胞内移行にはPRAT4Aが必要である。

マウスTLR9-GFPを発現するマクロファージ系列のRAW細胞にpSSCHベクター(control)およびPRAT4Aノックダウンベクター(shPRAT4A)を発現させ、以下の解析を行った。(A) PRAT4Aの発現量をReal Time PCRを用いて解析した結果。データはそれぞれtriplicateの平均値と標準誤差で示す。(B) controlおよびshPRAT4A RAW細胞の細胞表面におけるTLR4/MD-2およびRP105の発現量をFACSにより解析した。黒線ヒストグラムがそれぞれの発現量を、灰色ヒストグラムが2nd Reagentのみによる染色で得られたバックグラウンドを示す。(C) controlおよびshPRAT4A RAW細胞の無刺激時、およびCpG-B (1 μ g/ml) 刺激後1.5時間におけるTLR9-GFPの細胞内分布を共焦点レーザー顕微鏡により解析した。TLR9-GFPの細胞内分布をER tracker, LysoTracker, およびRhodamine標識CpG-Bの細胞内分布と共に示す。

A



B



C

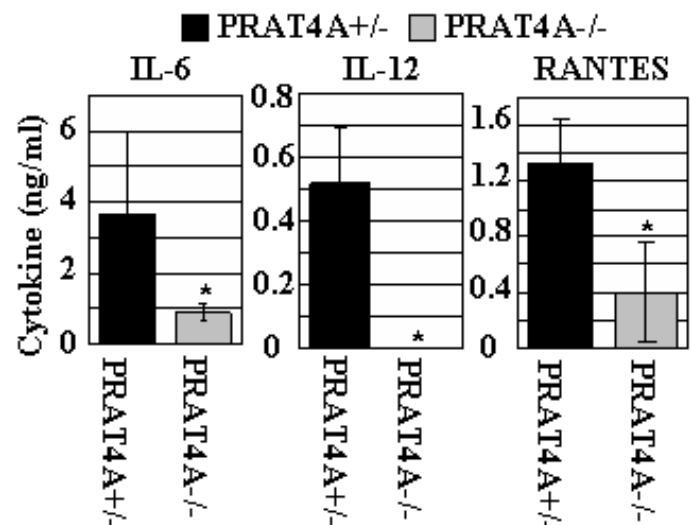


図17 : BM-DCの Heat-killed *Escherichia coli*に対するサイトカイン産生にはPRAT4Aが必要である。

PRAT4A Hetero、およびPRAT4A KO骨髄キメラマウスを用い、以下の解析を行った。
 (A) 骨髄キメラマウスの骨髄より誘導したBM-DCを図示した量のheat-killed *E. coli*で刺激し、刺激後24時間における培養上清中のTNF-α、IL-6、IL-12、およびRANTESの量をELISAにより測定した。
 (B) BM-DCを図示した量の*E. coli*で刺激し、24時間後の細胞表面におけるCD86のup-regulationをFACSにより解析した。黒線ヒストグラムが刺激後、点線ヒストグラムが無刺激時のCD86の発現量を示す。灰色のヒストグラムは2nd Reagentのみによる染色で得られたコントロールを示す。
 (C) 骨髄キメラマウスにheat-killed *E. coli* 3x10⁸個/mouseを腹腔内投与し、3時間後に下大静脈より血液を採材した。同血清サンプル中のIL-6、IL-12、およびRANTESの量をELISAにより測定した。*:P<0.05, **:P<0.01

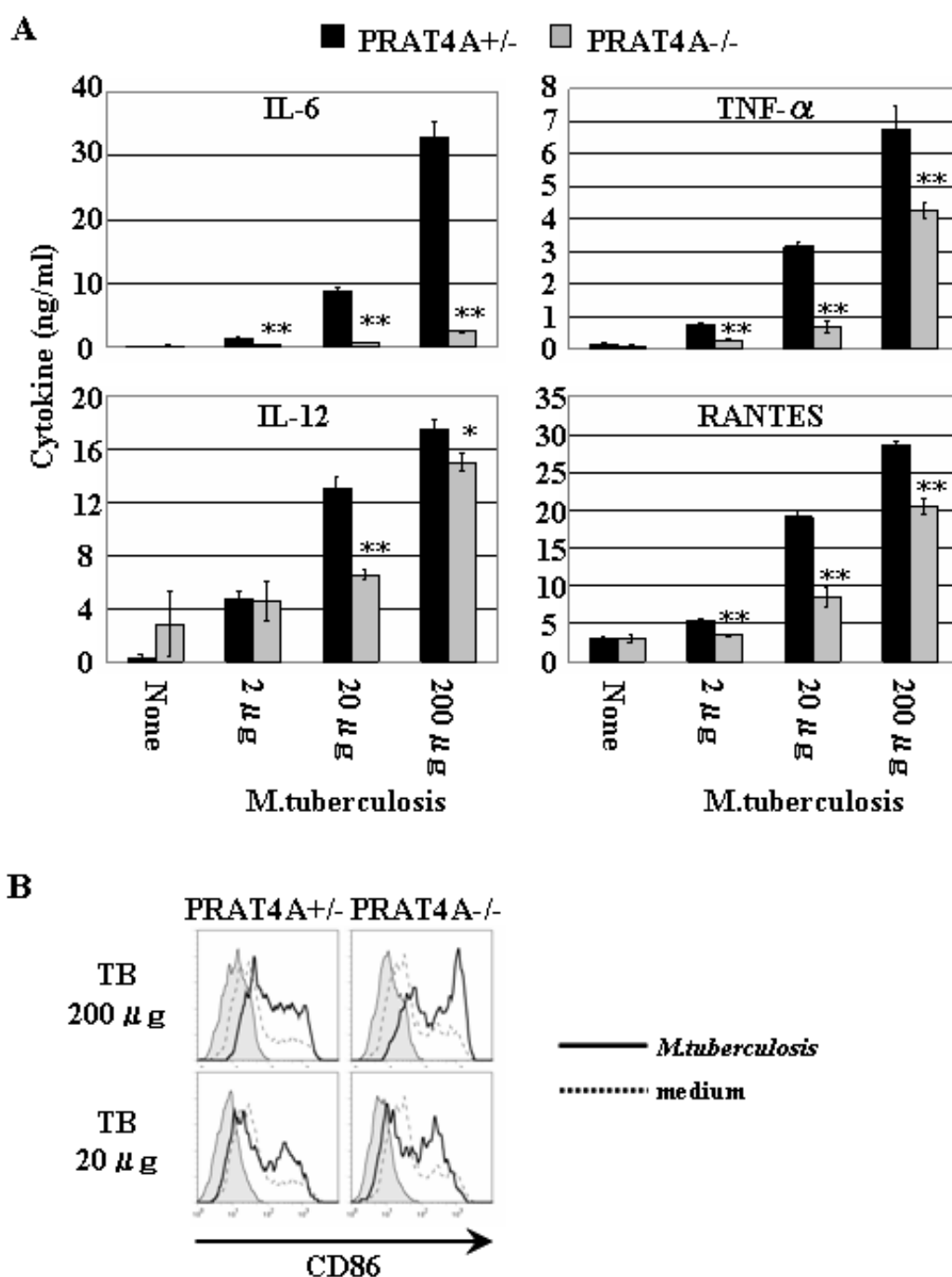


図18 : BM-DCのHeat-killed *Mycobacterium tuberculosis*に対するサイトカイン産生にはPRAT4Aが必要である。

PRAT4A Hetero、およびPRAT4A KO骨髄キメラマウスの骨髄より誘導したBM-DCをheat-killed *M.tuberculosis*で刺激し、以下の解析を行った。(A) BM-DCを図示した量の*M.tuberculosis*で刺激し、刺激後24時間における培養上清中のTNF- α 、IL-6、IL-12、およびRANTESの量をELISAにより測定した。(B) BM-DCを図示した量の*M.tuberculosis*で刺激し、24時間後の細胞表面におけるCD86のup-regulationをFACSにより解析した。黒線ヒストグラムが刺激後、点線ヒストグラムが無刺激時のCD86の発現量を示す。灰色のヒストグラムは2nd Reagentのみによる染色で得られたコントロールを示す。*P<0.05, **P<0.01

