

# 「生体と制御」研究領域 領域活動・評価報告書

－平成 16 年度終了研究課題－

研究総括 竹田 美文

## 1. 研究領域の概要

本領域は、感染症、アレルギー、免疫疾患などの発症メカニズムを生体機能や病原微生物との関わりに着目して、分子レベル、細胞レベルあるいは個体レベルで解析することにより、これらの疾患の新しい予防法、治療法の基盤を築く研究を対象としている。

具体的には、病原微生物のゲノム解析によって明らかになった情報や、ヒトゲノム計画の進展によって得られたゲノム情報を利用したワクチンの開発や遺伝性疾患の解析、あるいは生体防御反応・免疫応答に関わる分子の生体レベルでの解析による免疫系疾患の病因解明、およびそれらに対する新しい治療方法の探索を目指す研究等が含まれる。

## 2. 研究課題・研究者名

別紙一覧表参照

## 3. 選考方針

- 1) 選考は「生体と制御」領域に設けた選考委員 8 名と研究総括で行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
  - ・ 書類選考では 1 提案につき 3 名の選考委員が査読評価を行う。
  - ・ 書類選考の査読評価にあたっては、選考委員が応募者と近い関係にある場合には査読担当とならないように配慮する。
  - ・ 面接選考では、書類選考の順位と関係なく、改めて評価を行う。
  - ・ 面接選考において選考委員が候補者と近い関係にある場合には、その候補者の評価は棄権する。
- 3) 選考の基本的な考えは以下の通り
  - ① 「生体と制御」領域の趣旨に合致していること。
  - ② 独創性に富む発想が含まれていること。
  - ③ 独立して研究を進めることができ、活力・統率力に富み、研究グループを構成して研究を推進できる研究者であること。
  - ④ 提案された研究が予算的にも、期間的にも実施可能であること。

## 4. 選考の経緯

上記選考方針に基づき、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補者を選定した。

選考	書類選考	面接選考	採用者
対象者数	97 名	20 名	10 名

## 5. 研究実施期間

平成 13 年 12 月～平成 16 年 11 月(1 名)→研究終了後、速やかに発展継続研究を推進。  
平成 13 年 12 月～平成 17 年 3 月(9 名)

## 6. 領域の活動状況

領域会議を6回開催し、研究者は研究進捗状況の報告を行い、研究総括・領域アドバイザーの批判、討論、アドバイスを通じて研究の更なる進展を図った。また、研究分野を異にする研究者同士が討論の中で交流を深め、個々の研究者の視野が広がり、新しい研究の着想が得られるように留意した。研究報告会(東京国際フォーラム)を1回開催し、3年間の研究成果を広く公表し、一般の評価を受けた。

研究総括は研究開始に際し、全研究者を訪問し、所属部署の長に協力を要請すると共に研究環境の確認を行った。その後、研究期間内に研究者が研究実施場所を移った際には新たな研究実施場所を訪問し、研究環境と研究進捗状況の確認を行った。

## 7. 評価の手続き

研究総括が研究者からの報告・自己評価を基に、必要に応じて領域アドバイザーの協力を得て行った。

(評価の流れ)

平成16年11月	研究期間終了(1名)
平成16年12月	研究報告会を東京国際フォーラムで開催
平成17年3月	研究期間終了(9名)
平成17年3月	研究課題別評価(自己評価)提出
平成17年3月	研究総括による評価

## 8. 評価項目

- (1) 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、その他公表に至っていない新しい知見の取得等の研究成果の状況
- (2) 得られた研究成果の科学技術への貢献度

## 9. 研究結果

「生体と制御」領域は生物現象の広い分野と関連しているが、テーマの採択に当たってはその中でも免疫を中心とした生体の防御反応の基本的な理解につながるものおよびそれと関連した病原微生物に対する防御、特にワクチンの開発につながる期待の高い研究を対象とし、単なる技術開発だけのものは除外した。平成13年度に採択した研究者は細菌学分野の研究者が2名、ウイルス学分野2名、寄生虫・原虫学分野2名、免疫学分野4名であるが、本研究領域はポスドク参加型であり、研究員(ポスドク)や技術員数名とチームを構成し、提案者の構想の実現のために厚みを持った研究を推進できる特徴がある。各研究者はそれぞれに高い目標を掲げて研究を開始した。3年間の研究期間の研究はおおむね順調に進み、ほぼ全員が初期の目標に近づく成果を挙げたといえる。中でも5名(川端、高柳、田中、野崎、吉田)の挙げた大きな成果は、それぞれの分野の研究の飛躍的展開の基盤となり、その意義は極めて大きい。これらはポスドク参加型の研究支援体制が有効に働いたものと評価される。

一期生10名の研究成果と当初研究目標に対する達成度は以下の個々人の研究成果報告ならびに自己評価および8名の領域アドバイザー諸先生方の評価を踏まえた研究総括の見解に示されている通りである。

## 10. 評価者

研究総括 竹田 美文 実践女子大学 教授

領域アドバイザー氏名(肩書きは現職)

笹川 千尋	東京大学医科学研究所 教授
鈴木 守	群馬大学 学長
竹田 泰久	日本製薬工業協会理事長付部長
光山 正雄	京都大学大学院医学研究科 教授
湊 長博	京都大学大学院医学研究科 教授
宮村 達男	国立感染症研究所ウイルス第二部 部長
山西 弘一	大阪大学大学院医学系研究科 研究科長
渡邊 武	理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター ユニットリーダー

(参考)

(1)外部発表件数

	国内	国際	計
論文	0	99	99
口頭	146	69	215
出版物	28	2	30
合計	174	170	344

\*平成17年3月現在

(2)特許出願件数

国内	国際	計
1	0	1

(3)受賞等

・川端 重忠

⊗日本細菌学会 小林六造記念賞(平成17年4月)

・高柳 広

⊗International Cytokine Society, Young Investigator Award (平成14年10月)

⊗Amersham Biosciences and Science Prize for Young Scientists (平成14年11月)

⊗日本骨粗鬆症学会 研究奨励賞(平成14年11月)

⊗ノバルティス・リウマチ医学賞(平成16年4月)

⊗日本リウマチ学会賞(平成16年4月)

⊗アメリカ骨代謝学会, Fuller Albright Award(平成16年10月)

⊗第1回日本学術振興会賞、日本学士院学術奨励賞(平成17年2月)

・宮沢 孝幸

⊗6th International Feline Retrovirus Research Symposium Best Oral Presentation  
賞(平成14年12月)

⊗日本獣医学会賞(平成16年4月)

(4)招待講演

国際 16件

国内 52件

## 別紙

## 「生体と制御」領域 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所*)	現職* (応募時所属)	研究費 (百万円)
上田 啓次 (兼任)	ウイルス潜伏感染機構の解明とその 制御法確立の試み (大阪大学大学院医学系研究科)	大阪大学大学院医学系研究科 助教授 (同上)	87
川端 重忠 (兼任)	ゲノム情報を応用したA群レンサ球菌 感染症の制御法の確立 (大阪大学大学院歯学研究科)	大阪大学大学院歯学研究科 助教授 (同上)	125
鈴木 敏彦 (兼任)	粘膜病原細菌の感染に対するワクチン 開発を目指した新戦略の構築 (東京大学医科学研究所)	東京大学医科学研究所 講師  (同大学 助手)	92
高柳 広 (兼任)	自己免疫性関節炎における骨破壊の 分子機構の解明とその制御法の確立 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合 研究科)	東京医科歯科大学大学院医歯学総合 研究科 教授 (東京大学大学院医学系研究科 助手)	90
田中 義正 (兼任)	感染および抗腫瘍免疫における交差 性生体制御機構の意義 (京都大学大学院生命科学研究科)	京都大学大学院生命科学研究科 助手 (同上)	83
野崎 智義 (兼任)	プロテオーム解析による赤痢アメーバ の病原機構の解明 (群馬大学大学院医学系研究科)	群馬大学大学院医学系研究科 教授 (国立感染症研究所寄生動物部 室長)	93
三田村 俊秀 (兼任)	赤血球期マラリア原虫の細胞増殖と脂 質代謝・輸送の分子機構の解明 (大阪大学微生物病研究所)	大阪大学微生物病研究所 助教授  (同大学 講師)	96
宮沢 孝幸 (兼任)	ウイルスとの共生:生まれながらにして 持つ自然抵抗性機構の解明 (帯広畜産大学畜産学部)	帯広畜産大学畜産学部 助教授  (大阪大学微生物病研究所 助手)	101
牟田 達史 (兼任)	自然免疫による微生物認識の分子機 構の解明 (九州大学大学院医学研究院)	九州大学大学院医学研究院 助教授 (同上)	108

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所*)	現職* (応募時所属)	研究費 (百万円)
吉田 裕樹  (兼任)	サイトカイン受容体による初期Th1誘導機構の解明 (佐賀大学医学部)	佐賀大学医学部 教授  (九州大学生体防御医学研究所 助手)	77

\*研究終了時

## 研究課題別評価

### 1 研究課題: ウイルス潜伏感染機構の解明とその制御法確立の試み

### 2 研究者氏名: 上田 啓次

グループメンバー: 都 銀珠(研究期間: H14.4.1~H16.3.31)

木下 みさ(研究期間: H13.12.14~H16.11.30)

### 3 研究の狙い:

ウイルス潜伏感染はその存在によって生体に様々な影響をもたらす。それは特に移植や癌治療、或は他の病原微生物(特にヒト免疫不全症ウイルス: HIV)の感染によって引き起こされる免疫不全状態で時に重篤な病態となって現れる。ヒトγヘルペスウイルスはこの状態にあつて種々の悪性腫瘍の発生に関わるとされ、その制御法の確立は重要な課題である。本研究ではヒトγヘルペスウイルスの一つであるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルスをモデルとしてその潜伏感染のメカニズムを明らかにし、ウイルスを自在に制御するにはどのような分子を標的とすべきかを明らかにすることを目的とする。

### 4 研究成果:

カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV)の潜伏感染ではその遺伝子発現はごく一部の遺伝子に限られ、大部分の遺伝子はその発現が抑制されている。この機構に関し、LANA (latency associated nuclear antigen)がヘテロクロマチン化に関する宿主因子 Suv39H1 と相互作用し、ウイルスゲノムをヘテロクロマチン化することを示した。Suv39H1 はヒストン H3 のメチラーゼで特に9番目のリジンをメチル化することが知られている。このメチル化されたヒストンはヘテロクロマチン因子、HP1 によって認識され、HP1 がリクルートされる。HP1 はさらに Suv39H1 をリクルートすることによりヘテロクロマチン領域がゲノム全般に徐々に広がることが想定される。溶解複製 (lytic replication) / 再活性化において極めて重要なはたらきをするウイルス遺伝子 RTA (replication and transcription activator) の制御領域でも潜伏感染状態ではヘテロクロマチン化されていることを同時に示した。これは潜伏感染状態におけるウイルス遺伝子発現抑制維持機構をよく説明している。

ウイルスゲノムの末端には GC に富む末端反復配列 (terminal repeat=TR) が存在する。潜伏感染ではこの部分は閉じられ、ウイルスゲノムは閉環状のプラスミド状態として存在している。そしてこの TR には潜伏感染の樹立・維持に必須の因子 LANA が結合している。つまり TR はそれ自体で或いは LANA との結合により、潜伏感染の樹立・維持に重要な機能を果たしていると考えられる。そこでこの TR に結合する因子の分離同定を試みた。その結果 TR 結合因子の一つとして宿主因子 PARP1 を分離した。この結合は LANA に非依存性であるが実際の感染細胞では近傍に LANA が結合しており、ADP-リボシル化されることが示された。また PARP1 の活性に影響する薬剤処理によって潜伏感染細胞内でのウイルスゲノムコピー数が調節されていることが示された (PARP1 の活性を上げるとコピー数は減少し、下げると増加する)。また宿主の複製因子である ORC などは LANA 依存性に TR に集合することを示した。このプロセスが潜伏感染時の細胞周期依存性のウイルスゲノム複製を遂行させるものと考えられる。

### 5 自己評価:

潜伏感染機構には未だ謎も多くそのすべてを解明した訳ではない。中間報告での評価も低くまた最終目標としては制御法の確立であったので目標に対しては 40~50%程度の達成率かと自己評価する。様々な理由(ここではいちいちそれに関して述べることは避ける)で思ったように研究

は進まなかったことは否めない。

制御法という観点では LANA の結晶解析を通じてのドラッグデザインを進めている。また LANA のノックダウン、PARP1 のノックダウンの実験が進行中である。そして今後の研究を進めるに当たっての材料の蓄積はかなり進んだと思う。今後の自らの研究の発展に期待したい。

#### 6 研究総括の見解:

ヒトγヘルペスウイルスに属するカポジ肉腫関連ヘルペスウイルスの潜伏感染のメカニズムを明らかにし、その制御を目指した研究である。潜在感染の樹立・維持に必須の因子である LANA がウイルスゲノムの末端に存在する GC に富む末端反復配列 (TR) に結合するのに関与する宿主因子 PARP1 を分離するなど、一定の成果を挙げた。しかしながら潜伏感染のメカニズムの本質を明らかにするには至っていない。今後 LANA や PARP1 の解析を進めることにより潜伏感染の機構とその制御を明らかにすることを期待する。

#### 7 主な論文等:

##### 論文

1. Eriko Ohsaki, Keiji Ueda, Shuhei Sakakibara, Eunju Do, Kaori Yada, Koichi Yamanishi. PARP1 (poly(ADP-ribose) polymerase 1) Binds with Kaposi's sarcoma-Associated Herpesvirus (KSHV) Terminal Repeat Sequence and Modulates KSHV Replication in Latency. *J. Virology*. in press
2. Nishimura, K., Ueda, K., Guwanan, Edihi, Shuhei Sakakibara, Eunju Do, Eriko Osaki, Kaori Yada, Toshiomi Okuno, Koichi Yamanishi. A Posttranscriptional Regulator of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Interacts with RNA-binding Protein PCBP1 and Controls Gene Expression through the IRES. *Virology* 325: 364-378, 2004.
3. Sakakibara, Shuhei, Keiji Ueda, Ken Nishimura, Eriko Ohsaki, Eunju De, Koichi Yamanishi. Accumulation of heterochromatin components on the terminal repeat sequence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus mediated by the latency-associated nuclear antigen. *J. Virology*. 78: 7299-7310, 2004.
4. Nishimura, K., Ueda, K., Sakakibara, S., Do, E., Ohsaki, E., Okuno, T., and Yamanishi, K. A Viral transcriptional activator of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) induces apoptosis, which is blocked in KSHV-infected cells. *Virology* 316: 64-74, 2003.

##### 日本語総説

1. 上田啓次. カポジ肉腫とひとヘルペスウイルス 8. 秀潤社刊 *Visual Dermatology* 3: 164-167, 2004.
2. 上田啓次. エイズ流行で危惧されるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス感染と腫瘍発生. 最新医学社刊 *最新医学* 60(2): 252-259, 2005.

