Toll-like receptor 9による
リガンド認識機構の解析

松本　文

目次

頁

概要 1

序論 3

材料と方法 7

本論

第一章　TLR9 リガンド認識メカニズムにおける新規関連分子、カテプシンの発見

背景 15

結果 16

考察 21

第二章　核酸認識 TLR の cleaved form に関する研究

背景 25

結果 26

考察 30

謝辞 35

参考文献 36

概要

Toll-like receptor 9 (TLR9)は細胞内に取り込まれた病原微生物が含有する DNA の CpG モチーフを認識し、細胞活性シグナルを伝達している。TLR9 をはじめとする細胞内 TLR は、細胞表面に発現している TLR4 などと比較するとまだ分かっていないところが多い。本研究において核酸認識 TLR のリガンド認識について理解を深めるために TLR9 を中心として検討した。

第一章では、TLR9 の co-receptor 分子を同定するために cDNA ライブラリを用いて Functional Cloning を実施した。CpG-ODN(Oligodeoxynucleotides)に対して NF-κB 活性反応を示さないマウスプロ B 細胞株 Ba/F3 細胞に CpG 刺激に対して NF-κB 活性反応を示すマウス脾臓細胞あるいはマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞由来の cDNA ライブラリを導入することによって、CpG 刺激に対して活性化可能となった Ba/F3 細胞を選択、獲得した。このポジティブ細胞が含有する責任遺伝子をクローニングし、TLR9 の CpG 認識に重要な分子としてシステインプロテアーゼであるカテプシン B とカテプシン L を同定した。野生型のカテプシンを遺伝子導入した Ba/F3 細胞においては CpG 刺激依存的な NF-κB 活性反応が増強されたが、一方カテプシンの酵素活性を失活させる変異体を導入した場合にはこの増強効果は認められなかった。また他のカテプシンファミリーについて検討したところ、カテプシン S/F もカテプシン B/L と同様に TLR9 活性の増強効果を示し、カテプシン H に関しては無効であった。また、カテプシンの酵素活性阻害剤を用いた実験によりマウス初代培養 B 細胞の TLR リガンド刺激依存的な活性反応を測定したところ、阻害剤によって CpG 刺激により誘導される細胞活性反応が抑制された。興味深いことにカテプシンの阻害剤は CpG 刺激依存的な活性反応のみならず、TLR3/7 リガンド刺激に対する細胞活性反応をも抑制した。以上よりカテプシンの酵素活性は核酸認識 TLR に影響を与えていることが明らかである。次いでカテプシンの作用機序についても検討したところ、TLR9 が CpG を認識する場であるエンドリソソームにおいて pH 依存的にカテプシンが基質を切断し TLR9 活性反応に影響を与えている可能性が示唆された。

第二章では、カテプシンの TLR9 応答における役割について解析を進めた。カテプシンが切断する基質として第一に TLR9 が推測されうるが、これを示唆する結果が先日二つのグループから報告された。私自身もカテプシンが TLR9 を切断し機能的フォームを生じるのではないかと推測し、TLR9 の構造について検討を加えた。これまでの報告ではウエスタンブロットにおいて、TLR9 分子の全長サイズのバンドだけが検出されていたが、本研究において TLR9 を各種細胞株に強制発現させてそのフォームを確認したところ、TLR9 が切断されていることが明らかとなった。TLR9 が切断修飾を受けるのは細胞内小器官のいずれかであると推測されるので、TLR9 の細胞内移動を制御していると

報告されている PRAT4A 分子と Unc93-B 分子に関連して解析した。その結果、この二分子それぞれによる TLR9 の細胞内移動制御は TLR9 の切断メカニズムに重大な影響を与えていることを証明し、TLR9 の cleaved form が機能的である可能性が示唆された。また内在性 TLR9 を検出することにより生体内において生理学的に cleaved TLR9 が存在していることが明らかになったため、TLR9 が切断されるという現象についてさらに検討を加えた。TLR9 cleaved form の N 末端配列分析結果をもとに TLR9 の切断部位を決定し、non-cleaved コンストラクトを作成した。現在このコンストラクトを用いて解析を進めている。

以上の研究により、TLR9 をはじめとする核酸認識 TLR のリガンド認識においてカテプシンのプロテアーゼ活性が関与していることを発見した。また TLR9 の cleaved form が機能的である可能性を見出した。現在、核酸認識 TLR と自己免疫疾患などの病態との関わりが明らかになる一方で、リガンド認識における分子メカニズムについては大部分が未知である。それゆえに、本研究により明らかとなった分子レベルでの基礎情報は今後の研究に貢献し、ひいては疾患治療に発展する可能性を有している。

序論

免疫とは、われわれを取り巻く微生物から身を守るための生体防御機構である。この免疫機構は、外来微生物が体内に侵入してきたときに即時的に樹状細胞やマクロファージなどの非リンパ球系細胞が病原体を認識し、処理、排除する最前線の防御システムである自然免疫と、病原体がこの防御を突破したときに発動される抗原依存的なリンパ球の誘導、病原体除去を中心とした獲得免疫から構成されている[1, 2]。Toll-like receptor(TLR) は病原体構成成分を認識して自然免疫応答を惹起し、獲得免疫系を効果的に活性化するという免疫防御において不可欠な役割を担っている[3, 4]。

病原体センサーとしてのTLR

Toll-like receptor の Toll とは、そもそもショウジョウバエの個体発生時における背腹軸を決定するシグナルを伝達する分子として同定されたが、真菌に対する感染防御に働くことが 1996 年に報告された[5]。Toll を介したシグナルは Drosoomycin などの抗菌ペプチドの産生を誘導して真菌の排除を促進することが知られており、Toll に変異を持つハエでは、真菌感染に感受性を示す[5, 6]。この Toll のヒトホモログとして、1997 年に Medzhitov らによって TLR が発見されたことにより TLR の研究が始まった[7]。進化的にみて、無脊椎動物からヒトやネズミなどの脊椎動物にまでも高度に保存されていることからも生体防御における Toll/TLR の重要性が窺える[8]。

TLR は主に、抗原提示細胞であるマクロファージや樹状細胞に発現し、病原体構成成分を認識してシグナルを伝達するセンサーとして機能する[9]。TLR の構造は I 型の膜貫通タンパク質で、三つのドメインに分割される。病原体構成成分と結合しているロイシンリッチリピート (leucine-rich repeat, LRR) を有する外部ドメイン、膜貫通領域、そして細胞内には IL-1 のシグナル伝達ドメインと相同性の高い TIR(Toll/IL-1 receptor-like)ドメインを持つ。TLR はファミリーを形成していて、現在までにヒトやマウスにおいて 10 余りの TLR が同定されているが、これらは細胞表面に発現して働くもの (TLR1, 2, 4, 5, 6 など) と、細胞質内の小胞において機能するもの (TLR3, 7, 8, 9 など) の二種類に大別される(図 1)。細胞表面 TLR と細胞内 TLR はそれぞれ、病原体の膜構成成分と核酸成分を認識している。グラム陰性菌由来の外膜成分であるリポ多糖(LPS)を TLR4/MD-2 がグラム陽性菌由来のリポペプチドやペプチドグリカンを TLR1/2 及び TLR2/TLR6 ヘテロダイマーが、細菌の鞭毛由来のタンパク質であるフラジェリンを TLR5 が認識する。一方、ウイルス由来の二本鎖 RNA を TLR3 が、インフルエンザウイルス等の一本鎖 RNA を TLR7 が、ヘルペスウイルス等の DNA ウイルスや細菌由来の非メチル化 CpG モチーフを含む一本鎖 DNA を TLR9 がそれぞれ認識することが報告されている[9-11]。

TLR が各リガンドを認識することによって活性化すると、TIR ドメインを有する細胞内アダプター分子が移動しシグナル伝達コンプレックスを形成する。その中には四つの重要な分子として myeloid differentiation primary-response gene88(Myd88)、TIR-domain containing adaptor protein(TIRAP,別名 Mal)、TIRAP inducing IFNb(TRIF)、そして TRIF-related adaptor molecule(TRAM) が含まれる。四つの分子は多様な組み合わせで各 TLR と結合し、nuclear factor-κB(NF-κB)や mitogen-activated protein kinases(MAPKs)、IFN-regulatory factors(IRFs)などのシグナル経路を活性化し、これにより炎症性サイトカインやインターフェロン(IFN)、そしてケモカインや補助刺激分子などをコードする遺伝子の転写が誘導される[11, 12]。

実際に TLR からのシグナルは炎症性サイトカイン(TNF-a、IL-6、IL-12)や、Ⅰ型 IFN の産生により、マクロファージや NK 細胞の活性化を引き起こして自然免疫応答を増強する。同時にⅠ型 IFN の産生によって誘導される補助刺激分子やケモカインの発現により、リンパ球の活性化などを行い獲得免疫応答に対しても重要な役割を担っている[3, 4, 13, 14]。

多様なウイルスセンサー

TLR ファミリーのうち TLR7、8 と TLR9 は配列相同性が高く、共に RNA や DNA といった核酸を認識している[15, 16]。詳細には TLR7/8 はウイルス由来のグアノシンリッチあるいはウリジンリッチな一本鎖 RNA(ssRNA)を認識し、またグアノシン類似物として合成イミダゾキノリン化合物、Loxoribine、Imiquimod、R-848 に対しても認識、活性反応を示す[17-19]。TLR9 はウイルスや細菌由来のゲノムに多く認められる CpG モチーフを含有する一本鎖 DNA(ssDNA)を認識し、この CpG モチーフを配列に含む合成 ODN(Oligodeoxynucleotides)もまた TLR9 の外部ドメインと結合し、活性反応を引き起こす[20, 21]。リガンド結合後の TLR7/8/9 は TIR domain と death domain を有する Myd88 分子と会合する。Myd88 はほとんど全ての TLR（TLR3 を除く）及び IL-1 receptor のアダプター分子として機能し、Myd88 欠損マウスにおいては IL-1 や TLR2/4/5/7/9 リガンドに対する TNF や IL-6 の産生が阻害されている[11, 22, 23]。Myd88 と会合する TLR の中で TLR7/9 の活性は厳密に Myd88-dependent である(図 2)。TLR4 においては Myd88、TIRAP、TRIF、TRAM４分子を介して活性化シグナルが伝達され、TLR2 活性には Myd88 と TIRAP が使用される。マウスにおけるウイルス感染のモデルとして、TLR7 ノックアウトマウスにおいては、VSV(水疱性口内炎ウイルス) またはインフルエンザウイルス感染による IFNα活性が欠如している[17, 18]。また TLR9 ノックアウトマウス及び変異マウスを用いた実験において HSV-1(herpes simplex virus-1)、HSV-2 またはサイトメガロウイルスに対する形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid dendritic cell, pDC)の IFNα産生の欠如または易致死性が報告されている[24-26]。

一方、TLR7/8/9 と同じくエンドソームに存在する TLR3 はウイルス由来の二本鎖

RNA(dsRNA)と合成類似物である polyinosinic-polycytidylic acid(polyI:C)を認識する[27]。TLR3 は TLR7/8/9 とは異なり Myd88-independent なシグナル伝達経路を通じて活性化を伝えている。これは Myd88 欠損マウスにおいて、polyI:C 刺激を加えたときに炎症性サイトカインや共刺激分子の発現上昇が影響を受けないことより証明された[11, 28]。実際に TLR3 は TRIF-dependent にシグナル伝達を行い、様々なシグナル伝達経路を活性化する。IFN 産生に関しても TLR7/9 が IRF7 を介していることに対し、IRF3 を介して IFNβを誘導していることが特徴的である[28, 29]。TLR3 ノックアウトマウスにおけるマウスサイトメガロウイルス感染において I 型 IFN の産生が著しく低下することが報告されている[26]。

さらに TLR3 以外に dsRNA を認識する分子として RIG-I-like receptors(RLRs)が同定された。RLRs として３つの RNA ヘリケース retinoic acid inducible gene I(RIG-I)、melanoma differentiation-associated antigen 5(MDA5)、laboratory of genetics and physiology 2(LGP2)が知られている[30, 31]。タンパク構造的には、RIG-I と MDA5 は N 末端に caspase-recruitment domain(CARD)を持っている[32]。RLRs は、ミトコンドリアに発現している central receptor である、*IFNB*-promoter stimulator I(IPS1, 別名 MAVS, VISA, CARDIF)に作用している[33-35]。その後 TNF receptor-associated factor3(TRAF3)、TRAF-family-member-associated NF-κB activator-binding kinase 1(TBK1)、inhibitor of NF-κB kinases(IKKε, 別名 IKKi)などの分子とコンプレックスを形成してシグナルを伝達し、インターフェロンや炎症性サイトカインを産生する[30, 36]。

以上のように、われわれの身体には病原微生物の核酸を認識する多様なセンサーが存在し、それによって速やかに感染に対する防御反応が誘導されている。

TLR9 によるCpG認識メカニズム

核酸認識センサーの中で TLR9 は最も早い時期に発見され、研究が進んでいる。TLR9 の CpG 認識メカニズムに関しての解析は 2003 年の Eicke Lats らによる報告に端を発する[37]。この論文では、まず CpG が細胞表面からクラスリン依存性のエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた後、速やかにリソソームに運ばれる。この CpG の取り込みと同時に ER に存在する TLR9 はエンドリソソームへと移動し、さらに細胞質中の Myd88 も CpG や TLR9 を含んだコンパートメントに集積することを視覚的に捉えている。これより、TLR9 によるシグナリングが開始される舞台はリソソームにあると報告されている。またこの結果は、TLR9 の活性化が pH 依存的で、細胞内小胞の酸性化が必須であることに裏付けられている[38]。さらに近年の報告で、TLR9 が定常的に非活性ホモダイマーを形成し、CpG 刺激依存的にその構造変化を起こし細胞内シグナル伝達ドメインが接近することが証明された[39](図 3)。

Toll のヒトホモログとして TLR が発見されてからの 12 年間に、TLR を中心として自然免疫研究にはすさまじい進歩があり、ここ数年においては特にウイルス感染における TLR 依存性また非依存性の認識機構について大きな進歩があった。TLR3/7/9 に関しては、細胞内に発現して微生物内部の核酸を認識することから、その認識メカニズムにおいて他の TLR ファミリーとは異なったプロセスが存在すると考えられるが、これを解明するべく TLR9 を中心として検討した。

材料と方法

試薬

TLR9 リガンドである非メチル化CpGモチーフを有するODN、CpG-B(5’-TCCATGACGTTCCTGATGCT-3’)、Fluorescein isothio-cyanate(FITC)もしくはRhodamineでラベルしたCpG-B及びビオチン化CpG-BはHokkaido System Scienceに合成依頼し、購入した。TLR2/6のリガンドFSL-1、MALP-2やTLR1/2リガンドであるPam_3CSK_4はeBioscienceから購入した。TLR4リガンドのLipidAはSigma-Aldrichより購入した。TLR7リガンドであるLoxoribine (7-allyl-7,8-dihydro-8-oxo-guanosine)と、TLR3リガンドのPolyI:CはInvivoGenから購入した。

薬剤処理として細胞に添加したカテプシンL阻害剤I、カテプシンB阻害剤CA-074Me、ロイペプチン、ペプスタチンはCALBIOCHEMから購入した。

細胞株の維持

B細胞株M12の培養はRPMI1640培地(10%FBS添加RPMI1640)で行った。IL-3依存的なプロB細胞株Ba/F3はRPMI1640培地にマウス組み換えIL-3を添加した培地で培養した。マクロファージ細胞株RAW264.7及びヒト腎癌細胞株HEK293TはD-MEM培地(10%FBS添加D-MEM)で培養維持した。

遺伝子構築とtransfectantの樹立

マウスTLR3/7/9をコードする遺伝子のC末端にflagタグ(TLR3/7/9-flag)やGFP(TLR3/7/9-GFP)、HAHAタグ(TLR9-HAHA)をつないで、レトロウイルスベクターであるpMXpuroに組み込んだ。 マウスTLR4、MD2、CD14の各遺伝子は発現ベクターpcDNA3に組み込んだ。また、マウスカテプシンL/B/S/F/Hの各遺伝子はマウス脾臓細胞由来のcDNAライブラリよりクローニングした後pMXレトロウイルスベクターに組み込んだ。カテプシンLの変異体H163AとG149R、及びカテプシンBの変異体H199Aはそれぞれの野生型を鋳型としてQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit(STRATAGENE)を用いて変異導入を行った。各変異体の遺伝子もpMXベクターに組み込んだ。

Unc93b1遺伝子はマウス脾臓細胞由来のcDNAライブラリよりクローニングした後、GFPタグをつないで、pMXレトロウイルスベクターに組み込んだ。Unc93b1変異体H412RやTLR7のアラニン変異体(VLE-AAA)、TLR9の欠損変異は野生型(WT)を鋳型としてPrime STAR Mutagenesis Basal Kit(TaKaRa)を用いて変異導入を行った。マウスPRAT4Aの発現を阻害するshPRAT4A(ターゲット配列：5’-gagtttgaagaggtgattgag-3’)はレトロウイルスベクターpSSCHに組み込んだ。また、レトロウイルスベクターMI8R2に組み込まれたTLR9N4C-HAHA遺伝子はYale大学のRuslan Medzhitov教授より分与頂いた。

Ba/F3/TLR3/7/9-flag や Ba/F3/TLR3/7/9GFP、RAW264.7/TLR3/7/9GFP 等の細胞は ecotropic なレトロウイルスを用いた transduction によって作製した。及び Unc93b1(WT)、(H412R)や shPRAT4A、TLR7/9 変異体、TLR9N4C-HAHA の遺伝子導入もレトロウイルスを用いて行った。レトロウイルス作成に必要な pMX とその派生であるレトロウイルスベクターpMXpuro、及びパッケージング細胞 Plat-E は東京大学医科学研究所北村俊雄教授より分与いただいた[40-42]。また、レトロウイルスベクターpSSCH は東京大学医科学研究所　伊庭秀夫教授より分与いただいた。

Functional cloning に用いた Ba/F3 細胞には TLR4、MD2、CD14 そして NF-κB-GFP レポーターの各遺伝子を pulse controller plus(Bio-Rad)を用いて導入し、TLR9-flag をレトロウイルスにより遺伝子導入した。さらにこの細胞にカテプシンファミリーや変異体遺伝子をレトロウイルスの系により導入し、実験に用いた。

TLR9 の ligand binding assay に用いた細胞については、HEK293T 細胞に、pCAGGS 発現ベクターに組み込んだ TLR9-GFP 遺伝子を lipofection(Lipofectamine 2000 Transfection Reagent; invitrogen)によって強制発現させた。

細胞内シグナル伝達、免疫沈降とウエスタンブロット

各細胞株における蛋白質発現と細胞内シグナル伝達をウエスタンブロットにより解析した。細胞に各種TLRリガンド刺激を加えた後ハンクス平衡塩液(HBSS)で 3 回洗浄し、lysis buffer 1 及びlysis buffer 2 (表 1)で 15～30 分間氷上で溶解した。lysis buffer 2 はTLRとUnc93-Bの結合実験(図 2-3,2-4A)に用いた。この細胞溶解液を 4℃、15000rpm で 15 分間遠心することでヌクレオペレットを除去した後、Sample bufferを加えて 96℃で 5 分間ボイルした。免疫沈降を行う場合は、遠心後の細胞溶解液を抗体結合ビーズに加え、4℃でよく混合した。その後ビーズをbeads washing buffer 1 及びbeads washing buffer 2(表 1)で 3 回洗浄し、Sample buffer(表 2)を加えて 96℃で 5 分間ボイルした。サンプルはSDS-PAGEに流し、Immobilon-P transfer membrane(MILLIPORE)に転写してからウエスタンブロッティングを行った。

抗体結合ビーズ及び抗体は以下のものを使用した。anti-flag アガロース、streptavidin アガロース、anti-actin Ab は Sigma-Aldrich より購入した。anti-HA アガロースは MBL より購入した。anti-TLR9 Ab と anti-CD86 Ab は eBioscience から購入した。anti-IRAK-1 Ab、anti-Grb2 Ab 及び各種 anti-cathepsin Ab は Santa Cluz Biotechnology より購入した。anti-IκBα Ab、anti-GFP Ab は invitrogen から購入した。anti-His mAb(333)は本研究室にて作成したものを使用した。また図 2-3B、図 2-4A、図 2-7A での免役沈降においては、自身がラットに TLR9-GFP を免疫して作成した anti-GFP mAb(FM264G)結合アガロースを使用した。内在性 TLR9 の検出においても自身が TLR9 の TIR ドメインをウサギに免疫して作成した anti-TLR9 pAb を使用した。

二次抗体には、アルカリホスファテース結合 Goat anti-Mouse IgG、アルカリホスフ

ァテース結合 Goat anti-Rat IgG(American Qualex)、アルカリホスファテース結合 Goat anti-Rabbit IgG(Bio-Rad)、アルカリホスファテース結合 Rabbit anti-Goat IgG(Vector)を用いた。

RT-PCR

各細胞株のtotal RNAはRNeasy mini kit(QIAGEN)を用いて、説明書に従い抽出精製した。cDNAの合成はRever Tra Ace α(TOYOBO)を用いて行った。RNAは 30C°で 10 分プレインキュベーションした後、42 C° で 20 分間逆転写反応を行った。合成されたcDNAはそれぞれcathepsin L、cathepsin B、hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase(HPRT)特異的なプライマーセット（表 3）を用いてEx Taq(TaKaRa)で行った。増幅断片は 1%アガロースゲルで電気泳動した後、臭化エチジウム(EtBr)にて可視化した。

NF-κBルシフェラーゼレポーターアッセイ

NF-κB ルシフェラーゼレポーター遺伝子は、プロモーターの下流に 3 回のκB 配列とルシフェラーゼをコードする遺伝子が挿入されている。

NF-κBルシフェラーゼレポーター遺伝子を導入したM12 細胞を平底 96 ウェルプレートに 1×10^5/wellになるようにまき、カテプシンの阻害剤による処理の後、各種TLRリガンド刺激を加えた。刺激 5 時間後、passive lysis buffer(Promega)にて細胞を溶解し、ルシフェラーゼの活性をthe luciferase assay system(BERTHOLD)により測定した。

NF-κB-GFPレポーターアッセイ

NF-κB-GFP レポーター遺伝子である pNF-κBhrGFP は STRATAGENE より購入した。このベクターは NF-κB 遺伝子のエンハンサー配列(×5)の下流に GFP をコードする遺伝子を配している。

ルシフェラーゼレポーター遺伝子を導入したBa/F3 細胞を平底 96 ウェルプレートに 1×10^5/wellになるようにまき、各種TLRリガンド刺激を加えた。刺激 24 時間後、細胞をstaining buffer(1×PBS、2.5%FBS、0.05%NaN_3)で洗浄し、GFP蛋白の発現をフローサイトメトリーにて確認した。

Functional cloning

Functional cloningは過去の論文において提唱された原理を基にして行った[40, 41, 43, 44]。

cDNAライブラリは、RAW264.7 細胞及びマウス脾臓細胞から抽出したmRNAを鋳型として、SuperScriptTM Plasmid System for cDNA Synthesis and Cloning(Invitrogen)を用いて合成した。RAW264.7 細胞と脾臓細胞由来の各ライブラリにおいて約 2×10^6個の大腸菌コロニーを獲得した。精製したcDNAはpMXレトロウイルスベクターに組み込んだ。