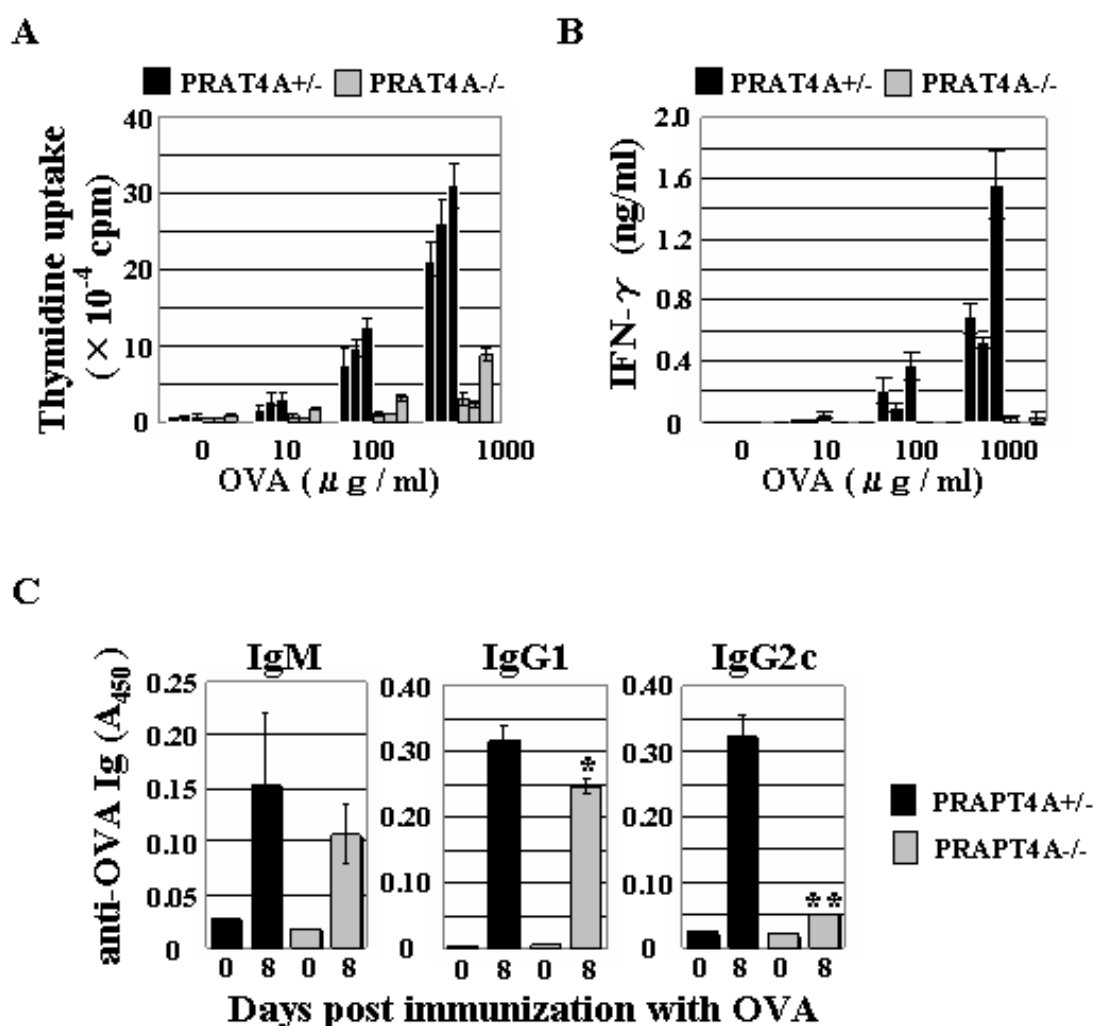


図19 : PRAT4AKO骨髄キメラマウスではTh1偏向の獲得免疫応答が顕著に抑制される。

PRAT4A HeteroマウスおよびPRAT4A KOマウスより作製した骨髄キメラマウスの後肢フットパッドにOVA + CFAを免疫し、8日後に所属リンパ節(膝下リンパ節、単径リンパ節)および血清を回収して解析を行った。(A)リンパ節細胞をOVAで刺激し、 $[^3\text{H}]$ Thymidineの取り込みを測定することでOVA特異的リンパ節細胞の増殖を解析した。(B)リンパ節細胞をOVAで刺激し、培養上清中に分泌されたIFN- γ の量をELISAにより解析した。(C)OVA免疫前後のキメラマウスより血清を採材し、血清中におけるOVA特異的なIgM、IgG2c、IgG1の量をELISAにより解析した。コントロールにはOVA非免疫のキメラマウスより採材した血清を用いた。(A)、(B)のデータはそれぞれtriplicateの平均値と標準誤差で、(C)のデータはそれぞれ3匹のマウスより得られた血清の平均値と標準誤差で示す。全ての実験は3回行い、同様の結果が得られた。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

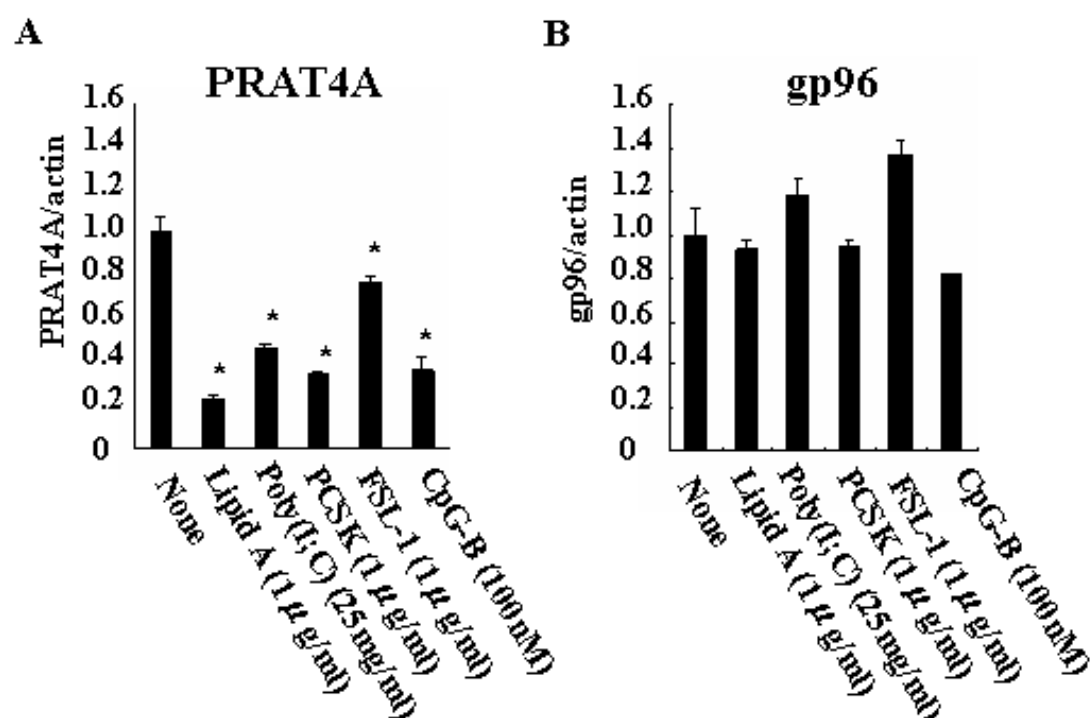


図20：様々なTLRリガンド刺激によりPRAT4AのmRNA量は顕著に減少する。

C57BL/6マウスの骨髄より誘導したBM-DCを複数のTLRリガンドで刺激し、刺激後5時間のmRNA量をReal Time PCRにより解析した。(A) PRAT4Aの相対的なmRNA発現量。(B) gp96の相対的なmRNA発現量。全てのmRNA発現量は β -ActinのmRNA量を用いて標準化し、データはそれぞれtriplicateの平均値と標準誤差で示した。

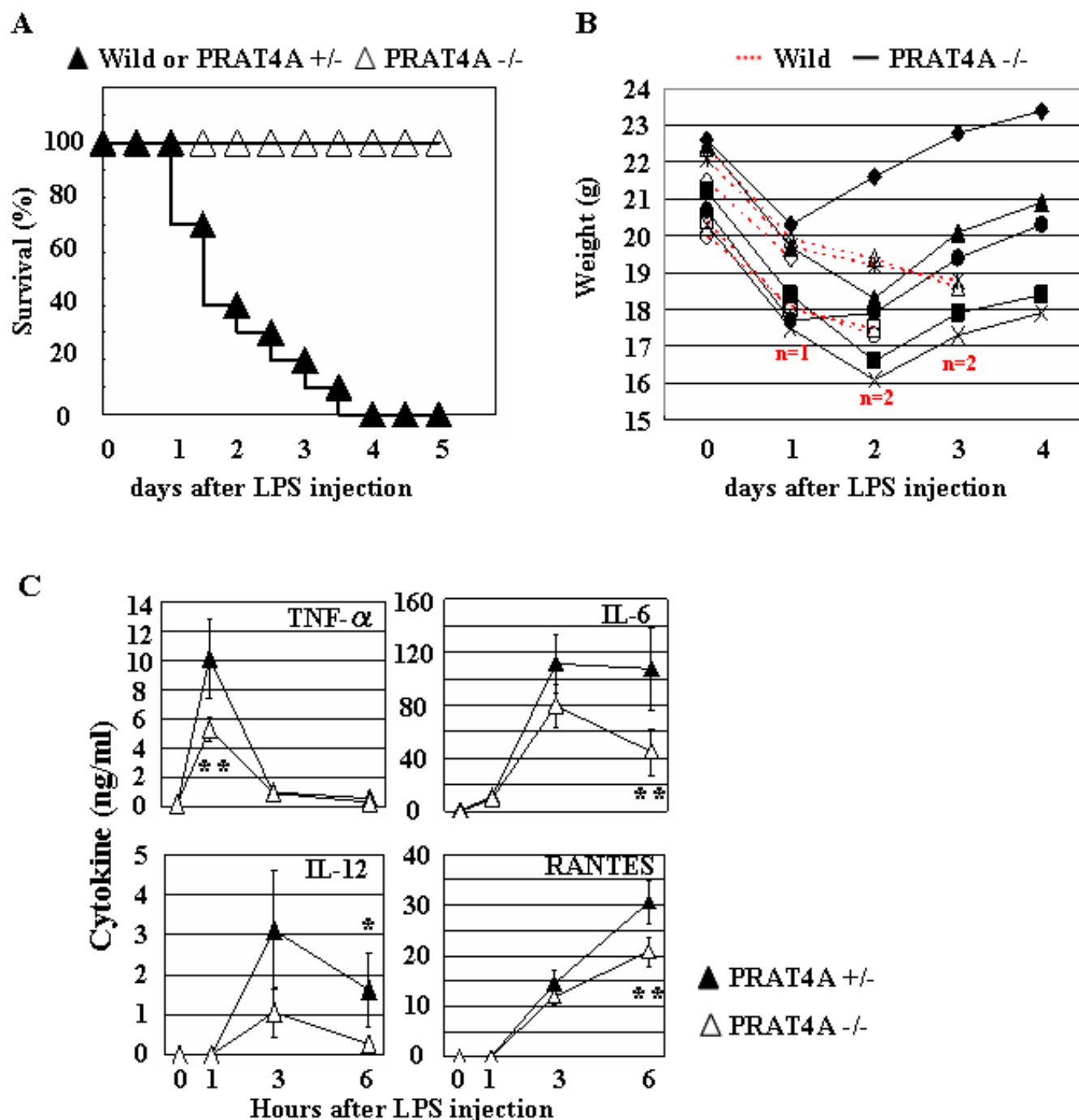


図21: PRAT4AKO骨髄キメラマウスはLPSにより誘導されるエンドトキシンショックに抵抗性である。

Wild type、PRAT4A Hetero、およびPRAT4A KOマウスより作製した骨髄キメラマウスに大量のLPSを投与し、Endotoxin ShockにおけるPRAT4Aの役割を解析した。(A) Wild (n=5)、PRAT4A Hetero (n=5)、PRAT4A KO骨髄キメラマウスに400~500 μ gのLPSを腹腔内投与し、投与後の死亡率を生存曲線として示した。(B) (A)で使用したWild type (n=5)、PRAT4A KO (n=5)骨髄キメラマウスのLPS投与に伴う体重変化。図中の(n=)で示された数は死亡したWild type骨髄キメラマウスの数を示す。(C) PRAT4A Hetero (n=6)およびPRAT4A KO (n=6)に致死量のLPS (500 μ g/mouse)を投与し、0(無処置)、1、3、6時間後に下大静脈より血液サンプルを回収した。同血清サンプル中のTNF- α 、IL-6、IL-12、およびRANTESの量をELISAにより測定した。

