

平成 22 年 6 月 9 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17012005

研究課題名（和文）がんと免疫をつなぐ情報発現システム

研究課題名（英文）Informatory expression system connecting cancer and immunity.

研究代表者

谷口 維紹 (TANIGUCHI TADATSUGU)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50133616

研究成果の概要（和文）：

インターフェロン、IRFs、Noxa 等の分子について機能解析を行った結果、これらの分子が細胞のがん化抑制やアポトーシス誘導、がん転移など多様なシグナル伝達系の制御に関与していた。また、TLR シグナルにおけるクロストークを見出した。さらに、自然免疫応答シグナル伝達系の解析から、DAI や HMGB1, 2, 3 が核酸に対する免疫応答シグナルに重要な役割を果たす事を見出した。これらのシグナルは発がんやがんの増悪と密接に関連しており、我々の研究成果は新たながん治療の開発に繋がる分子基盤を提供するものであると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We investigated biological mechanisms and role of effector molecules, e. g. interferons, IRFs and Noxa. It revealed that these molecules are involved in transformation, apoptosis induction and metastasis signaling pathways. We also found the cross-talk pathway between TLRs signaling. Moreover, we identified DAI and HMGB1, 2, 3 are important for the nucleic-acid mediated innate immune responses. Since these pathways regulate tumorigenesis and exacerbation, our findings will be proved to be useful for the development of novel tumor therapy in near future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	116,700,000	0	116,700,000
2006 年度	83,500,000	0	83,500,000
2007 年度	83,500,000	0	83,500,000
2008 年度	93,240,500	0	93,240,500
2009 年度	83,500,000	0	83,500,000
総計	460,440,500	0	460,440,500

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：(1) インターフェロン (2) IRF ファミリー (3) p53 (4) 樹状細胞
 (5) 発がん抑制 (6) Noxa (7) Puma (8) Toll 様受容体

1. 研究開始当初の背景

がんは生命の危険に直結する重篤な疾患であり、その効果的な治療体系の構築は急務である。従来のがん研究は細胞増殖因子や細胞周期制御など、増殖システムの制御に着目してきたが、近年の研究により細胞死の誘導にかかわるシグナル伝達系と免疫応答反応におけるシグナル伝達系は、インターフェロンやインターフェロン制御因子 (IRF) 等のエフェクター分子によって相互に関連していることが明らかになってきた。このことからがん細胞の細胞死制御に免疫応答経路シグナルが関わるのが予想され、その詳細な解析研究の推進が重要な課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では、発がん免疫応答の制御をつなぐ新しい研究領域を推進し、「がんの克服」に貢献する分野を開拓し、ひいては臨床応用へつながる分子基盤の解明を迫る事を目指し、各種免疫関連因子と生体のがん化制御機構のネットワークについて解析を行う。すなわち、免疫応答誘導の情報伝達系・遺伝子ネットワークについて解析するとともに、その過程に関与する IRF (Interferon Regulatory Factor)、p53 等のエフェクター分子の機能解析を発がん制御という視点から推進する。さらに我々が同定した細胞質内 DNA センサー分子 DAI (DNA-dependent activator of IRFs) の機能解析を通じ、免疫応答惹起と発がんとの関連についての解析、さらに、細胞死誘導因子 Noxa および Puma の機能解析および作用機序解析を行う。これらにより、がん免疫の情報発現システムを統合的に解明することを目的とする。

3. 研究の方法

有効な抗腫瘍免疫を誘導するため、樹状細胞の活性化に着目し、IRF-IFN 系による活性化への関与についてその詳細を検討する。我々はこれまでに、IRF7 が MyD88 や TRAF6 と会合し、これら複数の分子とともに細胞内シグナルプロセッサー (CTTP; cytoplasmic transductional-transcriptional processor) を構成し、この複合体が TLR9 や TLR7 からのシグナルを IFN 遺伝子発現に必要な IRF 転写因子の活性化にプロセスすることを明らかにしている。このことから、IRF ファミリー分子の活性化機構について時空間的な解析を行うため、蛍光エネルギー移動 (FRET) 法を用いて検討を行い、新しい側面から樹状細胞活性化機構を検討する。