このcDNAライブラリを、レトロウイルスの系を用いて約 13×10^6 万個のBa/F3/TLR4/MD2/CD14/TLR9flag/NF-κBhrGFP細胞に遺伝子導入した。細胞はCpG-B(100nM)で刺激し、24 時間後にGFP蛋白を発現した集団をフローサイトメーター、FACS Callibur System(BD Pharmingen)のソーティング機能で選別した。

CpG-Bに対してNF-κB活性を示す細胞集団から限界希釈培養法により単一細胞を分離した。これらのポジティブ細胞よりゲノムを抽出し、ライブラリ特異的プライマーセット(5'-GGTGGACCATCCTCTAGACT-3'、5'-TTTATTTTATCGTCGATCGACC-3')を用いてライブラリ由来遺伝子を増幅した。約 80 種類の cDNA をクローニングして再度Ba/F3/TLR4/MD2/CD14/TLR9flag/NF-κBhrGFP細胞に導入し、NF-κB-GFPレポーターアッセイによりCpG-Bに対する反応性を確認した。

マウスの管理、脾臓B細胞の単離と培養

雌のC57BL/6マウスを日本SLCから購入し、東京大学医科学研究所実験動物施設内においてSPF環境で維持した。実験には6～10週齢のものを用いた。

マウス脾臓B細胞は、AutoMACS(Miltenyi Biotec)を用いて脾臓細胞からCD43 陰性細胞を回収・分離した。マウスより摘出した脾臓を溶血処理し、回収した脾臓細胞にCD43 microbeads(Miltenyi Biotec)を加え、4℃で15分間混合した。300×gで10分間遠心し余分なCD43 microbeadsを除いた後、AutoMACSのdeplete programでB細胞を分離した。B細胞の分離効率はFACS Callibur System(BD Pharmingen)を用いたフローサイトメトリーにより確認した。分離したB細胞はRPMI1640培地で培養維持した。

フローサイトメトリー

フローサイトメトリーはFACS Callibur System(BD Pharmingen)で解析した。解析する細胞をstaining buffer(1×PBS、2.5%FBS、0.05%NaN_3)でリンスした後、必要のあるものは染色した。染色に用いた抗体として、ビオチン化antiCD86 はeBioscienceから、R-PE-streptavidinはSouthern Biotech Associatesから購入したものを用いた。

B細胞増殖応答の測定

単離したB細胞を平底96ウェルプレートに 2×10^5/wellになるようにまき、阻害剤等で処理した後に刺激物とともに培養した。刺激 3 日後、B細胞培養液に^{3}H－TTPを1 μCi/sampleとなるように加えてさらに6時間培養し、培養物を96ウェルマトリックスハーベスター(Perkin Elmer)によりガラス繊維性フィルター上で回収した。フィルター上に付着した各ウェルの^{3}H－TTP をMatrix 96 direct beta counter (Packard Instrument)で計数し、6時間あたりのDNA合成量を測定した。

CpG-ODN uptake assay

M12 細胞を 48 ウェルプレートに 7.5×10^5/wellになるようにまき、37℃条件下にて阻害剤等で処理した後にCpG-B-FITCで刺激を加えた。また同操作を 4℃条件下で、アジ化ナトリウム(NaN_3)を添加した培地において行った。4℃にて培養することで酵素反応は阻害され、またNaN_3は酸化的リン酸化を阻止するためATP(adenosine 5'-triphosphate)の合成阻害が起こりエンドサイトーシスを顕著に阻害する。この環境下でCpG-B-FITC刺激を加えたM12 細胞において、測定される蛍光（CpG-B-FITC）は細胞内に取り込まれたものではなく細胞表面に付着したものと考えられるので、これを陰性コントロールとした。各条件下での刺激後、10%FBSを添加したPBSで細胞を 2 回洗浄した後、細胞表面のCpG-B-FITCをクエンチングする目的で 50%トリパンブルー添加staining bufferに懸濁した。細胞が発する蛍光をフローサイトメトリーにて測定し、細胞内部に取り込まれたCpG-B-FITCを 37℃条件下で刺激培養したM12 細胞と、コントロール細胞とを比較することで確認した。

画像解析

M12 細胞を平底 96 ウェルプレートに 7.5×10^5/wellになるようにまき、阻害剤等で処理した後にCpG-B-Rhodamineで刺激を加えた。刺激後、10%FBSを添加したPBSで細胞を 2 回洗浄してから、細胞をガラスボトムディッシュ（Matsunami）に移し最終的に 10000 倍になるように希釈してlysoTracker(Molecular Probe)を添加し 37℃で 10 分間静置した。カバーガラスをかけ、共焦点顕微鏡(LSM5 PASCAL; Carl Zeiss, Inc.)にて細胞像を鏡検した。

TLR9 リガンド結合実験

TLR9 リガンド結合実験は過去の論文において報告された方法を基にして行った[37]。HEK293T細胞を 6 ウェルプレートに 2×10^5/wellになるようにまき、Lipofectamine 2000 Transfection Reagentを用いて一時的にTLR9-GFPを強制発現させた。細胞を阻害剤等で処理した後にビオチン化CpG-Bで刺激した。刺激後、細胞をD-MEM培地で 2 回洗浄し、lysis buffer 3(表 1)で氷上にて 30 分間溶解した。細胞溶解液をストレプトアビジンビーズにより免疫沈降した後、ビーズをbeads washing buffer 3(表 1)で 3 回洗浄し、Sample buffer(表 2)を加えて 96℃で 5 分間ボイルした。ビオチン化CpG-Bと共沈してきたTLR9-GFPをanti-GFP抗体を用いてウエスタンブロッティングにて検出した。

マウス骨髄幹細胞遺伝子導入法

マウスは東京大学医科学研究所実験動物施設内において SPF 環境で維持し、実験には 6～10 週齢のものを用いた。3d マウスは新潟大学　多部田康一博士より、TLR9 ノックアウトマウスは大阪大学　審良静男教授より分与いただいた。また野生型の C57BL/6 マ

ウスは日本SLCより購入した。

マウス骨髄幹細胞遺伝子導入法は過去の論文において報告された方法を基にして行った[45]。

マウスに5FU(5-フルオロウラシル)を5mg/headで腹腔内投与し、4日後に骨髄を採取した。骨髄細胞をD-MEM培地(15%FBS、2mM L-glu、50μM 2ME、10mM Sodium pyruvate、10ng/ml stem cell factor、10ng/ml IL-3、10ng/ml IL-6を添加)にて2日間培養した後、レトロウイルスを用いて遺伝子導入を行った。確実に遺伝子を導入するため翌日に再度遺伝子導入を行った直後から、培地にGM-CSF（Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor 顆粒球単球コロニー刺激因子）(10ng/ml)を添加した。遺伝子導入後2日目からpuromycin（2μg/ml)を培地に添加した。その後はGM-CSF(10ng/ml）、puromycin(2μg/ml)を添加したRPMI1640培地にて細胞を培養し、薬剤選択を行いながら樹状細胞に誘導した。GM-CSF添加後10日から13日目の細胞を実験に使用した。

サイトカインの産生

サイトカインの定量はサンドウィッチELISA法で行った。*In vitro*での樹状細胞の刺激後の細胞培養上清を回収し、IL-12、IL-6、TNFαの測定に用いた。ELISAはそれぞれDuoSet mouse IL-12 p40、DuoSet mouse IL-6、DuoSet mouse TNFα(R&D systems)を用いて添付の説明書に従って測定した。

表１　Lysis buffer、beads washing buffer、Sample bufferの組成

lysis buffer1

50mM	Tris-HCl (pH7.4)
150mM	NaCl
0.5%	TritonX-100
10μg/ml	Aprotinin
10μg/ml	Leupeptin
1mM	Phenyl methyl surfonyl fluoride(PMSF)

beads washing buffer1

50mM	Tris-HCl (pH7.4)
150mM	NaCl
0.1%	TritonX-100

lysis buffer2

50mM	Tris-HCl (pH7.4)
150mM	NaCl
5mM	EDTA (pH8.0)
1%	Digitonin
10μg/ml	Aprotinin
10μg/ml	Leupeptin
1mM	Phenyl methyl surfonyl fluoride(PMSF)

beads washing buffer2

50mM	Tris-HCl (pH7.4)
150mM	NaCl
5mM	EDTA (pH8.0)
0.1%	Digitonin

lysis buffer3

20mM	Tris-HCl (pH7.4)
137mM	NaCl
0.5%	TritonX-100
1mM	EDTA (pH8.0)
60mM	Octyl-β-glucoside (OBG)
25mM	iodoacetamide
10μg/ml	Aprotinin
10μg/ml	Leupeptin
1mM	Phenyl methyl surfonyl fluoride(PMSF)

beads washing buffer3

20mM	Tris-HCl (pH7.4)
137mM	NaCl
0.5%	TritonX-100
1mM	EDTA (pH8.0)
12mM	Octyl-β-glucoside (OBG)

表２　Sample bufferの組成

Sample buffer (2×)

125mM	Tris-HCl (pH6.8)
20%	Glycerol
4%	SDS
10%	2-mercaptoethanol (2ME)
0.005%	Bromo phenol blue (BPB)

表３　使用したDNAプライマー

プライマー名	塩基配列（5’→3’）
cathepsinL sense	ttctcacgctcaaggcaatcagg
cathepsinL antisense	ggttgtcccggtctttggctatt
cathepsinB sense	gccttccttccacccgctgtc
cathepsinB antisense	accattacagccgtccccacact
HPRT sense	tgatgaaccaggttatgacctag
HPRT antisense	ccagcaagcttgcaaccttaacc

本論

第一章　TLR9 リガンド認識メカニズムにおける新規関連分子、カテプシンの発見

背景

TLR のリガンド認識において、co-receptor の存在は非常に重要な役割を担っている。例えば TLR4 は病原微生物の膜成分である Lipopolysaccharide(LPS)を細胞表面で認識しているが、この認識には co-receptor である LPS-binding protein(LBP)、CD14 及び MD2 の働きが大きく影響を及ぼす。中でも MD2 は LPS 及び TLR4 の各々と結合して、まさに直接 LPS 認識に関わっている[46, 47]。また TLR1/2 ヘテロダイマーは膜構成成分のトリアシル基を持つリポタンパク質を認識し活性化するが、CD14 はこの反応性をも増強する[48]。同様に、CD36 が TLR2/6 ヘテロダイマーがジアシル基を持つリポタンパク質を認識するときに必要だということも示されている[49]。

co-receptorやアクセサリー分子探索からのアプローチで細胞表面TLRの認識メカニズム解明が進んでいる。また細胞内部のTLRにおいても、細胞内移動を調整する分子としてUnc93b1が同定された[50](図3)。またHMGB1がTLR9のリガンドであるCpGと結合してTLR9の反応を増強するという発見がなされた[51, 52]。また、このHMGB1や抗菌ペプチドであるLL37、抗DNA抗体などのDNA結合分子がTLR9の自己DNAに対する反応性を増強するという事実が、TLR9と自己免疫疾患との関連性を裏付けている[53, 54]。これよりTLR9の研究は病原微生物感染防御のみならず自己免疫疾患治療の観点からも注目され、同時にTLR9のリガンド認識を取り巻く分子の研究から得られる情報の重要性が再度認知された。

そこで今回、TLR9 のリガンド認識における分子メカニズム解明を目的として c DNA ライブラリを用いた Functional Cloning を実行し、新規関連分子の探索を試みた。

結果

各種細胞株におけるCpG-Bに対するNF-κB反応性の相違

TLR9 の反応性を促進する分子を探索するために、まず TLR9 のリガンドである CpG に対して反応を示さない細胞株を探索した。マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7、マウス B 細胞株 M12 及び IL-3 依存性のプロ B 細胞株 Ba/F3 にそれぞれ CpG-B 刺激を加えたとき、RAW264.7 と M12 細胞においては CpG-B 刺激により IκBα分子の分解が起こり、NF-κB が活性化されたが、Ba/F3 細胞に関しては IκBαの分解は認められなかった(図 1-1)。また、IRAK-1 (IL-1R associated kinase-1) 分子のリン酸化は TLR からのシグナル伝達ひいては NF-κB の活性化に必須のイベントであるが[55]、リン酸化後に検出される IRAK-1 分子の分解を再確認した。IκBαの分解と同様に、IRAK-1 の分解も Ba/F3 でのみ認められなかった。一方で TLR2/TLR6 ヘテロダイマーのリガンドである FSL-1 で刺激したとき、三細胞株全てにおいて NF-κB の活性化及び IRAK-1 の分解が認められた(図 1-1)。TLR9 と TLR2/TLR6 は共通のシグナル伝達経路を利用していることを考えると、Ba/F3 細胞はシグナル伝達の段階ではなく、TLR9 に特異的なリガンド認識段階に何らかの欠陥があり、それにより CpG-B 刺激に対して低反応性であると推測される。

また、Ba/F3 細胞における TLR9 の発現量を確実にするために、TLR9-flag を発現させた Ba/F3/TLR9-flag 細胞を作成した。TLR9-flag の発現に関しては、細胞溶解液を抗 flag 抗体により免疫沈降し抗 TLR9 抗体を用いたウエスタンブロッティング法によって確認した。この Ba/F3/TLR9-flag 細胞に CpG-B 刺激を加えた場合にも、IκBα分子の分解は認められなかった(図 1-2A)。Ba/F3 細胞が CpG-B 依存的な NF-κB 活性を示さないことをさらに確実にするために、Ba/F3 に TLR9-GFP と NF-κB レポーター遺伝子、NF-κB -luciferase を発現させて解析した。TLR9-GFP の発現に関しては、細胞溶解液を抗 GFP 抗体で免疫沈降し抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロッティング法によって確認した。この Ba/F3/TLR9-GFP/NF-κB-luciferase 細胞において TLR2/TLR6 のリガンドである MALP-2 で刺激を加えたときにのみ NF-κB 活性化が認められた。Ba/F3 細胞は TLR9－GFP を発現させても CpG-B に対する低反応性に変化はなかった(図 1-2B)。対照的に、B 細胞株である M12 は MALP-2 刺激と同様に CpG-B 刺激に対しても NF-κB の活性化が認められた。

Ba/F3 細胞におけるCpG-B刺激依存的なNF-κB活性に関与する分子の探索

Ba/F3 細胞は CpG-B 刺激に対して NF-κB を活性化しなかったが、前述の通りこれは TLR9 の CpG-B 認識段階に必要な分子が欠損しているためと考えることができる。そこで、この分子を探索するべく Functional cDNA Cloning を実施した(図 1-3)。

まず NF-κB の活性化をフローサイトメトリーで検出するために Ba/F3 細胞に

NF-κB-GFP レポーター遺伝子と、TLR9 の発現を確実にするために TLR9-flag 遺伝子を導入した。さらに TLR4/MD2/CD14 を発現させることで、コントロールとして LipidA 刺激による NF-κB 活性化に伴う GFP 発現誘導を確認できるようにした(図 1-4)。補完実験に使用する細胞として、定常状態では GFP 発現がほとんど検出されず、LipidA 刺激 24 時間後にはおよそ 2 乗オーダーまで発現上昇するものを選んだ。さらにこれより TLR リガンド刺激後 24 時間が GFP 蛋白の合成に十分であると判断し、以後の NF-κB-GFP レポーターアッセイの刺激時間に設定した。

一方で、既に CpG-B に対する NF-κB 活性能を保有している RAW264.7 細胞及びマウス脾臓細胞由来の cDNA ライブラリをレトロウイルスベクターに組み込んで作成し、これをウイルス感染によって Ba/TLR4/MD2/CD14/TLR9-flag/NF-κB -GFP 細胞に導入した。このとき、同細胞に IRES-GFP 遺伝子を同様に発現させ、ウイルス感染効率を恒常的な GFP 蛋白の発現によって確認したところ 93%の細胞が無刺激時に GFP 蛋白を発現していた（図 1-5 上)。これよりライブラリ遺伝子もまた高確率で細胞に導入されたと推測される。

cDNA ライブラリを導入した細胞群に CpG-B 刺激を加えて 24 時間後に GFP を発現した集団をフローサイトメーターのソーティング機能により分別し、GFP 発現が定常状態に戻るまで培養維持した。分別作業を 3 回繰り返すことで CpG-B 刺激に対して強い NF-κB 活性を示す Ba/F3 細胞群を濃縮し、最終的に全細胞数の約二割を占めるに至った（図 1-5 下)。この段階において、限界希釈培養法を用いて CpG-B 応答性モノクローナル細胞を選別した。代表的なものを図 1-6 において No.1ー8 として示す。各ポジティブ細胞が含有するライブラリ由来遺伝子をそれぞれクローニングし、再度 Ba/TLR4/MD2/CD14/TLR9-flag/ NF-κB-GFP 細胞に導入した。これらの細胞に CpG-B 刺激を加えて GFP の発現を確認することにより、Ba/F3 細胞に CpG-B 刺激依存的 NF-κB 活性化を促す責任遺伝子としてカテプシン L とカテプシン B を同定した。Ba/F3 細胞にカテプシン B あるいはカテプシン L を発現させたとき、CpG-B 刺激を加えると NF-κB に伴う GFP の発現上昇が確認された(図 1-8A)。

<u>CpG 認識に重要な分子として同定されたカテプシン L とカテプシン B</u>

Functional cloning によって Ba/F3 細胞において TLR9 の活性化に重要な分子として見出されたカテプシン B/L は共にシステインプロテアーゼとしての機能を有し、パパインファミリーに所属している[56-61]。両カテプシンは細胞内においてエンドソームやリソソームに局在しているが、その活性化には小胞内の酸性化が必須である[57, 59]。活性化機序として、不活性な前駆体（プロカテプシン）として合成されたものがアミノ末端のプロドメイン切断により活性化状態（カテプシン）となることが報告されている[57]。このときプロドメイン切断の役割を担うプロテアーゼにはカテプシンファミリーのメンバーも含まれることから、カテプシンは互いに切断し活性化するという相互作用

機序を形成している[57, 59]。

カテプシンの分子機構としては、図 1-7 に示したカテプシンＬのモデル図のように分子中央に V 字型の溝(V-shape active site cleft)が存在し、ここに基質が挿入されて切断が行われる[58, 60]。V 字溝はその左右に位置する二つのドメインにより形成されているが、各ドメインの中央あたりにはそれぞれシステイン残基(C)とヒスチジン残基(H)が存在し、両残基がイオンペアを形成することが酵素活性の触媒機構に不可欠である[58, 60]。

現在までに、カテプシンは MHC クラスⅡ分子と結合しているインバリアント鎖及び外来抗原の切断を行い、抗原提示に必須の役割を担っていることが報告されている[56, 57, 61]。

各種細胞株におけるカテプシン L 及びカテプシン B の発現

Ba/F3、M12、RAW264.7 細胞に発現しているカテプシン L 及びカテプシン B をコードしているｍRNA を調べたところ、Ba/F3 を含めた全ての細胞株において両遺伝子が発現していることが分かった(図 1-8C)。しかしカテプシン L に関して特に顕著であるが、Ba/F3 における発現レベルは RAW264.7 細胞や M12 細胞と比較して低く、TLR9 の反応に十分ではないと判断される。実際に RAW264.7 や M12 細胞においては抗カテプシン抗体によるウエスタンブロッティング法でカテプシン蛋白が検出されるが、Ba/F3 細胞ではほとんど検出されない(図 1-8A)。そしてカテプシン高発現 Ba/F3 細胞においては CpG-B 刺激に対して NF-κB 活性が確認された。

カテプシンの酵素活性を失わせた変異体による検討

次に、TLR9 の活性化にはカテプシンの酵素活性が必要かどうかを検討するためにカテプシンの酵素活性を失わせる変異体を用いて実験を行った(図 1-8A)。前述したカテプシンの活性中心を形成するヒスチジン残基(H)をアラニンに置換したカテプシン L 変異体(H163A)とカテプシンＢ変異体(H199A)を作成した。また 2000 年に The FASEB Journal に報告されている furless マウスに認められるカテプシン L 変異(G149R)もまた酵素活性を失わせることが明らかであるので、変異体を作成し使用した[62]。これらのカテプシン変異体の分子量を確認したところ、野生型とは明らかに異なっていたが、おそらくカテプシンが未成熟な状態（プロカテプシン）から成熟に至るプロセシングの段階が障害されているためと考えられる。これらの酵素活性を欠いたカテプシン B/L 変異体を野生型と同等量 Ba/TLR4/MD2/CD14/TLR9-flag/NF-κB-GFP 細胞に発現させたが、Ba/F3 細胞における CpG-B 刺激に対する NF-κB 活性の増強は認められなかった。

TLR9 活性におけるカテプシンファミリーメンバーの関与

カテプシン B/L は、システインプロテアーゼ、パパインファミリーに属しているが、

多くのメンバーが同分類に所属する[56-61]。ヒトにおいては 11 種類のシステインプロテアーゼが認知されている[56, 58, 60]。げっ歯類においては、カテプシン B/C/F/H/K/L/O/S/X/W の 10 種類が存在するが、この内カテプシン B/F/H/K/L/S はエンドペプチダーゼである[56]。

カテプシン B/L 以外の他のエンドペプチダーゼカテプシン（カテプシン S/F/H）が CpG-B 刺激に対する反応性に影響するかを検証した。このときカテプシン K に関しては、発現が破骨細胞と卵巣に限局されているため除外した[56]。興味深いことにカテプシン S と F においてはカテプシン L、B と同様に Ba/F3 細胞の CpG-B 依存的な NF-κB 活性を増強したが、カテプシン H を強制発現させても Ba/F3 の CpG-B 刺激に対する NF-κB 活性反応に影響を及ぼさなかった(図 1-8B)。

カテプシン酵素阻害剤が TLR3/7/9 活性に及ぼす抑制効果

強制発現させた TLR9 ではなく、生来発現している TLR9 の反応におけるカテプシンの役割を検討するために、B 細胞株 M12 の CpG-B 刺激に対する NF-κB 活性に対するカテプシン阻害剤の影響を調べた。阻害剤として、システインプロテアーゼ全般を阻害剤するロイペプチン、カテプシン L の阻害剤、Li-I、カテプシン B の阻害剤、CA-074 Me、そして陰性コントロールとしてアスパラギン酸プロテアーゼの阻害剤、ペプスタチンを用いた。薬剤処理の後、M12 細胞を CpG-B と TLR2/TLR6 のリガンドである FSL-1 で刺激し、NF-κB の活性化をルシフェラーゼの活性で検出したところ、ペプスタチンを除く全てのカテプシン阻害剤が CpG-B 依存的な NF-κB 活性を抑制した。一方で、FSL-1 刺激に対しては影響を及ぼさなかった(図 1-9)。

次に、各種TLRリガンド刺激による脾臓由来初代培養B細胞反応におけるカテプシン阻害剤の影響を検討した。M12 細胞と同様に、脾臓B細胞を薬剤処理した後にCpG-B、TLR7 リガンドであるLoxoribine、TLR3 リガンドであるpolyI:C、TLR1/TLR2 リガンドである Pam_3CSK_4で刺激した。CpG-B刺激 24 時間後に細胞上に発現している共刺激分子CD86 を特異的な抗体で染色したところ、CD86 分子の細胞表面発現上昇はカテプシン阻害剤処理によって抑制された(図 1-10A)。同様に、カテプシン阻害剤はLoxoribineやpolyI:C刺激によるB細胞反応をも抑制したが、Pam_3CSK_4刺激による反応には影響を及ぼさなかった。