*P<0.05, **P<0.01

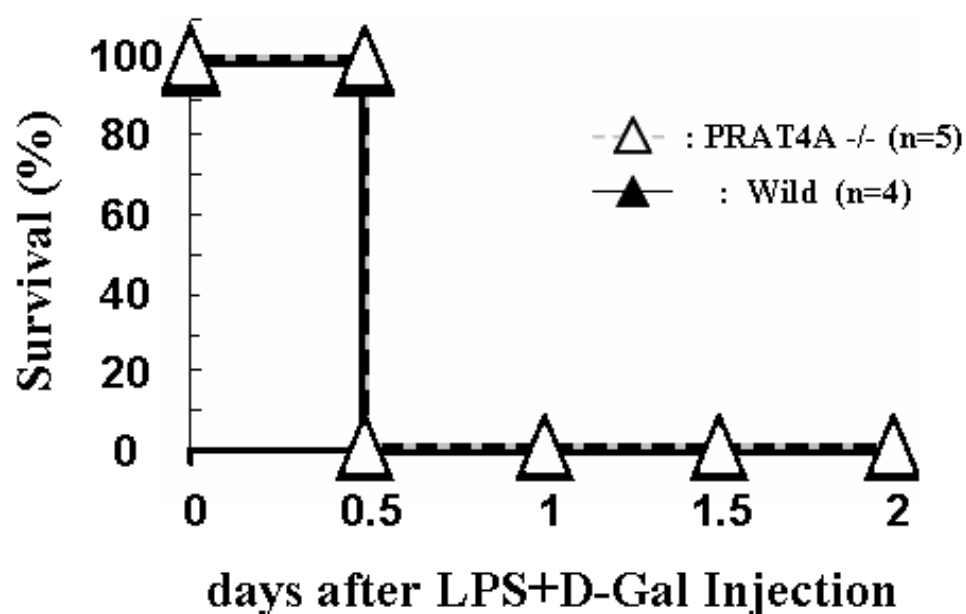


図22 : PRAT4AKO骨髄キメラマウスはD-Galactosamine+LPSにより誘導されるエンドキシンショックには感受性である。

Wild typeおよびPRAT4A KOマウスより作製した骨髄キメラマウスにD-Galactosamine (25mg/mouse) + LPS (0.5 μ g/mouse)を腹腔内投与し、投与後の死亡率を生存曲線として示した。

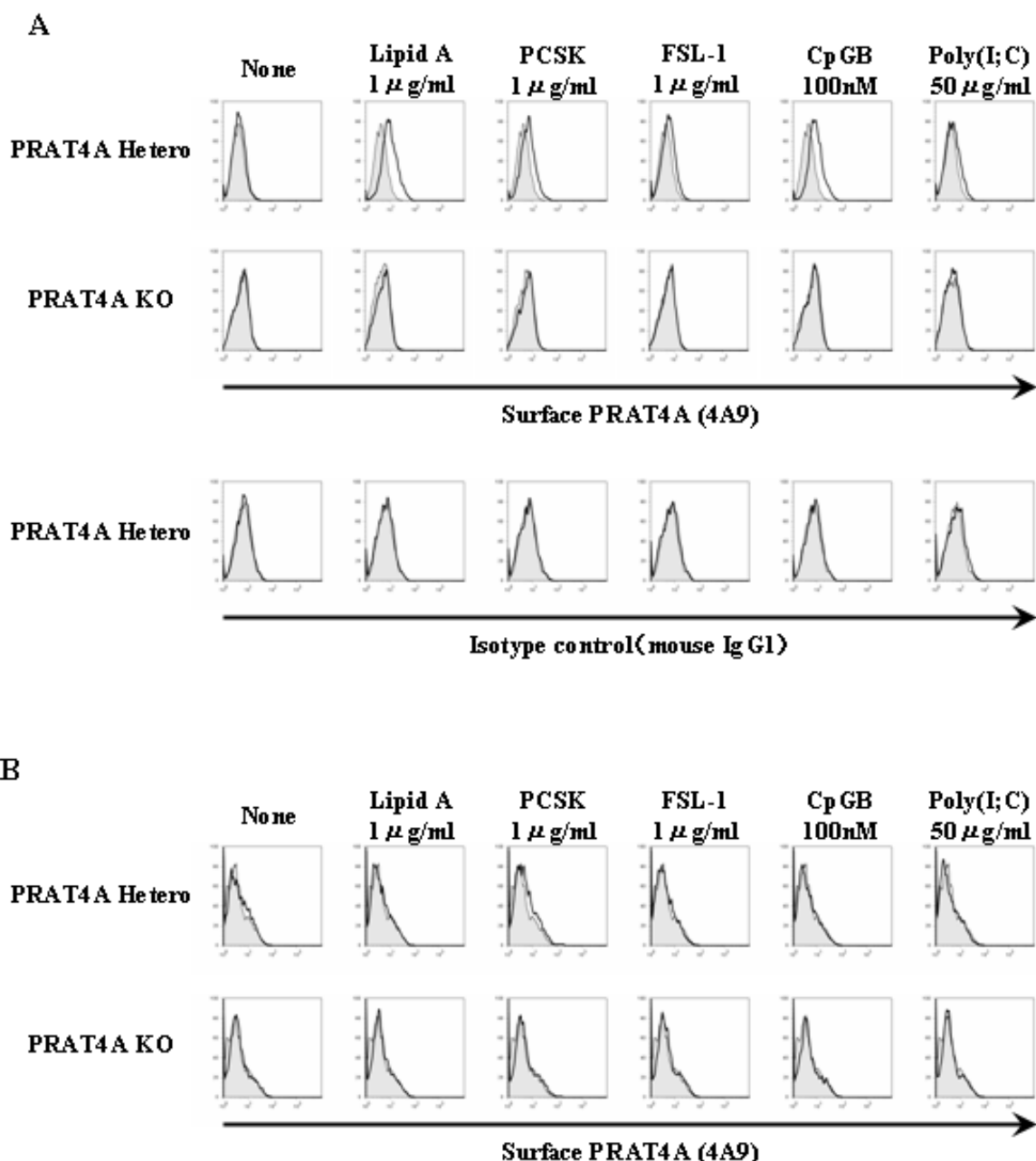


図23 : BM-M ϕ では様々なTLRリガンド刺激によりPRAT4Aが細胞表面に発現する。

Balb/c BackgroundのPRAT4A HeteroマウスとPRAT4A KO マウスの骨髄より誘導したBM-M ϕ およびBM-DCを複数のTLRリガンドで刺激し、刺激後24時間における細胞表面PRAT4Aの発現量をビオチン化抗マウスPRAT4Aモノクローナル抗体(4A9)を用いて検出した。(A) PRAT4A Hetero およびPRAT4A KO BM-M ϕ における細胞表面PRAT4Aの発現量をFACSで解析した結果。最下段は4A9のアイソタイプコントロール(マウスIgG1)によるBM-M ϕ 細胞表面の染色結果。(B) PRAT4A Hetero およびPRAT4A KO BM-DCにおける細胞表面PRAT4Aの発現量をFACSで解析した結果。黒線ヒストグラムが一次抗体による染色を示す。灰色ヒストグラムは2nd Reagentのみによる染色で得られたバックグラウンドを示す。