また、IRF シグナルと細胞死の制御の関連、IRFs とがん転移との関連、構成的な IFN 発現

による「弱いインターフェロンシグナル」のがん化抑制機構についても解析を推進する。さらに、DNA による炎症性免疫応答惹起と発がんの関連について明らかとするため、DNA センサー分子 DAI の機能についての機能解析を進めるとともに、in vivo における DAI の生理的機能を明らかとするため、Dai 遺伝子を欠損したノックアウトマウスを作成する。

このほか、我々が同定した細胞死誘導因子 Noxa、また Noxa と同じく BH3 ファミリーに属する Puma について、がん細胞に対するアポトーシス誘導の作用機序を検討し、新規がん治療法の開発を見据えて研究を進める。

自然免疫を強く活性化する TLR についても、TLR シグナルにおけるクロストークや TLR 同士の間乗効果をもたらすメカニズムの解析を通じ、抗腫瘍免疫応答の効果的な誘導法の確立を目指す。

4. 研究成果

(1) IRF シグナル伝達系の解析 ;
強力な免疫系賦活能をもつ Toll 様受容体 (TLR) および下流の MyD88 経路によるインターフェロン制御因子 (IRF) の活性化について FRET 法を用いて検討したところ、既知の IRF5 や IRF7 だけでなく、IRF4 も MyD88 と直接相互作用することを見出した。IRF4 ノックアウトマウスの解析により、IRF4 は IRF5 と競合的に MyD88 と結合することで、IRF5 による炎症性サイトカイン誘導を阻害する負の制御因子であることが明らかとなった。

(2) IRF3 による細胞死制御メカニズムの解明 ;
細胞に紫外線 (UV) を照射すると、IRF3 が活性化することを見出したため、IRF3 欠損マウスを用いた解析を進め、IRF3 が UV による皮膚細胞でのアポトーシス誘導に関与することを明らかとした。

(3) IRF5 による発がん抑制と抗腫瘍免疫応答の制御メカニズムの解明 ;
IRF5 は免疫系の制御のみならず発がんの抑制にも深く関わっているが、IRF5 欠損マウス由来細胞を用いて細胞のアポトーシス感受性に及ぼす影響を解析した結果、IRF5 が細胞種選択的に細胞死受容体 Fas によるアポトーシス感受性を決定することを明らかとした。さらに、マウスへの抗 FAS 抗体投与による劇症肝炎の発症についても検討を行ったところ、*Irf5* 遺伝子欠損マウスにおいて症状の抑制が認められたことから、IRF5 が細胞死受容体シグナルに関与することが明らかとなった。また実際に、ヒトがん細胞を移植した

がん転位マウスモデルを IRF5 欠損マウスと野生型マウスを用いて作成し、肺への転移を比較した結果、IRF5 欠損マウスでは野生型に比べ高頻度でがん転移を生ずることを明らかにした。この発見についてより詳細な解析を進め、IRF5 がいかなる細胞群に作用してがんの転位を抑制するかについて、候補細胞の絞込みを進めた。

(4)DNA による炎症性免疫応答惹起と発がんの関係の解明；
細胞は DNA 刺激により I 型インターフェロン分子を放出することが知られる。マウス細胞を用い、細胞が無視状態において構成的に発現する I 型インターフェロンシグナルが、細胞のがん化に及ぼす影響を解析した。その結果、このシグナル系が細胞のがん化抑制に重要な働きをしていることを明らかとした。また、DNA 刺激による I 型インターフェロン産生に関与する DNA センサー分子として我々が同定した DAI について、より詳細な機能の解析を進めるため、*Dai* 遺伝子ノックアウトマウスを作成した。このマウスを用いて生体における DAI の役割について検討したところ、DAI は細胞種特異的に、DNA 刺激によるインターフェロン誘導に関与することが明らかとなった。