また、TLRリガンド依存的なB細胞増殖反応についても検討した。その結果、CD86 の実験結果と同様に、ペプスタチンを除く全てのカテプシン阻害剤がCpG-BとLoxoribine刺激によって引き起こされるB細胞増殖を抑制したが、Pam_3CSK_4刺激による反応には影響を及ぼさなかった(図 1-10B)。

カテプシン阻害剤による TLR9 の CpG-B 認識抑制

では、カテプシンは TLR9 の反応にどのように関与しているのかという疑問を解決するために以下の実験を行った。まず、TLR のシグナル伝達カスケードの比較的上流に位

置する IRAK-1 のリン酸化に関連した事象であるこの分子の刺激依存的な蛋白分解を、M12 細胞と RAW 細胞を用いて確認した。TLR9-GFP を発現させた M12 細胞と RAW264.7 細胞はカテプシン阻害剤による処理の後、CpG-B と FSL-1 で刺激を加えた。M12 と RAW264.7 両細胞においてカテプシン L と B それぞれの阻害剤によって CpG-B 刺激依存的な IRAK-1 の分解が抑制された(図 1-11)。一方で FSL-1 刺激による IRAK-1 分解はカテプシン阻害剤による影響を受けなかった。

次に、CpG-B の細胞内取り込みについてカテプシン阻害剤の効果を確認した。M12 細胞をカテプシン阻害剤で処理した後に FITC で標識した CpG-B (CpG-B-FITC) で刺激を加え、インキュベートした。刺激後、細胞表面の CpG-B-FITC を可能な限りクエンチングし、細胞が発する蛍光強度をフローサイトメーターで解析した。細胞内部に取り込まれた CpG-B-FITC は 37℃条件下で刺激、培養した M12 細胞と、陰性コントロールとして 4℃条件下、アジ化ナトリウム添加培地で培養しエンドサイトーシスを阻害した状態にて刺激を加えた M12 細胞とを比較することで確認した。その結果 CpG-B-FITC 添加後 30 分と 120 分ではっきりとリガンドの細胞内取り込みが確認されたが、この取り込みに対してカテプシン阻害剤は影響を及ぼさなかった(図 1-12A)。

TLR9 が CpG-B を認識する場であるリソソームへの CpG-B の移動についてカテプシン阻害剤の効果を確認した。M12 細胞を Rhodamine で標識した CpG-B (CpG-B-rhodamine) で刺激した後に、共焦点顕微鏡でリソソームのマーカーである lysoTracker と共に rhodamine を検出した。CpG-B-rhodamine は lysotracker と共局在していたが、カテプシン阻害剤はこの細胞内分布に影響を及ぼさなかった(図 1-12B)。

TLR9 と CpG-B の結合に対するカテプシンの影響を確認した。以前の報告で、TLR9 を発現させたヒト腎癌細胞株 293T を用いて TLR9 と CpG-B の直接結合が証明されている[37]。これを基に TLR9-GFP を発現させた 293T 細胞をビオチン化した CpG-B で刺激した後、ストレプトアビジンアガロースで免疫沈降した。ビオチン化 CpG-B と共沈してきた TLR9GFP は抗 GFP 抗体で確認した。カテプシン L 阻害剤、Li-I はこの共沈に対して影響しなかったが、カテプシン B の阻害剤 CA-074 Me は TLR9-GFP の共沈を抑制した(図 1-13)。

考察

近年の研究より TLR9 のリガンド認識に関与する分子が数多く探索研究されているが、それでもなお解明されていない分子メカニズムが多く残されている。その理由として、TLR9 のリガンド認識に影響を及ぼすさらなる分子が存在し、見出されていない可能性が考えられる。TLR4 研究における MD-2 分子の位置づけからも理解されるように、TLR のリガンド認識において co-receptor が果たす役割は大きい。それゆえに TLR9 においても新規関与分子を探索することは大きな課題であった。今回 Functional cloning 法により TLR9 による CpG 認識に重要な新規分子としてカテプシンを同定したわけだが、この結果は今後の TLR9 の研究において貢献していくと思われる。具体的には、本研究をはじめとする TLR のリガンド認識機構解析の進展に留まらず、カテプシンをターゲットとした薬剤による病原体感染防御及び自己免疫疾患に対する臨床的なアプローチや免疫賦活アジュバンドとして有用な CpG の効果改善等の発展が見込まれる。

Functional Cloning に用いた Ba/F3 細胞は、TLR2 や TLR4 のリガンド刺激に対しては強い NF-κB 活性反応を示すが、TLR9 リガンドである CpG 刺激に対してはほとんど反応しない(図 1-1, 4)。また、Ba/F3 細胞に TLR9 を強制発現させたが反応性に変化はなかった(図 1-2)。これより Ba/F3 細胞において TLR のシグナル伝達は正常に機能し、TLR9 リガンド認識段階において TLR9 以外に何らかの分子が欠損していると考えられる。この性質を利用して Functional Cloning を実施し、TLR9 の CpG 認識に重要な分子としてカテプシンを同定した。Ba/F3 細胞にカテプシンファミリーメンバーを発現させると、レポーターアッセイにおいて CpG 刺激に対する NF-κB 活性は確かに増強された(図 1-8)。ところが TLR2 及び TLR4 のリガンド刺激に対する強い反応には及ばなかった。また RAW264.7 細胞や M12 細胞においては CpG 刺激に対する IRAK-1 や IκBα分子の分解現象が TLR2 リガンド刺激時と同等に認められたこと(図 1-1)に対し、Ba/F3 細胞はカテプシンを強制発現させた場合でも、CpG 刺激依存的な IRAK-1 や IκBa 分子の分解現象は認められなかった (データ省略)。これらの結果は Ba/F3 細胞が TLR9 リガンドに対して十分な NF-κB 活性反応を示すためには、カテプシン以外にも必要な分子が存在する可能性を示唆している。Ba/F3 細胞の CpG 刺激に対する NF-κB 活性を補完するためにはさらなる探索が必要である。

次いで TLR9 活性におけるカテプシンの効果を検証した。Ba/F3 細胞において野生型のカテプシン B/L を強制発現させた場合に TLR9 活性を増強することに対し、酵素活性を失わせた変異体では無効であった(図 1-8A)。このときカテプシン B/L の変異体の発現パターンは野生型のものとは大きく異なっていた。カテプシンはプレプロカテプシン、プロカテプシン、カテプシンとプロセシングにより形態を変えて成熟し、酵素活性を保有するようになる[57]。野生型カテプシンは正常に成熟段階に達するが、変異型カテプ

シンは問題なくタンパクを発現しているものの大部分が未成熟な状態であった。この酵素活性を持たない変異体をBa/F3細胞に発現させてもCpG刺激に対するNF-κB活性は認められなかった。この結果に加え、カテプシンの酵素活性阻害剤がTLR9活性を抑制したことから(図1-9, 10)、TLR9のCpG認識に重要なのはカテプシンの蛋白自体ではなくその酵素活性であることが明らかである。

カテプシンB/Lの酵素活性阻害剤は、興味深いことにTLR9リガンドのみならず、TLR7やTLR3リガンド刺激によるB細胞活性反応をも抑制した(図1-10)。ゆえにカテプシンB/Lは細胞内に発現している核酸認識TLRに対して影響を及ぼしていることが示唆された。カテプシンがTLR3/7/9それぞれにおいて同様に影響しているのか、あるいは特異的な関与があるのかは興味深い点である。例えばTLR9のリガンド認識はpH依存的でエンドリソソームの酸性化が必須であるが、TLR3/7はpH非依存的である。この性質の差異とカテプシン B/L を含むカテプシンファミリーメンバーの大部分が酵素活性を発揮する至適pHを酸性側に設定していることと関連があるのかもしれない。

またカテプシンの作用メカニズムへアプローチしたところ、カテプシンB/Lの酵素活性阻害剤は共にCpG刺激依存的なIRAK-1分子の分解を抑制し(図1-11)、CpGの細胞内取り込みやそれに続くエンドリソソームへの細胞内移動には影響を及ぼさないことが明らかとなった(図1-12)。初期のシグナル伝達を抑制しCpGの動態に問題がないこと、さらに前述のカテプシンのプロセシング及び酵素活性がリソソームの低pH環境で起こる現象であることを考え合わせると、カテプシンB/Lの作用点はTLR9がCpGを認識するエンドリソソーム内に限局される。これよりカテプシンがTLR9のリガンド認識の現場に存在し影響を与えていると推測される(図1-14)。

さらにカテプシンBの阻害剤は293Tに強制発現させたTLR9とCpGの結合を抑制した(図1-13)。これよりカテプシンBはエンドリソソームにおいてTLR9とCpGの直接結合を作用点としていることが示唆された。カテプシンの酵素活性がTLR9のリガンド認識に必要であることを考え合わせると、カテプシンBの基質はTLR9とCpGとの直接結合に関与していることが示唆された。一方、カテプシンL阻害剤はCpG刺激依存的なIRAK-1分子の分解を抑制したが、293T細胞においてカテプシンBの阻害剤とは異なりTLR9とCpGの結合には影響していないという結果であった。これよりカテプシンLはTLR9とCpGの結合後に作用していると推測することができる。TLR9がCpGと結合した後、シグナル伝達より前に起こる事象としてはTLR9のCpG刺激依存的な構造変化が報告されているが[39]、これがカテプシンLの作用点かもしれない。また、TLR9とCpGの結合以外にもTLR9の活性に影響を及ぼす事象があり、カテプシンLはそちらを抑制している可能性も考えられる。本研究で実施したTLR9のリガンド結合実験は非常に人工的な実験系であり、今後のカテプシンB/Lの作用点解明については、まず293T細胞以外の細胞株や生理学的に生体に近い初代培養細胞を用いて検討する必要がある。

以上より、CpG認識においてカテプシンの作用点は少なくとも2点あり、Ba/F3細胞

においてはその両方が損なわれていると推測される。カテプシン B/L をそれぞれ単独で Ba/F3 細胞に発現させた場合に TLR9 活性の増強効果が確認されたことについては(図 1-8A)、おそらく mRNA レベルで確認されたように微量ではあるが、Ba/F3 細胞がもともと両カテプシンを発現しているためと考えられる(図 1-8C)。また Ba/F3 細胞にカテプシン L とカテプシン B を共発現させた場合には、カテプシン B/L 単独発現細胞よりも TLR9 活性増強効果が顕著であったが（データ省略)、この結果はカテプシン B/L の作用点が少なくとも 2 点あるという可能性を裏付けている。また TLR9 の反応性は HMGB-1 や抗菌ペプチドである LL37、HSP90 などの DNA 結合分子による影響を受けている[51, 52, 63]が、カテプシンがこれらの分子に作用して TLR9 と CpG の結合に働きかけている可能性も推測されうる。CpG と TLR9 の結合は単純なものではなく、多くの分子が関与する複雑な相互作用であると考えられ、この分子メカニズムのさらなる解明について興味が尽きない。TLR9 のリガンド認識メカニズムを分子レベルで網羅的に解析していくことは TLR9 が関与する感染防御や自己免疫疾患のコントロールにつながり、病原体感染時の効果的な防御体制の誘導や自己抗原認識の抑制などを現実化するには不可欠の研究である。

カテプシン B/L に加えて、カテプシン S/F も Ba/F3 細胞において TLR9 の活性反応を増強することから(図 1-8B)、抗原提示細胞の抗原提示機能におけるカテプシンの蛋白分解作用と同様に TLR9 による CpG 認識においてもカテプシンファミリーで作用が重複している可能性が示唆された。これよりカテプシンファミリーにおいて TLR9 活性増強効果の代替機能が推測される。例えば図 1-11 において M12 と RAW264.7 両細胞の CpG-B 刺激依存的な IRAK-1 の分解がカテプシン B/L それぞれの阻害剤によって抑制されたが、M12 細胞と比較して RAW264.7 細胞は阻害剤の影響が少ない結果となった。この理由として、B 細胞と比較してマクロファージ細胞においては発現しているカテプシンの種類が多くさらに活性も強いため[61]、カテプシンファミリーの代替機能により阻害剤の効果が減弱された可能性が考えられる。

また本研究と同時期に、カテプシン K と TLR9 活性との関連についての論文が東京医科歯科大学　朝霧らによって報告された[64]。彼らは、カテプシン K の阻害剤(NC-2300)がアジュバンドによって誘導した関節炎(adjuvand-induced arthritis, AIA)の病態改善に効果があることを証明した。実際に、AIA を発症させたマウスの後足首の腫れは NC-2300 の経口投与により改善した。この実験において彼らは AIA を起こすために *Mycobacterium butyricum* を含んだ complete Freund’s adjuvant(CFA)を用いているが、このアジュバンドを認識すると考えられる TLR に着目し、NC-2300 を処理したときの各種 TLR 刺激に対する骨髄細胞由来樹状細胞の活性反応を調べた。その結果、NC-2300 処理によって CpG 刺激による樹状細胞のサイトカインやⅠ型インターフェロンの産生、補助刺激分子の発現上昇が抑制されることが明らかとなった。さらにカテプシン K ノックアウトマウス由来の樹状細胞においては CpG 刺激に対するサイトカイン産生が抑制さ

れている結果を示した。またこのマウスに多発性硬化症のモデルである experimental autoimmune encephalomyelitis(EAE)を発症させた場合に野生型マウスと比較して麻痺に関する臨床スコアが低く、組織像から骨髄炎症も軽度であることを示し、自己免疫疾患における TLR9 活性とカテプシン K との関与を示唆した。

ところが最近、別の二つのグループの報告によると、NC-2300 以外の別のカテプシン K 特異的阻害剤を処理して CpG 刺激に対する樹状細胞活性反応を検討したところ抑制効果は認められなかった[65]。またカテプシン K ノックアウト由来の樹状細胞においても CpG 刺激に対して問題なく応答することを示した[65, 66]。そもそも NC-2300 は朝霧らの研究室において独自に樹立した阻害剤で、主にカテプシン K を阻害するがカテプシン B/L/S も阻害することを朝霧らも証明している。さらに NC-2300 を用いた実験においては、カテプシン B/L/S も十分に阻害しうる量を細胞に処理していた。またカテプシン K の発現は非常に組織特異的（破骨細胞や卵巣など）であるため、樹状細胞においての発現はカテプシン K よりもカテプシン B/L/S が圧倒的に高い。以上より、NC-2300 処理による CpG 刺激依存的な樹状細胞活性反応を抑制する効果はカテプシン K のみならずカテプシン B/L/S も阻害した結果である可能性が考えられ、免疫細胞においてはカテプシン K よりもカテプシン B/L/S などが主に TLR9 活性に働きかけているのではないだろうか。

以上の考察に加えて、本研究によるカテプシン B/L/S/F が TLR9 活性増強活性を持つという結果より(図 1-8A, B)、カテプシン K 以外に他のカテプシンも疾患治療薬のターゲットとしての可能性を十分に持っていることが示された。まずは各カテプシン阻害剤が自己免疫疾患の病態改善に効果があるか検討する必要がある。また TLR9 による CpG 認識を取り巻くカテプシンファミリー間の関係を解明することは新たな疾患治療を考えるうえでの一助となるだろう。

本研究結果より、カテプシンは TLR3/7/9 の核酸認識メカニズムにおいて TLR 活性反応に影響を与えていることが明らかとなった[67]。さらにカテプシンが TLR9 による CpG 認識の場であるエンドリソソームにおいて pH 依存的に基質を切断し、細胞活性反応に影響を与えている可能性が示唆された。この発見は TLR9 によるリガンド認識のさらなる解明への口火を切ったといえる。

第二章　核酸認識 TLR の cleaved form に関する研究

背景

本論第一章において、エンドリソソームで行われる TLR9 の CpG 認識にカテプシンのプロテアーゼ活性が重要であることを証明したが、第二章ではカテプシンの TLR9 応答における役割について解析を進めた。カテプシンが切断する基質として第一に TLR9 が推測されることは必至である。それについては先日、カテプシンなどの pH 依存的なプロテアーゼが TLR9 を切断している可能性があるという結果が二つのグループから発表された[65, 66]。また自らもカテプシンが TLR9 を切断し機能的フォームを生じるのではないかと推測し、TLR9 の構造について検討を加えた。

各種細胞株に TLR3/7/9 を発現させ、その発現パターンをウエスタンブロットにおいて確認したところ、各 TLR において今まで論文に掲載されている全長サイズのバンドのみならず、その下部にもバンドが検出された。これより TLR が切断され、さらに機能を有するのではないかという仮説のもと TLR9 を中心として実験を行った。

結果

TLR3/7/9 強制発現細胞において検出された TLR cleaved form

CpG 刺激に対して細胞活性反応を示さない Ba/F3 細胞及び CpG 刺激に対して細胞活性反応を示す M12 細胞や RAW264.7 細胞に発現している TLR9 はどのような形態を呈しているか、各細胞株に TLR9-GFP を遺伝子導入し確認した。また、同様に TLR3/7 も Ba/F3 細胞、M12 細胞、RAW264.7 細胞の三細胞株に発現させてそのフォームを確認した。

TLR9 に関して、約 150kD のあたりに全長サイズの TLR9 (full-length TLR9) が確認され、full-length の下部約 100kD のところに切断された TLR9(cleaved TLR9)が検出された(図 2-1C)。また各細胞株において、full-length TLR9 と cleaved TLR9 の発現している割合は異なっていた。Ba/F3 細胞においては発現している TLR9 のうち大部分が full-length TLR9 として検出された。また M12 細胞は、Ba/F3 細胞と比較して full-length TLR9 の発現割合が少なく、cleaved TLR9 のバンドがしっかりと確認できた。一方 RAW264.7 細胞においては、cleaved TLR9 のタンパク発現が際立って多いという結果になった。

TLR3 に関しても、全ての細胞株において cleaved form が検出された(図 2-1A)。Ba/F3 細胞においては TLR9 と同様に、発現している TLR3 のうち大部分が full-length TLR3 として検出されたが、M12 細胞と RAW264.7 細胞では cleaved TLR3 が主に発現していた。

TLR7 もまた、全ての細胞株において cleaved form が検出された(図 2-1B)。しかし Ba/F3 細胞において、TLR3/9 と異なり cleaved TLR7 がはっきりと検出され、full-length TLR7 と cleaved TLR7 の発現割合において三細胞株間に大差はなかった。

PRAT4A ノックダウンによる TLR9 cleaved form の消失

図 2-1 より、TLR3/7/9 強制発現細胞において各 TLR は切断されているが、これは小胞体やゴルジ装置、エンドソーム、リソソームなどの細胞内小器官で行われていると推測される。そこで核酸認識 TLR の各コンパートメントへの移動を制御していると考えられている分子に関連して解析した。

我々の研究室においては以前に、TLR4 に結合するとして PRAT4A(a protein associated with TLR4)分子を同定したのだが、この分子のノックアウトマウスが TLR3 を除く TLR リガンドの刺激に対するサイトカイン産生を阻害することを報告した[68, 69]。また、PRAT4A 分子は TLR4 だけでなく TLR9 とも会合し、この分子をノックダウンすることで TLR9 のリガンド刺激依存的なリソソームへの移動が阻害されることも証明した。PRAT4A ノックダウン細胞において TLR9 及び TLR3 がどのような形態を呈しているのか確認した。

その結果、M12/TLR9GFP 細胞にさらに PRAT4A ノックダウンベクターを導入した細胞

において、full-length TLR9 はコントロールベクターを導入した M12/TLR9GFP 細胞と同様に発現しているが、cleaved TLR9 は消失していた(図 2-2 右)。一方 TLR3 に関しては、M12/TLR3GFP 細胞において PRAT4A ノックダウンベクターを導入したものもコントロールと同じく、full-length TLR3 と cleaved TLR3 の二つのフォームが検出された(図 2-2 左)。

TLR3/9 の切断に必要な Unc93-B 分子

また、Unc-93B 分子は核酸認識 TLR と生理学的に結合することで、TLR を ER からエンドソームまで運ぶ役割を担っている。この分子のミスセンス変異(H412R)を持つ 3d マウスにおいては、TLR3/7/9 リガンド刺激によって誘導されるサイトカイン産生や共刺激分子の発現上昇が阻害され、またマウスサイトメガロウイルス(MCMV)に対して感受性を示すと報告されている[50]。さらに In vitro において、H412R 変異を持つ Unc93-B 分子は TLR との結合が認められないことが証明された[50, 70]。この Unc93-B 変異体を用いた実験により TLR3/7/9 の切断における Unc93B1 分子の関与を検証した。

Ba/F3 細胞に、flag-His6(以下 fH と記載)タグをつないだ TLR3/7/9 を発現させた Ba/TLR3fH 細胞、 Ba/TLR7fH 細胞、 Ba/TLR9fH 細胞を作成し、これらの細胞にさらに Unc93-B 野生型(WT)と Unc93-B 変異型(H412R)を遺伝子導入した。各細胞に発現している TLR を確認したところ、TLR9 に関してコントロール細胞((-): Ba/TLR9fH 細胞)では full-length TLR9 のみが検出されたことに対し、Unc93-B(WT)を導入した細胞では cleaved TLR9 が確認された(図 2-3A 右)。TLR3 に関してもコントロール細胞(-)で full-length TLR3 のみが検出されたことに対して Unc93-B(WT)を導入した細胞では cleaved TLR3 が確認された(図 2-3A 左)。TLR3/9 共に Unc93-B(H412R)を発現させた細胞においては、コントロール細胞と同様に full-length form のみが発現していた。一方 TLR7 については、コントロールの Ba/TLR7fH 細胞と同様に Unc93-B(WT)及び Unc93-B(H412R)を遺伝子導入した細胞も full-length form と cleaved form の発現が確認されたが、Unc93-B(WT)を発現させた細胞において cleaved TLR7 タンパクが最も多く発現していた(図 2-3A 中)。

また Unc93-B 分子に会合している TLR3/7/9 を確認したところ、全ての TLR において full-length form のみならず cleaved form も結合していることが明らかになった(図 2-3B)。特に TLR9 に関して、RAW264.7 細胞に Unc93-B(WT)及び Unc93-B(H412R)を発現させて同様の共沈実験を行い、内在性の TLR9 を検出した場合も同様に full-length TLR9 と cleaved TLR9 が共に Unc93-B 分子と結合した(図 2-4A)。

さらに 3d マウスを用いて実験を行った。3d マウス及びコントロールマウスの骨髄由来幹細胞に TLR9fH と mock を遺伝子導入し、さらに GM-CSF を添加した培養液中で培養することで樹立した樹状細胞に発現している TLR9 を確認した。その結果、コントロールマウス由来の樹状細胞には full-length TLR9 と cleaved TLR9 が発現していることに

対して 3d マウス由来の細胞では cleaved TLR9 が消失し、full-length TLR9 のみが強く発現していた(図 2-4B)。

TLR9 細胞表面強制発現変異体における cleaved form の消失

cleaved TLR9 が消失している 3d マウスにおいては TLR9 リガンドに対する反応性が失われ、また PRAT4A ノックダウン細胞についても同様である。これより生体内における cleaved TLR9 の存在意義及び切断メカニズムを明らかにする必要がある。まず cleaved TLR9 を生じるための切断の場について検討するために一つの実験を行った。