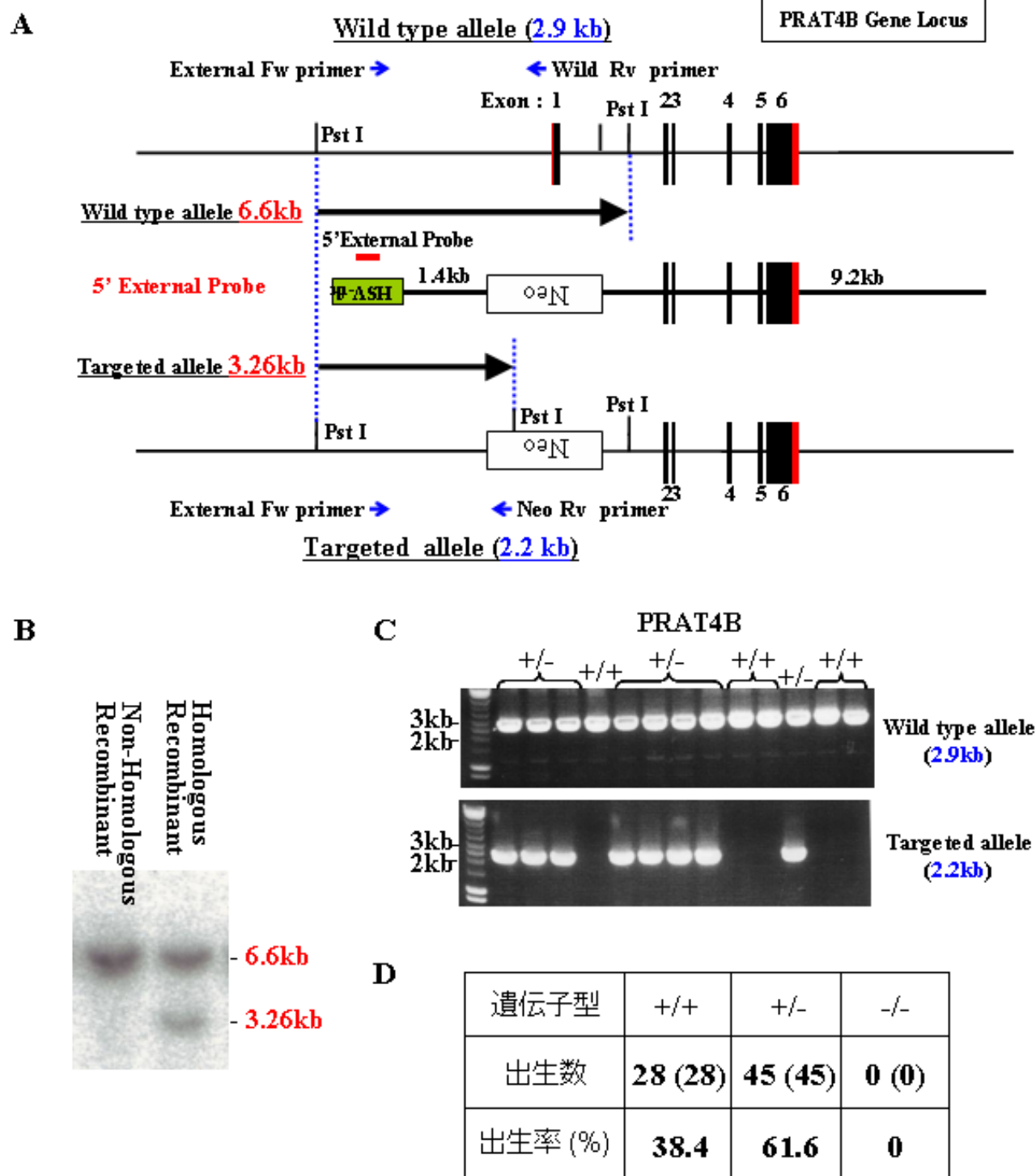


図24 : PRAT4B遺伝子欠損(PRAT4B KO)マウスの作製。

マウスPRAT4B遺伝子欠損法を示す。(A) 5'側External Probeを用いたSouthern Blot解析およびPCR法によるTargeted Alleleの検出法を示す。模式図はマウスPRAT4B遺伝子の構造、PRAT4B Targeting Vector、変異後のPRAT4B遺伝子の構造、そして制限酵素サイトの分布を表す。黒塗りのExon領域はCoding Exon。(B) Homologous Recombinationを起こしたES細胞のTargeted Alleleの確認。5'側External Probeを用いてSouthern Blot解析を行った結果。(C) PRAT4B Heteroマウス間の交配で得られたマウスをPCR法によりTypingした結果の一例。(D)雌雄PRAT4B Heteroマウス同士の交配により得られた仔マウスの遺伝子型。Wild(+/+), PRAT4B Hetero(+/-), PRAT4B KO(-/-)マウスの出生数と出生率を示す。出生数における0内は4週齢において生存していた数。

考察

PRAT4A KO マウスの解析をした結果、PRAT4A が免疫細胞における複数の TLR の細胞内移行に必須の役割を担っていることが判明し、その結果として TLR 応答を制御していることが明らかとなった(図 23)。また PRAT4A 欠損により引き起こされる免疫細胞の TLR リガンドに対する応答性の変化は、生体内における TLR を介した自然免疫応答および獲得免疫応答の両方に多大な影響を与えることも明らかとなった。

PRAT4A は細胞種を問わず、TLR4/MD-2、TLR2、TLR1、そして TLR 関連分子である RP105 の細胞表面発現の制御を担っている(図 8A, 11A, 12A, 13A, 14A, 15A、表 3)。解析した限り、TLR ファミリー以外の細胞表面分子は PRAT4A 欠損の影響を全く受けておらず、PRAT4A は TLR の細胞表面発現を特異的に制御する分子であると言える。細胞表面に分布する TLR にとって細胞表面はリガンド認識およびシグナル伝達の場合として重要であると考えられており(38, 78)、細胞表面における TLR の分布異常が PRAT4A 欠損に伴う TLR 応答の減少および消失の主要因であると推察される。一方で、PRAT4A KO 細胞でも TLR の細胞表面分布は完全に消失しなかったことより、PRAT4A 以外にも TLR の細胞表面分布を制御する分子群が存在することが強く示唆された。

細胞表面 TLR であると考えられている TLR4 では、BM-DC と BM-M ϕ においてその細胞表面分布が顕著に減少していた。PRAT4A をノックダウンした Ba/F3 細胞を用いた Western Blot 解析において、Endoglycosidase H (Endo H) 処理に抵抗性を示す高分子量の TLR4 (約

130kDa) は消失する(61)。Endo H は ER で起こる高マンノース型の N 結合型糖鎖を切断し、ゴルジ体移行後に成熟を受けた N 結合型糖鎖を切断できないという特徴を有する脱糖鎖酵素である。TLR4 の細胞表面への移行には糖鎖修飾が必要であることが報告されており(79)、PRAT4A の欠損における細胞表面 TLR4 の減少は TLR4 のゴルジ体における糖鎖成熟が阻害されたことに起因していると考えられる。また PRAT4A ノックダウン細胞の TLR1 でも同様の現象が認められており、TLR1 と TLR4 は同様の機構により細胞表面への分布が制御されていると考えられる(61)。

最近、マクロファージにおける TLR4 の免疫応答において、細胞表面で MyD88 依存的なシグナル伝達が起こり、その後の細胞表面 TLR4 の Internalization に伴って TRIF 依存的なシグナル伝達が起こることが示された (図 26) (38)。この報告と一致して、細胞表面 TLR4 がほとんど消失した Balb/c バックグラウンドの BM-M ϕ では、MyD88 依存的な TNF- α と IL-6 の産生および TRIF 依存的な IFN- β の産生が完全に消失していた。一方で、高濃度 Lipid A 刺激による TIRF 依存的な RANTES の産生、および CD40 の発現上昇はコントロールと同様に PRAT4A KO BM-M ϕ でも強く誘導されてきた。この事実は、細胞内に分布する TLR4 がリガンドを認識し得ることを示しており、TLR4 応答を考える上で細胞表面 TLR4 に加えて細胞内 TLR4 によるリガンド認識を考慮する必要があると考えられる (図 26)。

細胞表面 TLR とは異なり、細胞内 TLR4 が炎症性サイトカインを産生しないという結果は非常に興味深い。ワクチン開発において、炎症をなるべく引き起こさずに免疫応答を誘導するアジュバントが理想的

である。最近、そのようなアジュバントの候補として、TRIF 経路を選択的に活性化する TLR4 リガンドである Monophosphoryl Lipid A が注目されている(44)。PRAT4A KO 解析より、BM-Mφでは細胞内 TLR4 が TRIF 依存的経路を特異的に活性化し、MyD88 依存的経路を介した炎症性サイトカインの産生は誘導しない。また、PRAT4A KO BM-DC では細胞表面 TLR4 が欠損しても CD86 の発現上昇、即ち BM-DC の成熟は全く影響されていなかった。これらの結果は、細胞内に分布する TLR4 を刺激することで炎症性サイトカイン産生を伴うことなく十分な免疫応答を誘導できる可能性を示唆している。細胞内に TLR4 リガンドを送り込むようなドラッグデリバリーシステムを使用することができれば、炎症誘起の少ないアジュバントの作製が可能かもしれない。

また PRAT4A の欠損により細胞表面 TLR である TLR1 や TLR2 の細胞表面分布が一部の細胞種で完全に消失していた。しかし、それら細胞の TLR2 リガンドに対する免疫応答は残存していた (表 3)。マクロファージでは、TLR2 リガンド刺激によるサイトカイン産生が顕著に低下していたにも関わらず、細胞表面 CD40 の発現上昇が強く残存していた。また非免疫細胞である MEF では細胞表面 TLR2 が完全に消失していたにも関わらず、TLR2/TLR6 リガンド(FSL-1)刺激によるサイトカイン産生が明らかに残存していた。以上の事実は、TLR4 と同様に TLR2 のリガンド認識の場も細胞内に存在し得る可能性を強く示唆しており、PRAT4A は免疫細胞における細胞表面 TLR1/TLR2/TLR6 を介したサイトカイン産生などの即時的に要求される免疫応答の誘導を制御すると考えられる。

細胞表面 TLR とは異なり、核酸を認識する細胞内 TLR である TLR7/9 を介した免疫応答は PRAT4A 欠損により全ての細胞で消失した(表 3)。

TLR9 は細胞がリガンドを取り込んだ後に、小胞体から Lysosome へと移行することでリガンド認識が可能となる(66)。PRAT4A をノックダウンしたマクロファージ系列の RAW 細胞内では、リガンドの取り込みに影響はないものの、TLR9 リガンドである Rhodamine 標識 CpG-ODN の取り込まれるリソソームに TLR9 が移行できなくなっていた(図 16c)。また、PRAT4A をノックダウンした B 細胞系列の M12 細胞においても同様の現象が認められている(61)。この結果は、PRAT4A 欠損細胞では TLR9 がリガンドに出会うことができない為に全ての応答が消失していること示している。

最近、TLR9 は小胞体からゴルジ体を経てリソソームに至り、N 末端の Leucin-rich repeat の一部が切断されることで初めて機能的 TLR9 (cleaved TLR9) として機能することが報告された(80, 81)。当分野で最近得られた知見では、TLR9-GFP を発現する RAW および M12 細胞の PRAT4A をノックダウンすることで cleaved TLR9 が Western Blot 法で全く検出されなくなることが判明している(未発表データ)。この事実は、PRAT4A が TLR9 の小胞体からリソソームへの移行に必須の分子であるという推察を支持するものである。