さらに、DNA 認識に関与する分子のスクリーニングを進めたところ、主要タンパクとして HMGB1, 2, 3 が同定された。さらに機能解析を進めたところ、HMGB は DNA のみならず RNA にも結合し、HMGB の DNA/RNA への結合が核酸を認識する TLR や細胞質内核酸センサー分子による自然免疫応答の惹起に必要であることを見出した。これらの結果から、HMGB は核酸に対する自然免疫応答の根幹を担う分子であると考えられる。自然免疫応答による炎症反応はがんを増悪させる方向に働くため、HMGB を介して核酸による炎症応答を制御することで発がんあるいはがんの病態が制御できる可能性がある。

(5)Noxa 発現によるがん治療法の開発；
我々が同定した p53 誘導遺伝子である Noxa を、がん細胞および正常細胞へアデノウイルスによる遺伝子発現系にて発現させ、細胞死誘導能を検討したところ、Noxa はがん細胞に対しては、アポトーシスによる細胞死を誘導する一方、正常細胞にはまったく影響を及ぼさないことが明らかとなった。また、ヒトがん細胞を移植した担がんモデルマウスにて *in vivo* での効果を検討した結果腫瘍内への Noxa 遺伝子治療が著効することを確認した。このとき、腫瘍部分の細胞群には、アポトーシスによる DNA 断片化を認めしたが、腫瘍の周囲の正常組織部分では変化は

なく、Noxa が正常組織に傷害を与えないことが確かめられた。
さらにがん細胞への Noxa 導入効率の向上を目指し、HIV 由来の蛋白 TAT の細胞膜透過ドメイン TAT-PTD と Noxa を融合した新規蛋白製剤 TAT-Noxa を作成した。これをがん細胞および健常細胞に投与すると Noxa 発現ウイルスを用いた時と同様にがん細胞にのみアポトーシス誘導を起こすことを確認した。この TAT-Noxa は非感染性であり、臨床への応用が考えられるため、米国にて特許出願の仮申請を行った。

(6)アポトーシス誘導因子 Puma の作用機序解析；
Noxa と同じ BH3 ファミリーに属する細胞死誘導因子である Puma について分子作用機序を検討した。その結果 Puma は小胞体 (ER) を介した細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇を伴う新たなミトコンドリア依存性のアポトーシス経路を活性化することが明らかとなった。

(7)TLR 刺激シグナルのクロストークと新しい抗腫瘍免疫誘導メカニズムの解明；
TLRs は自然免疫応答を強力に惹起する受容体である。それぞれの TLRs は特異的な病原体由来分子パターン (PAMPs) に属する分子を認識することが知られているが、特定の TLRs アゴニスト群を同時に投与すると、免疫細胞活性化が相乗的に増加することから TLRs の下流シグナル間に、クロストークが存在することが予想された。解析の結果 TLR3 以外の TLR が活性化する MyD88 経路と TLR3 および TLR4 のみが活性化する TRIF 経路の間にクロストークが存在しており、これらがインターロイキン (IL)-6, IL-12p40, IL-23p19 などの炎症性サイトカインを相乗的に産生誘導する事、さらにこの経路における IRF5 の関与が明らかとなった。
よって、引き続き免疫細胞を活性化する新規治療法を見据え、TLRs の新規アゴニスト探索を進め、TLR3 の新規アゴニスト探索システムを確立することに成功した。今後はこれを用いてアゴニスト分子の探索を行う予定である。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 27 件)
[1] Savitsky D, Tamura T, Yanai H, Taniguchi T. Regulation of immunity and oncogenesis by the IRF transcription factor family. *Cancer Immunol. Immunother.*, 査読有, Vol. 59, 2010,