前述の通り Unc93-B 分子は TLR と結合し ER からエンドソームまでの細胞内移動を制御しているが、このとき TLR との結合において Unc93-B のアミノ酸 412 番目のヒスチジンが必須である。これは H412R 変異体を用いた実験からも明らかである(図 2-3B)。一方 TLR9 側においては、TLR4 とのキメラ分子を用いた実験より膜貫通領域に結合部位が存在すると報告されている。そこで膜貫通領域までの N 端(外部ドメイン)が TLR9、膜貫通領域と TIR ドメインを含んだ C 端を TLR4 由来のものとしたキメラタンパク(TLR9N4C)を用いて実験を行った。このタンパクの遺伝子は Yale 大学の Ruslan Medzhitov 教授より分与頂いた。彼らのグループの研究により TLR9N4C は EndoH 抵抗性であることからゴルジ装置を通過し、細胞表面に発現することが報告されている[45]。この TLR9N4C を M12 細胞に発現させ TLR9 の発現を確認したところ、cleaved form が消失していた(図 2-5)。

N 末端アミノ酸配列分析による TLR7/9 切断部位の決定

実際に cleaved TLR9 は full-length form のどこを切断されて生じるのかを明確にするために、N 末端アミノ酸配列分析を実施することにした。M12/TLR9GFP 細胞に発現している cleaved TLR9 タンパクを SDS-PAGE で展開し、転写したメンブレンごと切り出し解析を株式会社アプロサイエンスに委託した(図 2-6B 左)。また TLR7 についても、RAW/TLR7GFP 細胞に発現している cleaved TLR7 タンパクをサンプルとして提出した(図 2-6A 左)。その結果、TLR9 はアミノ酸 460 番のセリン(S)と 461 番のスレオニン(T)と 466 番のアスパラギン(N)と 467 番のフェニルアラニン(F)の間で切断され、TLR7 はアミノ酸 460 番のロイシン(L)と 461 番のグルタミン酸(E)と、その直後である 461 番のグルタミン酸(E)と 462 番のアラニン(A)の間で切断されているということが明らかになった(図 2-6AB 右上)。解析により判明した切断部位は、TLR7/9 が外部ドメインに所有している二つのロイシンリッチリピートをつなぐヒンジ領域に位置している(図 2-7AB 右下)。

non-cleaved TLR7/9 のコンストラクト作成

cleaved form が機能的かどうかを検証するために、N末端配列分析により明らかに

なったTLR7/9切断部位をもとにTLR7/9 non-cleaved formコンストラクトを作成した。TLR7に関して、アミノ酸459番のバリン(V)、469番のロイシン(L)、461番のグルタミン酸(E)をそれぞれアラニン(A)に変えたVLE-AAA変異体を作成し、野生型TLR7fHと共にBa/F3細胞に遺伝子導入したところ、VLE-AAA変異体ではcleaved TLR7が消失した(図2-7)。

一方、TLR9については、460番のセリン(S)から467番のフェニルアラニン(F)までを欠損させたd8(deletion 8a.a.)変異体及びd8からさらにN末端側に欠損させるアミノ酸を一つずつ増やしていったd9、d10、d11、d12、d13変異体の遺伝子コンストラクトを作成した。これらの変異遺伝子をmock及び欠損していないTLR9(full)と共にTLR9ノックアウトマウス(KO)及びコントロールマウスの骨髄由来幹細胞に遺伝子導入し、さらにGM-CSF添加培養液中で培養することで樹状細胞に誘導した。各細胞に発現しているTLR9を確認した結果、fullと同様にd8変異体ではcleaved formが検出され、d9及びd10変異体ではcleaved formの発現量が減少していた。そしてd11ではcleavad TLR9がさらに減少し、d12変異体においてはかすかな発現を認めるのみであり、d13で完全に消失した(図2-8A)。これによりTLR9の切断部位はd13の欠損範囲内にあり、N末端配列決定及び実験的結果から推定されるTLR9の切断部位近傍におけるマウスとヒトのアミノ酸配列はよく保存されていた(図2-8B)。

<u>TLR9 non-cleaved変異によるサイトカイン産生の抑制</u>

図2-8Aにおいて樹立した、TLR9変異遺伝子を導入したTLR9KO由来樹状細胞を用いてCpG-B刺激後の各種サイトカイン産生量を比較した。その結果、d8、d9、d10、d11変異体を遺伝子導入した細胞においてはfullと比較して問題なくサイトカインを産生していた(図2-9)。一方cleaved TLR9がほとんど確認できないd12及びd13変異体を発現させた細胞においては顕著にサイトカイン産生量が抑制された。この傾向はIL-12 p40及びIL-6、TNFα産生の全ての場合において観察された。

考察

細胞質内に存在する核酸認識 TLR と細胞表面に存在し細胞膜成分を認識している TLR は、そのリガンドと認識場所を明らかに区別している(図 1)。細胞表面 TLR については、病原微生物をいち早く認識するために細胞の最外部にリガンド結合部を発現していることでその優位性を最大限に利用している。一方、細胞内に存在している TLR 群については発現場所的優位性がない。病原体センサーとして細胞内に存在することの意義を考えると、それはおそらく細胞内でしか遭遇できないリガンドを認識できる点と細胞内での機動性ではないだろうか。しかし実際、核酸認識 TLR の特徴的な細胞内動態や機能のメカニズムについては大部分が未知である。ゆえに細胞内 TLR の生理学的な姿の解明に重点をおいた今回の研究は、これら TLR を取り巻く分子メカニズム解明に寄与すると考えられる。

プロ B 細胞株(Ba/F3) 、B 細胞株(M12) 、マクロファージ細胞株(RAW264.7)に TLR3/7/9 を発現させたところ、各 TLR が切断されていることが明らかとなった(図 2-1)。また TLR3/9 において Ba/F3 細胞において full-length form が主に発現し、RAW264.7 細胞では cleaved form の発現割合が圧倒的に多いことは特徴的であるが、細胞株により発現パターンが異なっている機序は明らかではない。一方、TLR7 に関しては Ba/F3 細胞において cleaved form がしっかりと確認され、三細胞株間において full-length form と cleaved form の発現割合の変化が TLR3/9 ほど著明には認められなかった。これより TLR7 は TLR3/9 とは大きく異なった切断メカニズムを持つと考えられる。また本研究に用いた三細胞株以外の免疫担当細胞や個体において TLR3/7/9 がどのような発現パターンを示すか検討する必要がある。

上記のように TLR3/9 は強制発現細胞株において cleaved form の発現パターンを見る限りでは共通しているが、PRAT4A 分子のノックダウン細胞における発現状態をみると明らかに異なっている。この細胞において TLR3 は問題なく cleaved form を発現しているが、TLR9 においては消失していた(図 2-2)。PRAT4A-independent である TLR3 と PRAT4A-dependent である TLR9 の切断機序に明らかな違いがあると窺い知ることができる。転じて PRAT4A はタンパク修飾という点において、核酸認識 TLR 間の区別を制御していることが示唆された。この分子についてさらなる研究が必要である。PRAT4A ノックアウトマウス由来の細胞においては TLR3 リガンドに対しては問題なく反応するが、TLR9 リガンドに対する反応性が完全に失われていること、及び PRAT4A ノックダウン細胞において TLR9 の刺激依存的な小胞体からリソソームまでの移動が阻害されていることを考えると、TLR9 において切断修飾を受けたフォームが機能的である可能性が示唆されている。すなわち、小胞体からの細胞内移動により切断されるはずの TLR9 が PRAT4A 機能欠損により不完全な形状のままであるため、リガンド刺激による活性化シグナルを

伝達できない状態にあるということが PRAT4A ノックアウトマウスの表現型の一部を説明しているのかもしれない。

TLR9 のリガンド刺激依存的な細胞内移動を制御する分子としてもう一つ、Uuc93-B がある。Ba/F3 細胞に Unc93-B を発現させると、TLR3/9 の cleaved form の発現が著明に増加したことより(図 2-3A)、Uuc93-B は PRAT4A とは異なり TLR9 のみならず TLR3 の修飾にも影響を与えていることが明らかである。また、TLR と結合できない Uuc93-B 変異体(H412R)を Ba/F3 細胞に発現させても cleaved TLR3/9 が検出されないことから、TLR3/9 は Uuc93-B と結合し細胞内移動することで切断修飾を受けることが可能になると考えられる。また、3d マウス由来樹状細胞に TLR9 を発現させた場合に cleaved form が消失していたことは(図 2-4B)、PRAT4A ノックダウン細胞における結果と同様に cleaved TLR9 が機能を有しているのではないかという仮説に対する状況証拠である。

一方 TLR7 に関しては、Unc93-B 分子の強制発現によって発現フォームに大きな変化が生じなかったことから(図 2-3A)、切断修飾という点において TLR3/9 と比較して Unc93-B に対する依存性が低い可能性が示唆された。TLR7 もまた TLR9 と同様に Unc93-B と直接結合すること及びリガンド刺激依存的細胞内移動が 3d マウス由来細胞において阻害されていることから、Unc93-B 分子とは何らかの相互作用を持っているが、その効果は TLR7/9 の間で随分異なっているのではないだろうか。また、TLR7 と PRAT4A 分子との連関についての解析は今後の課題である。

TLR9 の切断が行われる場について、細胞株にTLR9N4Cを発現させることでまず検討した。TLR9N4Cに関して、当初細胞表面局在機能を有するTLR4 の膜貫通領域を持つためにタンパク合成及び修飾後に細胞表面へ出ると報告されたが[45]、それに近年の知見を加えるとTLR9N4CはUuc93-Bと会合できないために、ERでタンパク合成及び一部の糖鎖修飾を受けた後リソソームに向かうことはないと考えることができる。このTLR9N4Cを発現させた細胞においてTLR9 cleaved formは消失した(図 2-5)。これよりTLR9 の切断の場はリソソームである可能性が示唆されたが、明確に結論付けるためにはクロロキン処理やNH_4Cl処理による検討を加える必要がある。さらにTLR9 の切断修飾におけるカテプシンの関与についても、Ba/F3 細胞に各種カテプシンを発現させてTLR9 のフォームを確認する等、検討していく予定である。

では、TLR7/9 cleaved form は機能的なのかという疑問に答えるために、両者の詳細な切断部位を決定し non-cleaved TLR7/9 を作成した(図 2-7, 8A)。TLR7 については N 末端配列分析の結果をもとに難なく TLR7(VLE-AAA)変異体を作成することができたのだが、TLR9 については N 末分析により判明した二箇所の切断箇所以外にも切断部位が存在することが明らかとなった。さらなる切断部位を同定するためアミノ酸欠損変異体を作成し解析した結果、d8 変異体ではcleaved TLR9 が依然として検出されたことに対し、d9 変異体及び d10 変異体ではその cleaved TLR9 の発現が減少した。これより、アミノ酸 458 番目のプロリン(P)と 459 番目のロイシン(L)の間が三つ目の切断部位であること

がわかる。さらに d11 変異体、d12 変異体と段階的に cleaved TLR9 が減少し、最終的に d13 変異体においては消失したことより、454 番目のプロリン(P)と 457 番目のアラニン(A)までの 4 アミノ酸の間隙三箇所においても切断されている可能性があることを証明した。N 末分析による結果と合わせて、計六箇所を TLR9 の切断される可能性のある部位として明確に同定した。これらの non-cleaved コンストラクトを使用して TLR7/9 cleaved form の機能解析を現在進めている。

背景でも触れたが、先日二つのグループからプロテアーゼによって TLR9 が切断され、切断されたフォームが CpG 認識機能を有するという論文が発表された。一つ目の報告はカリフォルニア大学の G.M.Barton らによるものであるが、彼らは TLR9 が切断されていることを示し、ファゴソーム(異物を取り込んだ小胞)内に存在する TLR9 においてはほとんどが切断された状態であることを見出した[66]。また shRNA による Unc93-B の発現阻害実験により TLR9 の切断には Unc93-B による TLR9 のエンドリソソームへの細胞内移動が必要であることを証明した。次いでバフィロマイシン A1 処理により細胞内 pH の低下を抑制した場合に cleaved TLR9 が消失したことより、TLR9 の切断はエンドリソソームにおいて pH 依存的に行われると説明している。切断を担当するプロテアーゼについては、リコンビナントなカテプシンを 293T 細胞に添加したときに TLR9 の cleaved form が増加したことにより、カテプシンが TLR9 の切断に寄与していることが明らかとなった。さらに彼らは TLR9 cleaved form が CpG と結合し、Myd88 とも会合することを示すことでその機能性についても検討を加えている。最終的には TLR9 を強制的に細胞表面に発現させる TLR9-Ist2 融合タンパク質を用いて NF-κB ルシフェラーゼレポーターアッセイを行ったときに NF-κB の活性が抑制され、細胞膜にターゲットされないように変異を加えた Ist2 を TLR9 につないだ TLR9-Ist2(Δ18)を細胞に発現させた場合には NF-κB の活性が回復した。この結果より、TLR9 がエンドリソソームにおいて切断されることが TLR9 の活性に必要であると言及している。

もう一方の報告はマサチューセッツ工科大学の H.L.Ploegh らによるものであるが、彼らはカテプシンファミリーを含むシステインプロテアーゼ全般の酵素活性を抑制する阻害剤(z-FA-fmk)を処理することにより TLR9 の cleaved form が消失することを示した[65]。次いで mass spectrometry により、システインプロテアーゼによる TLR9 の切断部位がアミノ酸 441 番のアラニンから 470 番のアルギニンまでの領域に存在すると推定している。彼らもまた TLR9 cleaved form が CpG と結合することを証明した。さらに TLR9 のアミノ酸 471 番のシステインから 1032 番(C 末端)までの recTLR9-Cter コンストラクトを作成し、これが CpG と結合することも示した。次いで TLR9 の切断部位と予測されたアミノ酸 441 番から 470 番までの領域を削除した TLR9Δ441-470 コンストラクトを作成し細胞に発現させたところ、TLR9 cleaved form が消失していた。さらに recTLR9-Cter、TLR9Δ441-470 コンストラクトをそれぞれ TLR9 ノックアウトマウスの骨髄由来樹状細胞に遺伝子導入した後、これらの細胞を CpG 刺激したときに産生された

TNFαを抗体で染色してフローサイトメトリーにて測定した。その結果 TLR9 野生型と比較して、TLR9 Δ441-470 を発現させた細胞はCpG 刺激に対してほとんどTNFαを産生せず、recTLR9-Cter は野生型には及ばないものの TNFα産生能を示した。また切断を担当するシステインプロテアーゼに関してカテプシン L/S/K の各特異的阻害剤を用いて検討したところ、RAW264.7 細胞においてカテプシン L/S（特にカテプシン L）は TLR9 切断に関与しているがカテプシン K については関与がないという結果が得られた。以上より、エンドリソソームにおける TLR9 の切断はその活性に必須であると結論付けている。

本研究においては TLR9 が切断されていることを証明し、その切断部位を明確に把握したことにより、アミノ酸 13 個のみの欠失により non-cleaved コンストラクトの作成に成功した(図 2-8A)。この各アミノ酸欠損変異遺伝子を TLR9 ノックアウトマウス由来の骨髄細胞に骨髄幹細胞遺伝子導入法により確実に導入した樹状細胞を用いて解析を進めている。解析結果の一つとして、各 TLR9 アミノ酸欠損変異遺伝子を導入した TLR9KO 由来樹状細胞に CpG-B 刺激を加え TNFαや IL-12、IL-6 などの各種サイトカイン産生量を比較したところ、d8～d11 変異体においては問題なくサイトカイン産生が確認されたが、d12 及び d13 変異体においては顕著に産生量が抑制された(図 2-9)。また TLR9 の発現パターンの確認により、d12 変異体はほとんど cleaved form が確認されず、また d13 変異体においては消失していた(図 2-8A)。これより切断された TLR9 は機能に必要であると考えられるが(図 2-10)、TLR9 が切断されることがその機能にどのように影響を及ぼすのか明確にするためにはさらなる解析が必要である。具体的には、ウイルス感染時に重要な生体防御反応である形質細胞様樹状細胞による I 型インターフェロン産生と TLR9 の切断が関係しているのか検討する他、実際にウイルス感染実験を行い各 TLR9 欠損変異体発現細胞がどのような反応性を示すか等を調査していく予定である。これにより前述の二報に加えて、TLR9 cleaved form 及び non-cleaved form の機能をより生理学的に捉えることができると考えられる。また、この二つのグループそれぞれによる TLR7 についての解析結果は supplemental data として掲載されていただけだが、完全に拮抗していた。G.M.Barton らは細胞に強制発現させた TLR7 を検出することで TLR7 も TLR9 のように切断されると報告しているが、H.L.Ploegh らは細胞に発現している内在性の TLR7 を検出することで TLR7 は切断されないと結論付けている。本研究による結果では、強制発現細胞による結果から TLR7 は切断されていると考え、N 末端配列分析により切断部位を決定して TLR9 と同様に non-cleaved form を作成した(図 2-7)。このコンストラクトを用いた実験結果は TLR7 cleaved form について重要な知見をもたらすと思われる。さらに本研究の特徴として、cleaved form という核酸認識 TLR の新たな形態を証明していく中で、Unc93-B や PRAT4A などの共受容体分子と TLR3/7/9 との関連の特異性がクローズアップされてきた。これに関する研究は今後の自然免疫分野において重要な課題の一つである。

今後の展望として、核酸認識 TLR である TLR3/7/9 が切断されることがその機能にど

のように関わるのかをさらに詳細に検討する予定であるが、それにより各 TLR による核酸認識がいかに構造的に制御されているか明らかになるだろう。アプローチの一つとして遺伝子改変マウスは分子の機能を生理学的に解析するのに適当な手段であるが、TLR9 が切断されない遺伝子改変を施したマウスを作成し解析することを検討している。現在までに、核酸認識 TLR がどういった機構で各々のリガンドを確実に認識しているのかは解明されていない。これにはおそらく多段階の制御プロセスがあると推測されるが、TLR9 が切断されることもその制御の一つであるかもしれない。TLR ファミリーは共通のシグナル伝達経路を利用しているので、リガンド認識段階での各 TLR 特異的な制御機構を解明し、その制御に重要な分子をターゲットとした薬剤等によって TLR の活性をコントロールできる可能性が考えられる。これにより、様々な病原微生物感染に対応した効率的な免疫誘導や自己免疫疾患の予防及び治療戦略に発展していくと期待している。

謝辞

本研究をまとめるにあたり、御指導、御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・三宅健介教授に深謝いたします。また数多くの貴重な御助言・御援助を下さいました、同研究室・齋藤伸一郎博士と、御協力いただいた共同研究者の皆様に深く感謝いたします。そして日々の研究において御助言、御協力下さいました東京大学医科学研究所感染遺伝学分野の皆様に心より感謝いたします。

参考文献

1. Ezekowitz, R.A.B. and J.A. Hoffmann, *Innate immunity.* Curr Opin Immunol, 1996. **8**(1): p. 1-2.
2. Fearon, D.T. and R.M. Locksley, *The instructive role of innate immunity in the acquired immune response.* Science, 1996. **272**(5258): p. 50-3.
3. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition.* Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
4. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses.* Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 987-95.
5. Lemaitre, B., et al., *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults.* Cell, 1996. **86**(6): p. 973-83.
6. Tauszig, S., et al., *Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in Drosophila.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(19): p. 10520-5.
7. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, Jr., *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity.* Nature, 1997. **388**(6640): p. 394-7.
8. Fallon, P.G., R.L. Allen, and T. Rich, *Primitive Toll signalling: bugs, flies, worms and man.* Trends Immunol, 2001. **22**(2): p. 63-6.
9. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira, *Toll-like receptors.* Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 335-76.
10. Akira, S. and H. Hemmi, *Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family.* Immunol Lett, 2003. **85**(2): p. 85-95.
11. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling.* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
12. Kawai, T. and S. Akira, *Innate immune recognition of viral infection.* Nat Immunol, 2006. **7**(2): p. 131-7.
13. Schnare, M., et al., *Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses.* Nat Immunol, 2001. **2**(10): p. 947-50.
14. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho, *Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity.* Nat Immunol, 2001. **2**(8): p. 675-80.
15. Wagner, H., *The immunobiology of the TLR9 subfamily.* Trends Immunol, 2004. **25**(7): p. 381-6.
16. Roach, J.C., et al., *The evolution of vertebrate Toll-like receptors.* Proc Natl Acad Sci

U S A, 2005. **102**(27): p. 9577-82.

17. Lund, J.M., et al., *Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(15): p. 5598-603.
18. Heil, F., et al., *Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8.* Science, 2004. **303**(5663): p. 1526-9.
19. Diebold, S.S., et al., *Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA.* Science, 2004. **303**(5663): p. 1529-31.
20. Hemmi, H., et al., *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA.* Nature, 2000. **408**(6813): p. 740-5.
21. Bauer, S., et al., *Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(16): p. 9237-42.
22. Adachi, O., et al., *Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function.* Immunity, 1998. **9**(1): p. 143-50.
23. Kaisho, T. and S. Akira, *Toll-like receptor function and signaling.* J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(5): p. 979-87; quiz 988.
24. Lund, J., et al., *Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells.* J Exp Med, 2003. **198**(3): p. 513-20.
25. Krug, A., et al., *Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9.* Blood, 2004. **103**(4): p. 1433-7.
26. Tabeta, K., et al., *Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(10): p. 3516-21.
27. Alexopoulou, L., et al., *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3.* Nature, 2001. **413**(6857): p. 732-8.
28. Yamamoto, M., et al., *Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling.* J Immunol, 2002. **169**(12): p. 6668-72.
29. Yamamoto, M., et al., *Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway.* Science, 2003. **301**(5633): p. 640-3.
30. Yoneyama, M. and T. Fujita, *Function of RIG-I-like receptors in antiviral innate immunity.* J Biol Chem, 2007. **282**(21): p. 15315-8.
31. Stetson, D.B. and R. Medzhitov, *Antiviral defense: interferons and beyond.* J Exp Med, 2006. **203**(8): p. 1837-41.
32. Yoneyama, M., et al., *Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity.* J Immunol, 2005. **175**(5): p.

2851-8.

33. Meylan, E., et al., *Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus.* Nature, 2005. **437**(7062): p. 1167-72.

34. Kawai, T., et al., *IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction.* Nat Immunol, 2005. **6**(10): p. 981-8.

35. Seth, R.B., et al., *Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3.* Cell, 2005. **122**(5): p. 669-82.

36. Matsui, K., et al., *Cutting edge: Role of TANK-binding kinase 1 and inducible IkappaB kinase in IFN responses against viruses in innate immune cells.* J Immunol, 2006. **177**(9): p. 5785-9.

37. Latz, E., et al., *TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome.* Nat Immunol, 2004. **5**(2): p. 190-8.

38. Hacker, H., et al., *CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation.* Embo J, 1998. **17**(21): p. 6230-40.

39. Latz, E., et al., *Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9.* Nat Immunol, 2007. **8**(7): p. 772-9.

40. Onishi, M., et al., *Applications of retrovirus-mediated expression cloning.* Exp Hematol, 1996. **24**(2): p. 324-9.

41. Kitamura, T., *New experimental approaches in retrovirus-mediated expression screening.* Int J Hematol, 1998. **67**(4): p. 351-9.

42. Morita, S., T. Kojima, and T. Kitamura, *Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses.* Gene Ther, 2000. **7**(12): p. 1063-6.

43. Kitamura, T., et al., *Efficient screening of retroviral cDNA expression libraries.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(20): p. 9146-50.