また、PRAT4A 欠損細胞では TLR7 リガンドに対する応答も完全に欠損していた。非常に断片的なデータではあるが、TLR7 も TLR9 と同様に ER からリソソームに移行するという報告(58)、また cleaved form が存在するという報告もあり(80)、TLR7 も TLR9 と同様に PRAT4A によ

り細胞内分布を制御されている可能性が示唆される。

一方、TLR7/9 と同様に核酸を認識する細胞内 TLR である TLR3 は DC や M ϕ において PRAT4A 欠損による影響を全く受けていなかった。Poly(I;C) は、TLR3 と細胞質内レセプターである melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5)、そして retinoic acid inducible gene I (RIG-I) により認識される(82)。このことから欠損した TLR3 の応答が MDA5 や RIG-I により補完されている可能性も考えられた。しかし、マクロファージにおける RANTES・IFN- β の産生や B 細胞における CD86 の発現上昇は TLR3 依存的であることが報告されている(83, 84)。同応答は PRAT4A 欠損細胞において全く影響を受けていなかったことより、DC や M ϕ において PRAT4A は TLR3 の応答制御に関与していないと考えられる。しかし、TLR3 依存的に誘導される脾臓 B 細胞の増殖が部分的に低下していたことより、PRAT4A は B 細胞において TLR3 の応答制御に関与している可能性がある (図 14C) (84)。B 細胞では TLR2 や TLR4 の応答に RP105 などのアクセサリ分子が必要なことが報告されており(34)、TLR3 の応答にも PRAT4A の欠損によりその細胞表面発現が低下していた同分子などの影響があるのかもしれない。いずれにせよ、B 細胞では PRAT4A が TLR3 を介した免疫応答に関与している可能性があり、注意深く解析を進めていく必要がある。

更に PRAT4A KO 細胞では、TLR5 を介した免疫応答も完全に消失していた (表 3)。TLR5 は上皮細胞において基底側細胞表面に分布することが知られているが(69)、免疫細胞における TLR5 の分布は全く判明していない。PRAT4A は TLR4/1/2/9 の細胞内分布を制御する分子であ

ったことより、PRAT4A 欠損で阻害される TLR5 の細胞内分布を解析することで免疫細胞における Flagellin の認識および応答の場が判明するかもしれない。

以上の事実より、PRAT4A は複数の TLR の細胞内移行および細胞内分布を制御することで TLR による免疫応答を統合的に制御していると言える。TLR の細胞内移行を特異的に制御する PRAT4A や UNC93B1 が小胞体タンパク質であること(58)、更に小胞体には TLR 特異的なシャペロン分子である gp96 の存在が知られていることなどから(74)、TLR の細胞内分布は小胞体において一連の分子群により特異的に制御されている可能性が高いと考えられる。

また一部の PRAT4A KO 細胞では細胞表面に分布する TLR2 や TLR4 の発現が完全に消失しなかったことより (表 3)、予測される分子機構に更なる重要な分子が存在することも示唆される。細胞表面 TLR の発現が複数の分子により制御されているという事実は、PRAT4A 依存的および PRAT4A 非依存的な細胞表面 TLR の分布制御が免疫応答のバランス調節においても何らかの意義を持つことを暗示しているのかもしれない。PRAT4A 非依存的な分布制御を担う分子を同定し、同分子を欠損する免疫細胞における免疫応答を解析することは非常に興味深い。

当分野では以前、TLR4 の細胞表面発現を制御する新たな分子として Protein associated with TLR4 B (PRAT4B) の存在を報告してきた。(65) PRAT4B は PRAT4A とタンパク質レベルで 38%の一致、および 54%の相同性をもつ PRAT4A のパラログであり、PRAT4A と同様の機能を有する可能性が高いと考えられる。私は PRAT4B KO マウスの作製を試みたが、同マウス

は胎生致死であり、胎齡の早期に死亡することから胎仔肝細胞を用いた骨髓キメラマウスの作製も不可能であった(図 24)。私は現在、PRAT4B コンディショナルノックアウトマウスの作製を試みており、PRAT4B を欠損した血球系細胞における TLR の機能変化を解析していく予定である。

個々の免疫担当細胞は複数種の TLR を同時に発現しており、複数の TLR リガンドを有する病原体の侵入に際しては TLR ファミリー間の協調的かつ相乗的免疫応答が非常に重要である。PRAT4A 欠損細胞では複数の TLR に対する応答が低下しており、病原体に対する免疫応答が顕著に減弱することが予測された。

PRAT4A KO BM-DC 細胞では、死菌の *E.coli* や *M.tuberculosis* に対するサイトカイン産生が有意に低下していた(図 17A, 18A)。in vivo においても *E.coli* に対するサイトカイン産生は顕著に低下していた(図 14C)。一方で、樹状細胞成熟の指標となる死菌により誘導される CD86 の発現上昇は正常であり(図 17B, 18B)、免疫応答全てが低下するわけではないと考えられた。

また、Th1 偏向の免疫応答を誘導する OVA と CFA による免疫においても、PRAT4A KO 骨髓キメラマウスでは IFN- γ の産生や OVA 特異的な血中 IgG2a/c 量が顕著に低下しており、Th1 偏向の免疫応答の欠損が明らかであった(図 19B,C)。一方で、OVA 特異的な血中 IgM や IgG1 はコントロールと同様に産生されていた(図 19C)。これらの事実は、PRAT4A の欠損が獲得免疫応答自体を欠損させるものではなく、サイトカイン産生を障害することで獲得免疫応答の質を変化させることを示唆していると考えられる。

PRAT4A KO 骨髓キメラマウスにおいて Th1 偏向が強く阻害されたの

は、Th1 偏向を誘導することが知られる TLR9 の応答が完全に欠損することが主な原因かもしれない(85, 86)。特に樹状細胞では TLR4 と TLR7/9、TLR3 と TLR7/9 の同時刺激により Th1 偏向を引き起こす IL-12p70 の相乗的な産生が起こることも知られており(87)、TLR9 応答の欠損がこうした Th1 サイトカインの相乗的な産生を欠損させていた可能性も考えられる。その結果として、PRAT4A KO における Th1 偏向の免疫応答が抑制されることになったと推測される。

PRAT4A KO BM-DC では、特にバクテリアに対する IL-6 産生が顕著に抑制されていた (図 17A, 18A)。IL-6 は Th17 偏向において重要であることから(5)、PRAT4A が Th17 偏向の獲得免疫応答に影響を与える可能性も考えられる。Th17 偏向で引き起こされる Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) などの実験系を用いて PRAT4A の Th17 偏向への影響を解析することも非常に興味深い。

以上の事実より、PRAT4A は複数の TLR の免疫応答に必須の分子であることが明白であるが、PRAT4A は TLR の応答を制御し得る分子でもある。これは BM-DC を様々な TLR リガンドで刺激した際に PRAT4A mRNA の発現量が顕著に低下することより強く示唆される。また大量の LPS 投与で誘導されるエンドトキシンショックモデルを用いた実験では、PRAT4A KO 骨髄キメラマウスはエンドトキシンショックに完全に抵抗性であった (図 21A)。この結果より、PRAT4A の消失は生体内における過剰な免疫応答を抑制し得ると考えられる。

自然免疫応答は感染防御に必須である一方、過剰な自然免疫応答の誘導はエンドトキシンショックなどの致死的な結果をもたらす。TLR4 には過剰な免疫応答を制御するシステムとして、一度 TLR4 リガンド

を認識した細胞が二度目に同リガンドを認識しても免疫応答が抑制されるという *tolerance* システムが存在する(88)。同システムは、最初の TLR4 リガンド認識により引き起こされる A20、IRAK-M、SIGIRR、ST2、SOCS1、SHIP、および MyD88s などの TLR4 シグナル伝達経路における Negative Regulator の誘導、更に生体にとって有害となる炎症に関連する遺伝子のクロマチン構造の変化に伴う転写抑制という二つの現象により理解されている(88)。私が示した PRAT4A mRNA の LPS 刺激に伴う減少および PRAT4A KO キメラマウスのエンドトキシンショックへの耐性は、*tolerance* が既知のメカニズムに加えて TLR の細胞内分布を変化させることでも制御されている可能性を強く示唆するものである。実際、*tolerance* 状態の腹腔マクロファージでは細胞表面 TLR4 の発現が低下しているという現象も報告されており(89)、*tolerance* において TLR の細胞内分布が重要な要因であることが示唆される。PRAT4A が実際に TLR4 の細胞内分布を制御することで *tolerance* に関与していることを示すには、TLR4 リガンド刺激でも高い PRAT4A の発現量を保てる PRAT4A トランスジェニックマウスの解析などが必要であろう。

一方で、致死の原因が TNF- α であることが明確に証明されている D-Galactosamine (D-Gal) と LPS によるエンドトキシンショックモデルでは(76, 77)、PRAT4A KO 骨髄キメラマウスは D-Gal と LPS によるエンドトキシンショックに抵抗性を示さなかった。*tolerance* 現象はこの系においても知られており(90)、PRAT4A の欠損はこの系におけるショックの誘導を抑制できなかった (図 22)。これは B6 バックグラウンド BM-M ϕ では細胞表面 TLR4 の発現が認められ、TLR4 リガンド刺激による TNF- α 産生がかなり残存していたことが原因であると考えられる (図 11A,B)。PRAT4A 以外にも細胞表面 TLR4 の発現を制御する分子

