

「TLR7 が誘導する非炎症性応答の誘導メカニズムの解明」

東京大学医科学研究所 老化再生生物学分野 准教授

柴田 琢磨

要旨

リソソームにおいて一本鎖 RNA を認識する Toll like receptor 7 (TLR7) は、炎症応答の誘導を介してウイルス感染時の生体防御に寄与する。また、TLR7 の活性化にはアジュバントとしての有効性も期待されている。一方、TLR7 の過剰活性化は自己免疫疾患の原因にもなることから、TLR7 応答の正確な理解は必要不可欠である。本研究では、TLR7 過剰応答が引き起こす病態の解明に加えて、非炎症性の TLR7 応答である「TLR7 ストレス応答」の意義を解析した。Slc29a3 欠損マウスでは、マクロファージのリソソーム内にグアノシンアナログが蓄積することで TLR7 ストレス応答が起こり、顎下腺が選択的に障害された。同応答ではマクロファージのケモカイン産生に伴うリンパ球の浸潤や獲得免疫応答の亢進により、唾液産生を担う腺房細胞が選択的に脱落することでドライマウスが発症していた。同病態はヒトの IgG4 関連疾患患者の顎下腺炎に類似しており、TLR7 ストレス応答は自己免疫性顎下腺炎において根幹的な発症分子機序である可能性が明らかになった。以上の結果は、TLR7 応答による副作用を理解する上で有用な知見であると共に、非炎症性に獲得免疫応答を誘導可能な TLR7 ストレス応答の理解は安全なアジュバント開発につながると期待される。

背景・目的

ウイルス感染を予防するためのワクチン開発を成功させる重要な要素の一つとして、免疫原性を高めるアジュバントが挙げられる。COVID-19 から得られた知見の一つとして、一本鎖 RNA センサーである TLR7 のウイルス感染症における重要性の発見が挙げられる。TLR7 機能欠損症では SARS-Co-V2 による肺炎の重篤化が引き起こされ[1]、TLR7 リガンドが効率的に抗 SARS-Co-V2 応答を誘導することも示されている[2] [3]。これらの知見は、TLR7 をターゲットとしたアジュバント開発の可能性を示唆する。しかし、TLR7 の過剰応答では強い炎症応答の誘導に伴って自己免疫疾患や自己炎症性疾患を発症することが問題である[4] [5]。申請者はこれまでに、TLR7 リガンドが ssRNA そのものではなく、その分解産物であるグアノシンアナログと短い一本鎖 RNA (オリゴリボヌクレオチド) の両者であることを報告してきた[6]。また同知見を基に、リソソームにおいてヌクレオシドのトランスポーターとして機能する Slc29a3 が TLR7 応答の抑制に寄与することを見出だした。Slc29a3 欠損マウスでは、グアノシンアナログがマクロファージのリソソームに過剰蓄積することで TLR7 が恒常活性化する。しかしながら、誘導される免疫応答は古典的な炎症性サイトカイン (IL-6, TNF- α 等) の産生を伴わない細胞増殖が主であり、我々はこの核酸ストレスに伴う非炎症性の TLR7 応答を「TLR7 ストレス応答」と名付けて報告してきた[7]。TLR7 リガンドを用いたアジュバント開発を可能とするには、TLR7 の活性化が生体内において誘導する免疫応答を十分に理解し、TLR7 リガンドを生体に対して用いることで生じ得る副作用を出来る限り減らす工夫が必要不可欠である。そこで本研究では、TLR7 の過剰応答が誘発する病態の

解明を目指すと共に、炎症応答を伴わない「TLR7 ストレス応答」が引き起こす免疫応答がワクチネーションに寄与し得るのかを検証した。

方法

本研究では、Slc29a3 欠損マウスや TLR7 ノックインマウスを活用し、生体内で起こる TLR7 の過剰活性化が引き起こす免疫応答および疾患の解析を行った。また同マウスより得られた知見を患者サンプルと比較し、得られた知見のヒトにおける有用性を検証した。本研究は、所属機関の動物実験委員会、遺伝子組換え生物等安全委員会、および倫理委員会の承認を得た後に実施された。