- [2] Yanai H, Ban T, Wang Z, Choi MK, Kawamura T, Negishi H, Nakasato M, Lu Y, Hangai S, Koshiba R, Savitsky D, Ronfani R, Akira S, Bianchi ME, Honda K, Tamura T, Kodama T, and Taniguchi T. HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic acid-mediated innate immune responses. *Nature*, 査読有, Vol. 462, 2009, 99-103,
- [3] Choi MK, Wang Z, Ban T, Yanai H, Lu Y, Koshiba R, Nakaima Y, Hangai S, Savitsky D, Nakasato M, Negishi H, Takeuchi O, Honda K, Akira S, Tamura T, Taniguchi T. A selective contribution of the RIG-I-like receptor pathway to type I interferon responses activated by cytosolic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, Vol. 106, 2009, 17870-17875,
- [4] Nakajima A, Nishimura K, Nakaima Y, Oh T, Noguchi S, Taniguchi T, Tamura T. Cell type-dependent proapoptotic role of Bcl2L12 revealed by a mutation concomitant with the disruption of the juxtaposed Irf3 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, Vol. 106, 2009, pp.12448-12452,
- [5] Suzuki S, Nakasato M, Shibue T, Koshima I, Taniguchi T. Therapeutic potential of proapoptotic molecule Noxa in the selective elimination of tumor cells. *Cancer Sci.*, 査読有, Vol. 100, 2009, pp. 759-769,
- [6] Chen HM, Tanaka N, Mitani Y, Oda E, Nozawa H, Chen JZ, Yanai H, Negishi H, Choi MK, Iwasaki T, Yamamoto H, Taniguchi T, Takaoka A. Critical role for constitutive type I interferon signaling in the prevention of cellular transformation. *Cancer Sci.*, 査読有, Vol. 100, 2009, pp. 449-456,
- [7] Yanai H, Savitsky D, Tamura T, Taniguchi T. Regulation of the cytosolic DNA-sensing system in innate immunity: a current view. *Curr. Opin. Immunol.*, 査読有, Vol. 1, 2009, pp.17-22,
- [8] Negishi H, Osawa T, Ogami K, Ouyang X, Sakaguchi S, Koshiba R, Yanai H, Seko Y, Shitara H, Bishop K, Yonekawa H, Tamura T, Kaisho T, Taya C, Taniguchi T, Honda K. A critical link between Toll-like receptor 3 and type II interferon signaling pathways in antiviral innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, Vol. 105, 2008, pp.20446-20451,
- [9] Kano S, Sato K, Morishita Y, Vollstedt S, Kim S, Bishop K, Honda K, Kubo M, Taniguchi T. The contribution of transcription factor IRF1 to the interferon-gamma-interleukin 12 signaling axis and T(H)1 versus T(H)-17 differentiation of CD4(+) T cells. *Nat. Immunol.*, 査読有, Vol. 9, 2008, pp.34-41,
- [10] Takaoka A, Tamura T, Taniguchi T. Interferon regulatory factor family of transcription factors and regulation of oncogenesis. *Cancer Sci.*, 査読有, Vol. 99, 2008, pp.467-478,
- [11] Mizutani T, Tsuji K, Ebihara Y, Taki S, Ohba Y, Taniguchi T, Honda K. Homeostatic erythropoiesis by the transcription factor IRF2 through attenuation of type I interferon signaling. *Exp. Hematol.*, 査読有, Vol. 36, 2008, pp.255-264,
- [12] Couzinet A, Tamura K, Chen HM, Nishimura K, Wang Z, Morishita Y, Takeda K, Yagita H, Yanai H, Taniguchi T, Tamura T. A cell-type-specific requirement for IFN regulatory factor 5 (IRF5) in Fas-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, Vol. 105, 2008, pp.2556-2561,
- [13] Tamura T, Yanai H, Savitsky D, Taniguchi T. The IRF Family Transcription Factors in Immunity and Oncogenesis. *Annu. Rev. Immunol.*, 査読有, Vol. 26, 2008, pp.535-584,
- [14] Wang Z, Choi MK, Ban T, Yanai H, Negishi H, Lu Y, Tamura T, Takaoka A, Nishikura K, Taniguchi T. Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, Vol. 105, 2008, pp.5477-5482,
- [15] Yanai H, Chen H., Inuzuka T., Kondo S., Mak WT., Takaoka A, Honda K, Taniguchi T. Role of IFN regulatory factor 5 transcription factor in antiviral immunity and tumor suppression. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA, 査読有, Vol. 104, 2007, pp. 3402-3407,

