

「生体防御のメカニズム」
平成7年度採択研究代表者

審良 静男

(大阪大学微生物病研究所 教授)

「遺伝子改変に基づく生体防御システムの解明」

1. 研究実施の概要

遺伝子欠損マウスを作製することにより、炎症や免疫反応にかかわる分子の生体における役割を研究している。本年度はToll-like receptor (TLR) ファミリー欠損マウスの作製とその解析をおこない、TLR2、TLR4がそれぞれ微生物細胞膜成分の異なる分子を認識する受容体であることをあきらかにした。さらに新規のTLRファミリーを同定し、10以上のTLRファミリーメンバーの存在をあきらかにした。今後これらのメンバーの遺伝子欠損マウスを作製し、TLRファミリーの全貌をあきらかにしたい。

2. 研究実施内容

グループA

1. Toll-like receptor 2 (TLR2) ノックアウトマウスを作製し、その解析をおこなった。TLR2はTLR4と同様にLPSシグナルに関わることが示唆されていたが、TLR2 ノックアウトマウス由来のマクロファージは、LPSに应答して正常マクロファージと同程度のサイトカインやNOを産生し、LPSシグナル伝達に関与しないことが判明した。しかしグラム陽性菌由来のペプチドグリカンにまったく反応せず、TLR2は、LPS以外の細菌菌体成分を認識する受容体であることがあきらかとなった。
2. TLR2が、マイコプラズマ菌のリポペプチドを認識する受容体であることがあきらかとなった。
3. マクロファージにおけるLPSトレランスのメカニズムを検討した。その結果、マクロファージにおけるLPSトレランスは、おもにTLR4受容体のダウンレギュレーションに起因することをあきらかにした。
4. LPSとマイコプラズマ菌のリポペプチドのマクロファージに対する作用において相乗効果とクロス・トレランスをあきらかにした。
5. MyD88 ノックアウトマウス由来のマクロファージが、LPS、グラム陽性菌由来のペプチドグリカン、グラム陽性菌膜成分、結核菌膜成分など多くの細菌菌体成分に反応しないことが判明した。MyD88はIL-1、LPS、また多くの細菌菌体成分

に対する反応に必須の分子であることがあきらかとなった。

- 6 . TLR1とTLR6ノックアウトマウスを作製した。ホモマウスはどちらも生存し、現在各種の細菌菌体成分に対する反応を検討している。
- 7 . データベースを用いて新規なTLRファミリーメンバーを5つ同定した。これらをTLR7、TLR8、TLR9、TLR10、TLR11と命名した。各メンバーのノックアウトマウスを作製するためにゲノムのクローニングをおこなった。
- 8 . MyD88欠損マクロファージでは、LPS刺激に対して、なおもNF- κ BとMAP kinaseファミリーの活性化が認められ、TLR4シグナル伝達においてMyD88非依存性経路の存在があきらかとなっている。われわれは、MyD88欠損樹状細胞がLPSによって成熟することを認めた。しかし、この樹状細胞からはサイトカインの産生がマクロファージの場合と同様に認められなかった。このことから、樹状細胞においてLPSによるサイトカイン産生にはMyD88依存性経路が必須であるが、樹状細胞の成熟にはMyD88非依存性経路だけで十分であることが判明した。
- 9 . さきにIKK γ ノックアウトマウスを作製し、IKK γ 欠損マウスが、四肢、皮膚の発達に障害をもち、出生直後に致死であることを報告した。今回IKK γ ノックアウトマウス由来の骨髄細胞をRAGノックアウトマウスに移入し、免疫系におけるIKK γ の役割を検討した。IKK γ 欠損B細胞は、分化障害とアポトーシスの亢進が認められ成熟B細胞が著明に低下していた。IKK γ がB細胞分化に必須であることがあきらかとなった。
- 10 . NF-IL6の組織特異的欠損マウスを作製した。現在マクロファージにおける役割を検討している。
- 11 . 昨年、LPSによってマクロファージに誘導される、I κ Bキナーゼと相同性がある新規遺伝子をクローニングした。今回、yeast two hybridシステムによって新規IKKに結合する分子としてI-TRAF(TANK)をクローニングした。新規IKKは従来のIKKと異なり、I-TRAFをリン酸化させることによりTRAF2を活性化させ、NF- κ BおよびJNKの活性化を引き起こすことが判明した。

グループB

1 . IL-18による好塩基球の活性化

骨髄細胞をIL-3とともに培養するとIL-18受容体陽性の好塩基球が誘導される。そしてこの細胞をさらにIL-18で刺激すると、この細胞からIL-4とIL-13が大量に産生される。これはIL-18の新たな活性で、IL-18がアレルギーにも関与していることを示している。

2 . IL-18ノックアウトマウスの感染抵抗性の解析

BALB/CマウスにLeishmania majorを感染させると、感染は致死性に経過する。ところが、外来性にIL-12とIL-18を投与することで感染は阻止され、マウスは感