44. Kitamura, T., et al., *Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics.* Exp Hematol, 2003. **31**(11): p. 1007-14.

45. Barton, G.M., J.C. Kagan, and R. Medzhitov, *Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA.* Nat Immunol, 2006. **7**(1): p. 49-56.

46. Kim, H.M., et al., *Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran.* Cell, 2007. **130**(5): p. 906-17.

47. Ohto, U., et al., *Crystal structures of human MD-2 and its complex with antiendotoxic lipid IVa.* Science, 2007. **316**(5831): p. 1632-4.

48. Jin, M.S., et al., *Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by*

binding of a tri-acylated lipopeptide. Cell, 2007. **130**(6): p. 1071-82.

49. Hoebe, K., et al., *CD36 is a sensor of diacylglycerides.* Nature, 2005. **433**(7025): p. 523-7.
50. Tabeta, K., et al., *The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9.* Nat Immunol, 2006. **7**(2): p. 156-64.
51. Tian, J., et al., *Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE.* Nat Immunol, 2007. **8**(5): p. 487-96.
52. Ivanov, S., et al., *A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA.* Blood, 2007. **110**(6): p. 1970-81.
53. Lande, R., et al., *Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide.* Nature, 2007. **449**(7162): p. 564-9.
54. Leadbetter, E.A., et al., *Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors.* Nature, 2002. **416**(6881): p. 603-7.
55. Yamamoto, M., et al., *Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4.* Nature, 2002. **420**(6913): p. 324-9.
56. Zavasnik-Bergant, T. and B. Turk, *Cysteine cathepsins in the immune response.* Tissue Antigens, 2006. **67**(5): p. 349-55.
57. Honey, K. and A.Y. Rudensky, *Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation.* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(6): p. 472-82.
58. Turk, D. and G. Guncar, *Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2003. **59**(Pt 2): p. 203-13.
59. Brix, K., et al., *Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions.* Biochimie, 2008. **90**(2): p. 194-207.
60. Turk, V., B. Turk, and D. Turk, *Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities.* Embo J, 2001. **20**(17): p. 4629-33.
61. Hsing, L.C. and A.Y. Rudensky, *The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation.* Immunol Rev, 2005. **207**: p. 229-41.
62. Roth, W., et al., *Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and pertubation of hair follicle cycling.* Faseb J, 2000. **14**(13): p. 2075-86.
63. Zhu, F.G. and D.S. Pisetsky, *Role of the heat shock protein 90 in immune response stimulation by bacterial DNA and synthetic oligonucleotides.* Infect Immun, 2001. **69**(9): p. 5546-52.
64. Asagiri, M., et al., *Cathepsin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis.* Science, 2008. **319**(5863): p. 624-7.

65. Park, B., et al., *Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9.* Nat Immunol, 2008.

66. Ewald, S.E., et al., *The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor.* Nature, 2008.

67. Matsumoto, F., et al., *Cathepsins are required for Toll-like receptor 9 responses.* Biochem Biophys Res Commun, 2008. **367**(3): p. 693-9.

68. Wakabayashi, Y., et al., *A protein associated with toll-like receptor 4 (PRAT4A) regulates cell surface expression of TLR4.* J Immunol, 2006. **177**(3): p. 1772-9.

69. Takahashi, K., et al., *A protein associated with Toll-like receptor (TLR) 4 (PRAT4A) is required for TLR-dependent immune responses.* J Exp Med, 2007. **204**(12): p. 2963-76.

70. Brinkmann, M.M., et al., *The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling.* J Cell Biol, 2007. **177**(2): p. 265-75.

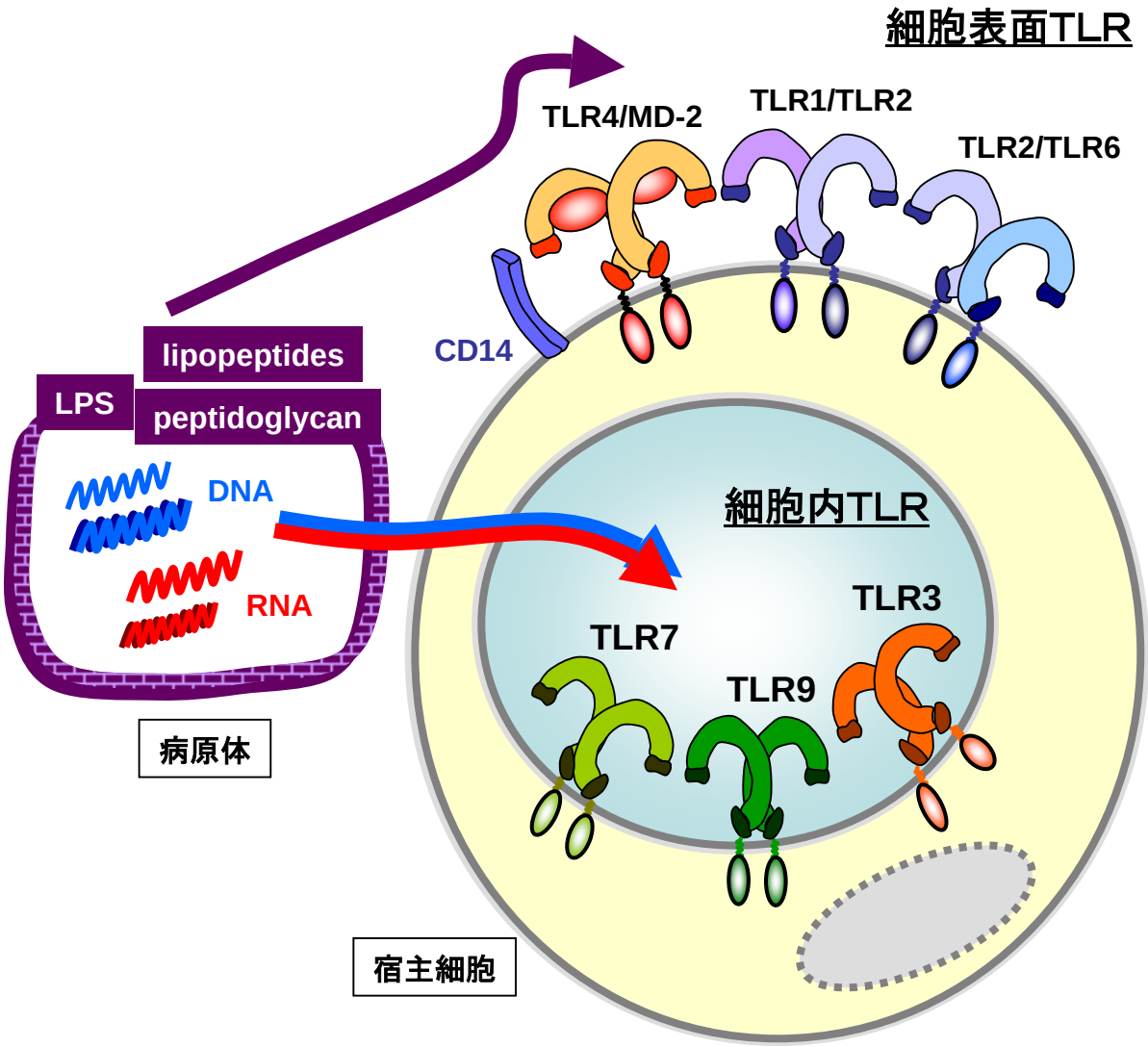


図1. Toll-like receptorによる病原体認識
　TLRは細胞表面に発現して病原体の外膜成分を認識するもの(細胞表面TLR)と、細胞内小胞において病原体の核酸を認識するもの(細胞内TLR)に区別される。

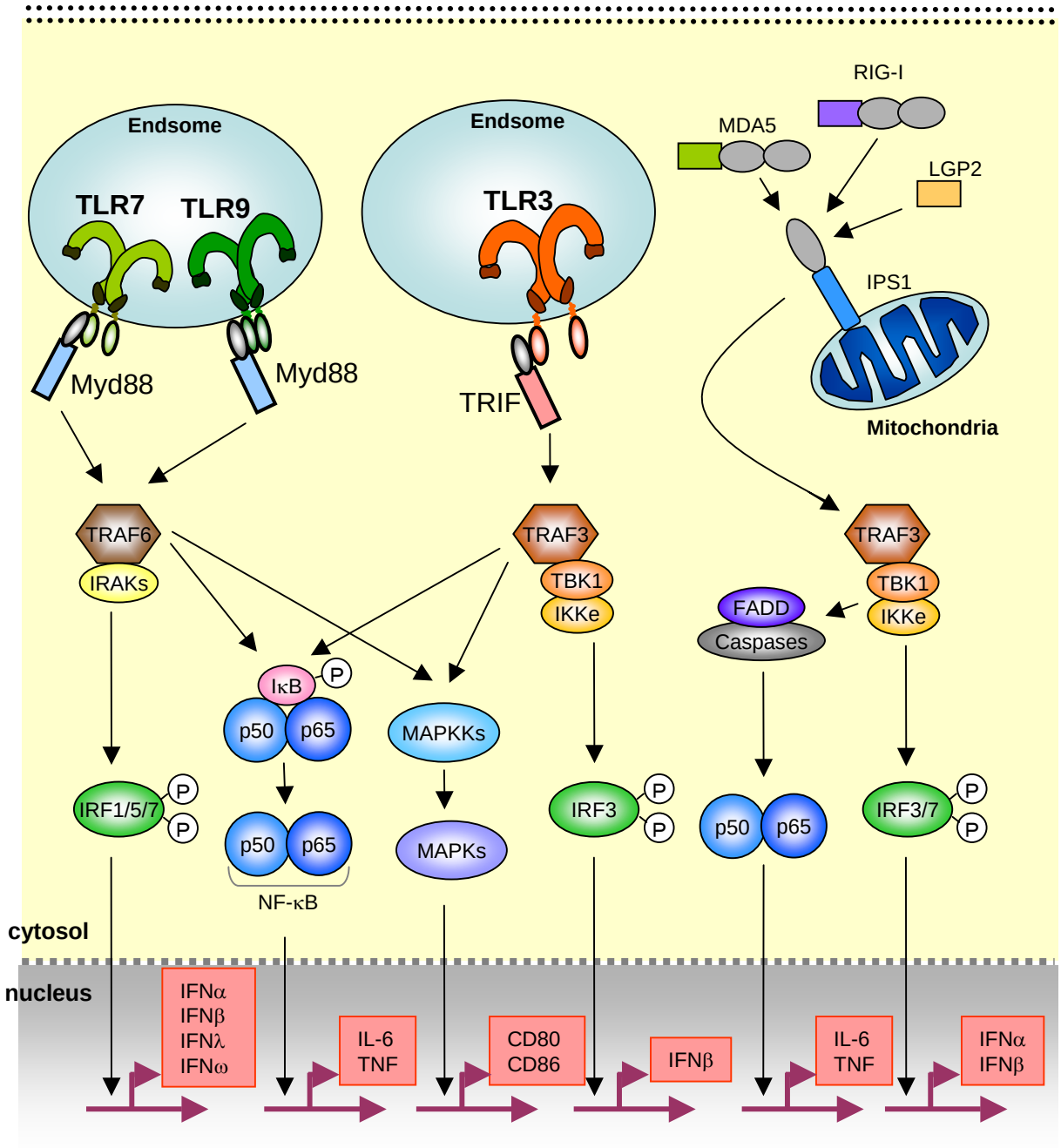


図2. 核酸センサーとシグナル伝達経路

TLR7/9はMyd88-dependent、TLR3はTRIF-dependentにシグナル伝達経路を活性化する。

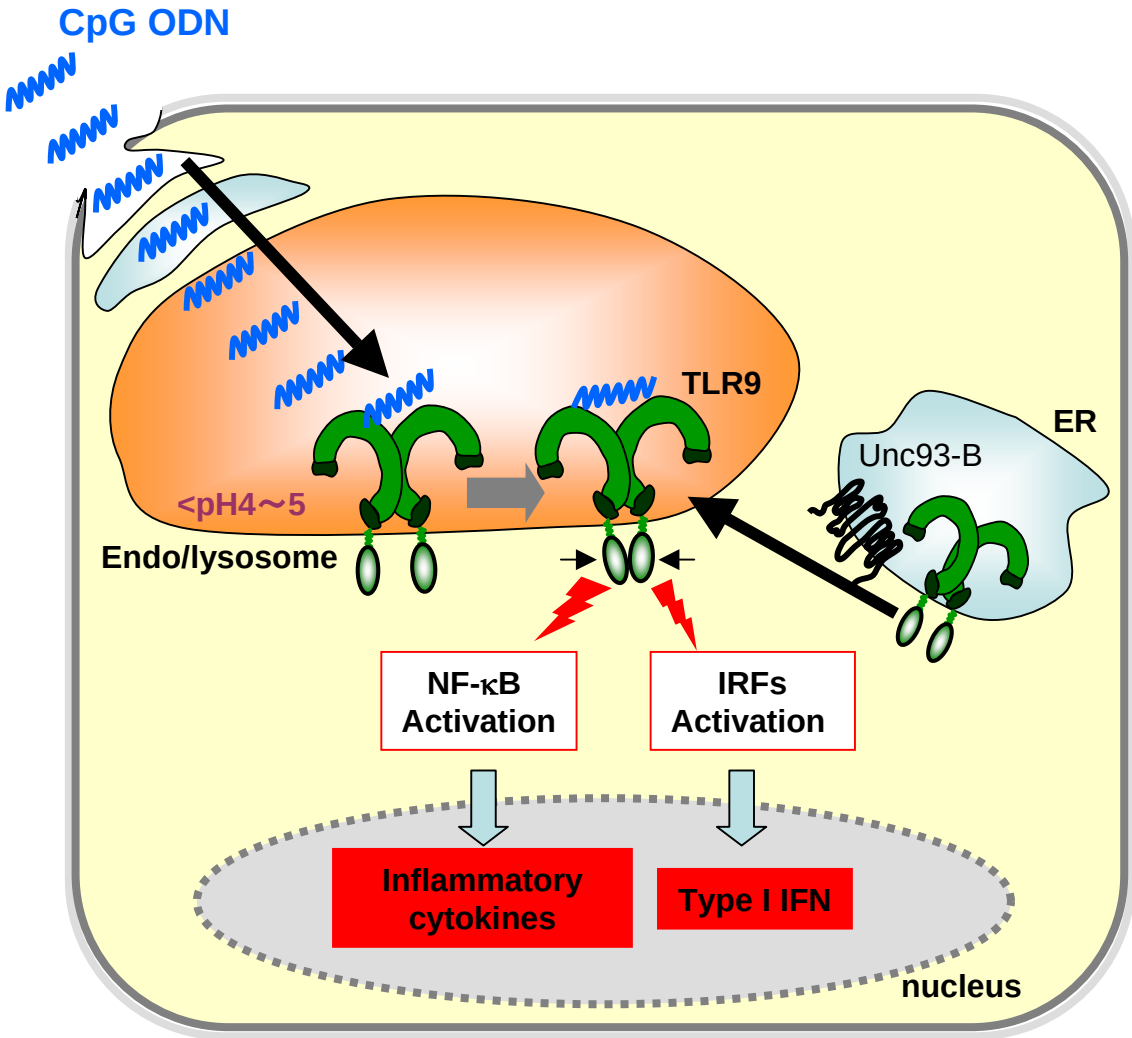


図3. TLR9のCpG認識メカニズムモデル

CpGは細胞表面からエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた後、リソソームに運ばれる。このCpGの取り込みと同時にERに存在するTLR9はUnc93-B依存的にエンドリソソームへと移動し、CpGを認識する。このときTLR9応答には小胞内の酸性化が必須条件である。その結果NF-κBやIRFsが活性化され、炎症性サイトカインや1型インターフェロンが産生される。またTLR9は定常的に非活性ホモダイマーを形成し、CpG刺激依存的に細胞内シグナル伝達ドメインが接近する構造変化が起こる。

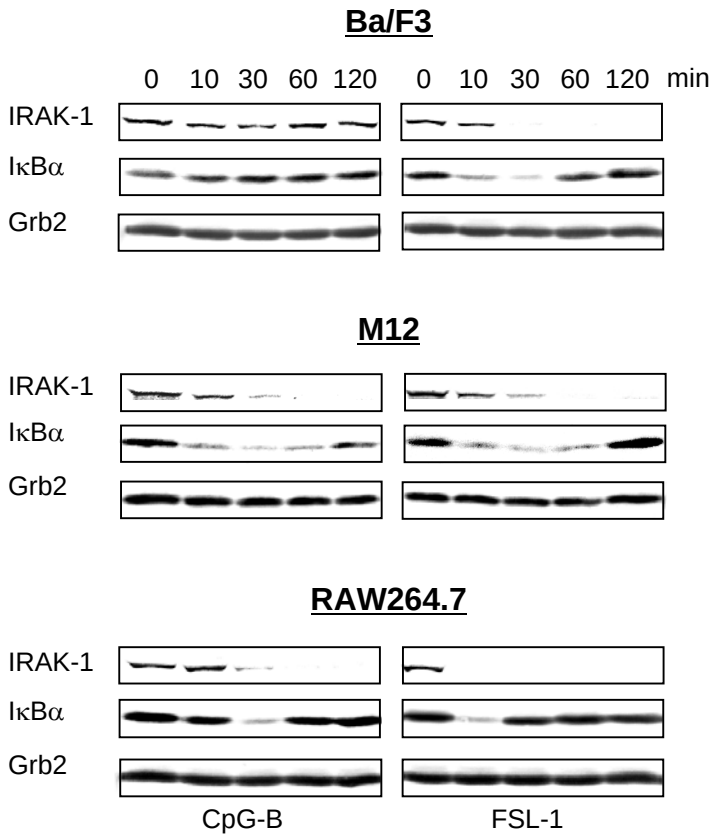


図1-1　各細胞株のCpG刺激に対する反応性の相違

Ba/F3細胞、M12細胞、RAW264.7細胞に、それぞれCpG-B(1μM)（左）とFSL-1(1μg/ml)（右）で刺激を加え、ウエスタンブロッティングによりIRAK-1とIκBα分子の分解を確認した。下段はインターナルコントロールとしてGrb2分子をブロットした。

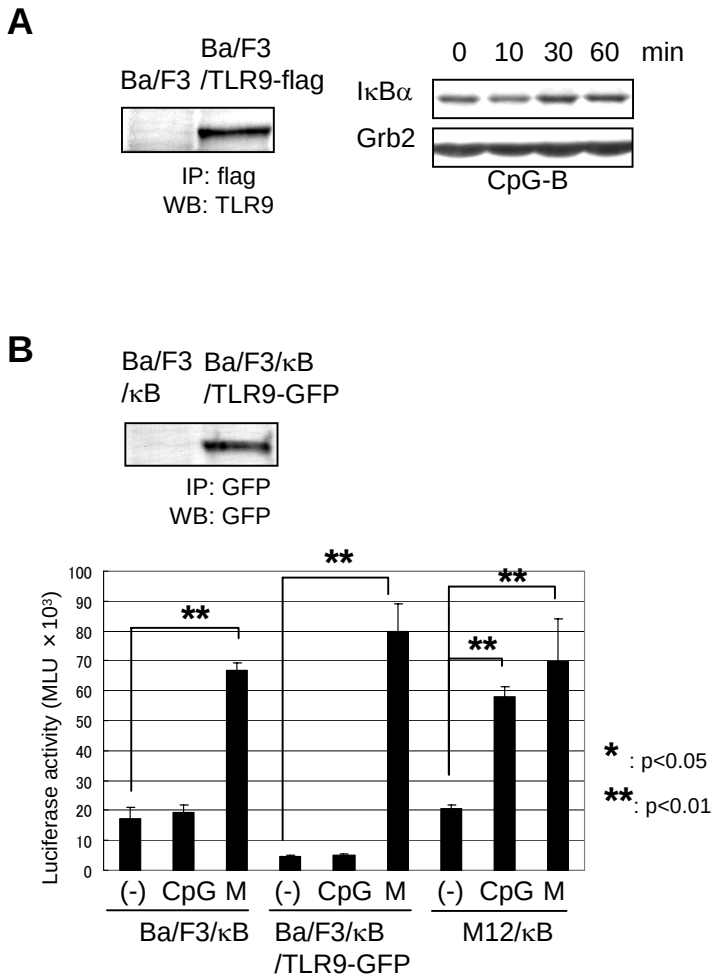


図1-2 TLR9強制発現Ba/F3細胞のCpG刺激に対する応答性

A: Ba/F3細胞にTLR9-flagを強制発現させ、発現をウエスタンブロッティングにより確認した（左）。Ba/F3/TLR9-flag細胞にCpG-B(1μM）刺激を加え、IκBα分子の分解の有無を確認した（右）。

B: NF-κB-luciferaseレポーター遺伝子を導入したBa/F3細胞にTLR9-GFPを強制発現させ、発現をウエスタンブロッティングにより確認した（上）。このBa/F3/NF-κB-luciferase細胞にCpG-B（1μM)及びMALP-2(Mと記載）(5μg/ml) 刺激を加え、刺激5時間後にNF-κB活性を測定した（下）。TLRリガンド刺激のコントロールとして、M12/NF-κB-luciferase細胞も同様に刺激を加え、NF-κB活性を測定した。

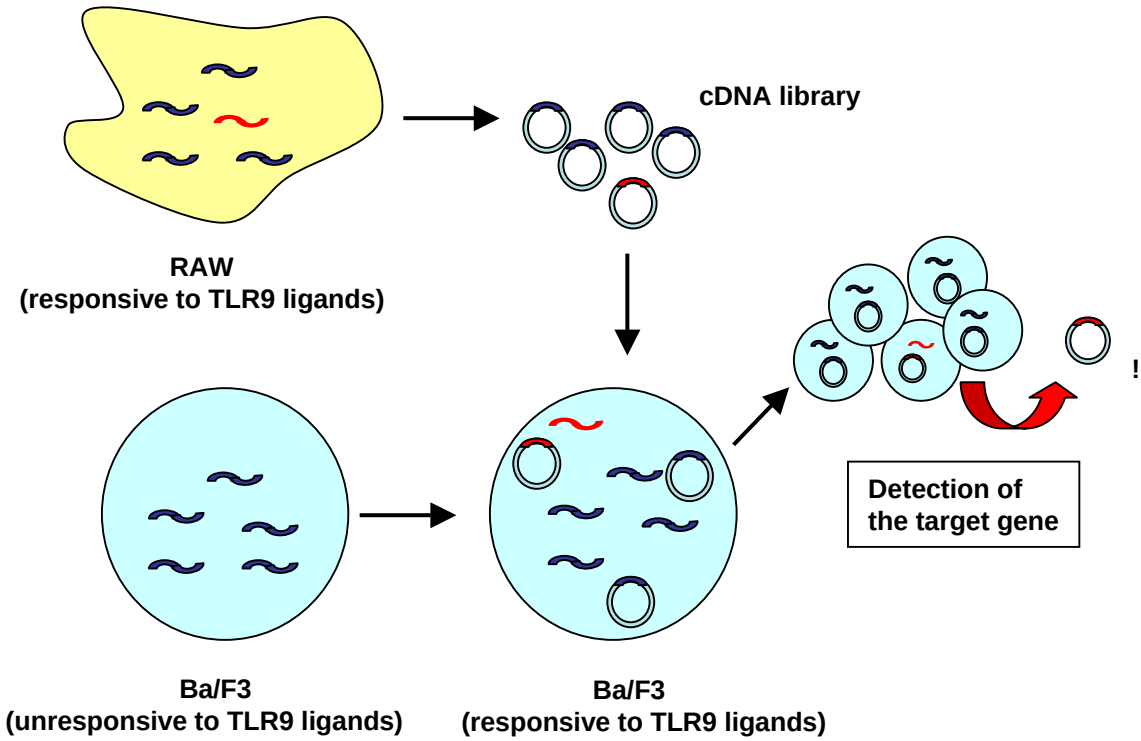


図1-3　Functional Cloning1

Ba/F3とRAWのTLR9リガンドに対する反応性の違いを利用して、TLR9関連分子を検索することにした。その手法として、RAWのcDNAライブラリをBa/F3に導入して反応性が補完された細胞を選択する、Complementation Cloningを用いることにした。