##### 学会発表等

国内 4 件、国際学会 4 件

## 研究課題別評価

1 研究課題名:ゲノム情報を応用した A 群レンサ球菌感染症制御法の確立

2 研究者氏名:川端 重忠

グループメンバー:寺尾 豊(研究期間:H14.4.1~H16.3.31)

3 研究の狙い:

A 群レンサ球菌(group A streptococci: GAS)は、ヒトの咽頭部より感染し、咽頭炎、扁桃炎、肺炎などの上・下気道炎を引き起こす。本来は咽頭炎などの局所の炎症にとどまるが、無菌であるべき血液や筋肉、内臓に GAS が侵入する侵襲型レンサ球菌感染症が報告されるようになった。この致死率は 10%程度とされる。さらに、軟部組織壊死や多臓器不全等を引き起こす劇症型 A 群レンサ球菌感染症(streptococcal toxic shock syndrome: STSS)が新たに出現してきた。同感染症は感染症法の 5 類感染症に分類され、STSS 患者の致死率は 40%を越える。急速な病態進行や発症の機構が不明なことから、予防法や治療法は今のところ確立されていない。2001 年に米国オクラホマ大学のグループにより GAS の全ゲノム情報が公開された。そこで、グラム陽性菌の膜貫通型タンパクにみられる LPXTG モチーフなどの配列をプローブとし、未知の機能性タンパクを同定し、侵襲型感染症の発症機構の解明をめざした。同時に劇症化 GAS 感染症のマウスモデル実験系を確立し、劇症化に関わる GAS 以外の因子についても検討を加えた。

4 研究成果:

我々は、GAS の組織侵襲因子や感染拡散因子などについて、GASゲノムデータベース(M タンパクの血清型である M1 型、M3 型、M18 型)を活用して、新規の機能性タンパクを同定し、解析を行った。たとえば、STSS 発症患者から分離された M3 型菌の菌体表層には、グラム陽性菌の表層タンパクの C 末端に存在する LPXTG モチーフをもつ未知のタンパクが認められた。このタンパク FbaB はフィブロネクチンと強い親和性を有し、M3 型菌における主要な細胞侵入因子であること、世界各地から分離された M3 型 GAS 菌株を調べたところ劇症型分離株のみに FbaB タンパクの発現が認められたことなどから、FbaB は M3 型菌の劇症化因子のひとつであることが明らかとなった。GAS の菌体表層抽出画分より、新規の IgG 結合タンパクである Sib35 を同定した。Sib35 はその中央領域から C 末端側にかけてロイシンジッパー様モチーフを有しており、同部分を含めた領域に IgG が結合することが認められた。Sib35 は IgG に対して高い親和性を示した。Sib35 は直接 B 細胞に会合し、細胞分裂を促した。完全なロイシンジッパー構造(LXXXXXXXXLXXXXXXXXL)を有するタンパクをデータベース検索した結果、候補タンパク LZP を見いだした。LZP は Sib35 よりもさらに強力な B 細胞マイトジェン活性を有しており、その活性は LPS とほぼ同等であった。マウス脾臓細胞に LZP を添加すると、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12 の産生が非添加群と比較して明らかに亢進した。

呼吸器感染症の代表的な原因微生物であるインフルエンザウイルスと GAS の重感染モデル系の構築と侵襲因子の解析を行った。マウスに非致死量のインフルエンザウイルスを経鼻感染後、同じく非致死量の GAS を感染させたところ、90%以上のマウスが感染死した。同ウイルスと細菌の重感染は、抗ウイルスヘマグルチニン抗体で完全に阻害され、マウスの致死も回避された。電子顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡によって、GAS 菌体周辺には多数のインフルエンザウイルスが付着することを明らかにした。インフルエンザウイルスが肺において感染の足場をつくり、二次的に GAS が感染することにより、微生物の病原性が相乗的に亢進することを示した。この重感染モデル系を用いて、GAS 菌側の致死因子を探索した。各病原因子欠失株をインフルエンザウイ

ルス感染マウスに感染させ致死率を算定したところ、莢膜を欠失させた GAS はインフルエンザウイルス感染上皮細胞への付着が最も減弱し、さらにウイルスとの直接結合も低下した。これらの事実は、GAS 莢膜はインフルエンザ感染細胞への付着と感染動物の致死作用において極めて重要な機能を果たしていることを示している。

#### 5 自己評価:

GAS 感染症の重症化因子の一つとして、インフルエンザウイルスによる先行感染が重要であるという成果は、当初目標よりもかなり早く達成できた。さらに、細菌とウイルスとの結合に関与する双方のリガンド(レセプター)も同定できた。インフルエンザウイルス以外の呼吸器感染に関わるウイルスと GAS との混合感染系についても詳細に検討を加える必要がある。

GASゲノム情報から新規病原因子を同定する計画について、初期の段階(1年目)で、候補遺伝子(タンパク)を数多く抽出、選択した。大腸菌による組換えタンパクや不活化変異株などの作製に苦労したターゲット遺伝子もあったものの、総じて順調に新規遺伝子群の機能解析を遂行できた。3年の研究期間は過ぎたが、性状解析中の遺伝子もいくつか残っており、今後継続して研究を進める予定である。

GAS の全ゲノム解析によると、1,750 の遺伝子が存在すると推定されるが、未だその 1/3 については機能が未知である。GAS のように炎症性疾患から非炎症疾患まで幅広い疾患を引き起こす細菌は、病原性を発揮する術を幾通りも備えていると思われる。また、ゲノムサイズも大腸菌の半分程度であり、各種細菌のなかでもかなりコンパクトである。1つのタンパクが複数の機能を有している例も珍しくなく、GASにおいても限られたタンパクを有効に作用させている様子が想像され、これらの機構をさらに解明したいと考えている。

#### 6 研究総括の見解:

A 群レンサ球菌の中でヒトに重篤な症状を起こす侵襲型レンサ球菌及び劇症型 A 群レンサ球菌について、発症機構や劇症化に関わる宿主因子の解明を目指した研究である。A 群レンサ球菌の重症化因子の一つとして、インフルエンザウイルスによる先行感染が重要であることを示したことは高く評価できる。また A 群レンサ球菌の全ゲノム情報から新規病原因子を同定することにも成功しており、今後さらなる発展が期待できる。

#### 7 主な論文等:

##### 主な論文

1. Kawabata S, Tamura Y, Murakami J, Terao Y, Nakagawa I, and Hamada S. (2002) A novel, anchorless streptococcal surface protein that binds to human immunoglobulins. *Biochem Biophys Res Commun* 296: 1329-1333.
2. Terao Y, Kawabata S, Nakata M, Nakagawa I, and Hamada S. (2002) Molecular characterization of a novel fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes* strains isolated from toxic shock-like syndrome patients. *J Biol Chem* 277: 47428-47435.
3. Okahashi N, Sakurai A, Nakagawa I, Fujiwara T, Kawabata S, Amano A, and Hamada S. (2003) Infection of *Streptococcus pyogenes* induces receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand expression in mouse osteoblastic cells. *Infect Immun* 71: 948-955.
4. Okamoto S, Kawabata S, Nakagawa I, Goto T, Sano K, Okuno Y, and Hamada S. (2003) Influenza A virus-infected hosts boost the outbreak of invasive group A *Streptococcus* infections in mice. *J Virol* 77: 4104-4112.
5. Okamoto S, Kawabata S, Fujitaka H, Uehira T, Okuno Y, and Hamada S. (2004) Vaccination with formalin-inactivated influenza vaccine protects mice against lethal

influenza-*Streptococcus pyogenes* superinfection. *Vaccine* 22: 2887-2893.

6. Okamoto S, Kawabata S, Terao Y, Okuno Y, and Hamada S. (2004) *Streptococcus pyogenes* capsule is required for adhesion of bacteria to virus-infected alveolar epithelial cells and lethal invasive bacteria-viral superinfection. *Infect Immun* 72: 6068-6075.
7. Okamoto S, Tamura Y, Terao Y, Hamada S, and Kawabata S. Systemic immunization with streptococcal immunoglobulin-binding protein Sib35 induces protective immunity against group A *Streptococcus* challenge in mice. *Vaccine* in press.

#### 総説, 著書

1. Okamoto S, Kawabata S, Nakagawa I, Okuno Y, Goto T, Sano K, and Hamada S. (2004) A model of invasive type of *Streptococcus pyogenes* infection after intranasal superinfection in influenza A virus-infected mice. *Options for the Control of Influenza V* edited by Kawaoka Y. Elsevier B.V., 733-736.
2. 岡本成史, 浜田茂幸, 川端重忠. (2003) 肺上皮におけるインフルエンザウイルスとレンサ球菌並行感染による重症化メカニズムの解明. *感染・炎症・免疫*. 33:68-70.
3. 川端重忠. (2004) インフルエンザウイルスと A 群レンサ球菌の協調作用. *最新医学*. 59: 2348-2351.
4. 浜田茂幸, 中川一路, 川端重忠. (2005) 劇症型感染症をひき起こす A 群レンサ球菌のゲノム解析と病原性因子. *蛋白質核酸酵素*. 50:253-261.

#### 招待講演

1. Kawabata S. Molecular aspects of invasive group A *Streptococcus* infections induced by superinfection with influenza virus. The 7th Korea-Japan International Symposium on Microbiology. October, 2004. Seoul, Korea.
2. 川端重忠. 宿主免疫応答からの回避する A 群化膿レンサ球菌の分子機構. シンポジウム「病原性グラム陽性球菌感染の分子病態」第 76 回日本細菌学会総会. 2003 年 4 月, 熊本.
3. 川端重忠. レンサ球菌の宿主細胞侵入因子の同定と制御. シンポジウム「さきがけ研究における制御」第 3 回計測自動制御学会. 2003 年 5 月, 神戸.
4. 川端重忠. 侵襲型 A 群レンサ球菌感染症の発症因子. 特別講演. 第 13 回ランスフィールドレンサ球菌研究会. 2004 年 6 月, 東京.

#### 特許

新規レンサ球菌タンパク質抗原(公開番号 特開 2004-321010)

#### 受賞

2005 年 4 月 日本細菌学会小林六造記念賞

## 研究課題別評価

### 1 研究課題: 粘膜病原細菌の感染に対するワクチン開発を目指した新戦略の構築

### 2 研究者氏名: 鈴木 敏彦

グループメンバー: 光田 輝彦(研究期間: H14.4.1~H15.3.31)

吉田 整(研究期間: H14.4.1~H15.12.31)

赤倉 麗子(研究期間: H15.1.1~H16.8.31)

### 3 研究の狙い:

細菌性赤痢は、現在でも発展途上国の乳幼児の下痢症による死亡原因の約 5 割を占めている重要な感染症である。実際の統計においても全世界で年間 1 億 6500 万人が罹患し、そのうち 110 万人が死亡している(WHO、1999 年)。社会基盤が脆弱な開発途上国においては抗生物質による治療は経済的に困難を伴い、またその乱用により多剤耐性菌が蔓延しており、したがって効果的で安全なワクチンの開発が切望されている。これまで赤痢ワクチンの研究から現時点では生菌による O-多糖抗原に対する免疫誘導が感染防御に最も有効であり、上皮細胞への侵入性を保持したまま細胞内での増殖と拡散を不能にした二重変異株が多く作製されてきた。しかしこのようなワクチン株は依然として発熱と軽度の下痢原性を有し、特に乳幼児に対する安全性が解決されていない。このような背景から、次世代の安全性に優れた赤痢弱毒ワクチン開発に必要な分子基盤を確立することを本研究の目標とした。特に赤痢菌から分泌され粘膜感染に必須な役割を果たすエフェクター蛋白機能および抗原提示細胞の細胞死誘導機構に焦点を当てその分子機構を解明することを目指し、さらに得られた知見をもとに弱毒でかつ高い防御免疫誘導能を有するワクチン株の試作を行った。

### 4 研究結果:

#### (1)赤痢菌のアクチン重合機構と宿主細胞特異性

赤痢菌は細胞内に侵入後菌の一極にアクチンの重合を誘導して細胞質中を運動し、さらに隣接細胞へ拡散する。このアクチン重合に基づく細胞間拡散は菌のエフェクター蛋白 VirG と N-WASP との結合を介した Arp2/3 complex の活性化機構による。N-WASP は N-WASP、WASP、WAVE-1、-2、-3 からなる WASP ファミリーの 1 分子であるが、我々は赤痢菌の VirG が N-WASP とのみ特異的に結合することを見出した。またマクロファージ等の血球系細胞では特異的に WASP が発現しているが N-WASP の発現は抑制されており、そのためマクロファージ内では赤痢菌はアクチンコメットを形成しない。このことから VirG-N-WASP の特異的結合が赤痢菌の細胞内運動機構における宿主細胞特異性を決定していることが明らかとなった。

#### (2)宿主細胞侵入性に関与する VirA エフェクターの機能の解明

赤痢菌のエフェクターの 1 つ VirA の宿主標的分子は宿主細胞のチューブリンであることを見出した。試験管内で VirA は微小管の不安定性を増大する活性をもっていたが、VirA の細胞内発現や細胞への微量注入を行うと VirA は微小管に局在し細胞辺縁からラッフル膜の形成を認めた。一方赤痢菌の感染や VirA の細胞内発現によって低分子量 GTP 結合蛋白 Rac1 の活性化がみられた。したがって VirA は微小管の不安定性を増大させることによって Rac1 を活性化し、これによって細胞による菌の貪食を誘導することが明らかとなった。

#### (3)抗原提示細胞に対する細胞死誘導機構の解明

赤痢菌が樹状細胞(DC)やマクロファージといった抗原提示細胞に侵入する(あるいは貪食される)と、ファゴゾームを溶解して細胞質へ離脱し、その後細胞死を誘導することが知られている。菌による細胞死誘導はカスパーゼ-1 の活性化によると報告されてきたが、我々はカスパーゼ-1 の

活性化は菌の細胞死誘導に促進的に働くが必須ではないことを明らかにした。各種赤痢菌変異株を用いた実験の結果、赤痢菌や大腸菌といったグラム陰性細菌に共通の因子がマクロファージの細胞質へ移行することによって細胞死の誘導が起きることが示された。さらに細胞死誘導因子の同定を行い最終的に Lipid A が細胞死誘導分子の 1 つであることを明らかにした。実際に Lipid A (あるいは LPS)が TLR4 を介してアポトーシス活性あるいは抗アポトーシス活性を誘導することは広く知られている。しかし、TLR4 欠損マクロファージに赤痢菌が感染しても依然細胞死の誘導が認められた。したがって感染細胞の細胞質において赤痢菌から放出される lipid A が TLR4 を介さない全く別の細胞死誘導シグナルを刺激していることが示唆された。

#### (4)新規弱毒ワクチン株の作製とその評価

赤痢菌がマクロファージに侵入し細胞質に遊離すると細胞死の誘導とそれに伴い IL-1 $\beta$  の分泌が引き起こされる。これらによる強い炎症は細胞侵入性を有する赤痢菌株であれば誘導される。したがってマクロファージの細胞死は従来の細胞侵入性弱毒ワクチン株でみられる炎症(ひいては発熱といった副作用)の誘導に関わると考えられた。そこで細胞侵入能は有するがマクロファージに感染後のファゴゾーム膜溶解能を欠失した変異株を作製できれば低炎症性の新規のワクチン株になる可能性があると考えられた。エルシニアの細胞侵入因子 *invasin* の遺伝子を細胞侵入能欠損株(IpaB エフェクター欠損株)に導入した。本変異株は細胞侵入性を持つがマクロファージに感染後細胞死を誘導せず、細胞死に伴って大量に分泌される IL-1 $\beta$  および IL-18 量も低下していた。次にマウスに対する肺炎惹起モデルを用い、*invasin* 発現変異株のワクチンとしての効果の有無を検討した。投与後の血清中および気管支肺洗浄液中の抗赤痢菌 LPS-IgG, -IgA の有意な上昇がみられ、さらに致死量の赤痢菌野生株感染に対する感染防御効果が示された(投稿準備中)。

#### 5 自己評価:

本研究の期間に赤痢菌が有しているエフェクターの多彩な機能の一部を明らかにすることができたが、新規に開始した未知のエフェクターの解析が思うように進行しなかったことは反省すべき点である。その一方で、赤痢菌が誘導する細胞死のメカニズムの一端を明らかにし、その応用として新たに作製したワクチン株による感染防御誘導は、低炎症性新規赤痢ワクチン株のプロトタイプとして有用な基礎知見となりえた。

#### 6 研究総括の見解:

赤痢菌の新世代ワクチンの開発を目指した研究である。赤痢菌の感染は粘膜細胞に侵入して成立するが、この粘膜感染に必須のエフェクター蛋白が数多く報告されている。これらエフェクター蛋白の機能の一部を明らかにしたことは評価に値する。また、赤痢菌は抗原提示細胞の細胞死を誘導するが、この細胞死の分子機構の一端を明らかにした。さらに、これらの成果を踏まえて新たなワクチン候補株を作製し感染防御を誘導することを示した。今後の新世代ワクチン開発の基礎を示したものとして期待される。

#### 7 主な論文等:

1. Suzuki, T., Mimuro, H., Suetsugu, S., Miki, H., Takenawa, T., and Sasakawa, C. 2002. Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) is the specific ligand for *Shigella* VirG among the WASP family and determines the host cell type allowing actin-based spreading. *Cell. Microbiol.* 4: 223-233.
2. Yoshida, S., Katayama, E., Kuwae, A., Mimuro, H., Suzuki, T., and Sasakawa, C. 2002. *Shigella* deliver an effector proteins to trigger host microtubule destabilization, which promotes Rac1 activity and efficient bacterial internalization. *EMBO J.* 21: 2923-2935.
3. Mimuro, H., Suzuki, T., Takaka, J., Asahi, M., Haas, R., and Sasakawa, C. 2002. Grb2 is a key

- mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities. *Mol Cell*. 10: 745–755.
4. Ogawa, M., Suzuki, T., Tatsuno, I., Abe, H., and Sasakawa, C. 2003. IcsB, secreted via the type III secretion system, is chaperoned by IpgA and required at the post-invasion stage of *Shigella* pathogenicity. *Mol. Microbiol.* 48: 913–931.
  5. Tanaka, J., Suzuki, T., Mimuro, H., and Sasakawa, C. 2003. Structural definition on the surface of *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus. *Cell. Microbiol.* 5: 395–404.
  6. Jang, M.H., Kweon, M.N., Iwatani, K., Yamamoto, M., Terahara, K., Sasakawa, C., Suzuki, T., Nochi, T., Yokota, Y., Pennert, P.D., Hiroi, T., Tamagawa, H., Iijima, H., Kunisawa, J., Yuki, Y., and Kiyono, H. 2004. Intestinal villous M cells: An antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
  7. Ogawa, M., Yoshimori, T., Suzuki, T., Sagara, H., Mizushima, N., and Sasakawa, C. 2005. Escape of Intracellular *Shigella* from Autophagy. *Science* 307: 727–731.
  8. Suzuki, T., Nakanishi, K., Tsutsui, H., Iwai, H., Akira, S., Inohara, N., Chamillard, M., Nunez, G., and Sasakawa, C. 2005. A novel caspase-1/Toll-like receptor 4-independent pathway of cell death induced by cytosolic *Shigella* in infected macrophages. *J. Biol. Chem.* In press.