[16] Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, Lu Y, Miyagishi M, Kodama T, Honda K, Ohba Y, Taniguchi T. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature*, 査読有, Vol. 448, 2007, pp. 501-505,

[17] Onoguchi K, Yoneyama M, Takemura A, Akira S, Taniguchi T, Namiki H, Fujita T. Viral Infections Activate Types I and III Interferon Genes through a Common Mechanism. *J. Biol. Chem.*, 査読有, Vol. 282, 2007, pp. 7576-7581,

[18] Shibue T, Suzuki S, Okamoto H, Yoshida H, Ohba Y, Takaoka A, Taniguchi T. Differential contribution of Puma and Noxa in dual regulation of p53-dependent apoptotic pathways. *EMBO J.*, 査読有, Vol. 25, 2006, pp. 4952-4962,

[19] Shibue T, Taniguchi T. BH3-only proteins: Integrated control point of apoptosis. *Int. J. Cancer*, 査読有, Vol. 119, 2006, pp. 2036-2043,

[20] Negishi H, Fujita Y, Yanai H, Sakaguchi S, Ouyang X, Shinohara M, Takayanagi H, Ohba Y, Taniguchi T, Honda K. Evidence for licensing of IFN- γ -induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, Vol. 103, 2006, pp. 15136-15141,

[21] Honda K, Taniguchi T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat. Rev. Immunol.*, 査読有, Vol. 6, 2006, pp. 644-659,

[22] Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, Mizutani T, Kano S, Honda K, Ohba Y, Mak TM, Taniguchi T. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature*, 査読有, Vol. 434, 2005, pp. 243-249,

[23] Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, Shimada N, Ohba Y, Takaoka A, Yoshida N, Taniguchi T. IRF-7

is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses.

Nature, 査読有, Vol. 434, 2005, pp. 772-777,

[24] Honda K, Ohba Y, Yanai H, Negishi H, Mizutani T, Takaoka A, Taya C, Taniguchi T. Spatiotemporal regulation of MymD88-IRF-7 signalling for robust type I interferon induction. *Nature*, 査読有, Vol. 434, 2005, pp. 1035-1040,

[25] Negishi H, Ohba Y, Yanai H, Takaoka A, Honma K, Yui K, Matsuyama T, Taniguchi T, Honda K. Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, Vol. 102, 2005, pp. 15989-15994,

[26] Taniguchi T, Takaoka A. Type I interferon system and IRF family of transcription factors in host defense regulation. *Proc. Jpn. Acad.*, 査読有, Vol. 81, 2005, pp. 1-13,

[27] Honda K, Yanai H, Takaoka A, Taniguchi T. Regulation of the type I IFN induction: a current view. *Int. Immunol.*, 査読有, Vol. 17, 2005, pp. 1367-1378,

[学会発表] (計 15 件)

[1] Taniguchi T. Nucleic acid sensing and activation of innate and adaptive immune responses. World Immune Regulation Meeting IV, 2010. 3. 29-4. 1, Davos, Switzerland

[2] Taniguchi T. Nucleic Acids-Sensing, Signaling and IRF Transcription Factors in Inflammation and Immunity. *The 9th World Congress on Inflammation*, 2009. 7. 6-10, 東京