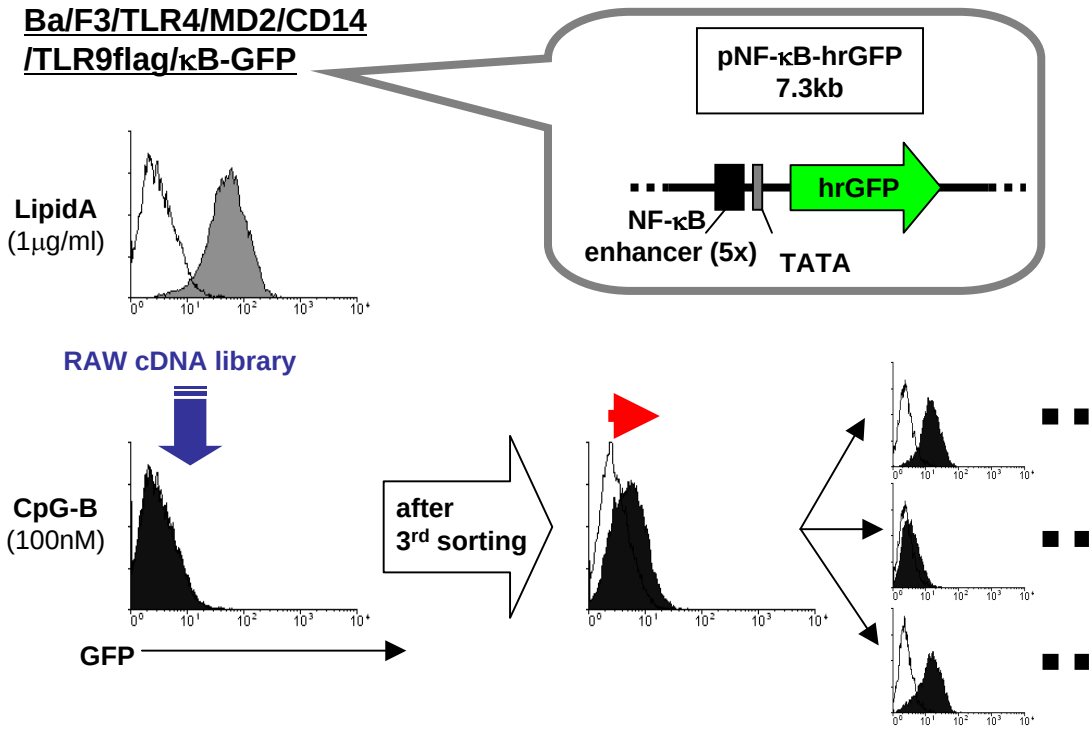


図1-4　Functional Cloning2

Ba/F3細胞にTLR4/MD2/CD14及びTLR9flagそしてNF-κB-GFPレポーター遺伝子を導入し、Ba/F3/TLR4/MD2/CD14/TLR9-flag/NF-κBhrGFP細胞を作成した。

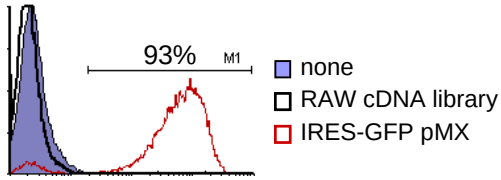
この細胞にLipidA刺激を加えると、NF-κBが活性化されGFP蛋白が発現したことより、リガンド認識後のシグナル伝達は問題なく機能していることを確認した。しかしCpG-B刺激時には活性化されないことから、この細胞はTLR9のリガンド認識の段階で分子が欠損していると考えられる。

ここにレトロウイルスの系を用いてRAWのcDNAライブラリを導入し、CpG刺激に対してGFP蛋白を発現するBa/F3細胞集団を選別するsorting操作を経て、限界希釈培養法により CpG-B応答性細胞を獲得した。

Ba/F3/TLR4/MD2/CD14/TLR9flag/κB-GFP

RAW細胞由来cDNA library 導入後

＜感染効率＞



CpG-B(100nM)刺激24時間後

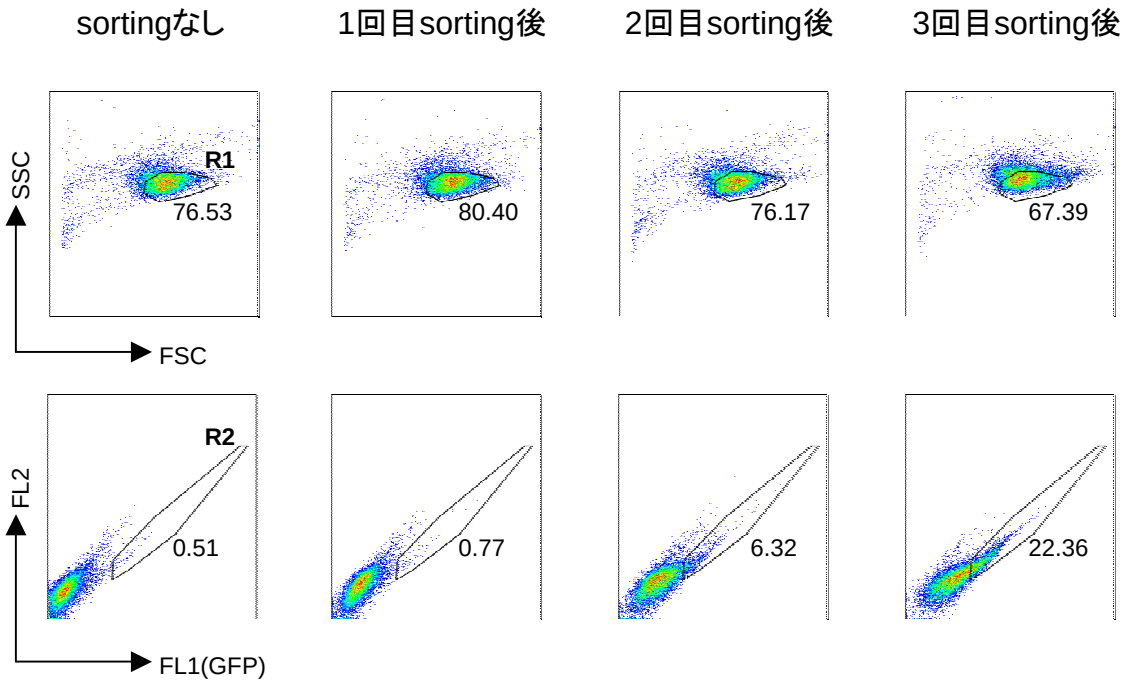
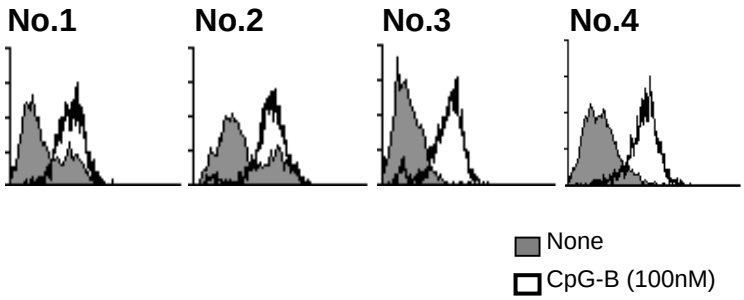


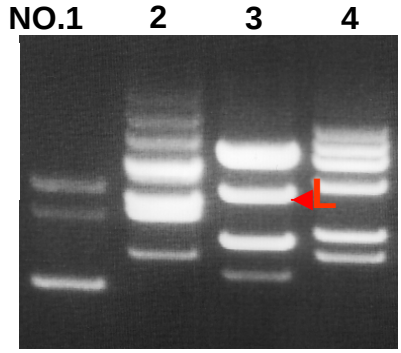
図1-5　レトロウイルスの感染効率とCpG刺激による細胞活性化に伴いGFP蛋白を発現したBa/F3細胞のsortingの経過

上部ヒストグラムはBa/F3/TLR4/MD2/CD14/TLR9-flag/NF-κBhrGFP細胞にRAW細胞由来cDNA libraryを遺伝子導入した時のウイルス感染効率を示す。ライブラリの導入と同様にIRES-GFP遺伝子をレトロウイルスの系を用いて導入し、GFPの発現を確認した〈赤線〉。下部パネルは段階的sortingに伴うCpG刺激後のGFP蛋白発現Ba/F3細胞加の経緯を示した。Sorting gateとしてR1(live gate)(上段）及びR2(GFP発現(+) gate)（下段）を併用した。各gateの右下に表示している数字は細胞数全体に占めるゲート内の細胞数のパーセント表示である。3回目のsorting操作の後、CpG刺激に対してよく反応するBa/F3細胞集団が獲得されたので、限界希釈培養法を用いてCpG-B応答性モノクローナル細胞を選別した。

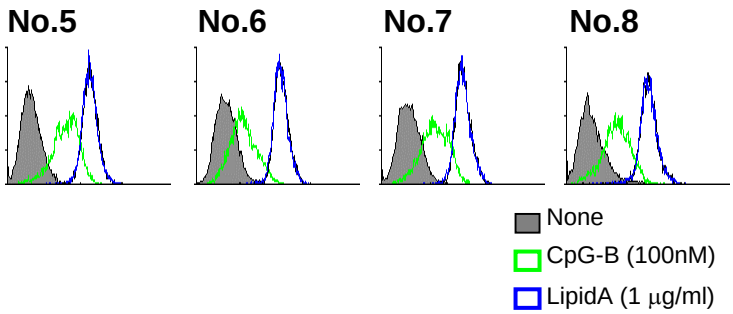
Ba/F3/TLR4/MD2/CD14/TLR9flag/κB-GFP
RAW細胞由来cDNA library 導入後
CpG-B(100nM)刺激24時間

＜試行1＞





＜試行2＞



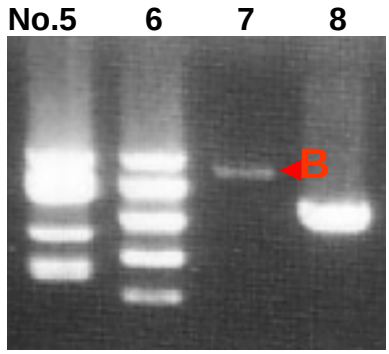
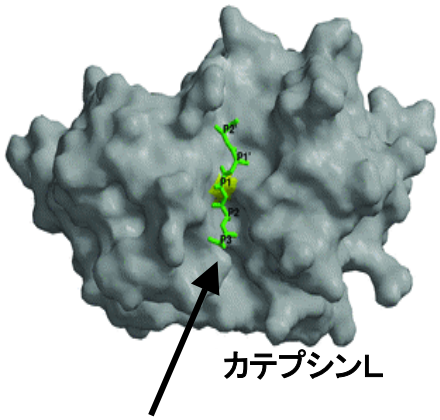


図1-6　CpG刺激依存的な細胞活性反応を増強する責任遺伝子の同定

RAW細胞由来cDNA libraryを遺伝子導入することで、CpG刺激に対して活性化反応を示すようになったBa/F3/TLR4/MD2/CD14/TLR9-flag/NF-κBhrGFP細胞が含有するライブラリ由来の責任遺伝子を同定した。No.1～8はCpG刺激に対して強い活性反応を示す代表的なモノクローナル細胞であり(左)、これらの細胞から抽出したゲノムを鋳型としてライブラリ特異的なプライマーを用いてPCRを行った。PCR産物をアガロースゲルに流し、各細胞につき1本または複数本のバンドを確認した（右）。検出された各バンドの遺伝子配列を確認し、サブクローニングしたものをBa/F3/TLR4/MD2/CD14/TLR9-flag/NF-κBhrGFP細胞に遺伝子導入した後、CpG刺激に対する活性化反応増強を確認することで責任遺伝子を同定した。赤矢印はカテプシンL（L、右上パネル）、カテプシンB（B、右下パネル）に相当するバンドを示す。

カテプシンBとカテプシンL



- システインプロテアーゼ、パパインファミリーに所属
  ヒト　　：11種類(カテプシンB/C/F/H/K/L/O/S/V/X/W)
  げっ歯類: 10種類(カテプシンB/C/F/H/K/L/O/S/X/W)
  この内カテプシンB/F/H/K/L/Sは
  エンドペプチダーゼ機能を持つ
- エンドソームやリソソームに局在
- 活性化にはエンド/リソソームの酸性化が必須
- プロカテプシン（非活性）→カテプシン(活性）

☆***Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation.***
Honey, K. and A.Y. Rudensky. Nat Rev Immunol, 2003.
カテプシンはMHCクラスⅡ分子と結合しているインバリアント鎖及び外来抗原の切断を行い、抗原提示に必須の役割を担っている。

☆ ***Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets.***
Turk, D. and G. Guncar. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2003.

☆ ***Cysteine cathepsins in the immune response.***
Zavasnik-Bergant, T. and B. Turk. Tissue Antigens, 2006.

図1-7　カテプシンBとカテプシンLに関する情報
　カテプシンLのモデル図（左上）とカテプシンB及びカテプシンLの主要な情報を示す。

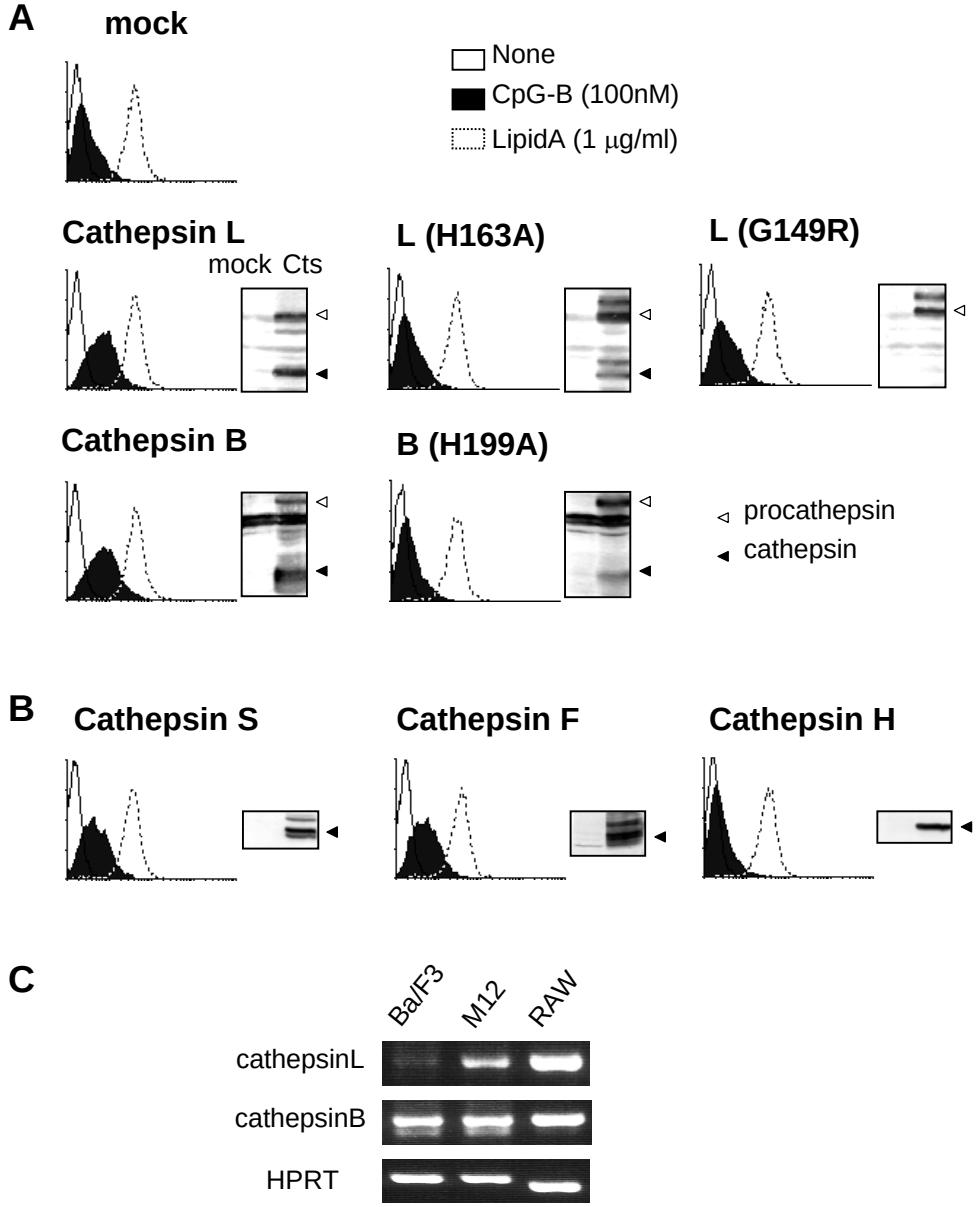


図1-8　カテプシン蛋白強制発現によるCpG刺激依存的NF-κB活性化増強

A: Ba/F3/TLR4/MD2/CD14/TLR9-flag/NF-κBhrGFP細胞(上段、mock)に、さらにカテプシンL及びカテプシンL変異体H163A、G149R(中段)、カテプシンB及びカテプシンB変異体H199A（下段）を遺伝子導入した。これらの細胞にCpG-B及びLipidAで刺激を加え、NF-κB-GFP reporter assayを行った。各ヒストグラムパネルの右側には、それぞれのカテプシンに特異的な抗体を用いたウエスタンブロッティングによりカテプシンの蛋白発現を確認した図を示す。

B: Aと同様にBa/F3/TLR4/MD2/CD14/TLR9flag/NF-κBhrGFP細胞にカテプシンS、F、Hを遺伝子導入し、これらの細胞にTLRリガンド刺激を加えNF-κB-GFP reporter assayを行った。

C: 各細胞株のカテプシンLとカテプシンB、及びコントロールとしてHPRTの発現をmRNAレベルで確認した。

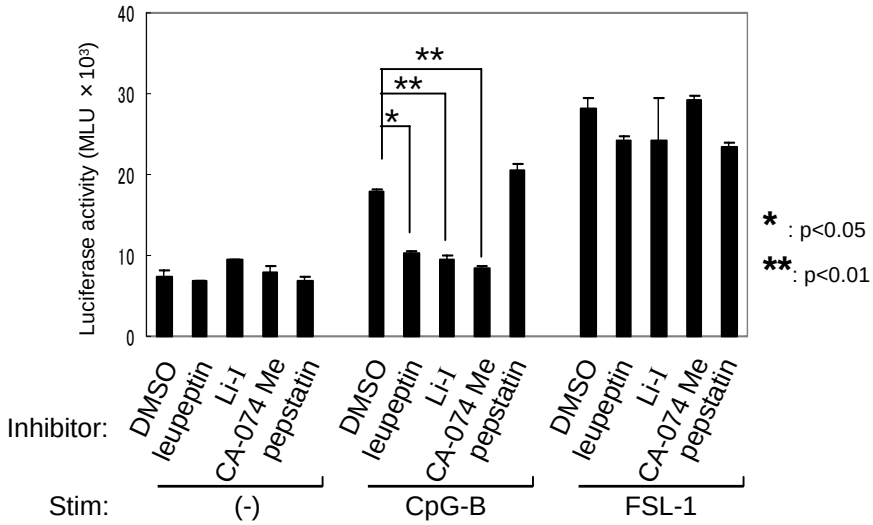
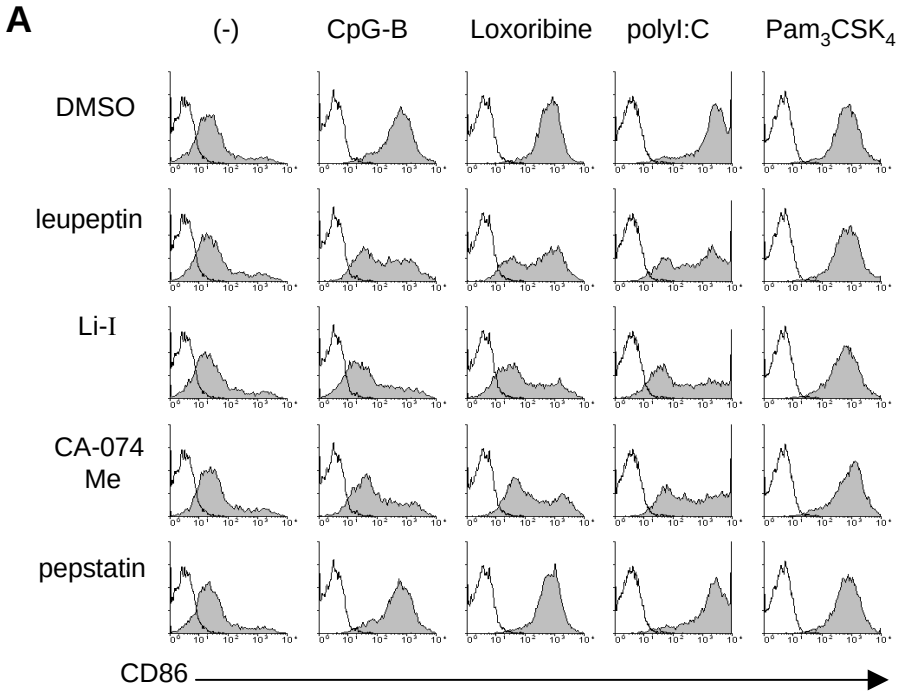


図1-9 CpG刺激依存的なB細胞活性におけるカテプシン阻害剤の影響

NF-κBルシフェラーゼレポーター遺伝子を導入したM12細胞を、vehicle DMSO、システインプロテアーゼ阻害剤 leupeptin(250μM)、cathepsinL inhibitor I (Li-I)(10μM) 、cathepsinB inhibitor CA-074 Me(10μM) 、アスパラギン酸プロテアーゼ pepstatin(25μM)で2時間処理した。その後CpG-B(10nM)、FSL-1(100ng/ml)で5時間刺激し、ルシフェラーゼ活性によりNF-κBの活性を測定した。