学会発表 国際 1件 国内 5件  
招待講演 国内シンポジウム 1件

## 研究課題別評価

1 研究課題: 自己免疫性関節炎における骨破壊の分子機構の解明とその制御法の確立

2 研究者氏名: 高柳 広

グループメンバー: 磯部 美穂(研究期間: H14.4.1~H16.11.30)

古賀 貴子(研究期間: H14.4.1~H16.7.31)

3 研究の狙い:

関節リウマチに代表される自己免疫性関節炎は全世界の人口の約 1%の患者を有する最も頻度の高い自己免疫疾患の一つである。滑膜の炎症に伴い骨破壊を生じるため、患者の運動機能は著しく制限されるが、この骨破壊を防止する治療法は確立されていない。これまでの研究で、関節炎性骨破壊において破骨細胞が重要な役割を果たし、この破骨細胞の誘導には TNF ファミリーのサイトカインである破骨細胞分化因子 (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand: RANKL) が重要であることを解明してきた。そこで、PRESTO においては、この RANKL の細胞内シグナル伝達に注目し、破骨細胞分化を制御する分子メカニズムを解明し、新たな骨破壊治療法への分子基盤を確立することをめざして研究を行った。

特に重点を置いたのが RANKL 誘導遺伝子の網羅解析である。従来 RANKL の細胞シグナル伝達に関与すると考えられている分子は、NF- $\kappa$ B, MAP kinase, AP-1 などが知られていた。しかし、これらのシグナル分子は多くの他のサイトカイン等によっても活性化されることから、RANKL 下流には、未知の特異的なシグナル伝達分子が存在するはずであると予想して、RANKL 誘導遺伝子のトランスクリプトーム解析を行った。この網羅的解析にはマウス全遺伝子をカバーする Affymetrix GeneChip を用いてゲノムワイドでのスクリーニングを行った。ここで得られた知見をもとに、骨吸収と骨形成の制御に必須の分子を同定し、ノックアウトマウスや遺伝子欠損 ES 細胞を利用して機能解析を行った。

4 研究成果:

### 【IFN- $\beta$ の RANKL シグナルの自己制御因子として意義の解明】

トランスクリプトーム解析の結果、RANKL によってインターフェロン(IFN)- $\alpha/\beta$ 誘導遺伝子として知られる遺伝子が多数誘導されることが明らかになった。これまで、IFN- $\alpha/\beta$ は抗ウイルス作用をもつ免疫制御分子であると考えられてきたが、IFN- $\alpha/\beta$ 受容体欠損マウス由来の骨髄細胞からは通常の 2 倍もの破骨細胞が形成されることから、IFN- $\alpha/\beta$ が破骨細胞分化を抑制する重要な因子であることが示唆された。IFN- $\alpha/\beta$ の中でも、破骨細胞前駆細胞においては、RANKL は IFN- $\beta$ を特異的に誘導することが明らかになり、IFN- $\beta$ の遺伝子欠損マウスの骨組織を検討したところ、破骨細胞の数が異常に増え、骨粗鬆症様の症状を呈するマウスであることがわかった。以上より、IFN- $\beta$ が骨代謝の制御でも必須の役割を担うことが明らかになった。また、IFN- $\beta$ による RANKL シグナルの抑制標的が転写因子 c-Fos であることも解明した。さらに、IFN- $\beta$ を投与することで、*in vivo* においてもマウスの炎症性骨破壊モデルの治療に成功した。これらの結果から、IFN- $\beta$ や IFN- $\beta$ 誘導剤あるいは、c-Fos 経路の抑制剤の研究開発を進めれば、炎症性骨疾患の治療に新たな道を拓く可能性が示された。(Nature 416 : 744, 2002)。

### 【破骨細胞の分化のマスターレギュレーター転写因子 NFATc1 の発見】

トランスクリプトーム解析による最大の成果は、転写因子 NFATc1 が、破骨細胞の分化のマスターレギュレーター(分化決定分子)であることを解明した点である(*Dev Cell* 3: 889, 2002)。これは、NFATc1 欠損 ES 細胞が破骨細胞に分化できないこと、骨髄マクロファージ系細胞にレトロウイルスで NFATc1 を過剰発現して破骨細胞を誘導可能であったことから証明された。RANKL は NFATc1 を大量に誘導することで破骨細胞の分化を促進することが明らかになり、はじめて破骨細胞分化特異的な転写プログラム的一端が解明された。さらに、この破骨細胞分化における NFATc1 の活性化には細胞内カルシウムシグナルの活性化やカルシウム依存的に活性化されるフォスファターゼであるカルシニューリンが重要であることが明らかになった。これらの新規シグナル経路を詳細に解析することで、破骨細胞分化機構の全貌が明らかになり、それを利用した新規骨疾患治療の可能性が拓かれたと言える。

【RANKL によるカルシウムシグナル活性化に必須の DAP12/FcR $\gamma$  会合免疫グロブリン様受容体群の同定】

上記の結果を進展させ、RANKL 下流におけるカルシウムシグナルの活性化機構の解析を続けた。特に、RANKL 受容体である RANK がカルシウムシグナルを直接活性化できないことに着目し、破骨細胞分化過程においてカルシウムシグナルを活性化する新たな受容体系を探索する過程で、DAP12 と FcR $\gamma$  のダブルノックアウトマウスにおいて破骨細胞分化が障害され、大理石骨病を呈することを発見した。DAP12 や FcR $\gamma$  と会合する免疫グロブリン様受容体群を介したシグナルが破骨細胞分化に必須であることを示しており、破骨細胞分化における新たな必須受容体を同定し、NFATc1 上流のカルシウムシグナル伝達経路の解明に道を拓く重要な成果といえる(*Nature* 428: 758, 2004)。

【関節リウマチの病態における NFATc1 の関与と治療標的としての重要性】

NFATc1 の関節リウマチの病態への関与についても検討を行った。関節リウマチの病理組織学的検討を行うと、骨破壊部に見られる破骨細胞において NFATc1 は非常に高く発現しており、治療標的として有望であることが示唆された。そこで、既存の抗リウマチ薬の破骨細胞分化系への作用を指標にしてスクリーニングを行い、骨破壊抑制効果をもつ抗リウマチ薬レフルノミドが NFATc1 を標的として破骨細胞分化を抑制すること、またこの抑制作用が生体レベルにおける骨破壊抑制作用にも重要であることを明らかにした(*Arthritis Rheum* 50: 794, 2004)。NFATc1 の活性化機構の解析が臨床的にも応用可能であることを示唆する重要な成果と言える。

【Stat1 の骨形成抑制機能の発見とその分子メカニズムの解析】

骨破壊を効率良く制御するには、骨吸収抑制だけではなく、骨形成を促進することも重要な側面である。すでに述べたように IFN- $\beta$  が意外にも骨代謝制御の必須分子であったことから、IFN- $\beta$  下流で活性化される転写因子複合体の構成分子の骨代謝における意義を遺伝子欠損マウスを用いて解析した。そして、転写因子 Stat1 が骨芽細胞分化を制御する転写因子 Runx2 の抑制因子であることを見いだした。Stat1 による抑制を解除することで、人為的に骨形成を促進する方法が開発できる可能性が示された(*Genes Dev* 17: 1979, 2003)。

このように、免疫系の制御分子による骨代謝制御という視点から、サイトカインや転写因子などの関与を分子レベルで解明した一連の報告は、osteimmunology (骨免疫学) と呼ば

れる分野を開拓したとして、主要国際誌において論評をうけている(*Nature* 416:686, 2002, *Nat Med* 10:458, 2004)。

#### 5 自己評価：

骨破壊の原因となる破骨細胞の分化制御機構の解析に関しては、サイトカイン RANKL の発見の後、世界的な競争が激化していた。特に、網羅的に下流のシグナル分子を探索する手法は比較的容易に着想できるため、その方法で重要な標的を発見し世界に先駆けて報告できるかどうかは楽観できない状況にあった。本研究においては、PRESTO の予算を重点的に網羅解析に利用することで、適切なコントロールを置いた大規模な検索を行うことができた。その結果、破骨細胞の分化のマスター転写因子 NFATc1 を同定し、世界に先駆けて発表することができた。この発見によって破骨細胞分化の研究は大きく発展し、新たな治療標的経路を示すことにも結びついた。また、NFATc1 を活性化するカルシウムシグナルの解析から、RANKL が機能するためには、共刺激シグナルを伝える免疫グロブリン様受容体が必須であることが解明された。この発見は、免疫系の制御に関わる受容体群が、広く骨代謝に関与することを初めて示した報告となり、われわれが推進する骨代謝学と免疫学の境界領域である骨免疫学の重要性を示すことができた。遺伝子改変マウスを用いた解析などを多用した煩雑な研究計画の遂行においては、ポスドク参加型による人的なサポートが不可欠であった。本研究期間においては、幸運にも当初の目標を概ね達成することができたと考えている。今後は、本研究で明らかになったメカニズムを発展させ、破骨細胞をモデルとした細胞分化機構全貌の解明を目指すと同時に、新たな骨破壊制御のための手法を探索し、臨床応用に向けた知見を集めることが重要と考える。

#### 6 研究総括の見解：

関節リウマチなどの自己免疫性関節炎における骨破壊の分子機構の解明のために、骨吸収と骨形成の制御に必須の分子を同定し、その機能を明らかにすることを目的とした研究である。破骨細胞の分化のマスター転写因子の発見や同シグナルを伝える免疫グロブリン様受容体の発見などにより、骨代謝学と免疫学の境界領域である骨免疫学を確立し、骨破壊制御による治療の基盤を樹立した極めて独創的かつ発展性豊かな研究である。

#### 7 主な論文等：

##### 【論文】

1. Gohda, J., Akiyama, T., Koga, T., Takayanagi, H., Tanaka, S. and Inoue, J. RANK-mediated amplification of TRAF6 signaling leads to NFATc1 induction during osteoclastogenesis. **EMBO** 24(4)790-799 (2005)
2. Takatsuna, H., Asagiri, M., Kubota, T., Oka, K., Osada, T., Sugiyama, C., Saito, H., Aoki, K., Ohya, K., Takayanagi, H. and Umezawa K. Inhibition of RANKL-induced Osteoclastogenesis by (-)-DHMEQ, a Novel NF- $\kappa$ B Inhibitor, through Downregulation of NFATc1. **J Bone Mineral Res** 20(4) 653-662 (2005)
3. Matsumoto, M., Kogawa, M., Wada, S., Takayanagi, H., Tsujimoto, M., Katayama, S., Hisatake, K., Nogi, Y. Essential role of p38 MAP kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1. **J Biol Chem.** 279(44),45969-79 (2004)

4. Koga, T., Inui, M., Inoue, K., Kim, S., Suematsu, A., Kobayashi, E., Iwata, T., Ohnishi, H., Matozaki, T., Kodama, T., Taniguchi, T., Takayanagi, H.\*, and Takai, T.\* Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. **Nature** 428,758–763 (2004)  
\*Corresponding authors
5. Urushibara, M.\*, Takayanagi, H.\*, Koga, T., Kim, S., Isobe, M., Morishita, Y., Nakagawa, T., Löeffler, M., Kodama, T., Kurosawa, H., and Taniguchi, T. The antirheumatic drug leflunomide inhibits osteoclastogenesis by interfering with receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand-stimulated induction of nuclear factor of activated T cells c1. **Arthritis Rheum** 50(3), 794–804 (2004)  
\*Equal contributors
6. Kim, S., Koga, T., Isobe, M., Kern, B. E., Yokochi, T., Chin, Y. E., Karsenty, G., Taniguchi, T., and Takayanagi, H. Stat1 functions as a cytoplasmic attenuator of Runx2 in the transcriptional program of osteoblast differentiation. **Genes Dev** 17(16), 1979–91 (2003)
7. Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J-I, Wagner, E. F., Mak, T. W., Kodama, T., and Taniguchi, T. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling for terminal differentiation of osteoclasts. **Dev Cell** 3, 889–901(2002)
8. Takayanagi, H., Kim, S., Matsuo, K., Suzuki, H., Suzuki, T., Sato, K., Yokochi, T., Oda, H., Nakamura, K., Ida, N., Wagner, E. F. & Taniguchi, T. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of *IFN- $\beta$* . **Nature** 416, 744–49 (2002)
9. Nakamura, I., Kadono, Y., Takayanagi, H., Jimi, E., Miyazaki, T., Oda, H., Nakamura, K., Tanaka, S., Rodan, G. A. & Duong le, T. IL-1 regulates cytoskeletal organization in osteoclasts via TNF receptor-associated factor 6/c-Src complex. **J Immunol** 168, 5103–9 (2002)
10. Yamamoto, A., Miyazaki, T., Kadono, Y., Takayanagi, H., Miura, T., Nishina, H., Katada, T., Wakabayashi, K., Oda, H., Nakamura, K. & Tanaka, S. Possible involvement of I $\kappa$ B kinase 2 and MKK7 in osteoclastogenesis induced by receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand. **J Bone Miner Res** 17, 612–21. (2002)
11. Ogasawara, K., Hida, S., Weng, Y., Saiura, A., Sato, K., Takayanagi, H., Sakaguchi, S., Yokochi, T., Kodama, T., Naitoh, M., De Martino, J. A. & Taniguchi, T. Requirement of the IFN- $\alpha/\beta$ -induced CXCR3 chemokine signalling for CD8<sup>+</sup> T cell activation. **Genes Cells** 7, 309–320 (2002)

#### 【総説】

1. Takayanagi H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. **J Periodontal Res** (in press)
2. Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. **J Mol Med** 83(3), 170–179 (2005)

他、英文 3 編/邦文 17 編

【特許】

発明の名称：大理石骨病発生症モデル非ヒト動物（出願番号：2004-108206）

発明者：高井俊行、高柳広、乾匡範、古賀貴子 出願日：2004年3月30日

出願人：科学技術振興機構

【受賞】

2002年

国際サイトカイン学会 International Cytokine Society, Young Investigator Award 2002.10.6

サイエンス誌若手科学者賞 Amersham Biosciences and Science Prize for Young Scientists  
2002.11.20(*Science* 298 p. 1568 (2002))

平成 14 年度日本骨粗鬆症学会研究奨励賞 2002.11.22

2004年

ノバルティス・リウマチ医学賞 2004.4.14

日本リウマチ学会賞 2004.4.15

アメリカ骨代謝学会, Fuller Albright Award 2004.10.2

2005年

第1回(平成 16 年度)日本学術振興会賞 2005.3.22

第 1 回日本学士院学術奨励賞 2005.3.22

【招待講演】

Hiroshi Takayanagi: Integration of RANKL Signaling by NFATc1 in Osteoclastogenesis.  
26<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, 2004.10.3,  
Seattle

Hiroshi Takayanagi: Leflunomide inhibits bone destruction by interfering with RANKL  
signaling and osteoclastogenesis

Annual European Congress of Rheumatology "EULAR 2004", 2004.6.11, Berlin

他、国際 6 件/国内 27 件

## 研究課題別評価

1 研究課題: 感染および抗腫瘍免疫における交差性生体制御機構の意義

2 研究者氏名: 田中 義正

グループメンバー: 喜多 祥一(研究期間: H14.4.1~H17.3.31)

3 研究の狙い:

現在行われているがんに対する治療法は、手術、放射線照射、化学療法などいずれも侵襲性の高いものが多く、患者の QOL がきわめて悪い。これに対して、がんに対する免疫療法は、侵襲性が低く、QOL も良好であるが、治療効果の面で期待されているほどの成績は出していない。本研究課題においては、ヒト $\gamma\delta$ 型T細胞の有する感染免疫作用と抗腫瘍免疫作用との交差性を利用した新しい腫瘍標的免疫療法を確立するための基盤解析を行うことを目的とした。