の存在が示唆されていることより、tolerance における細胞表面 TLR4 の分布量変化を理解するにはそうした分子の存在も考慮していく必要がある。

Tolerance 状態を再現していると考えられる PRAT4A KO 骨髄キメラマウスであるが、大量 LPS 投与直後の 1、3、6 時間における血中サイトカイン濃度では時間帯により一部で有意な差が認められるのみであった (図 21C)。LPS 投与直後から半日後までの臨床症状 (下痢、食欲減退、元気喪失、不動) では PRAT4A KO とコントロールの間に差が認められなかったが、PRAT4A KO 群は LPS 投与後 1~2 日目から体重が増加するなど劇的な症状の回復を示した (図 21B)。一方で、コントロール群は回復することなく徐々に衰弱して死亡した (図 21B)。これらの事実は、LPS 投与直後に認められるサイトカイン産生とは別に、エンドトキシンショック後期に引き起こされる免疫応答が直接的な致死の原因である可能性を示唆している。こうした観点から、エンドトキシンショックの late mediator として知られる high-mobility group box 1 (HMGB-1) の動態を解析することは非常に興味深い。HMGB-1 は LPS 投与の 15 時間以降に血中に認められるようになり、HMGB-1 の中和抗体の投与により大量 LPS によるマウスの致死が回避されることが知られている(91)。PRAT4A KO 骨髄キメラマウスにおける HMGB-1 の血中濃度を解析することで、PRAT4A 欠損に伴うエンドトキシンショックに対する抵抗性の理由が判明するかもしれない。

最後に、私は PRAT4A の新たな細胞内動態を発見したので、そのことについて述べたい。PRAT4A による TLR の分布制御は、PRAT4A の分布より小胞体において行われていると考えられた (図 4B)。しかし、

樹状細胞における PRAT4A の強制発現により PRAT4A が培養上清中へ分泌された(図 10A)。こうした事実は、PRAT4A に更なる機能が存在することを示唆しており、私は抗 PRAT4A モノクローナル抗体を用いることで PRAT4A の新たな細胞内動態を解析した。興味深いことに、マクロファージでは PRAT4A が様々な TLR 刺激に伴って細胞表面に出現するようになった (図 23B)。この現象は BM-Mφ においてのみ認められ、BM-DC では全く検出できなかった (図 20A, B)。この現象がその後の免疫応答にどのような関与するかについては未だ検討中であるが、PRAT4A が Th1 偏向の免疫応答の誘導に強く関与していたことから(図 16)、Th1 細胞によるマクロファージの活性化に必要である可能性なども考えられる。また、内因性の PRAT4A が血清中に存在することも同抗体を使用して確認済みであり、この soluble PRAT4A の生理機能は今後の検討課題である。

今回、PRAT4A KO マウスの解析を通じ、複数の TLR における細胞内分布および免疫応答が一つのアクセサリ分子である PRAT4A により広範に制御されるという現象が認められた。PRAT4A は様々な TLR リガンド刺激によりその発現量が顕著に変化しており、TLR の応答を統合的に制御する分子機構を担っていると考えられる。最近、ヒトの PRAT4A で認められた single nucleotide polymorphisms (SNP) の一つである M145K において、TLR9 の応答性のみが特異的に消失するという現象が認められた(92)。この事実は、PRAT4A の微小な変異が免疫応答自体を修飾する可能性を示すものであり、PRAT4A で発見される SNP の特徴を解析することは免疫応答における個人差を理解する上で大きく役に立つかもしれない。

また、PRAT4A KO 細胞における TLR の細胞内分布の変化を利用するこ

とで、細胞表面がリガンド認識の場であると考えられている TLR4 が細胞内でも機能し得るという新たな現象が明らかとなった(図 26)。TLR のリガンド認識機構は、リガンド認識の場やシグナル伝達の場を含めて未だ不明な点が多く、PRAT4A 欠損細胞を用いることでそうした TLR の未知の部分の解明が更に進むことが期待される。

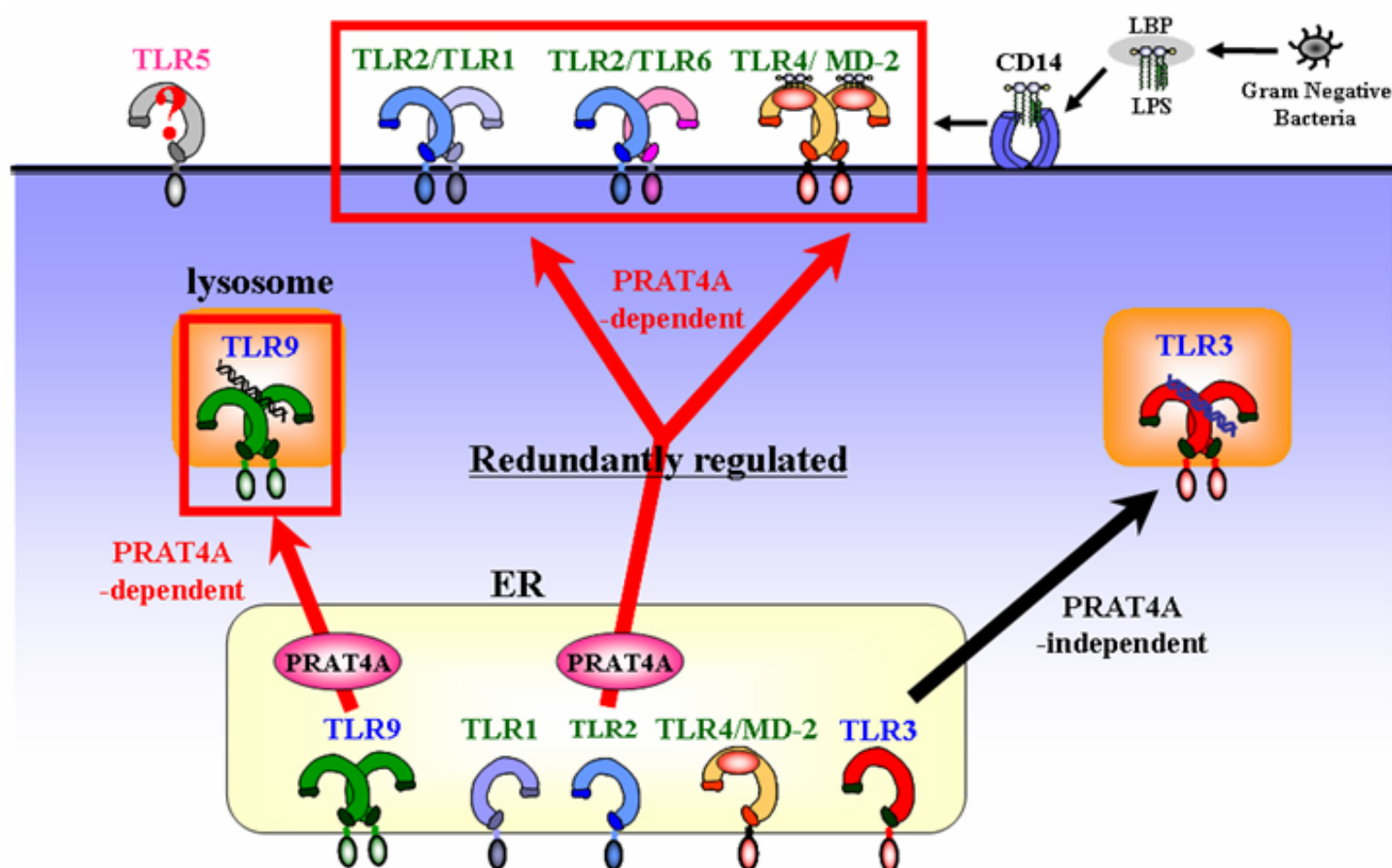


図25 : PRAT4Aは複数のTLRの細胞内分布を制御することでTLRの免疫応答を制御する。

細胞表面TLRであるTLR4, TLR2, TLR1はPRAT4Aにより細胞表面の発現を制御されている。しかし、PRAT4A欠損細胞でもそれらTLRの細胞表面発現が完全に消失しないことより、PRAT4A以外にもTLRの細胞表面への分布を司る制御分子の存在が示唆される。

細胞内TLRであるTLR7とTLR9による免疫応答は完全にPRAT4A依存的であり、PRAT4AはTLR9の小胞体からリガンド認識の場であるリソソームへの移行を制御する。TLR7/9と同様に細胞内TLRであるTLR3の免疫応答は、基本的にPRAT4Aによる制御を受けていないと考えられる。