染から完全に回復した。Leishmania major感染抵抗性のC57BL/6 backgroundのIL-18ノックアウトマウスにLeishmania majorを感染させると、正常マウスより感染回復が著明の遅延した。このことは、IL-18がLeishmania major感染の回復に重要であり、この感染症における治療のよい適応薬になる可能性を持っている。

3 . IL-18の急性肝障害における関与

*P.acnes*感作後のマウスは、LPS投与により致死性の急性肝障害をきたす。このとき肝臓のマクロファージではFasの発現が亢進し、Fas ligand依存性にIL-18を分泌する。この現象はIL-18を成熟型に換えるCaspase-1のノックアウトマウスでも認められる。しかしIL-18ノックアウトマウスでは、Fas ligand投与による肝障害が認められない。この結果は、Caspase-1非依存性のIL-18分泌がFas ligandによる肝障害の誘導に重要であることを示している。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*, 11, 115-122, 1999.

Hayashi, N., Matsui, K., Tsutui, H., Osada, Y., Mohamed, R., Kashiwamura, S.-I., Hyodo, Y., Takeda, K., Akira, S., Hada, T., Higashino, K., Kojima, S. and Nakanishi, K. Kupffer cells from *Schistosoma mansoni*-infected mice are responsible for prompt type-2-differentiation of hepatic T cells in response to worm antigens. *J. Immunol.*, 163, 6702-6711, 1999.

Tsutsui, H., Kayagaki, N., Kuida, K., Nakano, Y., Hayashi, N., Takeda, K., Matsui, K., Kashiwamura, S.-I., Hada, T., Akira, S., Yagita, H., Okamura, H. and Nakanishi, K. Caspase-1-independent Fas/Fas ligand-mediated IL-18 secretion from macrophages causes acute liver injury in mice. *Immunity*, 11, 359-367, 1999.

Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, 11, 443-451, 1999.

Kaisho, T., Tsutsui, H., Tanaka, T., Tujimura, T., Takeda, K., Kawai, T., Yoshida, N., Nakanishi, K. and Akira, S. Impairment of natural killer cytotoxic activity and interferon- γ production in C/EBP β -deficient mice. *J. Exp. Med.*, 190, 1673-1582, 1999.

Hoshino, K., Kashiwamura, S.-I., Kuribayashi, Y., Kodama, T., Tujimura, T., Nakanishi, K., Matsuyama, T., Tadeka, K. and Akira, S. Absence of IL-1 receptor-related T1/ST2 does not affect T helper cell type 2 development and its effector function. *J. Exp. Med.*, 190, 1541-1548, 1999.

Yoshimoto, T., Tsutsui, H., Tominaga, K., Hoshino, K., Okamura, H., Akira, S., Paul, W. E. and Nakanishi, K. IL-18, although anti-allergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 13962-13966, 1999.

Matsumoto, M., Tanaka, T., Kaisho, T., Sanjo, H., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A. and Akira, S. A novel LPS-inducible C-type lectin is a transcriptional target of NF- κ B in macrophages. *J. Immunol.*, 163, 5039-5048, 1999.

Sano, S., Itami, S., Takeda, K., Tarutani, M., Yamaguchi, Y., Miura, H., Yoshikawa, K., Akira, S. and Takeda, J. Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis. *EMBO J.*, 18, 4657-4668, 1999.

Takeuchi, O., Takeda, K., Hoshino, K., Adachi, O., Ogawa, T. and Akira, S. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int. Immunol.*, 12, 113-117, 2000.

Takeuchi, O., Kaufmann, A., Grote, K., Kawai, T., Hoshino, K., Morr, M., Muhlradt, P. F. and Akira, S. Preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide MALP-2 activates immune cells through a Toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signalling pathway. *J. Immunol.*, 164, 554-557, 2000.

Takeuchi, S., Takeda, K., Oishi, K., Nomi, M., Ikeya, M., Itoh, K., Tamura, S., Ueda, T., Hatta, T., Otani, H., Terashima, T., Takeda, S., Yamamura, H., Akira, S. and Minami, Y. Mouse Ror2 receptor tyrosine kinase is required for the heart development and limb formation. *Genes Cells*, 5, 71-78, 2000.

Nomura, F., Akaishi, Y., Sakao, Y., Sato, S., Kawai, T., Matsumoto, M., Nakanishi, K., Kimoto, M., Miyake, K., Takeda, K. and Akira, S. Endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with downregulation of surface Toll-like receptor 4 expression. *J. Immunol.*, 164, 3476-3479, 2000.

Nomura, F., Kawai, T., Nakanishi, K. and Akira, S. NF- κ B activation through IKK-i-dependent I-TRAF/TANK phosphorylation. *Genes Cells*, 5, 191-202, 2000.

Okusu, K., Yoshimoto, T., Takeda, K., Ogura, T., Kashiwamura, S.-I., Iwakura, Y., Akira, S., Okamura, H. and Nakanishi, K. Potentiality of interleukin-18 as a useful reagent for treatment and prevention of *Leishmania major* infection. *Infect. Immun.*, 68, 2449-2456, 2000.