一般に、免疫療法は大きく2つに分類することができる。一つは、サイトカインなどを用いた非特異的免疫療法であり、他方は、細胞傷害性T細胞を利用した特異的免疫療法である。前者においては、IL-2 を利用した LAK 療法などが代表的なものである。これらの治療法においては、具体的な手技として、サイトカインの投与といった既存の一般的技術しか利用しないため、治療法の標準化が容易である。しかし、その治療効果はメラノーマなど一部の腫瘍に限定され、一般化が困難である。後者においては、特異的なペプチド性抗原認識が期待されるため、理論的には治療の標準化が可能であるが、実際的には、腫瘍特異的ペプチドの同定や抗原特異的T細胞の大量培養などの高度な免疫学的手法を駆使するため、臨床的な標準化が困難である。また、腫瘍細胞にMHCの発現抑制があると、効果がなくなるため、適用症例にも限界がある。

一方、 $\gamma\delta$ 型T細胞は、結核菌、マラリア原虫、ピロリ菌など病原性微生物の産生するピロリン酸モノエステル系代謝産物、プロテウスなどの病原性細菌の産生するアルキルアミン系代謝産物、また、それら天然微生物抗原の類縁体である窒素含有型ビスホスホン酸などを認識する。すなわち、微生物に特異的なパターン抗原を認識するという点で、機能的には自然免疫系の細胞群に分類されるが、抗原認識に遺伝子の再構成を経て構築された $\gamma\delta$ 型T細胞受容体を利用しており、構造学的には適応性免疫にも分類される。このことから、 $\gamma\delta$ 型T細胞は自然免疫と適応性免疫との交差性を有していることが考えられる。また、病原性微生物の産生する抗原を認識し、感染直後に増殖誘導がみられることから、 $\gamma\delta$ 型T細胞は感染免疫に関与していることが明らかであるが、一方、増殖誘導をうけ活性化された $\gamma\delta$ 型T細胞は強い腫瘍細胞傷害性を有するという点において、腫瘍免疫にも関与していると考えられる。実際に、腎臓がんにおいては、約4分の1の患者において $\gamma\delta$ 型T細胞の増加がみられ、原発巣の摘出後には $\gamma\delta$ 型T細胞の減少が観察されている。このように $\gamma\delta$ 型T細胞は、感染免疫と抗腫瘍免疫との交差性をも有する。

本研究課題においては、 $\gamma\delta$ 型T細胞の感染免疫的側面を利用して、ピロリン酸モノエステル系化合物により $\gamma\delta$ 型T細胞の増殖誘導を行い、また、その細胞の腫瘍免疫的側面を利用して、窒素含有型ビスホスホン酸処理により感作した腫瘍細胞を効率よく傷害するという、新しい腫瘍標的免疫療法を確立するための基盤解析を行った。

4 研究成果:

(1)  $\gamma\delta$ 型T細胞受容体依存的非ペプチド性抗原の認識機構の解析

$\alpha\beta$ 型T細胞は、主要組織適合性抗原(MHC)クラス I あるいは II / 抗原性ペプチド複合体を $\alpha\beta$ 型T細胞受容体(TCR)で認識し、その際、その相互作用を CD4 あるいは CD8 分子が補助する。一般に、 $\gamma\delta$ 型T細胞は CD4、CD8 分子を欠落しており、抗原もペプチドではなく、ピロリン酸モノエステル、アルキルアミン、窒素含有型ビスホスホン酸のような非ペプチドである。このような

ことから、 $\gamma\delta$ 型T細胞の非ペプチド性抗原認識機構が $\gamma\delta$ 型 TCR 依存性かどうかは明らかではなかった。そこで、Jurkat 細胞の系を用いて TCR 依存性を検討した。まず、TCR 欠損株の Jurkat 細胞に $\gamma$ 鎖および $\delta$ 鎖の遺伝子を導入し、 $\gamma\delta$ 型 TCRを発現する Jurkat 細胞を確立した。そして、 $\alpha\beta$ 型 Jurkat、TCR欠損型 Jurkat、 $\gamma\delta$ 型 Jurkat のそれぞれに、3種の非ペプチド性抗原を作用させた結果、 $\gamma\delta$ 型 Jurkat 細胞だけが反応性を示し、IL-2を産生した。このことから、ピロリン酸モノエステル、アルキルアミン、窒素含有型ビスホスホン酸の非ペプチド性抗原は、いずれも $\gamma\delta$ 型 TCRにより認識されることが明らかとなった。

次に、 $\gamma\delta$ 型 TCRによりどのようにして非ペプチド性抗原が認識されるのか明らかにするために、 $\gamma\delta$ 型 TCRの立体構造解析を行った。まず、 $\gamma$ 鎖および $\delta$ 鎖の細胞外領域をコードする遺伝子を大腸菌用の発現ベクターに組み込んだ。このままでは、いずれも発現が見られなかったため、RBS 領域の改変、ステムループの除去、ホルミルメチオニンの効率的除去、リボソームの可動性誘導、レアコードンの除去などを行い、大腸菌1リットル培養において300mg程度の封入体を得ることができた。次に、これら封入体をDTT加尿素・グアニジン溶液に溶解し、アルギニン加トリスベース緩衝液に迅速希釈した。さらに、低濃度尿素加トリス緩衝液に対して透析を行い、陽イオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製を行った。 $\gamma\delta$ 型TCR細胞外領域タンパク質の純度検定については電気泳動、ゲル濾過、光散乱により行い、免疫グロブリンフォールドの形成は円偏光二色性により確認した。得られたタンパク質標品を結晶化スクリーニングに供した結果、2種類の緩衝液で結晶が確認され、0.2mm程度の単結晶が得られた。これをインハウスのX線発生装置で解析した結果、4Åの解像度でデータが得られ、さらに、SPring8の放射光を用いた解析により、1.9Åの解像度のデータセットが得られた。次に、結晶の軸を決定し、分子置換法により分子モデルを構築し、精密化した結果、2.4Åの解像度で $\gamma\delta$ 型 TCRの構造を決定することができた。

次に構造解析の結果、および、遺伝子配列解析の結果から、非ペプチド性抗原認識に関わると考えられるアミノ酸残基を推定したところ、 $\gamma$ K108、 $\delta$ R51、 $\delta$ L97が重要であると考えられた。そこで、この3つのアミノ酸残基をアラニン置換して、それらをコードする遺伝子を、Jurkat細胞のシステムで再構成したところ、いずれの点変異においても非ペプチド性抗原に対する反応性は消失した。このことから、非ペプチド性抗原の認識機構は、次のようになると考えられた。まず、ピロリン酸モノエステル系抗原の場合、 $\gamma$ K108および $\delta$ R51のポジティブチャージしたアミノ酸側鎖に環境中の無機リン酸などのネガティブチャージしたイオンが相互作用する。ここにピロリン酸モノエステル系抗原が入ってくると、無機リン酸が排除され、ピロリン酸残基のネガティブチャージが $\gamma$ K108および $\delta$ R51のポジティブチャージと相互作用する。そして、ピロリン酸モノエステル系抗原の炭化水素鎖と $\delta$ L97のアミノ酸側鎖が疎水相互作用する。このようにして、ポジティブ・ネガティブの相互作用と疎水相互作用により、ピロリン酸モノエステル系抗原が認識される。一方、ポジティブチャージを有しているアルキルアミン系抗原の場合には、環境中の無機リン酸はそのまま、そのネガティブチャージとアルキルアミンのポジティブチャージが相互作用する。すなわち、 $\gamma$ K108および $\delta$ R51のポジティブチャージ、無機リン酸のネガティブチャージ、アルキルアミンのポジティブチャージの電荷ブリッジが形成される。そして、ピロリン酸モノエステル系抗原の場合と同様、アルキルアミン系抗原の炭化水素鎖と $\delta$ L97のアミノ酸側鎖が疎水相互作用する。このようにして、アルキルアミン系抗原が、ピロリン酸モノエステル系抗原の認識部位と同一の部位で認識される。また、窒素含有ビスホスホン酸系抗原の場合には、基本的には、アルキルアミン系抗原と同様の作用様式で認識されることが考えられる。以上のように、本研究により、 $\gamma\delta$ 型TCRの結晶構造が高解像度で解析され、さらに、遺伝子工学的手法を用いた機能解析の結果から、構造・機能相関が明らかとなり、 $\gamma\delta$ 型T細胞による非ペプチド性抗原認識機構を詳細に解析することが可能になった。

(2)  $\gamma\delta$ 型T細胞による腫瘍細胞認識に関与する副刺激シグナル分子の解析

$\gamma\delta$ 型T細胞は、高活性化状態にあるときには、ナチュラルキラー様の活性により、 $\gamma\delta$ 型TCR非依存的に種々の腫瘍細胞を傷害する。しかし、定常状態においては、非常に限られた細胞株だけを $\gamma\delta$ 型TCR依存的に傷害する。これらの中には、RPMI8226などのマルチプルミエローマ細胞やDaudiなどのバーキットリンパ腫が含まれる。これは、RPMI8226やDaudiに $\gamma\delta$ 型TCRの抗原が発現されているためだと考えられる。一方、腎臓がん、膀胱がん、肺がんを含むほとんどの腫瘍細胞株において、窒素含有型ビスホスホン酸処理を行うと、定常状態の $\gamma\delta$ 型T細胞が $\gamma\delta$ 型TCR依存的に腫瘍細胞傷害性を呈するようになる。この際、腫瘍細胞表面上の窒素含有型ビスホスホン酸が $\gamma\delta$ 型TCR依存的に認識されると考えられる。しかし、そのシグナル伝達をサポートする副刺激シグナル分子については、ほとんど明らかになっていなかった。そこで、本研究において、ほとんどの腫瘍細胞上に発現している正の副刺激シグナル分子の探索を行った。まず、膀胱癌の一種であるEJ-1と肺癌の一種であるLK-2をマウスおよびラットに免疫し、それらを認識するモノクローナル抗体をスクリーニングした。この際、他に6種類の腫瘍細胞の染色も行い、計8種類の腫瘍細胞をクロス染色できるモノクローナル抗体を選択した。その結果、8種類の独立したモノクローナル抗体が樹立でき、ウェスタンブロッティング解析、免疫沈降解析、質量分析を行い、樹立された8種類のモノクローナル抗体がいずれもCD166を認識していることを確認した。CD166の発現分布を解析した結果、ほとんどのヒト腫瘍細胞にその発現がみとめられ、正常細胞では、CD14陽性のモノサイト系の細胞にその発現が確認された。ここで、CD166の受容体はCD6であることが明らかとなっているので、 $\gamma\delta$ 型T細胞上の発現を確認したところ、CD6の強い発現が認められた。

以上の結果から、CD166/CD6の相互作用が $\gamma\delta$ 型T細胞の抗腫瘍活性に影響を与えている可能性が示唆されたので、機能解析を行うことにした。まず、CD166の発現の認められないエリスロリユーケミアであるK562にモックのベクターあるいはCD166の遺伝子を組み込んだ発現ベクターを遺伝子導入し、K562/MockおよびK562/CD166細胞を樹立した。これらの細胞に窒素含有型ビスホスホン酸をパルスし、 $\gamma\delta$ 型T細胞を作用させた。その結果、CD166の発現があると、 $\gamma\delta$ 型T細胞の抗原認識能が明らかに上昇した。このことは、CD166/CD6の相互作用が、 $\gamma\delta$ 型T細胞の腫瘍細胞傷害性において、明らかに正の制御を行っていることを示唆している。また、逆にCD166の発現を抑制した場合に $\gamma\delta$ 型T細胞の機能にどのような影響を与えるか検討を行った。まず、CD166分子を発現しているLK-2にモックのベクターあるいはCD166のRNA干渉用のベクターを組み込んだ。そして、窒素含有型ビスホスホン酸パルスを行い、 $\gamma\delta$ 型T細胞の反応性の違いを検討した。その結果、CD166の発現を抑制すると、 $\gamma\delta$ 型T細胞のエフェクター作用が抑制されることが明らかとなった。以上の結果より、CD166/CD6の相互作用が、 $\gamma\delta$ 型T細胞の抗腫瘍作用において、正の副刺激シグナルとして作用していることが明らかになった。

### (3)新しい腫瘍標的免疫療法における安全性の確立

上記の $\gamma\delta$ 型T細胞のエフェクター作用に関する基礎的解析結果をもとに、新しい腫瘍標的免疫療法を開発するための基盤解析を行った。この腫瘍標的免疫療法は、病原性微生物抗原の合成誘導体である2-メチル-3-ブテニル-1-ピロリン酸により、*in vitro*で $\gamma\delta$ 型T細胞を増殖誘導する局面と、がん細胞を窒素含有型ビスホスホン酸で標識して、 $\gamma\delta$ 型T細胞で傷害する局面とに分かれる。このうち、最初の局面においては、まず、健常人末梢血単核球で検討したところ、抗原処理により $10^3$ 倍から $10^4$ 倍の増殖効果が見られた。また、がん患者においても、同様の結果が得られたことから、 $\gamma\delta$ 型T細胞の増殖誘導に関しては問題のないことが明らかになった。次に、がん細胞を窒素含有型ビスホスホン酸で標識する局面に関しては、窒素含有型ビスホスホン酸投与の安全性が確立しているため問題は生じない。そこで、最後の局面である、 $\gamma\delta$ 型T細胞の投与に関してその安全性を検討した。すなわち、がん患者において、抗原処理により $\gamma\delta$ 型T細胞を増殖誘導し、それをがん患者に投与することに関して、その安全性を検討した。その結果、 $\gamma$

δ型T細胞を $10^{10}$ から $10^{11}$ 程度移入しても、重篤な副作用はみとめられず、その安全性が確認された。以上の臨床的結果より、今後、新しい腫瘍標的免疫療法を開発するための基盤が確立された。

#### 5 自己評価:

本研究課題に採択された際に、掲げた目標は、 $\gamma\delta$ 型TCRの構造解析を行い、それをもとにして、構造・機能相関から $\gamma\delta$ 型T細胞の非ペプチド性抗原認識機構を明らかにするとともに、その作用様式を利用して、新しい腫瘍標的免疫療法を開発するための基盤解析を行うというものであった。まず、最初の目的である、結晶解析による三次構造の決定であるが、これは、三次構造解析技術を習得することと、実際得られた構造をもとにして構造・機能相関解析を行うことの2つの目的があった。技術の習得に関しては、タンパク質の発現制御、リフォールディング、結晶化、コンピューター解析と一連の手技を習得することができ、今後の研究において重要な意味を持つと考えられる。また、実際に得られた結果に関しては、 $\gamma\delta$ 型TCRによる非ペプチド性抗原認識機構の概要が明らかになり、それをもとに、構造・機能相関解析ができるようになった。しかし、より明確な結論を出すためには、 $\gamma\delta$ 型TCRと非ペプチド性抗原との共結晶解析、点変異体 $\gamma\delta$ 型TCRの結晶解析が必要であり、今後の課題となっている。しかし、技術的問題はクリアーされているので近い将来結果を出すことができると思われる。また、本研究の基礎面における結果を応用する試みとして、もう一つの課題であった実際の臨床応用研究の基礎構築を試みた。その結果、臨床応用のための前臨床治験も終了し、その安全性が確立されたので、これから、がんトランスレーショナルリサーチへと進み、本研究課題で提唱した新しい腫瘍標的免疫療法の確立を目指していきたい。

#### 6 研究総括の見解:

ヒト $\gamma\delta$ 型T細胞の感染免疫作用と抗腫瘍免疫作用との交差性を利用した新しい腫瘍標的免疫療法を確立するための基盤解析を目標とした研究である。 $\gamma\delta$ 型T細胞の感染免疫学的側面を利用したピロリン酸モノエステル系化合物による $\gamma\delta$ 型T細胞の増殖誘導やその細胞の腫瘍免疫的側面を利用した窒素含有型ビスホスホン酸処理により感作した腫瘍細胞の効率の良い傷害など、新しい腫瘍標的免疫療法を確立するための基盤解析を行い、今後の発展が期待される成果を挙げている。

#### 7 主な論文等:

##### 論文

(1) Ying Li, Takaaki Koshiba, Atsushi Yoshizawa, Yukihide Yonekawa, Kosuke Masuda, Atsushi Ito, Mikiko Ueda, Takehide Mori, Hiroshi Kawamoto, Yoshimasa Tanaka, Shimon Sakaguchi, Nagahiro Minato, Kathryn J. Wood, and Koichi Tanaka

Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation

*Am. J. Transplant.* 4: 2118–2125 (2004).

(2) Taku Okazaki, Yoshimasa Tanaka, Ryosuke Nishio, Tamotsu Mitsuiye, Akira Mizoguchi, Jian Wang, Masayoshi Ishida, Hiroshi Hiai, Akira Matsumori, Nagahiro Minato, and Tasuku Honjo  
Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for the dilated cardiomyopathy in PD-1 deficient mice

*Nature Med.* 12: 1477–1483 (2003).