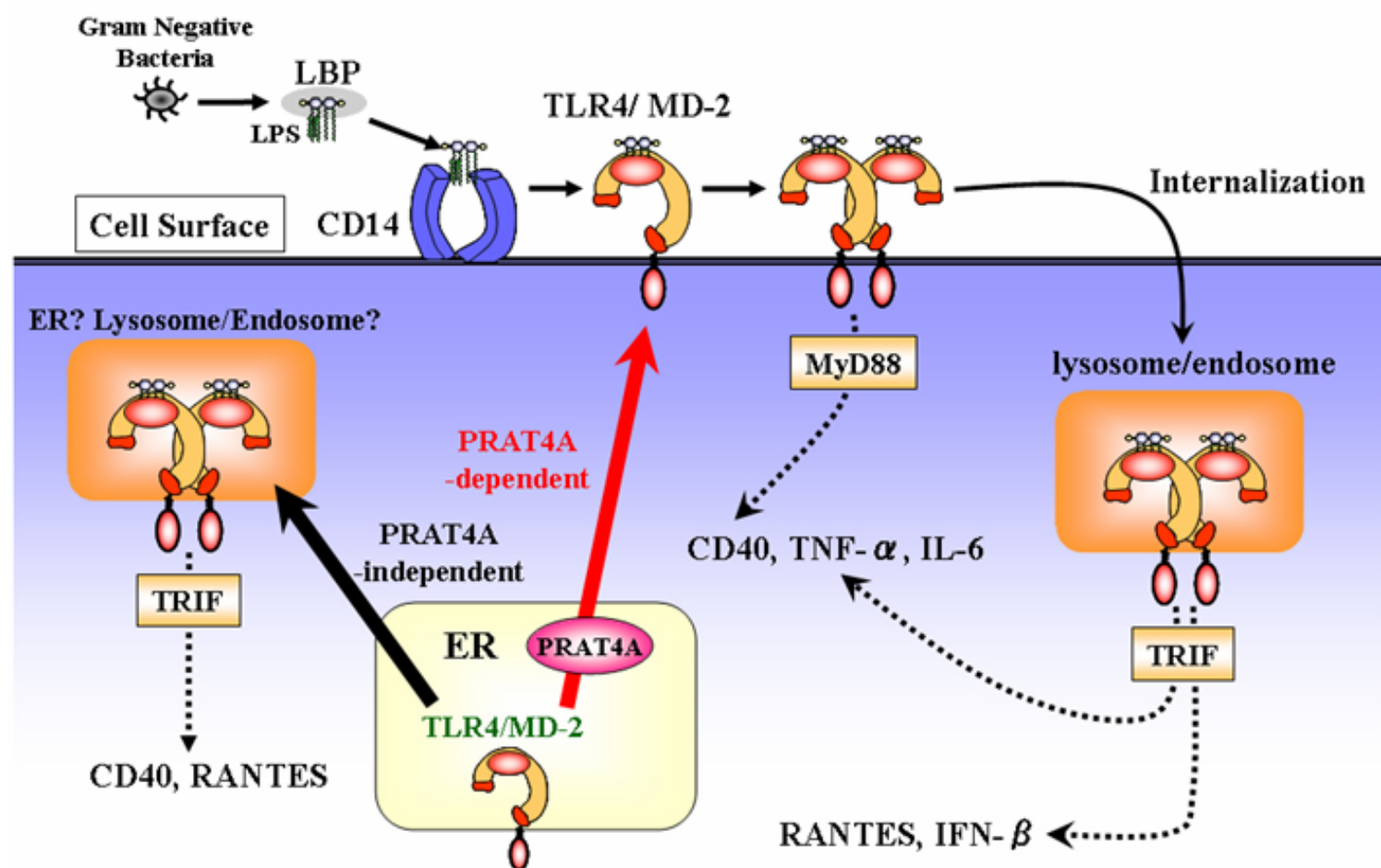


図26 : マクロファージの細胞内TLR4によるリガンド認識。

マクロファージにおいて、TLR4は細胞表面においてMyD88経路を活性化し、その後の細胞表面TLR4のInternalizationによりTRIF経路を活性化すると考えられている。しかし、PRAT4A KO BM-M ϕ の解析結果より、細胞内TLR4がリガンド認識を担っており、特定のTRIF経路を活性化し得ることが強く示唆された。

謝辞

本研究の遂行にあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学医科学研究所感染遺伝学分野の三宅健介教授に深く感謝いたします。また、本研究の開始時において研究の基礎を丁寧に指導して頂いた楠本豊博士(現・大阪大谷大学免疫学教室准教授)、数多くの貴重なご助言を頂きました東京大学医科学研究所感染遺伝学分野の高村(赤司)祥子博士、小林俊彦博士、谷村奈津子博士に厚くお礼申し上げます。そして、日々の研究においてご協力頂きました東京大学医科学研究所感染遺伝学分野の皆様に感謝いたします。

博士課程の4年間、研究に集中することができたのは、経済的および精神的に支え続けてくれた両親や妻の絵梨子の存在があったからであり、家族には心から御礼申し上げます。また、博士論文を書き上げる中で大きな心の支えとなった娘の彩音にも感謝の意を表したいと思います。

参考文献

1. Janeway CA, Jr, Travers P. 1997. *IMMUNOBIOLOGY-The Immune System in Health and Disease, Third Edition*
2. Iwasaki A. 2007. Mucosal dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 25: 381-418
3. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21: 685-711
4. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6: 1133-41
5. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. 2007. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* 8: 345-50
6. Qian Y, Liu C, Hartupée J, Altuntas CZ, Gulen MF, Jane-Wit D, Xiao J, Lu Y, Giltiay N, Liu J, Kordula T, Zhang QW, Vallance B, Swaidani S, Aronica M, Tuohy VK, Hamilton T, Li X. 2007. The adaptor Act1 is required for interleukin 17-dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease. *Nat Immunol* 8: 247-56
7. Kolls JK, Linden A. 2004. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21: 467-76
8. Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. 2003. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol* 21: 713-58
9. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. 2007. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 25: 821-52
10. Litman GW, Cannon JP, Dishaw LJ. 2005. Reconstructing immune phylogeny: new

- perspectives. *Nat Rev Immunol* 5: 866-79
11. Rotrosen D, Gallin JI. 1987. Disorders of phagocyte function. *Annu Rev Immunol* 5: 127-50
 12. Lekstrom-Himes JA, Gallin JI. 2000. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N Engl J Med* 343: 1703-14
 13. Janeway CA, Jr. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1: 1-13
 14. Beutler B. 2004. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 40: 845-59
 15. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86: 973-83
 16. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394-7
 17. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 282: 2085-8
 18. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the *Lps* gene product. *J Immunol* 162: 3749-52
 19. Beutler B, Jiang Z, Georgel P, Crozat K, Croker B, Rutschmann S, Du X, Hoebe K. 2006. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol* 24: 353-89

20. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783-801
21. Miyake K, Yamashita Y, Hitoshi Y, Takatsu K, Kimoto M. 1994. Murine B cell proliferation and protection from apoptosis with an antibody against a 105-kD molecule: unresponsiveness of X-linked immunodeficient B cells. *J Exp Med* 180: 1217-24
22. Miyake K, Yamashita Y, Ogata M, Sudo T, Kimoto M. 1995. RP105, a novel B cell surface molecule implicated in B cell activation, is a member of the leucine-rich repeat protein family. *J Immunol* 154: 3333-40
23. Nagai Y, Shimazu R, Ogata H, Akashi S, Sudo K, Yamasaki H, Hayashi S, Iwakura Y, Kimoto M, Miyake K. 2002. Requirement for MD-1 in cell surface expression of RP105/CD180 and B-cell responsiveness to lipopolysaccharide. *Blood* 99: 1699-705
24. Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M, Miyake K. 2002. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* 3: 667-72
25. Kim HM, Park BS, Kim JI, Kim SE, Lee J, Oh SC, Enkhbayar P, Matsushima N, Lee H, Yoo OJ, Lee JO. 2007. Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell* 130: 906-17
26. Ohto U, Fukase K, Miyake K, Satow Y. 2007. Crystal structures of human MD-2 and its complex with antiendotoxic lipid IVa. *Science* 316: 1632-4
27. Akira S, Takeda K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4: 499-511
28. Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Foy E, Loo YM, Gale M, Jr., Akira S, Yonehara S, Kato A, Fujita T. 2005. Shared and

- unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* 175: 2851-8
29. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 5: 730-7
 30. Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, Lu Y, Miyagishi M, Kodama T, Honda K, Ohba Y, Taniguchi T. 2007. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448: 501-5
 31. Saijo S, Fujikado N, Furuta T, Chung SH, Kotaki H, Seki K, Sudo K, Akira S, Adachi Y, Ohno N, Kinjo T, Nakamura K, Kawakami K, Iwakura Y. 2007. Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat Immunol* 8: 39-46
 32. Robinson MJ, Sancho D, Slack EC, LeibundGut-Landmann S, Reis e Sousa C. 2006. Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat Immunol* 7: 1258-65
 33. Kobayashi T, Takahashi K, Nagai Y, Shibata T, Otani M, Izui S, Akira S, Gotoh Y, Kiyono H, Miyake K. 2008. Tonic B cell activation by Radioprotective105/MD-1 promotes disease progression in MRL/lpr mice. *Int Immunol* 20: 881-91
 34. Nagai Y, Kobayashi T, Motoi Y, Ishiguro K, Akashi S, Saitoh S, Kusumoto Y, Kaisho T, Akira S, Matsumoto M, Takatsu K, Miyake K. 2005. The radioprotective 105/MD-1 complex links TLR2 and TLR4/MD-2 in antibody response to microbial membranes. *J Immunol* 174: 7043-9
 35. Dearman RJ, Cumberbatch M, Maxwell G, Basketter DA, Kimber I. 2008. Toll-like receptor ligand activation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *Immunology*

36. Kurt-Jones EA, Sandor F, Ortiz Y, Bowen GN, Counter SL, Wang TC, Finberg RW. 2004. Use of murine embryonic fibroblasts to define Toll-like receptor activation and specificity. *J Endotoxin Res* 10: 419-24
37. Takeda K, Kaisho T, Akira S. 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21: 335-76
38. Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R. 2008. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol* 9: 361-8
39. Rock KL, Kono H. 2008. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol* 3: 99-126
40. Marshak-Rothstein A. 2006. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 6: 823-35
41. Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R. 2006. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* 7: 49-56
42. Kaisho T, Akira S. 2006. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 117: 979-87; quiz 88
43. Kaisho T, Takeuchi O, Kawai T, Hoshino K, Akira S. 2001. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J Immunol* 166: 5688-94
44. Mata-Haro V, Cekic C, Martin M, Chilton PM, Casella CR, Mitchell TC. 2007. The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science* 316: 1628-32
45. Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. 2001. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2: 947-50
46. Asagiri M, Hirai T, Kunigami T, Kamano S, Gober HJ, Okamoto K, Nishikawa K,