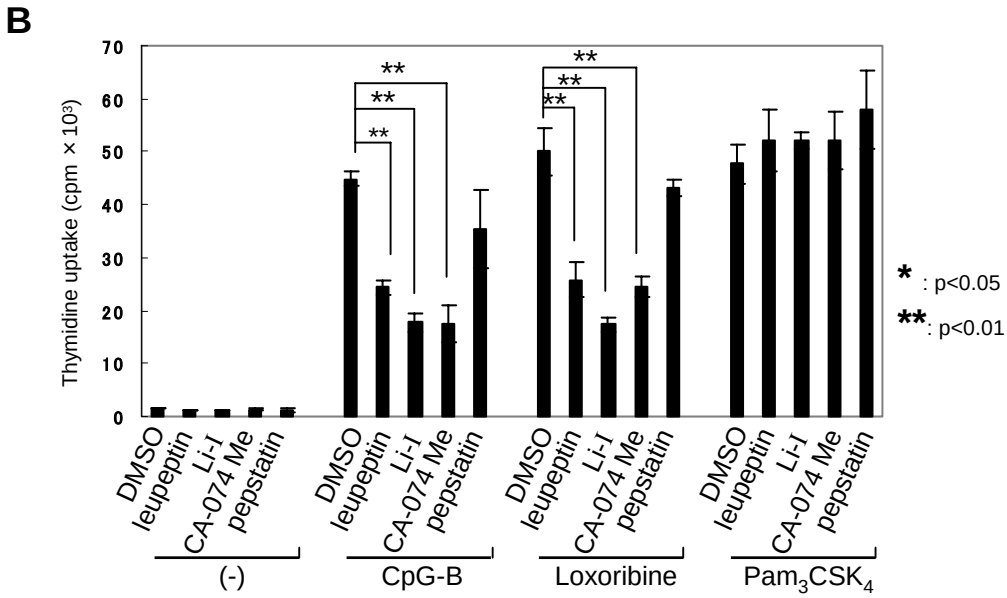
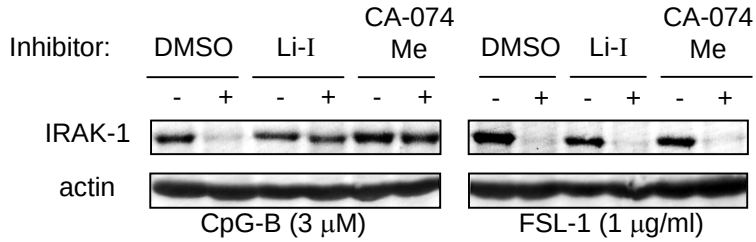


図1-10　マウス脾臓B細胞活性におけるカテプシン阻害剤の影響

A: マウス脾臓より単離したB細胞を、vehicle DMSO、leupeptin(250μM)、Li-I(3μM) 、CA-074 Me(3μM) 、pepstatin(25μM)で2時間処理した後、CpG-B(10nM)、Loxoribine(1μM)、poly(I:C)(30μg/ml)、Pam_3CSK_4(100ng/ml)で刺激した。刺激24時間後、細胞表面のCD86分子を特異抗体で染色しフローサイトメトリーにより解析した。色つきのヒストグラムはB細胞上のCD86分子の発現を、オープンヒストグラムは陰性コントロールとして二次抗体のみの染色である。

B: マウス脾臓より単離したB細胞を、vehicle DMSO、leupeptin(25μM)、Li-I(1μM) 、CA-074 Me(1μM) 、pepstatin(2.5μM)で2時間処理した後、CpG-B(10nM)、Loxoribine(1μM)、Pam_3CSK_4(100ng/ml)で刺激した。刺激三日後に1μCiの^{3}Hサイミジンを6時間パルスし、細胞内に吸収されたサイミジンをシンチレーションカウンターで測定した。

A **M12/TLR9-GFP**



B **RAW/TLR9-GFP**

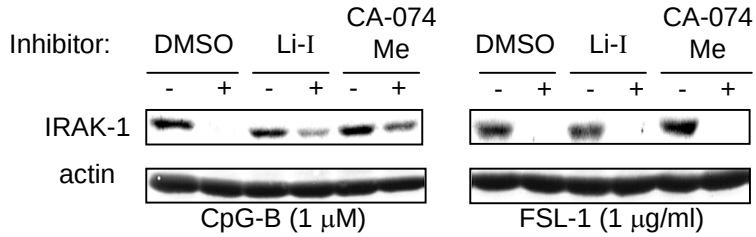


図1-11　TLRリガンド刺激依存的なIRAK-1分解におけるカテプシン阻害剤の影響

M12/TLR9-GFP細胞(A)とRAW/TLR9-GFP細胞(B)を、vehicle DMSO、Li-I (30μM) 、CA-074 Me(30μM) で2時間処理した後、CpG-B、FSL-1で2時間刺激した。刺激2時間後細胞を溶解し、サンプルをSDS-PAGEで展開した。抗IRAK-1抗体によりウエスタンブロッテイングを行った。

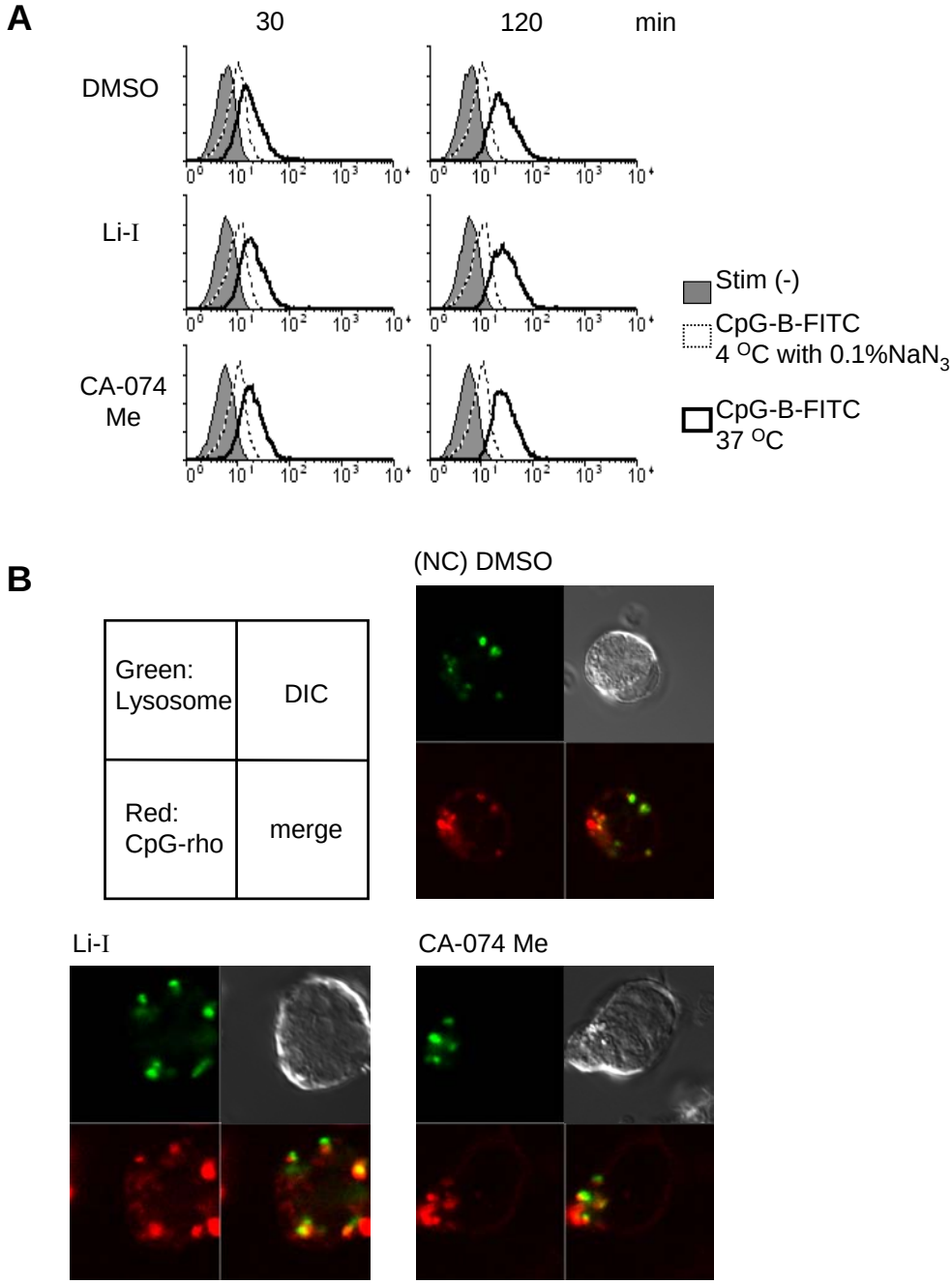


図1-12　CpGの細胞内動態におけるカテプシン阻害剤の影響

A: M12細胞を、37℃条件下にてDMSO、Li-I(30μM) 、CA-074 Me(30μM) で2時間処理した後CpG-B-FITC(1μM)を添加した〈実線〉。またエンドサイトーシスのネガティブコントロールとして4℃条件下、0.1%アジ化ナトリウム(NaN_3)添加培地にて同試行を行った（破線）。刺激30分あるいは120分後細胞を50%トリパンブルーで細胞表面のCpG-B-FITCをクエンチングし、フローサイトメトリーにて細胞内に取り込まれたCpG-B-FITCを測定した。

B: M12細胞を、**A**と同様に阻害剤等で2時間処理した後CpG-B-rhodamine(3μM)を添加した。刺激2時間後、LysoTrackerを添加してさらに10分間インキュベートすることにより、CpG-B-rhodamine(赤)及びリソソーム(緑)を可視化し共焦点顕微鏡で確認した。

293T/TLR9-GFP

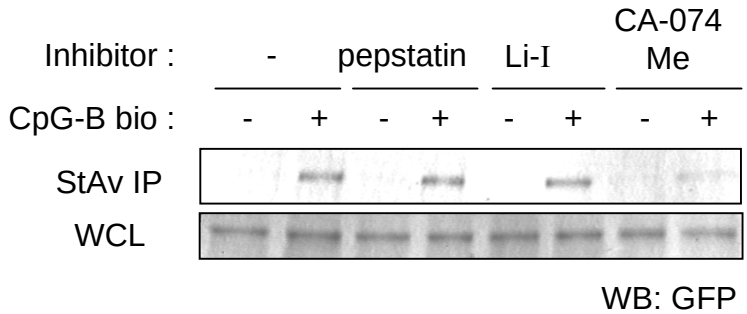


図1-13　TLR9-CpG結合におけるカテプシン阻害剤の影響

TLR9-GFPを一過性に発現させた293T細胞をDMSO、pepstatin(75μM)、Li-I(30μM) 、CA-074 Me(30μM) で2時間処理した後ビオチン化CpG-B(3μM)を添加した。刺激2時間後細胞を溶解し、ストレプトアビジンビーズでビオチン化CpG-Bを免疫沈降した。CpG-Bと共沈してきたTLR9-GFPを抗GFP抗体を用いたウエスタンブロッティングにより確認した（上）。TLR9-GFPの発現は細胞溶解液(WCL)を抗GFP抗体を用いたウエスタンブロッティングにより確認した（下）。

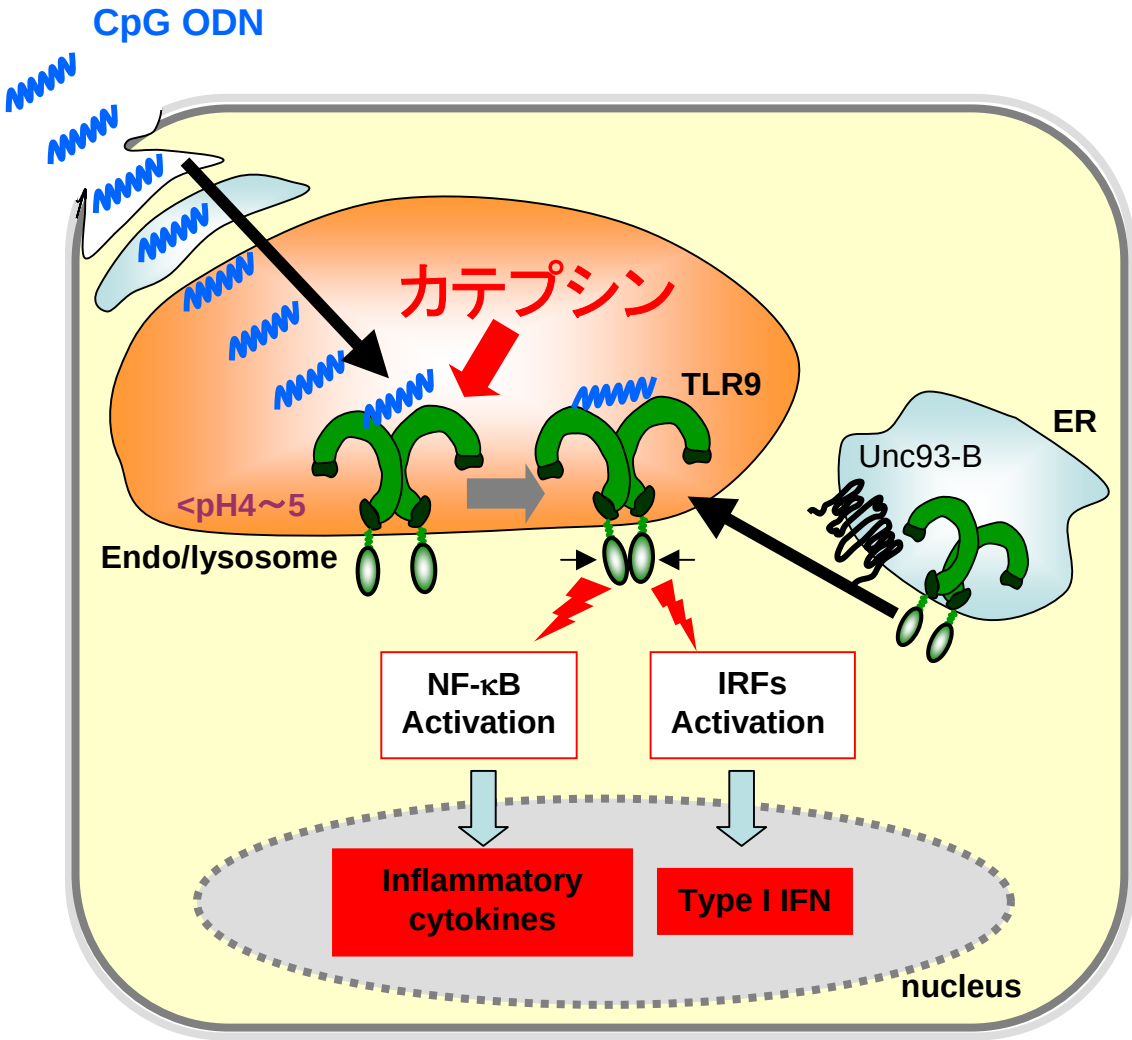


図1-14　TLR9のCpG認識メカニズムモデル1
　カテプシンはエンドリソソームに存在し、TLR9のCpG認識に関与する。

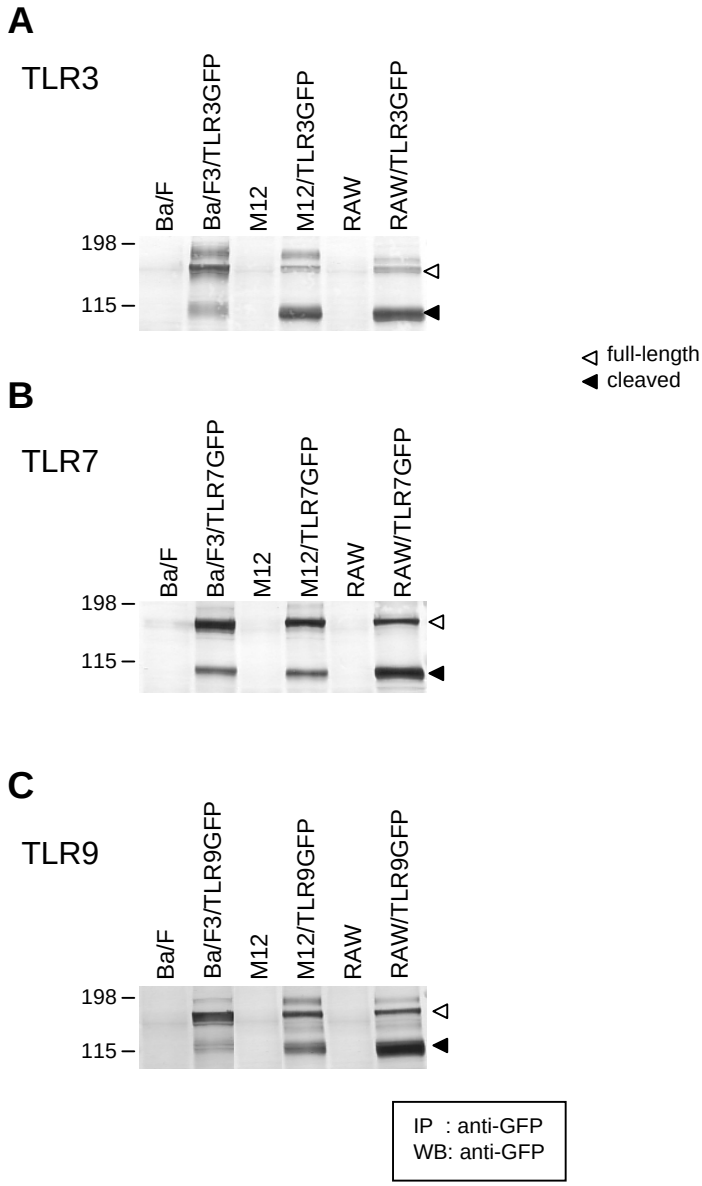


図2-1 TLR3/7/9強制発現細胞において検出されたTLR cleaved form

Ba/F3細胞、M12細胞、RAW264.7細胞それぞれにTLR3-GFP(A)、TLR7-GFP(b)、TLR9-GFP(C)遺伝子をレトロウイルスにて導入しタンパク発現させた。これらの細胞を元の細胞と共に溶解し、抗GFP抗体にてを免疫沈降した。抗GFP抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、TLR3/7/9分子を検出した。

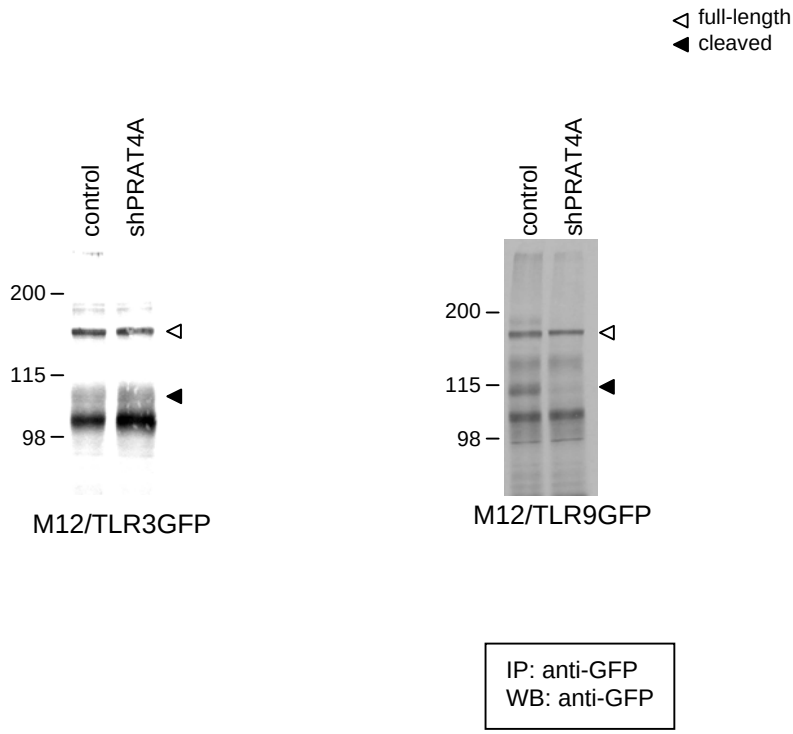


図2-2　PRAT4Aノックダウンによる TLR9 cleaved formの消失

M12/TLR3GFP細胞(左) 、M12/TLR9GFP細胞(右)のそれぞれの細胞にPRAT4Aノックダウンベクターとコントロールベクターを遺伝子導入した。各細胞を溶解し、抗GFP抗体にて免疫沈降した。抗GFP抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、TLR3/9を検出した。

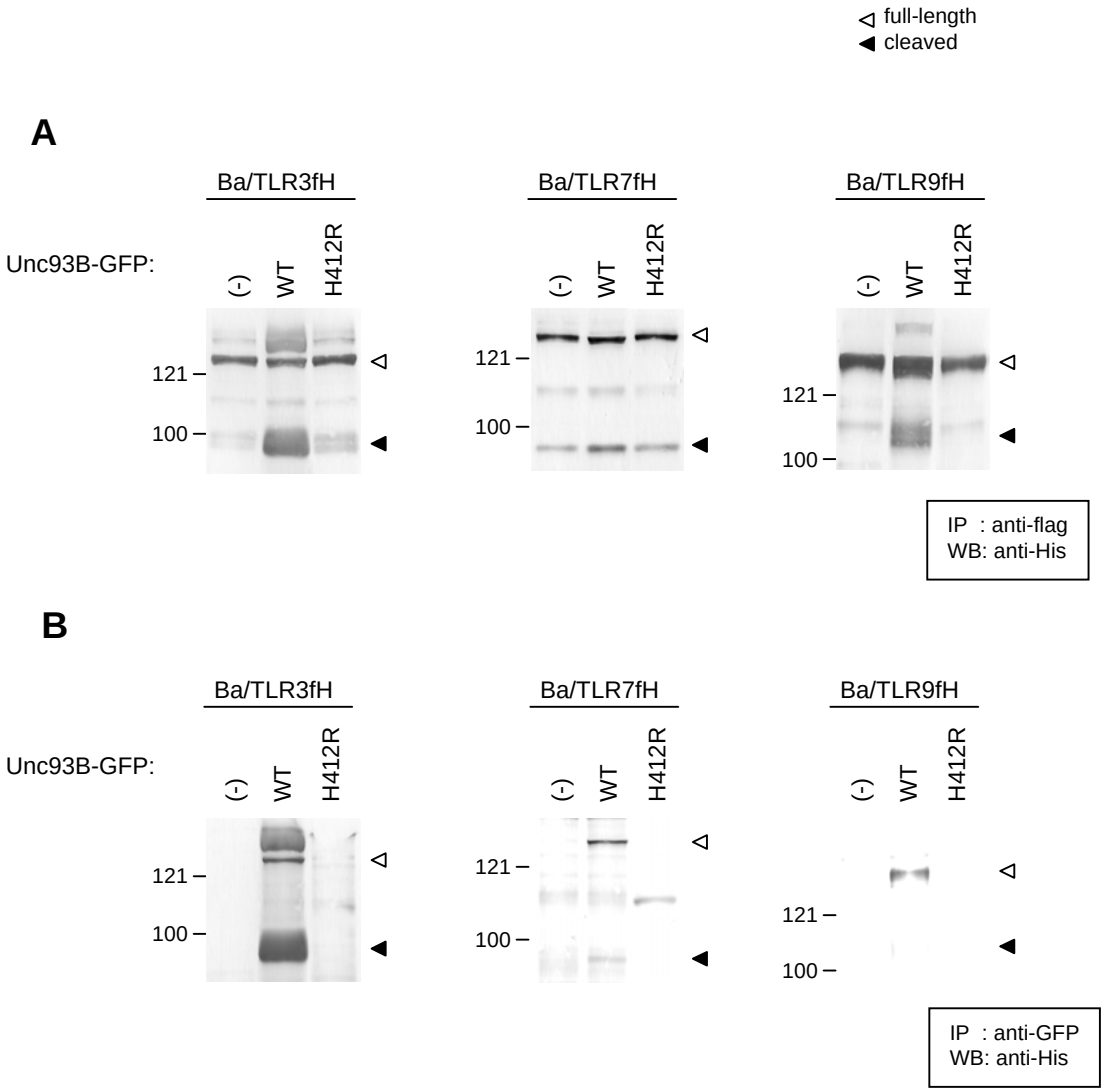


図2-3 Unc93-B強制発現Ba/F3細胞において検出されたTLR3/7/9 cleaved form

A: Ba/TLR3flagHis6(以下fHと記載）細胞(左)、Ba/TLR7fH細胞(中)、M12/TLR9fH細胞(右)のそれぞれの細胞にUnc93-B野生型(WT)と変異体(H412R)を遺伝子導入した。元の細胞(-)を含めた各細胞を溶解し、抗flag抗体にてTLR3/7/9を免疫沈降した。抗His抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、TLR3/7/9を検出した。