(3) Seiji Yamashita, Yoshimasa Tanaka, Masashi Harazaki, Bunzo Mikami, and Nagahiro Minato  
Recognition mechanism of non-peptide antigens by human  $\gamma\delta$  T cells

*Int. Immunol.* 15: 1–7 (2003).

(4) Yu Kato, Yoshimasa Tanaka, Hidenori Tanaka, Seiji Yamashita, and Nagahiro Minato  
Requirement of species-specific interactions for the activation of human  $\gamma\delta$  T cells by pamidronate

*J. Immunol.* 170: 3608–3613 (2003).

(5) Yoshiko Iwai, Masayoshi Ishida, Yoshimasa Tanaka, Taku Okazaki, Tasuku Honjo, and Nagahiro Minato

Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor

immunotherapy by PD-L1 blockade

*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 12293-12297 (2002).

(6) Masayoshi Ishida, Yoshiko Iwai, Yoshimasa Tanaka, Taku Okazaki, Gordon J. Freeman, Nagahiro Minato, and Tasuku Honjo

Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues

*Immunol. Lett.* 84: 57-62 (2002).

(7) Fumi Miyagawa, Yoshimasa Tanaka, Seiji Yamashita, Bunzo Mikami, Kiichiro Danno, Masami Uyehara, and Nagahiro Minato

Essential contribution of germline-encoded lysine residues in J $\gamma$ 1.2 segment to the recognition of nonpeptide antigens by human  $\gamma\delta$  T cells

*J. Immunol.* 167: 6773-6779 (2001).

#### 特許

(1) Yoshimasa Tanaka and Takehiko Uchiyama

2-Methyl-3-butenyl-1-pyrophosphoric acid salts and agents for treating lymphocytes

United States Patent, US 6,534,050 B1, Mar. 18, 2003.

#### 招待講演

国内 5件

## 研究課題別評価

1 研究課題:プロテオーム解析による赤痢アメーバの病原機構の解明

2 研究者氏名:野崎 智義

グループメンバー:佐藤 暖(研究期間:H16.4.1~H16.8.31)

繁田 泰男(研究期間:H15.5.1~H17.3.31)

岡田 麻美(研究期間:H14.4.1~H15.3.31)

3 研究の狙い:

嫌気性原虫赤痢アメーバはヒトの大腸に寄生し、複数の病原因子を細胞外に放出して免疫細胞を融解したり、感染局所の組織破壊を起こすとともに、破壊された細胞・組織を活発に貪食(ファゴサイトーシス)・除去して寄生を成立させる。病原因子の分泌や貪食は赤痢アメーバの寄生に不可欠であり、その分子機構を解明することは、赤痢アメーバの病原機構を理解するために不可欠である。我々は分泌や貪食を調節する細胞機構としての小胞輸送に注目し、赤痢アメーバの小胞輸送の特殊性を分子レベルで明らかにすることにより、赤痢アメーバの小胞輸送が病原機構にどう関与するかを解明することを目指した。

4 研究成果:

### 1. プロテオーム解析によるファゴソームタンパク質の網羅的同定

貪食過程に関わる分子を網羅的に同定することを目的として、貪食胞(ファゴソーム)を分離・精製し、ファゴソームに存在するタンパク質をプロテオーム解析により同定した。これによりファゴソームの形成、成熟の過程でファゴソームに動員される160を超えるタンパク質とそれぞれのタンパク質の動態を明らかにした。赤痢アメーバに特異的な細胞表面レクチン、システインプロテアーゼ(CP)を含む様々な加水分解酵素、Rabタンパク質などが同定された。約40%のタンパク質はいかなる既知のタンパク質とも有意な同一性をもたない新規タンパク質であり、赤痢アメーバ特異的なファゴソーム成熟機構が示唆された。また、これまで細胞表面やミトコンドリアに存在すると予測されていたタンパク質がファゴソームに構成的に見られた。以上の結果をもとに赤痢アメーバのバーチャルファゴソームを構築することができ(図1)、赤痢アメーバのファゴソーム形成・成熟に関与するタンパク質群の全体像とその詳細な動態が解明された。同時に、赤痢アメーバのファゴソーム成熟過程の特殊性の一端が分子レベルで明らかになった。

### 2. 赤痢アメーバの貪食におけるRabタンパク質の役割の解明

低分子量GTPaseRabタンパク質は特定の小胞間の特異的な結合と融合(docking/fusion)に機能する重要なタンパク質である。我々は貪食の際に機能する数種類のRabタンパク質の特異的な役割を明らかにした。赤痢アメーバがほ乳動物の赤血球に接着すると、貪食が開始する前に、ファゴソームと独立した2-3 $\mu$ mの空胞(prephagosomal vacuole, PPV)が形成された。この空胞の形成には少なくともRab5とRab7Aの2種類のRabが関与していた。Rab5はPPV形成に、Rab7AはPPVの形成とPPVを介するリソソーム分解酵素のファゴソームへの輸送に機能していた。PPVは他種生物に見られないユニークなオルガネラであり、リソソーム由来の分解タンパク質であるCPやアメーバポア(AP)などを活性化し貯蔵する準備空胞であると予想された(図2)。

更にRab7Aの機能を調節するタンパク質としてRab7A結合タンパク質を生化学的精製により単離したところ、他種生物でレトロマー(retromer)と呼ばれている複合体と似た構造を示す複合体を獲得した。赤痢アメーバのレトロマー様複合体は赤痢アメーバRab7Aと特異的に結合し、リソソーム酵素の輸送をネガティブに制御していた(図2)。複合体との結合を介したRab7Aの調節機構は

他種生物と異なった前例のない制御機構であった。

赤痢アメーバの小胞輸送の特殊性として、Rab の高度の多様性が挙げられる。一般に酵母などの単細胞生物では 7-11 種、多細胞生物のハエ、線虫、植物、ヒトでも 29-57 種の Rab が存在するに過ぎないのに対して、単細胞生物である赤痢アメーバは少なくとも 90 種の Rab タンパク質を有する。赤痢アメーバの Rab の多様性を示す 1 つの例としてヒトでは存在しない Rab7 のアイソタイプの存在が挙げられる。赤痢アメーバでは少なくとも 8 種類の Rab7 アイソタイプが存在する。我々は上記 Rab7A に続いて Rab7B, Rab7D の貪食の小胞輸送における役割を明らかにした(図 2)。これらの一連の成果により赤痢アメーバの貪食における Rab7 アイソタイプの貪食における特異的な役割が明確になった。

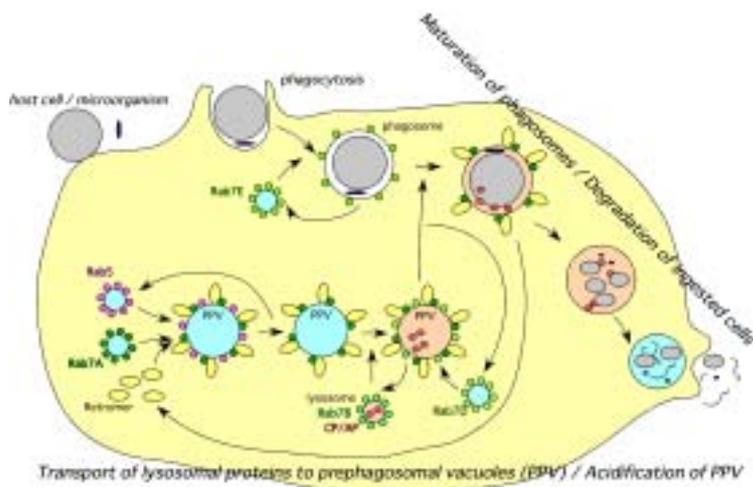
### 3. 赤痢アメーバにおける貪食過程の可視化

貪食におけるファゴソームの成熟過程をリアルタイムで追跡するシステムを構築した。赤痢アメーバのファゴソーム内腔はファゴソームの形成後 2 分以内に pH4.5 まで低下し、少なくとも数時間酸性化されたまま維持された。また、貪食胞における緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現した酵母やリーシュマニア原虫の分解も半減期 10 分以内であり、効率的な酸性化と分解が急速に起こっていることが明らかになった。病原性の効率の異なる複数の赤痢アメーバ株と非病原性関連種である *E. dispar* を用いてファゴソームの酸性化と分解の比較を行った。ファゴソームの酸性化の効率とファゴソームでの GFP 分解は良く相関していたが、酸性化・分解の効率は必ずしも見かけの病原性と相関していなかった。以上のことはファゴソームの酸性化が分解機構と密接に相関していることを示していると同時に、ファゴソームの酸性化・分解・成熟の効率だけが赤痢アメーバ原虫の病原性を規定しているのではなく、分解酵素の細胞内での分別輸送・分泌の調節がより密接に病原性に関与していることが予想された。

図 1 プロテオーム解析によるバーチャルファゴソーム



図 2 赤痢アメーバにおけるファゴソームの形成と成熟過程



## 5 自己評価:

赤痢アメーバの病原機構を小胞輸送という観点からとらえた研究を目指し、十分な成果を挙げることができたのではないかと考えている。第1に食食過程に関与する分子を網羅的に同定することにより、他種生物との相似及び赤痢アメーバにおける特殊性が明らかにされただけでなく、今後病原性と直接リンクするタンパク質を解明する基盤を構築することができた。第2に病原機構の一部である食食の小胞輸送に関与する個別のタンパク質の機能を解明する過程で、赤痢アメーバ原虫に特異的な細胞内オルガネラの同定と空胞の成熟機構の発見に至った。第3に赤痢アメーバにおける小胞輸送を分子プローブを用いて可視化することに成功した。また、本報告書には記載しないが、赤痢アメーバに選択的に存在するアミノ酸代謝酵素メチオニンガンマリアーゼ、並びに、低分子量 GTPase の脂質修飾酵素の発見とこれら標的酵素に対する創薬も達成しており、目指した研究提案の多くを達成することが出来たのではないかと考える。しかしながら、命題の中心である食食・分泌の病原機構における必須性に関しては、今後の研究で明らかにしたい。特に、食食に関与するどの分子が病原性と最も高く相関しているかを、病原性株・非病原性分離株間、及び赤痢アメーバ・非病原性アメーバ間での量・動態の比較により発見し、その機能を逆遺伝学的手法を用いて解明する予定である。また、赤痢アメーバ全遺伝子を網羅した DNA マイクロアレイを作製し、病原性に強く相関する小胞輸送、或いはそれ以外の経路に関与する遺伝子を網羅的に同定したいと考えている。

## 6 研究総括の見解:

腸管寄生原虫赤痢アメーバの小胞輸送の特殊性を分子レベルで明らかにすることにより、赤痢アメーバの小胞輸送が病原機構にどう関与するかを解明することを目的とした研究である。赤痢アメーバの食食の特殊性を明らかにするとともに病原性に直接関与する蛋白因子を解明した。また食食の小胞輸送に関与する蛋白の機能を解明して、赤痢アメーバに特異的な細胞内オルガネラの同定と空胞の成熟機構を発見した。さらに小胞輸送を分子プローブを用いて可視化することに成功し、初期の研究目的を達成した。

## 7 主な論文等:

### 論文

1. Haghghi, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Masuda, G., and Nozaki, T. (2002) Remarkable genetic polymorphism among *Entamoeba histolytica* isolates from a

- limited geographic area. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4081-90.
2. Haghghi, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Thammapalerd, N., and Nozaki, T. (2003) Geographic diversity of genotypes among *Entamoeba histolytica* field isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 3748-3756.
  3. Dvorak, J.A., Kobayashi, S., Nozaki, T., Takeuchi, T., and Matsubara, C. (2003) Induction of permeability changes and death of vertebrate cells is modulated by the virulence of *Entamoeba* spp. Isolates. *Parasitol. Int.* 52, 169-173.
  4. Ali, V., Shigeta, Y., and Nozaki, T. (2003) Molecular and structural characterization of NADPH-dependent D-glycerate dehydrogenase from the enteric parasitic protist *Entamoeba histolytica*. *Biochem. J.* 375, 729-736.
  5. Tokoro, M., Kobayashi, S., Takeuchi, T., and Nozaki, T. (2003) A novel sulfur-containing amino acid degradation enzyme methionine  $\gamma$ -lyase from the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 278, 42717-42727
  6. Ghosh, S., Chan, J., Lea, C.R., Meints, G.A., Lewis, J.C., Tovian, Z., Flessner, R., Loftus, T.C., Bruchhaus, I., Fradley, K.L., Kendrick, H., Croft, S., Kemp, R., Kobayashi, S., Nozaki, T., and Oldfield, E. (2004) Effects of Bisphosphonates on the Growth of *Entamoeba* and *Plasmodium* species *in vitro* and *in vivo*. *J. Med. Chem.* 47, 175-187.
  7. Kumagai, M., Makioka, A., Takeuchi, T., and Nozaki, T. (2004) Molecular cloning and characterization of a protein farnesyltransferase from the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 279, 2316-2323.
  8. Ali, V., Shigeta, Y., Tokumoto, U., Takahashi, Y., and Nozaki, T. (2004) An intestinal parasitic protist *Entamoeba histolytica* possesses a non-redundant NIF-like system for iron-sulfur cluster assembly under anaerobic conditions. *J. Biol. Chem.* 279, 16863-16874.
  9. Ali, V., Shigeta, Y., Hashimoto, T., and Nozaki, T. (2004) Molecular and biochemical characterization of D-phosphoglycerate dehydrogenase from *Entamoeba histolytica*: a unique enteric protozoan parasite that possesses both phosphorylated and non-phosphorylated serine metabolic pathways. *Eur. J. Biochem.* 271, 2670-2681.
  10. Saito-Nakano, Y., Yasuda, and Nozaki, T. (2004) Unique role of Rab5 and Rab7 in phagocytosis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 279, 49497-49507.
  11. Loftus, B., Anderson, I., Davies, R., Alismark, U. C. M., Samuelson, J., Amedeo, P., Roncaglia, P., Berriman, M., Hirt, R. P., Mann, B. J., Nozaki, T., Suh, B., Pop, M., Duchene, M., Ackers, J., Tannich, E., Leippe, M., Hofer, M., Bruchhaus, I., Willhoeft, U., Bhattacharya, A., Chillingworth, T., Churcher, C., Hance, Z., Harris, B., Harris, d., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Ormond, D., Squares, R., Whitehead, S., Guillen, N., Gilchrist, C., Stroup, S. E., Bhattacharya, S., Lohia, A., Foster, P. G., Sicheritz-Ponten, T., Weber, C., Singh, U., Mukherjee, C., Petri, W. A. J., Clark, C. G., Embley, T. M., Barrell, B., Fraser, C. M., and Hall, N. (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* (in press)
  12. Okada, M., Huston, C. D., Mann, B. J., Petri, Jr., W. A., Kita, K., and Nozaki, T. (2005) Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot. Cell* (in press).

13. Saito-Nakano, Y., Loftus, B. J., Hall, N., and Nozaki, T. (2005) The diversity of Rab small GTPases in *Entamoeba histolytica*. *Exp. Parasitol.* (In press).
14. Beck, D.L., Boettner, D., Dragulev, B., Ready, L., Mackey, A.J., Nozaki, T., Pearson, W.R., and Petri, Jr., W.A. (2005) Identification and gene expression analysis of a large family of transmembrane kinases related to the Gal/GalNAc lectin in *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot. Cell* (in press)
15. Nozaki, T., Ali, V., and Tokoro, M. (2005) Sulfur-containing amino acid metabolism in parasitic protozoa. *Adv. Parasitol. Review* (in press).

#### 招待講演

1. Nozaki, T. (2002) Proteome analysis of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*. Amitochondriate Protozoan Genome Sequencing Projects: *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, and *Giardia lamblia*. Cambridge, U.K., May 20-21, 2002
2. Nozaki, T. (2003) Functional characterization of a complex associated with small GTPase Rab7, which plays an important role in phagocytosis. EMBO Workshop on pathogenesis of amebiasis: from genomics to disease Paris, May 19-21, 2003.
3. Nozaki, T. (2004) Iron-sulfur cluster formation in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*: unique non-redundant nitrogen fixation (NIF)-like system in the anaerobic parasite. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Aug 30-Sept 2, 2004, Awaji, Japan.
4. Nozaki, T. (2004) *Entamoeba histolytica* phagosome proteome “Genomics and Biology of the Amitochondriates” Sept 18-19, 2004, Woods Hole.
5. Nozaki, T., Nakada-Tsukui, K., Mitra, B. N., Okada, M., Saito-Nakano, Y., Huston, C. D., Mann, B. J., and Petri, Jr., W. A. (2004) Vesicular trafficking in phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. EMBO Workshop on Pathogenesis of Amoebiasis: From Genomics to Disease, Nov 16-20, 2004, Ein Gedi, Israel.