[3] Taniguchi T. Nucleic Acids Sensing, IRFs and Interferons: Implication in Protective and Pathological Immunities. *米国臨床免疫学講座学会*, 2009. 6. 11-14, San Francisco, USA

[4] Taniguchi T. Activation of innate immune responses by nucleic acids and IRFs. *Immune Regulation*, 2009. 5. 25-27, 大阪国際会議場 (大阪)

[5] Taniguchi T. "Sensing, signaling and transcription in the innate immune

response”. *The 6th Congress of the Chinese Society for Immunology*, 2008. 10. 31-11. 3, 西安、中華人民共和国

[6] Taniguchi T. “Cytoplasmic receptors for the perception of danger”. *1st International Conference on Immunochemotherapy*, 2008. 10. 17-18, Paris, France

[7] Taniguchi T. “30 Years After the Dawn of Cytokine Molecular Biology: Roles of IRF Transcription Factors”. *Cytokines 2008 - 7th Joint Conference of the International Society for Interferon and Cytokine Research and International Cytokine Society*, 2008. 10. 12-16, モントリオール (カナダ)

[8] Wang Z. et al. Regulation of Innate Immune Responses by DAI (DLM-1/ ZBP1) and Other DNA-sensing Molecules. *7th Joint Conference of the International Society for Interferon and Cytokine Research and International Cytokine Society*, 2008. 10. 12-16, モントリオール (カナダ)

[9] Taniguchi T. 核酸認識による免疫系の活性化. *Toll 2008 国際会議*, 2008. 8. 24-27, Lisbon, Portugal

[10] Taniguchi T. The IRF family transcription factors in oncogenes and immunity. *Molecular biology of cancer: 20 years of progress punctuated by the Pezcoller Symposia*, 2008. 6. 11-13, in Trento, Italy,

[11] Taniguchi T. “Interferons and DNA Sensors”. *Perspectives in Immunology Symposium*, 2008. 5. 12, California, USA

[12] Taniguchi T. Senseing, signaling and transcription in innate immune responses. *1st International - Singapore Symposium of Immunology*, 2008. 1. 12-16, Biopolis, Singapore

[13] 柳井 秀元. IRF-5の抗ウイルス応答及び抗腫瘍応答における役割. *日本癌学会*, 2007. 10. 3-5, パシフィコ横浜 (横浜)

[14] Taniguchi T. IRFs in Innate Immune Signaling. *Interacademy Symposium: innate immunity and its interface with adaptive immunity*, 2007. 8. 2-5, France

[15] Taniguchi T. Regulation of immune response and tumor suppression by the IRF family transcription factors. *International Conference on Immunology*, 2007. 7. 12-15. China

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称; 核酸により活性化される自然免疫応答の抑制剤およびそのスクリーニング方法

発明者 谷口 維紹

権利者 同上

種類: 特許

番号: 特願 2009-238606

国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 維紹 (TANIGUCHI TADATSUGU)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 5 0 1 3 3 6 1 6

(2) 研究分担者

高岡 晃教 (TAKAOKA AKINORI)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号: 3 0 3 2 3 6 1 1

※ 平成17年度～平成19年度

田村 智彦 (TAMURA TOMOHIKO)

東京大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 5 0 2 8 5 1 4 4

※ 平成20年度～平成21年度

本田 賢也 (HONDA KENYA)

東京大学・大学院医学系研究科・助手

研究者番号: 6 0 3 3 4 2 3 1

※ 平成17年度～平成18年度

大場 雄介 (Ooba Yuusuke)

東京大学・大学院医学系研究科・助手

研究者番号: 3 0 3 3 3 5 0 3

※ 平成17年度

柳井 秀元 (YANAI HIDEYUKI)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 7 0 4 3 1 7 6 5

※ 平成18年度～平成21年度

(3) 連携研究者

なし