1. マウスの使用：Tlr7 などの遺伝子欠損マウスを Slc29a3 欠損マウスと交配して得られた複数遺伝子欠損マウスを使用した。また、ヒト SLE より見付かった TLR7 変異のノックインマウス (VarM マウス) を作製した。
2. 組織学的解析：マウスおよびヒトの顎下腺組織における H&E 染色、および抗 Aqp5 抗体等を用いた免疫組織化学 (IHC) や蛍光免疫染色を行った。
3. オミクス解析：顎下腺や顎下腺マクロファージの Bulk RNA-seq、および顎下腺に浸潤した免疫細胞のシングルセル RNA-seq (scRNA-seq) により遺伝子発現プロファイルを解析した。
4. ヌクレオシドの定量：LC-MS/MS により顎下腺組織内のヌクレオシド量を定量した。
5. フローサイトメトリー：組織内の免疫細胞はスペクトル型セルアナライザーを用いて検証した。
- 6 ヒト検体の解析：IgG4-RD 患者の顎下腺組織および健康対照者の小唾液腺を用いて解析を行った。

結果

① TLR7 の過剰応答が誘発する病態の解明

1. マクロファージにおいて TLR7 応答が亢進する Slc29a3 欠損マウスの諸臓器を解析した結果、雌雄に関わらず、3 ヶ月齢までに全個体に顎下腺炎が生じた。同マウスの顎下腺は野生型と比較して重量が有意に減少すると共に唾液分泌量が顕著に低下しており、ドライマウスを発症していた。

2. SLE 患者より見出された TLR7 の V826M 変異を導入した VarM マウスを作出して解析したところ、同マウスでは SLE 患者において認められた糸球体腎炎に加えて十二指腸炎といった特徴的な病態が再現され (図 1)、Slc29a3 と同様にマクロファージの蓄積も認められた。また、V826M 変異を有する TLR7 は様々な既知 TLR7 リガンドに対する応答性が亢進していた。特に認識する一本鎖 RNA の配列スペクトラムが顕著に拡大しており、生体内 RNA を認識し易くなることで病態の発症に寄与する可能性が示唆された。

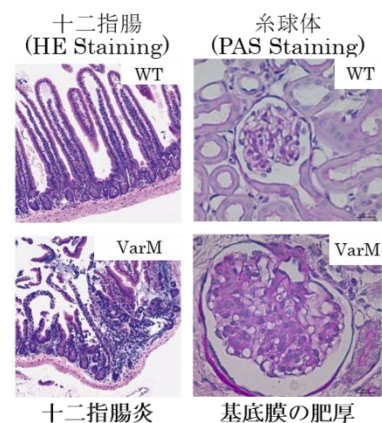


図1：VarMマウスの病理解析の結果

② TLR7 ストレス応答が誘導する免疫応答の解析

1. Slc29a3 欠損マウスの顎下腺では、唾液産生を担う Aqp5 陽性の腺房細胞および介在導管細胞が TLR7 依存的に著明に減少していた。一方で、他の導管細胞や筋上皮細胞は維持されており、TLR7 依

存的に選択的な組織破壊が起こることでドライマウスが誘発されていた。また Bulk RNAseq の結果から得られた特徴として、炎症性サイトカインや I 型 IFN の産生上昇は非常に微量であった。

2. 顎下腺の RNAseq および scRNAseq の結果から、Slc29a3 欠損マウスの顎下腺ではマクロファージに加えて T 細胞や B 細胞の顕著な浸潤とリンパ濾胞形成が認められ (図 2)、これらは TLR7 依存的であった。