他国内3件

## 研究課題別評価

### 1 研究課題: 赤血球期マラリア原虫の細胞増殖と脂質代謝・輸送の分子機構の解明

### 2 研究者氏名: 三田村 俊秀

グループメンバー: Nirianne Marie Q. Palacpac (研究期間: H14.4.1~H16.11.30)

瀬戸 真太郎(研究期間: H15.4.1~H16.3.31)

### 3 研究の狙い:

地球規模の問題であり、未だ人類に脅威を与えつつけている寄生虫感染症マラリアの臨床症状、ならびに複雑な病理は、病原因子であるマラリア原虫がその生活環境中の赤血球サイクルに入った時のみ生じる。熱帯熱マラリア原虫は、人に感染する原虫種の中で最も悪性な種であり、かつ、汎用されている抗マラリア薬に対する耐性株が蔓延している。さらにはこの原虫種に対する有効なワクチンが実用化されていない。このような現状において、新規抗マラリア薬の開発は、ワクチン開発と同様急務の課題である。

本研究では、熱帯熱マラリア原虫が呈するモデル生物、特に哺乳動物には見られない細胞増殖と細胞内物質輸送に関するユニークな現象に着目し、赤血球期熱帯熱マラリア原虫の細胞増殖に必須な血清中脂質成分の代謝・輸送の分子機構の解析を通して、感染症マラリアの治療・予防に資する新規抗マラリア薬開発につながる標的分子の提供を目指した。

### 4 研究成果:

#### (1) トリアシルグリセロールのユニークな代謝・輸送

赤血球期熱帯熱マラリア原虫におけるトリアシルグリセロール(TAG)の代謝・輸送については、原虫細胞が、赤血球サイクル後期にTAGを蓄積するということがほぼ 20 年前に報告されて以来、長らく報告がなかった。そこで、我々は、TAGの代謝・輸送が感染赤血球内で実際に機能しているのかを検証し、その生物学的意義を考察した。赤血球サイクル全体にわたる精査の結果、以下の4点が明らかとなった。1) TAGの見かけの蓄積速度は、原虫細胞の主要な膜構造の構成成分であるホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミンのそれらに比べて、明らかに遅れて、かつより急速に増加すること。さらに、赤血球サイクルの後期に蓄積が最大となるTAGは、感染赤血球の壊裂直前から分解が進行し、それにともない遊離脂肪酸が培地中に放出されること。2) TAGが濃縮される細胞内脂質滴を可視化し、赤血球サイクルの各ステージでその数が増加するとともにそれらの局在を変え、赤血球壊裂直前のステージにおいては、寄生液胞膜と原虫細胞の周りに集中すること。また、その数と局在の変化は、プレフェルデン A に感受性であること。3) TAG合成の最終酵素として知られるジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ(DGAT)活性は、1)、2)の結果と一致して、赤血球サイクル後期に上昇すること。4) TAG をエネルギー貯蔵体として利用する上で重要な位置を占める脂肪酸の酸化分解系、その代表である  $\beta$ -酸化について、熱帯熱マラリア原虫の活性は、哺乳動物のミトコンドリア内に存在するそれと比較し、少なくとも 1/300 以下であること。

今回明らかにした赤血球期熱帯熱マラリア原虫の TAG 代謝・輸送に関する上記の知見は、一般に言われている TAG の機能であるエネルギー貯蔵体として、もしくは脂質代謝のアシル供与体として、生体の恒常性の維持に関与しているという概念では説明できない。つまり、赤血球期原虫において、TAG は、これまでにない新規の機能、我々の解析結果から考えると感染赤血球の壊裂、または感染赤血球からの娘細胞の遊離の段階において、原虫特異的な重要な機能を果たしているという可能性が考えられる。この仮説を支持するひとつの証拠として、DGAT 活性を担う酵素の 1 つとして知られる DGAT1 の熱帯熱マラリア原虫オルソログ遺伝子(PfDGAT1)を破壊した原虫株

を樹立しようと試みたが、PCR 法による遺伝子破壊はできているという証拠は得ることができたにもかかわらず、遺伝子破壊株を濃縮することはできなかった。この結果は、PfDGAT1 が、赤血球期熱帯熱マラリア原虫の細胞増殖において必須の役割を果たしている可能性が高いと解釈できる。

#### (2) 血清中細胞増殖必須脂肪酸の感染赤血球内への取り込み・輸送に関与する原虫側因子

マラリア生物学において遺伝学的手法が使用できる HB3 株と Dd2 株、さらにはこれらの親株から派生した 26 種類のキメラ子孫細胞株を用いて、赤血球期熱帯熱マラリア原虫の細胞増殖に必要な血清中脂肪酸であるパルミチン酸とオレイン酸の取り込み・輸送に関与する原虫因子の同定につなげることができないかを検討した。結果、以下の 3 点が明らかとなった。1) パルミチン酸とオレイン酸を会合させた脂質フリーのウシ血清アルブミン(FA)に対する細胞増殖応答は、HB3 株は通常の数増殖をするのに対して、Dd2 株は明らかな異常を示すこと。そして、Dd2 株が呈した異常は、用いた FA の量的問題ではなく、細胞機能そのものの違いである可能性が高いこと。2) 全てのキメラ子孫細胞株の FA に対する細胞増殖応答は、親株である HB3 株型、もしくは Dd2 株型のどちらかに分類できることから、FA に対する細胞増殖応答の違いを規定する原因遺伝子は、1 遺伝子である可能性が高いこと。3) Dd 株が呈する FA に対する細胞増殖応答異常は FA の代謝系における異常ではなく、むしろ、FA の取り込み、もしくは輸送に何らかの異常が生じたことにより、結果として細胞増殖応答異常という表現型となった可能性が高いこと。ここで、2002 年に発表された熱帯熱マラリア原虫の全ゲノム配列中には、これまで他種生物で確認されている脂肪酸トランスポーターや脂肪酸輸送蛋白質の原虫オルソログは存在しないことから、今回その存在が示唆された脂肪酸の取り込み、もしくは輸送に関与する原虫因子は、マラリア原虫固有な新規なものである可能性が強く示唆された。

#### 5 自己評価:

我々自身が明らかにしてきた赤血球期熱帯熱マラリア原虫の細胞増殖に必要な血清中脂質成分であるパルミチン酸とオレイン酸の代謝・輸送について、モデル生物、特に哺乳動物細胞には見られないユニークな点を明確にするという研究の方向性のもとに、新規抗マラリア薬創製につながる標的分子の提供を目指し、本さきがけ研究を提案した。3 年間の成果としては、

- (1) これまでほとんど手がつけられていなかった TAG の代謝・輸送が、確かに熱帯熱マラリア原虫感染赤血球内において機能しているという証拠を複数の方法により示すことができた。さらに、我々の実験結果から、熱帯熱マラリア原虫において、TAG は、これまでに確立されてきた機能ではなく、原虫特有の機能を提唱することができた。
- (2) 細胞増殖に必要な血清中脂肪酸であるパルミチン酸とオレイン酸の熱帯熱マラリア原虫感染赤血球内への取り込み、もしくは輸送に関与する因子の分子同定がより現実的であることを示す証拠が示せた。さらに、熱帯熱マラリア原虫のゲノム情報から、この候補遺伝子は、これまでに報告されていない新規の脂肪酸トランスポーター、もしくは脂肪酸輸送蛋白質である可能性が高いと判断できた。

以上のように、一定の成果を上げることはできたが、細胞レベルでの解析に思った以上に時間をとられてしまい、全体としては赤血球期熱帯熱マラリア原虫特有のユニークな現象を明確にさせたというところにとどまり、当初目標としていた各項目について、分子同定とそれらの機能解析によるユニークな現象を分子レベルで説明するというところまでは踏み込めなかった。また、成果を正式な形で公表する前の投稿準備段階の論文を幾つかかかえてしまったことは反省点として残った。今後は、分子レベルでの解析を継続させ、脂質代謝・輸送に関して、熱帯熱マラリア原虫と哺乳動物細胞との違いを明確にすることにより、マラリア化学療法の新規標的分子となりえる因子の提供、さらには新規抗マラリア薬の創製につなげるよう研究を進展させたい。

## 6 研究総括の見解:

赤血球期マラリア原虫の細胞増殖に必須な血清中脂質成分の代謝・輸送の分子機構を解析し、マラリアの治療・予防のための新規抗マラリア薬開発につながる標的分子の発見を目指した研究である。熱帯熱マラリア原虫のトリアシルグリセロールが熱帯熱マラリア原虫感染赤血球内において機能している分子であり、また血清中脂質成分であるパルミチン酸とオレイン酸の熱帯熱マラリア原虫感染赤血球内への取り込みもしくは輸送に関与する因子を同定することが出来た。しかしながら、初期の目的を達成する成果を挙げることは出来ていない。今後の発展に期待したい。

## 7 主な論文等:

### 論分・総説

1. N. M. Q. Palacpac, Y. Hiramine, S. Seto, R. Hiramatsu, T. Horii, and T. Mitamura. Evidence that *Plasmodium falciparum* diacylglycerol acyltransferase is essential for intraerythrocytic proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321; 1062–1068, 2004.
2. N. M. Q. Palacpac, Y. Hiramine, F. Mi-ichi, M. Torii, K. Kita, R. Hiramatsu, T. Horii and T. Mitamura. Developmental-stage-specific triacylglycerol biosynthesis, degradation and trafficking as lipid bodies in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte. *J. Cell Sci.* 117; 1469–1480, 2004.
3. T. Mitamura and N. M. Q. Palacpac. Lipid metabolism in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte: possible new targets for malaria chemotherapy. (Review) *Microbes Infect.* 5; 545–552, 2003.

### 学会発表

国内 13 件(招待講演 4 件を含む) / 国際 5 件

## 研究課題別評価

1 研究課題: ウイルスとの共生: 生まれながらにして持つ自然抵抗性機構の解明

2 研究者氏名: 宮沢 孝幸

グループメンバー: 辛 磷実(研究期間: H14.2.4~H15.3.31)

森 嘉生(研究期間: H14.4.1~H15.3.31)

山岸 潤也(研究期間: H16.4.1~H16.11.30)

中村 理加(研究期間: H16.4.1~H17.3.31)

3 研究の狙い:

人はヒト免疫不全ウイルス(HIV)に対して感受性であるが、アカゲザルやアフリカミドリザルはHIVに対して抵抗性である。この事実を説明するために我々は、サルがHIVに対して細胞内で働く抵抗性因子をもっているが、人はもっていないという仮説をたてた。本研究では、その物質的基盤を明らかにすることを第一の目的とした。研究を開始してまもなく、ロンドン大学のグループにより、人やサルがN指向性のマウス白血病ウイルス(N-MLV)に対して抵抗性因子(*Ref-1*)をもち、さらにサルの*Ref-1*が、HIVに対しても抵抗性を発揮すること(*Lv-1*活性をもつこと)が報告された。そこで、人がもつ*Ref-1*因子のcDNAクローニングを試みた。また、動物がもっているさまざまなレトロウイルスの宿主特異性決定機構および病原性発現機構の解明を行った。

4 研究成果:

1) マウス以外にも、サルやウサギなど、さまざまな動物がN-MLVに対して細胞内で働く抵抗性因子(*Ref-1*活性)をもっていることを明らかにした。また、アフリカミドリザルやアカゲザルなどのサル類がHIV-1に対して抵抗性(*Lv-1*活性)をもっていることを明らかにした。この抵抗性を担う蛋白のcDNAのクローニングを、レトロウイルスを用いた新規発現クローニング法で試みた。感染の指標としてEGFPを用いる方法、アポトーシスを誘導するBims遺伝子を用いる方法、ジフテリア毒素レセプターとジフテリア毒素を用いる方法、リボザイムライブラリーを用いる方法など、さまざまな方法を試みた。いくつかの候補遺伝子をクローニングしたが、解析の結果、我々が追い求めている*Ref-1*遺伝子ではなく、非特異的にウイルス増殖を抑えるものであった。

2) 豚のトランスジェニック技術およびノックアウト技術の進歩により、豚から人への異種間臓器移植の際の、超急性拒絶反応を回避する豚が作出できるようになった。しかし、その実用化の前に大きく立ちはだかっている問題が、豚がもっている内在性レトロウイルス(豚内在性レトロウイルス(PERV))である。人に感染する可能性のあるPERVは少なくとも2種類(PERV-AおよびPERV-B)存在する。我々は、PERVのレセプター遺伝子のクローニングを試み、PERV-Aのレセプター遺伝子のクローニングに成功した。さらに、PERVの感染が、他のレトロウイルスのエンベロープ蛋白の一部の助けを借りて、非特異的に感染を成立させてしまうことも明らかにした。

3) HIVやサル免疫不全ウイルス(SIV)は、レトロウイルス科レンチウイルス属に分類される。レンチウイルス属に分類されるウイルスは、馬、羊、山羊、牛や猫などの家畜にも存在する。その中でHIV感染に酷似した免疫不全を引き起こすのは、ネコ免疫不全ウイルス(FIV)のみである。レンチウイルスの感染機構を明らかにするために、FIVのレセプターのクローニングを試みた。その結果、CD134(OX40)がプライマリーレセプターとしてクローニングされ、FIVがCD134をプライマリーレセプターに、CXCR4をコレセプターとして使用することが明らかとなった。興味深いことに、コレセプターには、種特異性はなく、種特異性をエントリーレベルで規定しているのは、プライマリーレセプターであることがわかった。

## 5 自己評価:

本研究では、HIV に対して細胞内で働く抵抗性因子が様々な動物に存在する、という仮説のもとで研究を開始した。研究開始早々から、抵抗性因子の存在に気づき、その本体の蛋白の遺伝子クローニングに専念した。さらに研究の過程で、人がもっている N 指向性 MLV に対する抵抗性因子 (*Ref-1*) と HIV に対する抵抗性因子 (*Lv-1*) が同一であるという可能性を知り、何としてもその遺伝子を世界に先駆けてクローニングしたかったのであるが、他のグループに先を越された形となった。しかしながら、*Ref-1* と同定された TRIM5 $\alpha$  が、我々が追い求めていたものと異なるという実験結果も出ており、TRIM5 $\alpha$  の作用機序も依然として不明である。*Ref-1* および *Lv-1* に関する研究は今後継続する必要があると考えている。

一方、レトロウイルスを用いた発現クローニング法の改良を行い、ウイルスのレセプターを効率よくクローニングする系を確立することができた。この系を応用して、FIV のレセプターのクローニングに成功し、*Science* 誌に発表することができたことには満足している。他に、異種間臓器移植実用化の際に問題となっている PERV の、レセプター遺伝子のクローニングにも成功したことは、大きな成果であると考えている。現在、カリシウイルスのレセプター遺伝子のクローニングにも成功しており、今後、様々なウイルスのレセプター遺伝子のクローニングに、我々が開発した発現クローニング法が応用できると考えている。

## 6 研究総括の見解:

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) に対してヒトは感受性があるがアカゲザルやアフリカミドリザルは抵抗性であるのは、サルが HIV に対して細胞内で働く抵抗因子を持っていることを示すことにより、動物のレトロウイルス宿主特異性決定機構および病原性発現機構の解明の手がかりとすることを目的とした研究である。ヒトやサルがマウス白血病ウイルスに対して抵抗性因子を持ち、サルのこの抵抗性因子は HIV に対しても抵抗性を発揮することを証明し、その遺伝子をクローニングした。さらにレトロウイルスを用いた発現クローニング法の改良を行い、ウイルスのレセプターを効率よくクローニングする系を確立し、今後のウイルスレセプター遺伝子の効率良いクローニングへの道を拓いた。

## 7 主な論文等:

### (1) 論文

1. Mariko Kohmoto, Yasuhiro Ikeda, Eiji Sato, Yorihiro Nishimura, Yasuo Inoshima, Masayuki Shimojima, Takeshi Mikami, and Takayuki Miyazawa (2003) Experimental mucosal infection with molecularly cloned feline immunodeficiency virus. *Clin.Diagn. Lab. Immunol.* 10: 185-188.
2. Kazuya Nakamura, Yosiyuki Suzuki, Yasuhiro Ikeda, Eiji Sato, Ninn T. P. Nguyen, Kazuho Ikeo, Takashi Gojobori, Takeshi Mikami, and Takayuki Miyazawa (2003) Phylogenetic analysis of Vietnamese isolates of feline immunodeficiency virus: genetic diversity of subtype C. *Arch. Virol.* 148: 783-791..
3. Takashi Kurihara, Takayuki Miyazawa, Shuji Miyakawa, Keizo Tomonaga, Kenji Hazama, Junko Yamada, Ryota Shirakura, and Yoshiharu Matsuura (2003) Sensitivity to human serum of gammaretroviruses produced from pig endothelial cells transduced with glycosyltransferase genes. *Xenotransplantation* 10: 562-568.
4. Masayuki Shimojima, Takayuki Miyazawa, Yumiko Sakurai, Yorihiro Nishimura, Yukinobu Tohya, Yoshiharu Matsuura, and Hiroomi Akashi (2003) Usage of myeloma and panning in retrovirus-mediated expression cloning. *Anal. Biochem.* 315: 138-140.
5. Masayuki Shimojima, Yorihiro Nishimura, Takayuki Miyazawa, Kentaro Kato, Yukinobu

Tohya, and Hiroomi Akashi (2003) CD56 molecules in feline lymphoid cells. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 767–773.