B: Aと同じ細胞を溶解し、抗GFP抗体にてUnc93-Bを免疫沈降した。抗His抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、Unc93-Bに結合したTLR3/7/9を検出した。

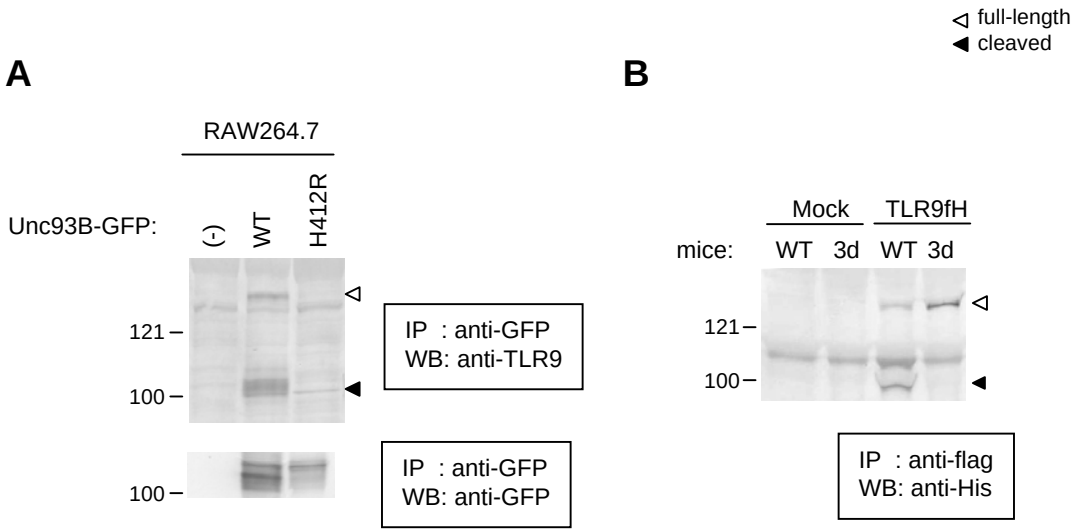


図2-4 Unc93-Bと結合する内在性TLR9 と3dマウスにおけるTLR9の発現フォーム

A: RAW264.7細胞にUnc93-B野生型(WT)と変異体(H412R)を遺伝子導入した。各細胞を溶解し、抗GFP抗体にてUnc93-Bを免役沈降した。抗TLR9抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、TLR9を検出した(上)。同免役沈降サンプルを抗GFP抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、Unc93-Bの発現を確認した(下)。

B: C57BL/6マウス(WT)と3dマウスの骨髄幹細胞にmock (pMXpuro)及びTLR9fHを遺伝子導入した後、樹状細胞に誘導した。この細胞を溶解し抗flag抗体にて免疫沈降した。抗His抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、TLR9を検出した。

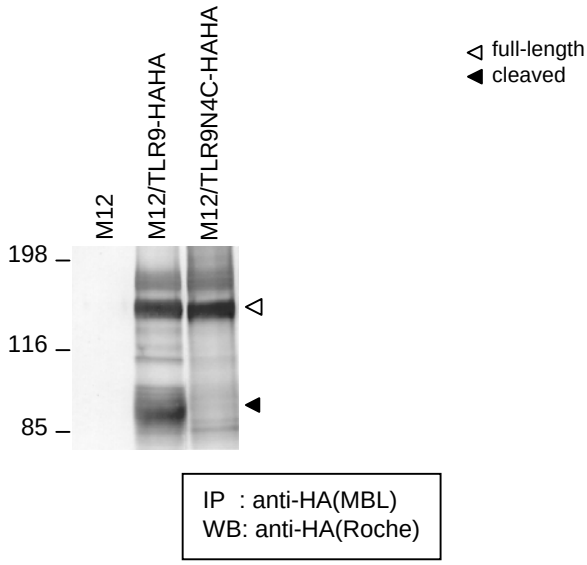
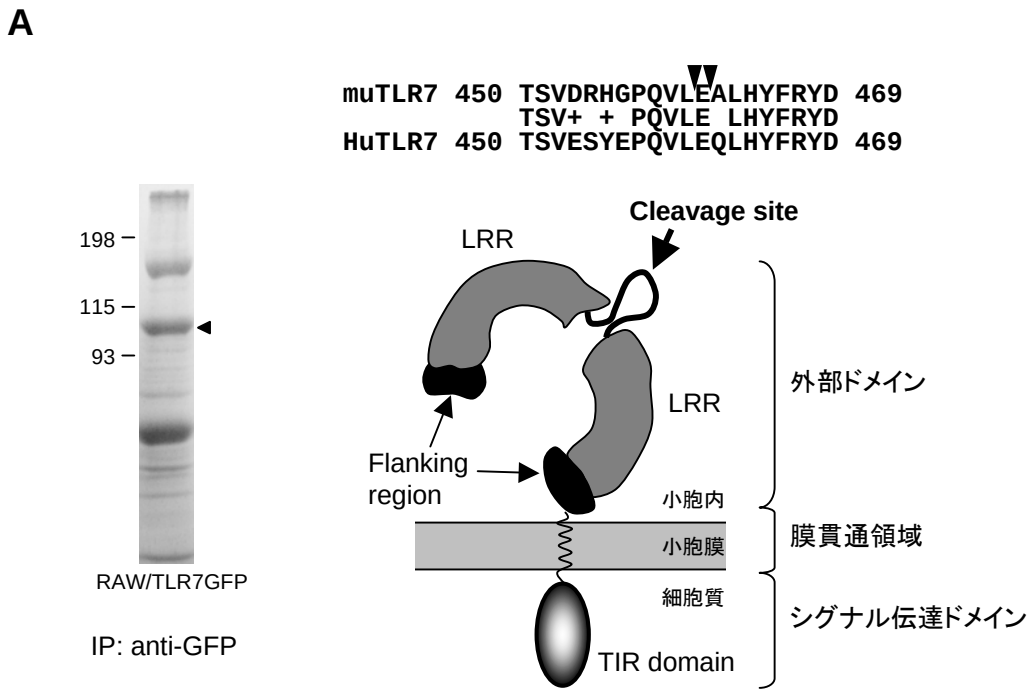


図2-5 TLR9細胞表面強制発現によるcleaved formの消失

M12細胞にTLR9-HAHAとTLR9N4C-HAHAキメラ遺伝子を導入した。各細胞を溶解し、ウサギ抗HAポリクローナル抗体にて免役沈降した。ラット抗HAモノクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、TLRを検出した。



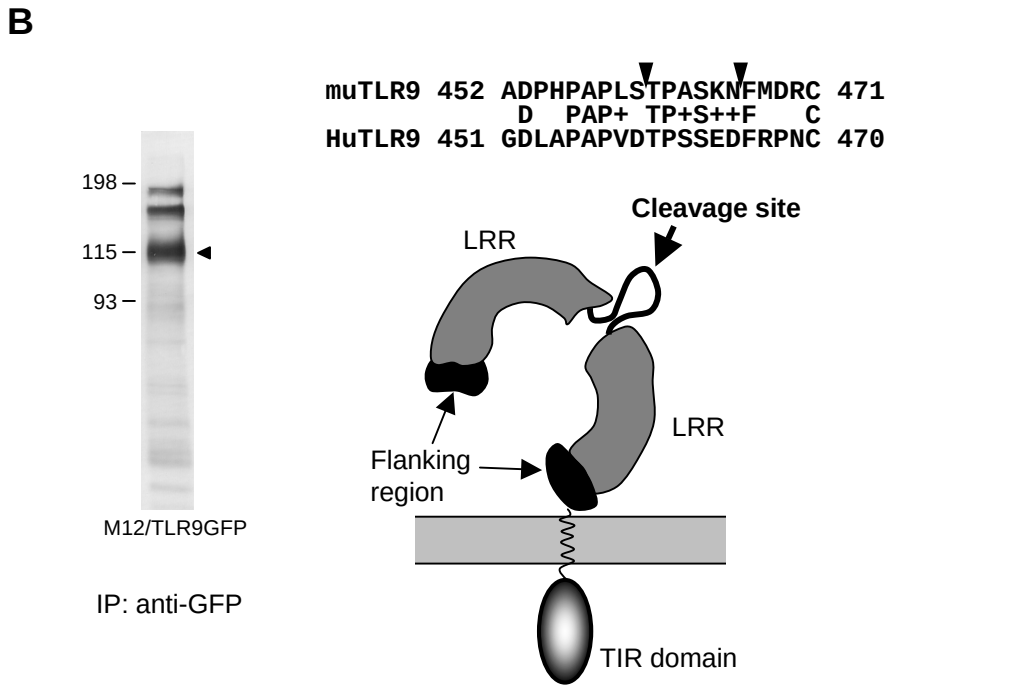


図2-6 TLR7/9 cleaved formのN末端配列

RAW/TLR7GFP細胞（A)、M12/TLR9GFP細胞(B)を溶解し、抗GFP抗体で免疫沈降したサンプルをSDS-PAGEで展開し、クマシー青にて染色した(左)。矢印で示したバンドをサンプルとして切り取って、N末端アミノ酸配列分析を実施した。右上部にマウスTLR7（A)またはTLR9(B)のアミノ酸配列とそれに対応するヒトの配列を記載した。矢印は分析により明らかとなったTLR7/9の切断部位を示す。
右下部はTLR7（A)及びTLR9（B)の切断部位を示したモデル図。

TLR7 450 **TSVDRHGPQVLEALHYFRYD** 469

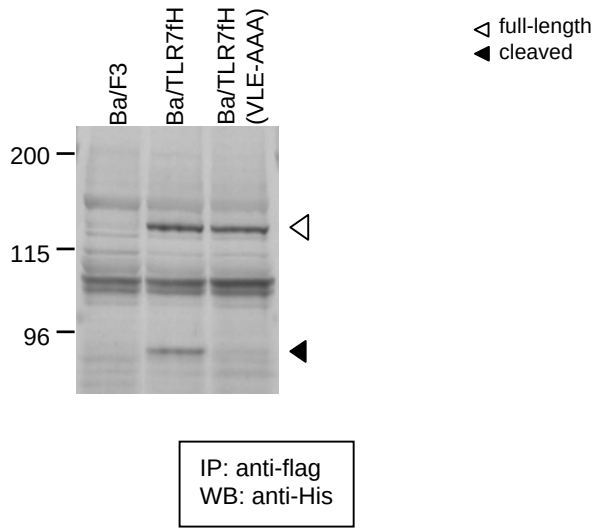
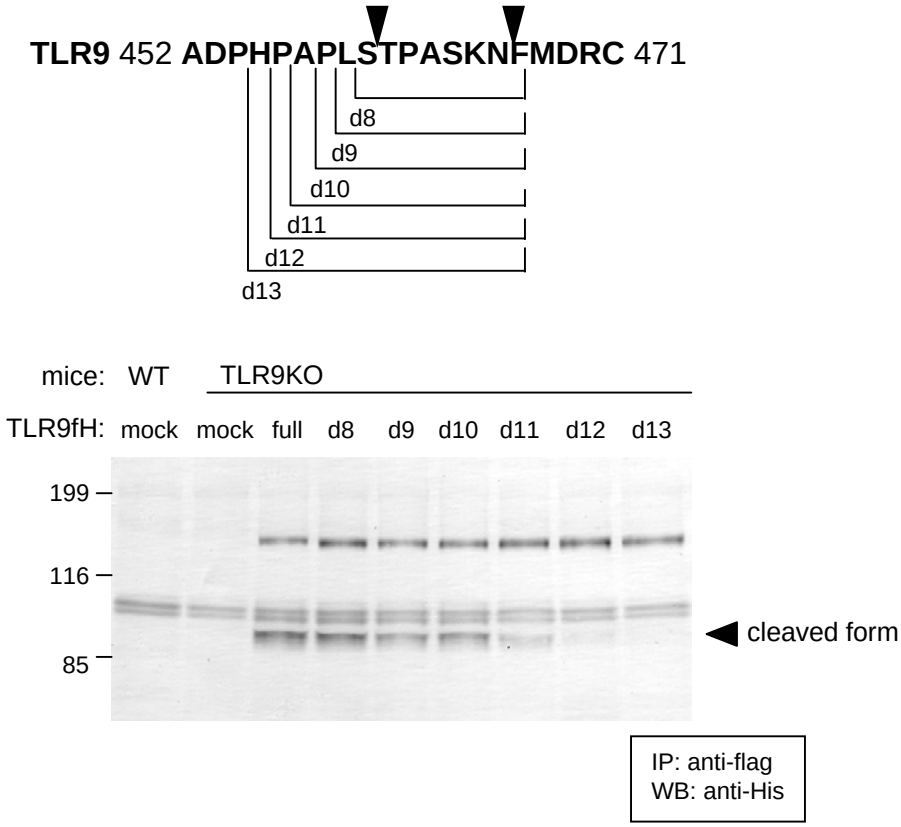


図2-7　non-cleaved TLR7の作成

Ba/F3細胞にTLR7fHとTLR7のa.a.459-461(VLE)をアラニンに置換したVLE-AAA変異体を遺伝子導入した。各細胞を溶解し、抗flag抗体にてTLRを免役沈降した。抗His抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、TLR7を検出した。

A



B

```
muTLR9  452  ADPHPAPLSTPASKNFMDRC  471
               D   PAP+  TP+S++F    C
HuTLR9  451  GDLAPAPVDTPSSEDFRPNC  470
```

▼ N末配列より決定した切断部位

▽ Deletion mutantより推定される切断部位

切断部位が集合した領域

図2-8　non-cleaved TLR9の作成

A: TLR9のaa460-467(d8)、aa459-467(d9)、aa458-467(d10)、aa457-467(d11)、aa456-467(d12)、aa455-467(d13)を欠失させた各変異体のコンストラクトを作成した（上）。各変異体のC末端にはfHタグを付加した。これらの変異体及びmock、TLR9fH(full)をTLR9ノックアウトマウス(TLR9KO)の骨髄幹細胞に遺伝子導入した後、樹状細胞に誘導した。コントロールとしてC57BL/6マウス(WT)にmock遺伝子を導入した。これらの細胞を溶解し抗flag抗体にて免疫沈降した。抗His抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、TLR9を検出した（下）。

B: マウスTLR9(muTLR9)及びヒトTLR9(HuTLR9) の切断部位付近のアミノ酸配列。

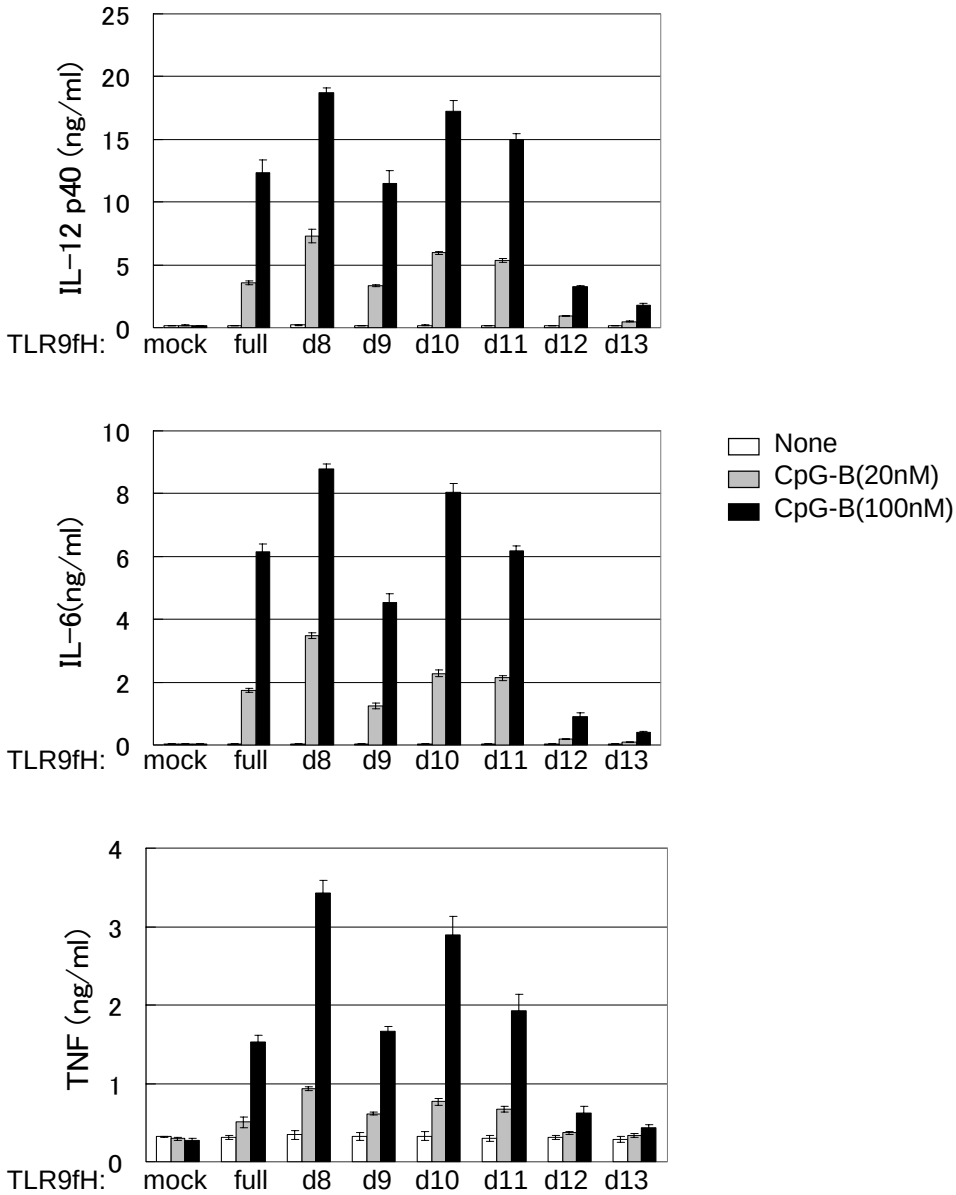


図2-9 non-cleaved TLR9を発現させたTLR9KO由来樹状細胞のサイトカイン産生

non-cleaved TLR9変異体及びmock 、TLR9fH(full)をそれぞれTLR9KOの骨髄幹細胞に遺伝子導入した後、樹状細胞に誘導した。この細胞にCpG刺激を加えて24時間後、細胞培養上清中に含まれる各種サイトカイン量を測定した。

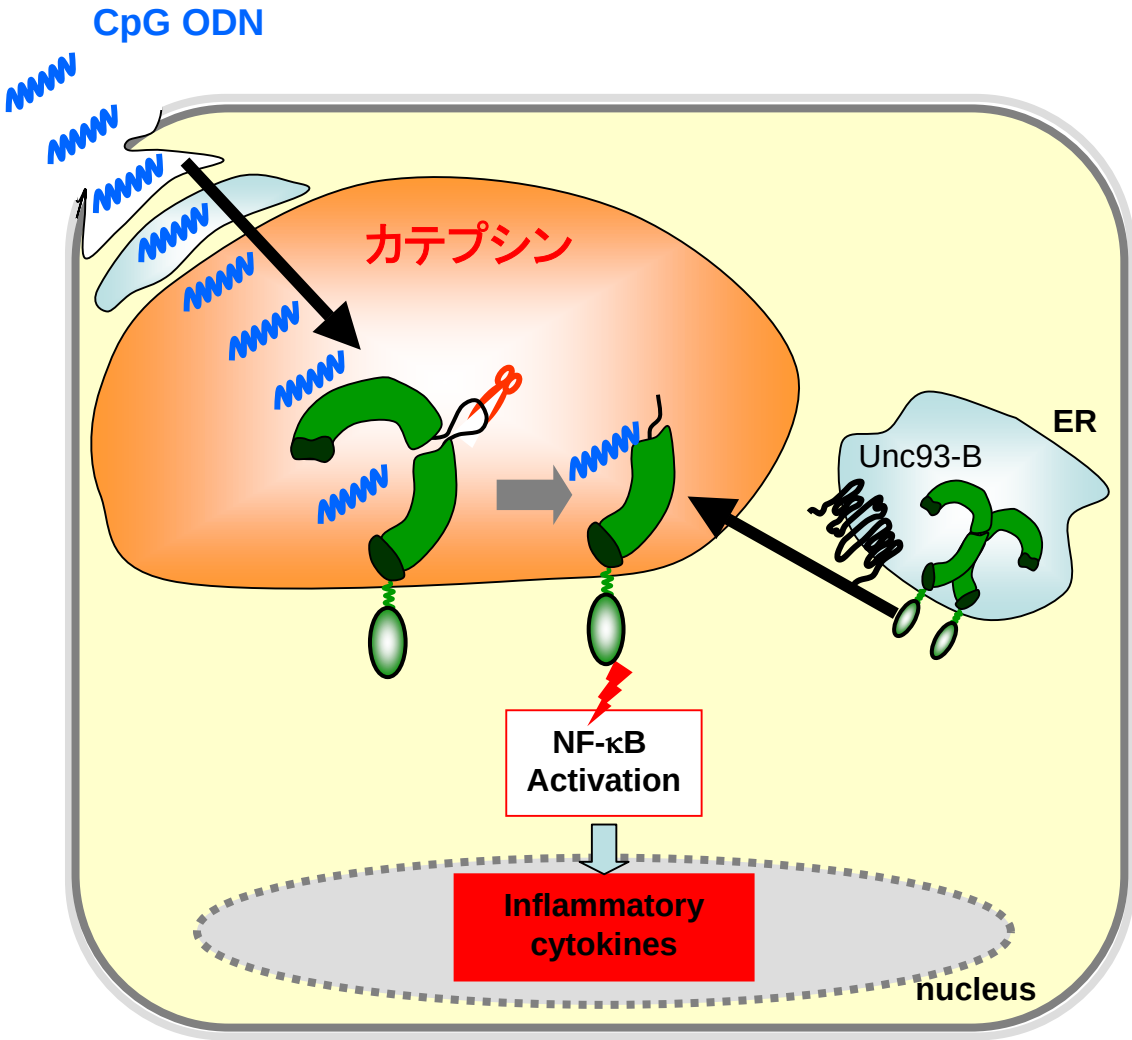


図2-10　TLR9のCpG認識メカニズムモデル2
　TLR9は二つのロイシンリッチリピートの間にあるヒンジ領域が切断され、切断されたTLR9が機能に必要である。