- Latz E, Golenbock DT, Aoki K, Ohya K, Imai Y, Morishita Y, Miyazono K, Kato S, Saftig P, Takayanagi H. 2008. Cathepsin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis. *Science* 319: 624-7
47. Iwasaki A, Medzhitov R. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5: 987-95
 48. Kattah MG, Wong MT, Yocum MD, Utz PJ. 2008. Cytokines secreted in response to Toll-like receptor ligand stimulation modulate differentiation of human Th17 cells. *Arthritis Rheum* 58: 1619-29
 49. Marta M, Andersson A, Isaksson M, Kampe O, Lobell A. 2008. Unexpected regulatory roles of TLR4 and TLR9 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 38: 565-75
 50. Prinz M, Garbe F, Schmidt H, Mildner A, Gutmacher I, Wolter K, Piesche M, Schroers R, Weiss E, Kirschning CJ, Rochford CD, Bruck W, Becher B. 2006. Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 116: 456-64
 51. Chen K, Huang J, Gong W, Iribarren P, Dunlop NM, Wang JM. 2007. Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer. *Int Immunopharmacol* 7: 1271-85
 52. Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. 2004. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol* 5: 975-9
 53. Misch EA, Hawn TR. 2008. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease. *Clin Sci (Lond)* 114: 347-60
 54. Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. 2005. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov* 4: 854-65
 55. Kitchens RL, Wang P, Munford RS. 1998. Bacterial lipopolysaccharide can enter monocytes via two CD14-dependent pathways. *J Immunol* 161: 5534-45

56. Marshak-Rothstein A, Rifkin IR. 2007. Immunologically active autoantigens: the role of toll-like receptors in the development of chronic inflammatory disease. *Annu Rev Immunol* 25: 419-41
57. Akashi-Takamura S, Miyake K. 2008. TLR accessory molecules. *Curr Opin Immunol* 20: 420-5
58. Kim YM, Brinkmann MM, Paquet ME, Ploegh HL. 2008. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* 452: 234-8
59. Casrouge A, Zhang SY, Eidenschenk C, Jouanguy E, Puel A, Yang K, Alcais A, Picard C, Mahfoufi N, Nicolas N, Lorenzo L, Plancoulaine S, Senechal B, Geissmann F, Tabeta K, Hoebe K, Du X, Miller RL, Heron B, Mignot C, de Villemeur TB, Lebon P, Dulac O, Rozenberg F, Beutler B, Tardieu M, Abel L, Casanova JL. 2006. Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science* 314: 308-12
60. Wakabayashi Y, Kobayashi M, Akashi-Takamura S, Tanimura N, Konno K, Takahashi K, Ishii T, Mizutani T, Iba H, Kouro T, Takaki S, Takatsu K, Oda Y, Ishihama Y, Saitoh S, Miyake K. 2006. A protein associated with toll-like receptor 4 (PRAT4A) regulates cell surface expression of TLR4. *J Immunol* 177: 1772-9
61. Takahashi K, Shibata T, Akashi-Takamura S, Kiyokawa T, Wakabayashi Y, Tanimura N, Kobayashi T, Matsumoto F, Fukui R, Kouro T, Nagai Y, Takatsu K, Saitoh S, Miyake K. 2007. A protein associated with Toll-like receptor (TLR) 4 (PRAT4A) is required for TLR-dependent immune responses. *J Exp Med* 204: 2963-76
62. Haraguchi T, Ozaki Y, Iba H. 2009. Vectors expressing efficient RNA decoys achieve the long-term suppression of specific microRNA activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*

63. Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, Nakanishi K, Akira S. 1998. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 9: 143-50
64. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. 1999. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11: 115-22
65. Konno K, Wakabayashi Y, Akashi-Takamura S, Ishii T, Kobayashi M, Takahashi K, Kusumoto Y, Saitoh S, Yoshizawa Y, Miyake K. 2006. A molecule that is associated with Toll-like receptor 4 and regulates its cell surface expression. *Biochem Biophys Res Commun* 339: 1076-82
66. Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT. 2004. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 5: 190-8
67. Leifer CA, Kennedy MN, Mazzoni A, Lee C, Kruhlak MJ, Segal DM. 2004. TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation. *J Immunol* 173: 1179-83
68. van Kooten C, Banchereau J. 2000. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 67: 2-17
69. Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL. 2001. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* 167: 1882-5
70. Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, Monks B, Pitha PM, Golenbock DT. 2003. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 198: 1043-55
71. Pasare C, Medzhitov R. 2005. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature* 438: 364-8
72. De Trez C, Pajak B, Brait M, Glaichenhaus N, Urbain J, Moser M, Lauvau G,

- Muraille E. 2005. TLR4 and Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter-inducing IFN-beta, but not MyD88, regulate Escherichia coli-induced dendritic cell maturation and apoptosis in vivo. *J Immunol* 175: 839-46
73. Trinchieri G, Sher A. 2007. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 7: 179-90
 74. Yang Y, Liu B, Dai J, Srivastava PK, Zammit DJ, Lefrancois L, Li Z. 2007. Heat shock protein gp96 is a master chaperone for toll-like receptors and is important in the innate function of macrophages. *Immunity* 26: 215-26
 75. West MA, Heagy W. 2002. Endotoxin tolerance: A review. *Crit Care Med* 30: S64-S73
 76. Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, Wiegmann K, Ohashi PS, Kronke M, Mak TW. 1993. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. *Cell* 73: 457-67
 77. Horiuchi K, Kimura T, Miyamoto T, Takaishi H, Okada Y, Toyama Y, Blobel CP. 2007. Cutting edge: TNF-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock. *J Immunol* 179: 2686-9
 78. Kagan JC, Medzhitov R. 2006. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* 125: 943-55
 79. da Silva Correia J, Ulevitch RJ. 2002. MD-2 and TLR4 N-linked glycosylations are important for a functional lipopolysaccharide receptor. *J Biol Chem* 277: 1845-54
 80. Ewald SE, Lee BL, Lau L, Wickliffe KE, Shi GP, Chapman HA, Barton GM. 2008. The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature*

81. Park B, Brinkmann MM, Spooner E, Lee CC, Kim YM, Ploegh HL. 2008. Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat Immunol*
82. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh CS, Reis e Sousa C, Matsuura Y, Fujita T, Akira S. 2006. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441: 101-5
83. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413: 732-8
84. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301: 640-3
85. Jegerlehner A, Maurer P, Bessa J, Hinton HJ, Kopf M, Bachmann MF. 2007. TLR9 signaling in B cells determines class switch recombination to IgG2a. *J Immunol* 178: 2415-20
86. Wagner H. 2001. Toll meets bacterial CpG-DNA. *Immunity* 14: 499-502
87. Napolitani G, Rinaldi A, Berton F, Sallusto F, Lanzavecchia A. 2005. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol* 6: 769-76
88. Foster SL, Medzhitov R. 2009. Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. *Clin Immunol* 130: 7-15
89. Akashi S, Shimazu R, Ogata H, Nagai Y, Takeda K, Kimoto M, Miyake K. 2000. Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J Immunol*

164: 3471-5

90. Freudenberg MA, Galanos C. 1988. Induction of tolerance to lipopolysaccharide (LPS)-D-galactosamine lethality by pretreatment with LPS is mediated by macrophages. *Infect Immun* 56: 1352-7
91. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. 1999. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 285: 248-51
92. Kiyokawa T, Akashi-Takamura S, Shibata T, Matsumoto F, Nishitani C, Kuroki Y, Seto Y, Miyake K. 2008. A single base mutation in the PRAT4A gene reveals differential interaction of PRAT4A with Toll-like receptors. *Int Immunol* 20: 1407-15
93. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-9
94. Hiratsuka S, Watanabe A, Sakurai Y, Akashi-Takamura S, Ishibashi S, Miyake K, Shibuya M, Akira S, Aburatani H, Maru Y. 2008. The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nat Cell Biol* 10: 1349-55
95. Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MA, Nacken W, Foell D, van der Poll T, Sorg C, Roth J. 2007. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat Med* 13: 1042-9
96. Cavassani KA, Ishii M, Wen H, Schaller MA, Lincoln PM, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL. 2008. TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. *J Exp Med* 205: 2609-21

97. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S. 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 169: 10-4
98. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13766-71
99. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189: 1777-82
100. Jiang Z, Georgel P, Du X, Shamel L, Sovath S, Mudd S, Huber M, Kalis C, Keck S, Galanos C, Freudenberg M, Beutler B. 2005. CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat Immunol* 6: 565-70
101. Akashi S, Saitoh S, Wakabayashi Y, Kikuchi T, Takamura N, Nagai Y, Kusumoto Y, Fukase K, Kusumoto S, Adachi Y, Kosugi A, Miyake K. 2003. Lipopolysaccharide interaction with cell surface Toll-like receptor 4-MD-2: higher affinity than that with MD-2 or CD14. *J Exp Med* 198: 1035-42
102. Ulevitch RJ, Tobias PS. 1995. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* 13: 437-57
103. Lee HK, Dunzendorfer S, Soldau K, Tobias PS. 2006. Double-stranded RNA-mediated TLR3 activation is enhanced by CD14. *Immunity* 24: 153-63
104. Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Shamel L, Hartung T, Zahringer U, Beutler B. 2005. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* 433: 523-7
105. Ivanov S, Dragoi AM, Wang X, Dallacosta C, Louten J, Musco G, Sitia G, Yap GS,

- Wan Y, Biron CA, Bianchi ME, Wang H, Chu WM. 2007. A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA. *Blood* 110: 1970-81
106. Tian J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, Parroche P, Drabic S, Golenbock D, Sirois C, Hua J, An LL, Audoly L, La Rosa G, Bierhaus A, Naworth P, Marshak-Rothstein A, Crow MK, Fitzgerald KA, Latz E, Kiener PA, Coyle AJ. 2007. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol* 8: 487-96
 107. Brinkmann MM, Spooner E, Hoebe K, Beutler B, Ploegh HL, Kim YM. 2007. The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J Cell Biol* 177: 265-75
 108. Tabeta K, Hoebe K, Janssen EM, Du X, Georgel P, Crozat K, Mudd S, Mann N, Sovath S, Goode J, Shamel L, Herskovits AA, Portnoy DA, Cooke M, Tarantino LM, Wiltshire T, Steinberg BE, Grinstein S, Beutler B. 2006. The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat Immunol* 7: 156-64
 109. Randow F, Seed B. 2001. Endoplasmic reticulum chaperone gp96 is required for innate immunity but not cell viability. *Nat Cell Biol* 3: 891-6