6. Hang T. T. Phung, Yukinobu Tohya, Masayuki Shimojima, Kentaro Kato, Takayuki Miyazawa and Hiroomi Akashi (2003) Establishment of a GFP-based indicator cell line to quantitate feline foamy virus. *J. Virol. Meth.* 109: 125–131.

7. Thomas A. Ericsson, Yasuhiro Takeuchi, Christian Templin, Gary Quinn, Shelli F. Farhadian, James C. Wood, Beth A. Oldmixon, Kristen M. Suling, Jennifer K. Ishii, Yoshinori Kitagawa, Takayuki Miyazawa, Daniel Salmon, Robin A. Weiss, and Clive Patience (2003) Identification of receptors for pig endogenous retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 6759–6764.

8. Risa Nakata, Takayuki Miyazawa, Yeon-Shil Shin, Rie Watanabe, Takeshi Mikami, and Yoshiharu Matsuura (2003) Reevaluation of host ranges of feline leukemia virus subgroups. *Microbes Infect.* 5: 947–950.

9. Masayuki Shimojima, Yorihiro Nishimura, Takayuki Miyazawa, Yukinobu Tohya and Hiroomi Akashi (2003) Phenotypic changes of CD8<sup>+</sup> peripheral blood lymphocytes in cats infected with feline immunodeficiency virus. *Microbes Infect.* 5: 1171–1177.

10. Kenji Hazama, Shuji Miyagawa, Takayuki Miyazawa, Junko Yamada, Keizo Tomonaga, Mitsunori Ota, Hikaru Matsuda, and Ryota Shirakura (2003) The significance of N-linked glycosylation in pig endogenous retrovirus infectivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310: 327–333.

11. Masato Nakamura, Kazuya Nakamura, Takayuki Miyazawa, Yukinobu Tohya, Masami Mochizuki, and Hiroomi Akashi (2003) Monoclonal antibodies that distinguish antigenic variants of canine parvovirus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10: 1085–1089.

12. Rie Watanabe, Takayuki Miyazawa, and Yoshiharu Matsuura (2004) Comparison of serum sensitivity of pseudotype retroviruses produced from newly established packaging cell lines of human and feline origins. *Virus Res.* 99: 89–93.

13. Yasuhiro Ikeda, Takayuki Miyazawa, Yorihiro Nishimura, Kazuya Nakamura, Yukinobu Tohya, and Takeshi Mikami (2004) High genetic stability of TM1 and TM2 strains of subtype B feline immunodeficiency virus in long-term infection. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 287–289.

14. Yumiko Sakurai, Masayuki Shimojima, Takayuki Miyazawa, Kohta Masuoka, Yukinobu Tohya, and Hiroomi Akashi (2004) Identification of the feline CD63 homologue using retrovirus-mediated expression cloning. 98: 185–191.

15. Masayuki Shimojima, Yorihiro Nishimura, Takayuki Miyazawa, Yukinobu Tohya and Hiroomi Akashi (2004) T cell subpopulations mediating inhibition of feline immunodeficiency virus replication in mucosally infected cats. *Microbes Infect.* 6: 265–271.

16. Masayuki Shimojima, Takayuki Miyazawa, Yasuhiro Ikeda, Elizabeth L. McMonagle, Hayley Haining, Hiroomi Akashi, Yasuhiro Takeuchi, Margaret J. Hosie, and Brian J. Willett (2004) Use of CD134 as a primary receptor by the feline immunodeficiency virus. *Science* 303: 1192–1195.

17. Yorihiro Nishimura, Masayuki Shimojima, Eiji Sato, Yoshihiro Izumiya, Yukinobu Tohya, Takeshi Mikami, and Takayuki Miyazawa (2004) Down-modulation of CD3 $\epsilon$  expression of CD8 $\alpha^+$  $\beta^-$  T cells of feline immunodeficiency virus-infected cats. *J. Gen. Virol.* 85: 2585–2589.

18. Masato Nakamura, Yukinobu Tohya, Takayuki Miyazawa, Masami Mochizuki, H. T. T. Phung, N. H. Nguyen, L. M. T. Huynh, P. N. Nguyen, P. V. Nguyen, N. P. T. Nguyen, and H. Akashi (2004) A novel antigenic variant of Canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Arch. Virol.* 149: 2261–2269.

19. Naho Nagashima, Masaharu Hisasue, Kazuo Nishigaki, Takayuki Miyazawa, Rui Kano, and Atsuhiko Hasegawa (2005) In vitro selective suppression of feline myeloid colony formation by a molecularly cloned strain of feline leukemia virus with unique long terminal repeat. Res. Vet. Sci. 78: 151-154.

20. Rie Wanabate, Takayuki Miyazawa, and Yoshiharu Matsuura Cell-binding properties of the envelope proteins of porcine endogenous retroviruses. Microbes Infec (in press)

21. Hang T. T. Phung, Yukinobu Tohya, Takayuki Miyazawa, and Hiroomi Akashi Characterization of Env antigenicity of feline foamy virus (FeFV) using FeFV-infected cat sera and a monoclonal antibody. Vet. Microbiol. (in press)

22. Shuji Miyagawa, Junko Yamada, Kenji Hazama, Aki Yamamoto, Katsuyoshi Matsunami, Keizo Tomonaga, Takayuki Miyazawa, and Ryota Shirakura Prevention of PERV infections in pig to human xenotransplantation by the RNA interference silences gene. J. Biochem. (in press)

(2) 総説

1. 下島昌幸、宮沢孝幸:ネコ免疫不全ウイルスのプライマリーレセプター、細胞工学、VOL. 23、458-459.

2. 宮沢孝幸:ネコ免疫不全ウイルスのレセプター、医学のあゆみ、VOL.209、No.11、907-908.

3. 宮沢孝幸:レンチウイルスの受容体、膜、2005(印刷中)

(3) 受賞

1. **Best Oral Presentation 賞**、6<sup>th</sup> International Feline Retrovirus Research Symposium, 2002年12月 フロリダ、USA

2. 日本獣医学会賞(第95号)、2004年4月

(4) 招待講演

国内会議・シンポジウム等 3件

(5) その他学会発表

国内 15件／国際 3件

## 研究課題別評価

### 1 研究課題: 自然免疫による微生物認識の分子機構の解明

### 2 研究者氏名: 牟田 達史

グループメンバー: 砂川 優子(研究期間:H14.4.1~H16.3.31)

横山 照史(研究期間:H14.5.1~H14.6.30)

浅井 大輔(研究期間:H15.4.1~H17.3.31)

### 3 研究の狙い:

多細胞生物が1個体として成立するためには、異なる細胞間の認識を介して、それぞれの場における反応の制御により、同一のゲノムからなる多機能の自己を確立することが必要である。自己細胞を認識する初期発生と、外来の異物・微生物を認識する生体防御系はその代表的な例である。全ての多細胞生物がもつ生体防御系である自然免疫系は、体内に侵入した病原微生物表面の特異的な分子パターンを認識し、適切な炎症反応を、適切な場所で、適切な程度、惹起する。

本研究では、異物認識の物質的基盤、シグナル増幅システム、及び反応の“場”を限定する機構に関する新しい概念の提唱を目指し、自然免疫系において受容体として機能する Toll-like receptor (TLR) による微生物表面物質に対する分子認識機構とともに、我々が見出した新規誘導型核タンパク質 I $\kappa$ B- $\zeta$  による細胞応答制御機構を明らかにすることを目的とした。

### 4 研究成果:

#### (1) 哺乳動物の真菌に対する自然免疫機構

哺乳動物では、リポ多糖(LPS)に代表される様々な細菌由来成分、あるいはウイルス由来の成分が、TLR を介して自然免疫担当細胞を活性化することが明らかにされている。一方、細菌と並んで重要な病原微生物である真菌に対する細胞応答反応については、未だ不明な点が多い。研究者が以前研究していた節足動物カブトガニの体液凝固系は、真菌に由来する(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカンによって活性化される。本研究では、 $\beta$ -グルカンの哺乳動物マクロファージ活性化能について解析した。

様々な $\beta$ -グルカンのマクロファージ活性化能を、炎症応答において中心的な役割を果たす転写因子 Nuclear Factor (NF)- $\kappa$ B の活性化を指標に検討したところ、直鎖状(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカンであるカードランに最も強い活性を見出した。中性の水溶液中で不溶性のカードランは、その三重らせん構造を基本とした高次構造を破壊する 50-300 mM のアルカリ溶液を用いて溶解することによって、その活性が著しく増強され、マクロファージ様細胞株において、腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ )、ケモカイン(MIP-2)、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) の発現を誘導した。カードランに対する細胞応答は、TLR/インターロイキン(IL)-1 受容体に共通するアダプター分子 MyD88 の変異体の遺伝子導入により抑制された。従って、直鎖状(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカンは、その高次構造に依存してマクロファージ刺激活性をもち、その受容体は、TLR のような Toll/IL-1 receptor-like (TIR) ドメインを含む膜タンパク質であることが強く示唆された。また、我々は、 $\beta$ -グルカンによるマクロファージ活性化には、細胞膜上の分子に加え、血清成分が必須であることを明らかにしており、血清中、あるいは細胞表面で $\beta$ -グルカンと直接相互作用する因子を介して、 $\beta$ -グルカンの高次構造変換が誘導され、TLR の活性化が惹起されていると考えられる。

#### (2) 自然免疫応答を制御する新規転写制御因子 I $\kappa$ B- $\zeta$ の分子機能

我々は、自然免疫系の強力な活性化剤であるグラム陰性菌由来のリポ多糖(LPS)でマクロファージを刺激した際に誘導される分子を検索し、非刺激の細胞ではほとんどその発現が観察されないが、LPS 刺激によって強く誘導される新規分子を見出し、I $\kappa$ B- $\zeta$  (zeta) と命名した。この分子は C 末端側に I $\kappa$ B タンパク質ファミリーにみられるアンキリンリピート構造をもつが、その N 末端側は、

既知のタンパク質と相同性を示さない。典型的な I $\kappa$ B タンパク質と異なり、核内に局在する I $\kappa$ B- $\zeta$  は、炎症応答において中心的な役割を果たす転写因子 NF- $\kappa$ B の p50 サブユニットとその C 末端側を介して結合し、その転写活性を阻害することが当初の解析によって示された。

I $\kappa$ B- $\zeta$  は、LPS 刺激のみならず、ペプチドグリカン、CpG DNA などの TLR 刺激物質、さらには IL-1 $\beta$  による刺激によっても強く発現が誘導された。一方、同様な炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  刺激の場合には、その誘導はほとんど見られなかった。I $\kappa$ B- $\zeta$  誘導に関わる細胞内シグナル伝達系について検討したところ、この分子の誘導には、NF- $\kappa$ B 自身の活性が必須であるが十分ではないことが判明し、TLR、IL-1 受容体に共通して存在する細胞内ドメインである TIR ドメインの活性化に由来する、特異的な mRNA 安定性の上昇が重要であることが明らかになった。

他のタンパク質と相同性を示さない I $\kappa$ B- $\zeta$  の N 末端側の機能について検討した結果、この領域内に核移行シグナル(NLS)とともに、転写活性化活性をもつ領域が存在することを明らかにした。この領域の示す活性は、全長の I $\kappa$ B- $\zeta$  には検出されず、共に転写活性をもたない NF- $\kappa$ B p50 サブユニットと全長の I $\kappa$ B- $\zeta$  を共発現した際に、転写活性が検出されるようになることを見出した。従って、I $\kappa$ B- $\zeta$  の転写活性化能は、NF- $\kappa$ B との結合を介した構造変換によって発揮されると考えられた。実際の遺伝子の転写に及ぼす影響を調べるため、繊維芽細胞やマクロファージにレトロウイルス発現系を用いて I $\kappa$ B- $\zeta$  を過剰発現したところ、LPS 刺激に伴う IL-6 の産生が亢進する一方、TNF- $\alpha$  の産生が抑制されることを見出した。

さらに、I $\kappa$ B- $\zeta$  の生体内での機能を明らかにする目的で、大阪大学の審良教授のグループと共同で I $\kappa$ B- $\zeta$  遺伝子欠損マウス由来の細胞の自然免疫応答について検討したところ、LPS や他の TLR 刺激物質による刺激、あるいは IL-1 $\beta$  刺激に対する IL-6 mRNA の誘導がほとんどみられないことが判明した。一方、TNF- $\alpha$  刺激に伴う IL-6 産生は正常であった。さらにこの細胞では、IL-6 のみならず、IL-12 などを含む一群の LPS 誘導性の遺伝子の発現が著しく障害されていることが判明し、I $\kappa$ B- $\zeta$  は自然免疫活性化時におけるこれらの遺伝子発現に必須の因子であることが明らかになった。さらに、LPS 投与後のマウス個体レベルでのサイトカイン産生について検討したところ、IL-12 の産生は減弱しているものの、TNF- $\alpha$  の産生が著しく亢進していることが明らかになった。

以上の結果より、I $\kappa$ B- $\zeta$  は、自然免疫活性化時に、NF- $\kappa$ B 活性化と特異的な mRNA 安定化を介して細胞内に出現する分子であり、NF- $\kappa$ B やその他の因子との相互作用を介して、ある一群の遺伝子の転写の亢進に必須な役割を果たす一方、別の遺伝子群の転写に対しては抑制的に機能する二面性をもち、炎症の方向性を左右する極めて重要な因子であることが判明した。

## 5 自己評価:

微生物由来物質による TLR 活性化の分子基盤に関しては、真菌の構成成分である $\beta$ -グルカンにその高次構造依存的に細胞刺激活性があることを示すことができたが、分子認識の本質に迫るには至らなかった。しかし、本分野は、TLR の biology の解析が非常に進んだ現在でも、世界的に未解決の分野であり、今後も解析を進める必要がある。一方、I $\kappa$ B- $\zeta$  による細胞応答制御については、in vitro の解析によって、この分子のもつ NF- $\kappa$ B 結合性および転写活性化能、さらにその特異的誘導機構について明らかにするとともに、その炎症の転写制御における生理機能についても遺伝子欠損マウスの解析により示すことができた。本研究の成果により、本因子が転写を正と負、双方向に制御する極めて重要な転写制御因子であることを確立することができた。さらに、これまで NF- $\kappa$ B などの単一の転写因子によって制御されていると考えられていた多くの転写反応に、刺激に伴い初めて誘導される I $\kappa$ B- $\zeta$  が必須であることが示されたことにより、炎症反応が、複数の活性化ステップにより誘導される転写制御因子によって、時系列および遺伝子特異的に巧妙に制御されていることを示すことができ、シグナル増幅とともに、反応の「場」および「質」を規定する転写反応制御において新たな概念を提唱することができたと考える。

## 6 研究総括の見解:

自然免疫系において受容体として機能する Toll-Like Receptor (TLR) による微生物表層物質に対する分子認識機構を解明するとともに新規誘導型核蛋白質 I $\kappa$ B- $\zeta$  による細胞応答制御機構を

明らかにすることを目的とした研究である。微生物由来物質による TLR 活性化に関しては、真菌の構成成分である $\beta$ -グルカンがその高次構造依存的に細胞刺激活性があることを示した。また I $\kappa$ B- $\zeta$ による細胞応答制御については、in vitro の解析によって、この分子の NF- $\kappa$ B 結合性および転写活性化能、さらにその特異的誘導機構について明らかにした。今後これらの成果を基に一層の発展が期待される。

## 7 主な論文等：

### 論文

1. Motoyama, M., Yamazaki, S., Eto-Kimura, A., Takeshige, K., and Muta, T.:  
Positive and Negative Regulation of Nuclear Factor- $\kappa$ B-mediated Transcription by I $\kappa$ B- $\zeta$ , an Inducible Nuclear Protein  
*J. Biol. Chem.*, Papers In Press, published online ahead of print December 23, 2004. *J. Biol. Chem.*, 10.1074/jbc.M412738200.
2. Yamazaki, S., Muta, T., Matsuo, S., and Takeshige, K.:  
Stimulus-Specific Induction of a Novel NF- $\kappa$ B Regulator, I $\kappa$ B- $\zeta$ , via Toll/Interleukin-1 Receptor Is Mediated by mRNA Stabilization.  
*J. Biol. Chem.* 280, 1678-1687, (2005)
3. Fujimoto, T., Yamazaki, S., Eto-Kimura, A., Takeshige, K., and Muta, T.:  
The Amino-terminal Region of Toll-like Receptor 4 Is Essential for Binding to MD-2 and Receptor Translocation to the Cell Surface.  
*J. Biol. Chem.* 279, 47431-47437, (2004)
4. Yamamoto, M., Yamazaki, S., Uematsu, S., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Kuwata, H., Takeuchi, O., Takeshige, K., Saitoh, T., Yamaoka, S., Yamamoto, N., Yamamoto, S., Muta, T., Takeda, K., Akira, S.:  
Regulation of Toll/IL-1 Receptor-mediated Gene Expression by the Inducible Nuclear Protein I $\kappa$ B $\zeta$ .  
*Nature* **430**, (6996), 218-222, (2004).
5. Muta, T., Yamazaki, S., Eto, A., Motoyama, M., and Takeshige, K.:  
I $\kappa$ B- $\zeta$ , a New Anti-inflammatory Nuclear Protein Induced by Lipopolysaccharide, Is a Negative Regulator for Nuclear Factor- $\kappa$ B.  
*J. Endotoxin Res.* **9**, (3), 187-191, (2003).
6. Eto, A., Muta, T., Yamazaki, S., and Takeshige, K.:  
Essential Roles for NF- $\kappa$ B and a Toll/IL-1 Receptor Domain-Specific Signal(s) in the Induction of I $\kappa$ B- $\zeta$ .  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**, (2), 495-501, (2003).
7. Kataoka, K., Muta, T., Yamazaki, S., and Takeshige, K.:  
Activation of Macrophages by Linear (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Glucans: IMPLICATIONS FOR THE RECOGNITION OF FUNGI BY INNATE IMMUNITY.  
*J. Biol. Chem.* **277**, (39), 36825-36831, (2002).