3. Slc29a3 欠損マウスにおいて B 細胞および T 細胞を欠損させて病態を検証したところ、T 細胞を欠損した際にドライマウスが

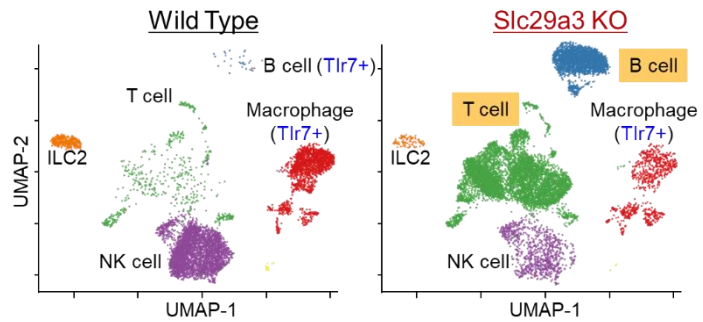


図2：顎下腺CD45陽性細胞のscRNAseq解析の結果

顕著に改善することが判明した。顎下腺では、B 細胞とマクロファージのみが Tlr7 を発現することから、マクロファージによる T 細胞の直接的な活性化がドライマウスを誘発すると考えられる。

4. Slc29a3 欠損マウスの脾臓では細胞増殖を特徴とする TLR7 ストレス応答が認められたが、顎下腺では CXCL9 や CCL5 といったリンパ球を誘引するケモカインが TLR7 依存的に産生されていた。また、顎下腺マクロファージでは抗原提示の誘導に必須となる分子群が TLR7 依存的に発現上昇していた。

5. ドライマウスが主徴とするヒト疾患として IgG4 関連疾患が考えられることから、Slc29a3 欠損マウスと IgG4 関連疾患患者の顎下腺を比較した。Slc29a3 欠損マウスと同様に、IgG4 関連疾患の顎下腺では AQP5 の発現低下、および CXCL9 や CCL5 などケモカインの高発現が確認された。

③ TLR7 ストレス応答の誘導に関わる分子メカニズムの解明

1. Slc29a3 欠損マウスの脾臓における増殖を特徴とする TLR7 ストレス応答の誘導には、ITAM アダプター分子として知られる DAP10 や FcR γ といった 1 回膜貫通型のアダプター分子が関与していた[7]。そこで *in vitro* の系において TLR7 依存的細胞増殖を誘導し得る DAP10/FcR γ 会合分子を複数同定し、それらを Slc29a3 欠損マウスにおいて欠損させる実験を行った。しかしながら、細胞増殖に必須の制御分子は未だ発見できておらず、TLR7 依存的な細胞増殖には複数分子が関与すると考えられる。

2. 顎下腺マクロファージにおける抗原提示を特徴とする TLR7 ストレス応答の誘導に関与する分子メカニズムとして、エンドリソソームに分布する新規分子を見出した。Slc29a3 欠損マウスにおける同分子の欠損により、TLR7 依存的なサイトカイン産生は影響を受けなかった。一方、TLR7 依存的な抗原提示は完全に消失し、顎下腺炎は全く発症しなかった。現在、この新規分子によるマクロファージにおける TLR7 制御メカニズムを更に解析中である。

考察

本研究から、TLR7 の過剰応答がヒトにおいて SLE を誘導すること、および顎下腺炎の発症に関わることを明らかにすることが出来た。TLR7 と SLE の関連は以前にも報告されているが[4]、我々は新規に見出した TLR7 変異体の解析を通じて、TLR7 の 1 アミノ酸変異がリガンドに対する応答性の亢進を誘導するのみならず、リガンドのスペクトラムを変化させることを新たに見出した。その結果として、普段は認識されない生体内 RNA に対する応答が亢進し、SLE が発症すると考えられる。また、Slc29a3 欠損に起因するリソソームのグアノシンアナログの蓄積は、顎下腺マクロファージの TLR7 活性化を誘導することでケモカイン産生や抗原提示を特徴とする新たな「TLR7 ストレス応答」を誘導し、ドライマウスを引き起こすことを見出した。これらは未報告の TLR7 による新規病態発症メカニズムである。興味深いことに、マクロファージが誘導する TLR7 ストレス応答は臓器間で異なり、脾臓では細胞増殖が主徴であるのに対して、顎下腺では獲得免疫応答の誘導を介した組織破壊が進行することが明らかとなった。以上の結果は、TLR7 を標的とした治療戦略が、SLE のみならず IgG4 関連疾患などの自己免疫性