### 招待講演

Muta, T.:

Molecular Basis for Innate Immune Recognition of (1,3)- $\beta$ -D-Glucan as a Pathogen-Associated Molecular Pattern.

The 8th Conference of the International Endotoxin Society (Lunchon Seminar), November 17, 2004, Kyoto.

牟田 達史:

獲得免疫系の発動を制御する Toll-like receptor を介した自然免疫系活性化とその制御の分子機構。

第 63 回日本癌学会学術総会(教育講演), 2004 年 10 月 1 日, 福岡.

牟田 達史:

異なる種間でみられる Toll-like receptor を介した自然免疫機構の共通性。

第 5 回日本進化学会(シンポジウム), 2003 年 8 月 3 日, 福岡.

牟田 達史:

Roles of Toll-like receptors in innate immune responses to fungi and their regulation by a novel inducible nuclear protein, I $\kappa$ B- $\zeta$ .

第 76 回日本生化学会大会(シンポジウム), 2003 年 10 月 18 日, 横浜.

牟田 達史:

微生物菌体成分に対する自然免疫担当細胞の Toll-like receptor (TLR)を介した応答とその制御。

第 76 回日本細菌学会(シンポジウム), 2003 年 4 月 1 日, 熊本.

牟田 達史:

自然免疫による真菌細胞壁主要成分(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Glucan 認識の分子機構。

第 25 回日本分子生物学会年会(ワークショップ), 2002 年 11 月 14 日, 横浜.

Muta, T., Yamazaki, S., Eto, A., Motoyama, M., and Takeshige, K.:

I $\kappa$ B- $\zeta$ , a New Anti-inflammatory Nuclear Protein Induced by LPS, Is a Negative Regulator for NF- $\kappa$ B.

The 7th Conference of International Endotoxin Society (Invited), July 18-21, 2002, Washington D. C. USA

## 研究課題別評価

1 研究課題: サイトカイン受容体による初期 Th1 誘導機構の解明

2 研究者氏名: 吉田 裕樹

グループメンバー: 山中 篤志(研究期間: H14.4.1~H15.3.31)

宮崎 義之(研究期間: H15.4.1~H16.4.30)

王 森(研究期間: H16.7.2~H17.3.31)

3 研究の狙い:

サイトカインは、免疫反応を制御する重要な分子群である。このなかで、インターロイキン(IL)-12は、細胞内寄生性病原体の排除に重要な役割を果たすTh1反応の誘導に必須のサイトカインである。近年、IL-12に類似したサイトカイン、IL-23およびIL-27が同定された。研究者はリガンド不明のサイトカイン受容体「WSX-1」のノックアウトマウスの解析により、この受容体がTh1反応の誘導に必須の役割を果たしている事を明らかにしており、このWSX-1のリガンドがIL-27であることが示唆されるようになった。そこで、本研究ではWSX-1ノックアウトマウスの解析を中心に、この分子の生体内における役割を解明し、またWSX-1のリガンドの同定やシグナル伝達経路の解析を行うことを目的とした。さらにこの経路を恣意的に制御することによる新規疾患治療法の開発を目指した。具体的には、以下の4つの項目を目標として設定した。

1. WSX-1のリガンドの同定、副受容体の同定、および下流のシグナル伝達経路の解明。
2. 種々の病原体に対する、サイトカインを介した感染防御機構におけるWSX-1の役割の解析
3. サイトカイン産生異常や過剰な免疫反応により引き起こされる自己免疫疾患の病態形成におけるWSX-1の役割の解明
4. 1-3により得られた知見に基づき、抗体やサイトカイン投与によるWSX-1シグナル制御法の確立と疾患治療への応用

4 研究成果:

1) WSX-1のシグナル伝達機構の解明に関しては、そのTh1反応誘導能に注目し、シグナル伝達因子の結合・活性化に注目して実験を行った。WSX-1の下流では、Jak1/STAT1が活性化する事を確認し、このSTAT1の活性化を介してTh1細胞特異的転写因子T-betの発現が誘導されることを明らかにした。またIL-27がWSX-1の生理的リガンドである事を明らかにした。一連の実験結果から、IL-27/WSX-1が、IL-12よりも早期にTh1細胞分化を決定付ける重要な因子であることを示した。このことは、WSX-1が感染早期のTh1反応の誘導に重要であるという研究者の報告を裏付けるものであった。副受容体に関しては、IL-6受容体のシグナル伝達因子gp130がその候補であると考えられるが、以下に述べる、「WSX-1シグナルによる炎症反応の抑制」、という観点からの詳細な確認が必要である。

2) WSX-1欠損マウスでは、Th1反応の障害により原虫*Leishmania major*感染に対する抵抗性が減弱するという知見に基づき、さまざまな感染実験を行ったところ、WSX-1の新しい役割が浮かび上がってきた。腸管内寄生性線虫*Trichuris muris*感染では、ノックアウトマウスにおいて予想通りTh1反応の減弱とそれに伴うTh2反応の亢進により虫体の排除能が高まっていた。しかしながら、細胞内寄生性原虫*Trypanosoma cruzi*や*Toxoplasma gondii*感染においては、ノックアウトマウスにおいて予想に反してTh1関連サイトカインに加えさまざまな炎症性サイトカインの過剰産生が生じ、マウスが炎症による肝障害などで死亡することが明らかになった。最も興味深い例は、結核菌感染実験のもので、ノックアウトマウスにおいて、防御に関するサイトカインが過剰に産生され

るために感染後の菌数自体は減少するもののこの過剰なサイトカイン産生により個体は炎症により死亡してしまう、という結果が得られている。これらの結果から、免疫反応が病原体を排除する反応と自己に対する障害の抑制という微細なバランスの上に成り立っていることが推察された。

3) WSX-1 を欠損するマウスでは、自己抗原により引き起こされる Th1 サイトカイン依存性実験的ぶどう膜炎に対する抵抗性が認められた。また、ヒト SLE に類似した病態を示すマウスと交配した WSX-1 欠損マウスにおいては、糸球体腎炎の病態変化が認められ、病態解明、および治療薬の開発という点から新しい糸球体腎炎のモデルマウスが得られた。WSX-1 欠損マウスでは、サイトカインによる実験的炎症性腸炎の症状が軽減しており、ヒトの炎症性腸炎にも IL-27/WSX-1 の関与が示唆された。マウスにおけるアレルギー性喘息のモデル実験では、WSX-1 ノックアウトマウスは炎症性サイトカインの過剰産生のため病状・組織像の悪化を示した。

4) シグナル伝達阻止型の抗 WSX-1 受容体抗体作成を試みたが、抗原性の低さのため有効な抗体を得られていない。リコンビナント IL-27 や IL-27 発現プラスミドは一部の感染に対して Th1 反応誘導により防御能を亢進させる働きが確認できた。

## 5 自己評価:

当初の目的であった、Th1 反応の誘導における WSX-1 の役割、という観点からは、1) WSX-1 の下流におけるシグナル伝達経路の解明、リガンドの同定、副受容体(候補分子)の同定、2) いくつかの感染実験において WSX-1 欠損により Th1 反応の減弱と感染抵抗性の減弱が認められたこと、3) ある種の自己免疫疾患の病態形成における IL-27/WSX-1 の役割が明らかにできたこと、4) IL-27 により感染防御能の亢進効果が認められたこと、などから一定の成果が得られたものと考えている。

IL-27/WSX-1 に炎症・免疫反応抑制効果があるという知見は予想外であったが、この IL-27/WSX-1 の新しい役割の発見は、IL-23 も含めて「IL-12 関連サイトカインによる炎症制御」という新しい研究分野の確立につながった。本研究の対象ではない IL-23 に炎症惹起作用があることが明らかにされたこととあわせて、IL-12 サイトカインファミリーによる、Th1/2 という概念とは異なるあたらしいパラダイムの確立が予感される。また実際面でも IL-27/23 シグナルの制御によるさまざまな炎症性疾患の治療法が期待されている。しかしながら、IL-27 による炎症抑制機構の詳細は明らかではなく、本研究でも感染実験においてこの抑制作用が明らかになった後、その分子メカニズムの解明を目指したが、研究期間内にはその全貌を示すことはできなかった。今後、本研究において得られた結果をもとに、免疫反応の誘導と抑制の使い分けのメカニズムが明らかにできるものと考えている。

IL-27/WSX-1 シグナル制御による疾患治療法の確立、という目標に関しては、リガンド投与による Th1 反応の誘導、あるいは WSX-1 シグナル抑制による Th1 型自己免疫疾患の予防・治療に対する実験的レベルにおける道筋が得られたものと考えている。しかしながら、同じ IL-27/WSX-1 が炎症反応を抑制する働きも有することが示されたことから、単純にリガンドや阻止抗体などを投与すると期待と逆の効果が得られる可能性が浮かび上がってきた。したがって、IL-27/WSX-1 のシグナル伝達系—Th1 誘導能、および炎症抑制能の両面に関して一の解明、そしてさまざまな病態におけるそれぞれの機能の使い分けのメカニズムを解明することが必須であり、この理解をもって初めて WSX-1 シグナル制御の治療応用が可能になるものと考えられた。

総体的には、研究開始当初に掲げた目標はおおむね達成できたものと考えているが、研究の過程で得られた WSX-1 の役割に関する新しい知見に関しては、現象面の解析が多くなり、抗体作製がうまく行かなかったことなどのため、その分子レベルでの解明が進まなかったことが残念である。しかし、新しい研究分野、あるいは概念を確立できたことは一定の評価に値するものと考えており、引き続き分子レベルでの解析、およびさまざまな病態における IL-27/WSX-1 の役割の解析を行い、最終的には治療応用を目指した研究を続けていきたい。

## 6 研究総括の見解:

リガンド不明のサイトカイン受容体 WSX-1 の生体内における役割を解明し、WSX-1 のリガンドを同定し、シグナル伝達経路を解析することを目的とした研究である。WSX-1 のリガンドが IL-27 であることを示し、WSX-1 が Th1 反応の減弱と感染抵抗性の減弱に関与することを証明した。IL-27/WSX-1 が炎症反応を抑制することを明らかにしたことは、今後、新しい研究展開があるものと期待される。

## 7 主な論文等:

### 著書および総説

1. Yoshida, H., Hamano, S. & Miyazaki, Y. The role of WSX-1 (IL-27R) as an initiator and attenuator of immune responses and inflammation. *Recent Res Devel Immunology* **6**, 123-134, 2004.
2. Yoshida, H., Hamano, S. & Miyazaki, Y. Double identity of WSX-1 (IL-27R) as an initiator and attenuator of immune responses: Regulation by WSX-1 of pro-inflammatory cytokine production in the liver. *Mucosal Immunology Update* **12**, 7-9, 2004.
3. Yoshida, H., Hamano, S. & Miyazaki, Y. The Double Identity of WSX-1 (IL-27R) as an Initiator and Attenuator of Immune Responses. *Current Immunology Reviews* **1**, 55-60, 2005.
4. 吉田裕樹: Th1 分化と新規 IL-12 ファミリーメンバー. *Molecular Medicine* **40**:1296-1301, 2003.
5. 吉田裕樹: T 細胞系サイトカインとシグナル. *分子細胞治療* **3**:229-232, 2004.
6. 吉田裕樹, 濱野真二郎: IL-27 受容体(WSX-1)による Th1 誘導と炎症性サイトカインの産生制御. *臨床免疫* **42**: 485-489, 2004.
7. 吉田裕樹, 濱野真二郎: IL-27 受容体(WSX-1)による Th1 誘導と炎症性サイトカイン産生抑制. *Molecular Medicine 臨時増刊号* **41**:137-143, 2004.

### 原著論文

1. Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J., Wagner, E. F., Mak, T. W., Kodama, T., and Taniguchi, T.: Induction and Activation of the Transcription Factor NFATc1 (NFAT2) Integrate RANKL Signaling in Terminal Differentiation of Osteoclasts. *Dev Cell* **3** (6): 889-901, 2002.
2. Takeda, A., Hamano, S., Yamanaka, A., Hanada, T., Ishibashi, T., Mak, T. W., Yoshimura, A., and Yoshida, H.: Cutting Edge: Role of IL-27/WSX-1 Signaling for Induction of T-Bet Through Activation of STAT1 During Initial Th1 Commitment. *J Immunol* **170** (10): 4886-4890, 2003.
3. Hanada, T., Yoshida, H., Kato, S., Tanaka, K., Masutani, K., Tsukada, J., Nomura, Y., Mimata, H., Kubo, M., and Yoshimura, A.: Suppressor of cytokine signaling-1 is essential for suppressing dendritic cell activation and systemic autoimmunity. *Immunity* **19** (3): 437-50, 2003.
4. Villarino, A., Hibbert, L., Lieberman, L., Wilson, E., Mak, T., Yoshida, H., Kastelein, R. A., Saris, C., and Hunter, C. A.: The IL-27R (WSX-1) Is Required to Suppress T Cell Hyperactivity during Infection. *Immunity* **19** (5): 645-655, 2003.
5. Hamano, S., Himeno, K., Miyazaki, Y., Ishii, K., Yamanaka, A., Takeda, A., Zhang, M., Hisaeda, H., Mak, T. W., Yoshimura, A., and Yoshida, H.: WSX-1 Is Required for Resistance to *Trypanosoma cruzi* Infection by Regulation of Proinflammatory Cytokine Production. *Immunity* **19** (5): 657-667, 2003.
6. Yamanaka, A., Hamano, S., Miyazaki, Y., Ishii, K., Takeda, A., Mak, T. W., Himeno, K., Yoshimura,

- A., and Yoshida, H.: Hyperproduction of Proinflammatory Cytokines by WSX-1-Deficient NKT Cells in Concanavalin A-Induced Hepatitis. *J Immunol* 172 (6): 3590-3596, 2004.
7. Bancroft, A. J., Humphreys, N. E., Worthington, J. J., Yoshida, H., and Grencis, R. K.: WSX-1: A Key Role in Induction of Chronic Intestinal Nematode Infection. *J Immunol* 172 (12): 7635-41, 2004.
  8. Artis, D., Villarino, A., Silverman, M., He, W., Thornton, E. M., Mu, S., Summer, S., Covey, T. M., Huang, E., Yoshida, H., Koretzky, G., Goldschmidt, M., Wu, G. D., de Sauvage, F., Miller, H. R., Saris, C. J., Scott, P., and Hunter, C. A.: The IL-27 receptor (WSX-1) is an inhibitor of innate and adaptive elements of type 2 immunity. *J Immunol* 173 (9): 5626-34, 2004.
  9. Hölscher, C., Hölscher, A., Yoshimoto, T., Yoshida, H., Mak, T., Saris, C., and Ehlers, S.: The IL-27 receptor chain WSX-1 differentially regulates antibacterial immunity and survival during experimental tuberculosis. *J Immunol*, in press.

学会発表

国内 11 回、国際 11 回