顎下腺炎に対する有効な介入手段となり得ることを示唆している。また、TLR7 が炎症を伴わずに獲得免疫を誘導する「TLR7 ストレス応答」の存在が明らかになったことから、同機構の詳細な分子基盤が更に解明されることで、より副作用の少ない次世代アジュバントの開発が可能になると期待される。

共同研究者

三宅 健介	千葉大学 未来粘膜ワクチン研究開発シナジー拠点、特任教授
清水 敏之	東京大学大学院薬学系研究科、教授
森山 雅文	九州大学大学院歯学研究員、教授
田岡 万悟	東京都立大学 理学研究科化学専攻、准教授
山口 貴世志	東京大学 医科学研究所、准教授
目黒 和行	千葉大学大学院医学研究院、講師

引用論文

- [1] Asano T, Boisson B, Onodi F et al. X-linked recessive TLR7 deficiency in ~1% of men under 60 years old with life-threatening COVID-19. *Sci Immunol*. 2021 19:6(62).
- [2] Yin Q, Luo W, Mallajosyula V, et al. A TLR7-nanoparticle adjuvant promotes a broad immune response against heterologous strains of influenza and SARS-CoV-2. *Nat Mater*. 2023 22(3):380-390.
- [3] Kasturi SP, Rasheed MA, Daughton CH et al. 3M-052, a synthetic TLR-7/8 agonist, induces durable HIV-1 envelope-specific plasma cells and humoral immunity in nonhuman primates. *Sci Immunol*. 2020 19:5(48).
- [4] Brown GJ, Cañete PF, Wang H et al. TLR7 gain-of-function genetic variation causes human lupus. *Nature*. 2022 605(7909):349-356.
- [5] Hamerman JA and Barton GM. The path ahead for understanding Toll-like receptor-driven systemic autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 2024 91:102482.
- [6] Shibata T, Ohto U, Nomura S et al. Guanosine and its modified derivatives are endogenous ligands for TLR7. *Int Immunol*. 2016 28(5):211-22.
- [7] Shibata T, Sato R, Taoka M et al. TLR7/8 stress response drives histiocytosis in SLC29A3 disorders. *J Exp Med*. 2023 4:220(9).

助成研究に関連した発表論文

1. **Shibata T**, Okabe-Kibe K, Chen H, Yamaguchi K, Koga D, Taoka M, Motoi Y, Sato R, Hsiao HW, Fukui R, Kaneko N, Wang Z, Li Y, Wei W, Cai Z, Furukawa Y, Nishimura E, Kawano S, Moriyama M, Nakamura S, Miyake K.
“TLR7 responses to nucleosides drive sialadenitis in Slc29a3-deficient mice”
Int Immunol. in press. doi: 10.1093/intimm/dxaf073.
2. Takayama A*, Meguro K*, **Shibata T***, Yamaide F, Imai Y, Goto Y, Nishio Y, Oso T, Numata T, Suzuki K, Etori K, Kageyama T, Ito T, Maeda A, Yagyu H, Yamamoto T, Ishikawa J, Hirahara K, Hamada H, Ogi T, Ichikawa T, Nishimura K. E, Koide T, Shimizu T, Miyake K, Nakajima H. (***equally contributed**)

“TLR7 variants enhance responsiveness and broaden RNA specificity to drive human lupus”

MedRxiv. 2025 Nov: doi: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2025.11.07.25338211>