

令和元年5月26日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19548

研究課題名（和文）Toll様受容体による内在性レトロウイルス制御機構の分子基盤解明

研究課題名（英文）Understanding a mechanism controlling endogenous retrovirus by Toll-like receptors

研究代表者

三宅 健介（MIYAKE, Kensuke）

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：60229812

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：内在性レトロウイルスの活性化は、核酸特異的Toll-like receptor (TLR)によって制御されていることが明らかになりつつある。本研究では、内在性レトロウイルスの活性化とそれに対するTLR7の応答について解析した。結果として、一つの遺伝子を欠損させるとTLR7の応答性が高くなることを見出した。その遺伝子を欠損した細胞における内在性レトロウイルスの発現を検討したところ、亢進していることが明らかとなった。今後、この細胞において、TLR7を活性化する内在性ウイルスについての解析を進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内在性レトロウイルスは、ゲノムにコードされているにも関わらず、外来性のウイルスと同じように核酸特異的Toll様受容体（Toll-like receptor, TLR）に認識されることが分かっている。核酸特異的TLRがないと、内在性レトロウイルスが活性化されてしまう。本研究では、内在性レトロウイルスの制御機構とTLR7の活性化の関係について検討した。本研究の結果は、内在性レトロウイルスの制御機構の解明に貢献しうる。

研究成果の概要（英文）：Activation of endogenous retroviruses (ERVs) is controlled by nucleic acid-specific Toll-like receptors. This study focused on molecular mechanisms behind ERV activation and TLR7 responses to ERVs. We found that the lack of a single gene increased expression of ERVs and activated TLR7 and.

研究分野：免疫学

キーワード：自然免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Toll 様受容体 (TLR、Toll-like receptor) は病原体成分に応答して感染防御反応を誘導する病原体センサーであるが、内因性のリガンドにも応答し、非感染性の疾患に関与する。核酸特異的 TLR の内因性リガンドとして、内在性レトロウイルスが報告されている。内在性レトロウイルスはゲノムの 8-10% を占めており、様々なストレスで発現が誘導され、遺伝子変異の原因となったり、様々な疾患に関与すると考えられている。核酸特異的な TLR3、TLR7、TLR9 を全て欠損したマウスでは、内在性レトロウイルスが恒常的に活性化され、遺伝子変異を起こした結果として T 細胞腫瘍が発生し、個体死に至ることが報告されている。この結果は、核酸特異的 Toll 様受容体による内在性レトロウイルスの制御はゲノムの安定性維持に重要である可能性を示す結果である。したがって、核酸特異的 TLR の内在性レトロウイルスに対する応答を調べることは、感染防御とは異なる新たな役割を明らかにする可能性がある。

2. 研究の目的

TLR3、TLR7、TLR9 の中でも特に TLR7 が直接内在性レトロウイルス由来の Alu と呼ばれる RNA 配列に応答し、内在性レトロウイルスに対する抗体産生を誘導する。内在性レトロウイルスによる TLR7 の活性化は、一方で自己免疫疾患を誘導する可能性がある。Ro60 は SLE などの疾患で検出される自己抗体の抗原である。Ro60 は、Alu 配列に結合し、内在性レトロウイルスの活性化を防ぐ。Ro60 に対する自己抗体の産生は、Ro60 と内在性レトロウイルスが自己免疫疾患において、TLR7 を活性化している可能性を示している。本研究においては、内在性レトロウイルスの活性化機構、TLR7 による内在性レトロウイルスの認識機構及び制御機構について解析を進める。ヒトやマウスが、内なる感染である内在性レトロウイルスを如何に制圧し、ゲノムの恒常性を維持してきたのか、またその代償としての自己免疫疾患がどのように誘導されているのか、明らかにすることを目的とする。本研究の成果は、ゲノムの恒常性維持機構における自然免疫の役割を解明することと、自己免疫疾患の病態解明に資することが期待される。

3. 研究の方法

1. 内在性レトロウイルス制御機構の解明

Ro60 が欠損したマクロファージ細胞株を作成し、細胞表面に発現する内在性レトロウイルス由来のタンパク質を FACS で検出し、内在性レトロウイルスの活性化を確認する。次に Ro60 と同様に内在性レトロウイルス制御に関わる分子を、CRISPR/CAS9 を用いた機能欠損型スクリーニングで検索する。同定された遺伝子と Ro60 との関係について検討する。

2. TLR7 による内在性レトロウイルス認識機構の解析

NF- κ B の活性化で GFP が誘導されるレポーターと CAS9 を発現させたマクロファージ細胞株で、Ro60 かあるいは(1)で同定された遺伝子を欠損させ、TLR7 を活性化するかどうか、検討する。内在性レトロウイルスによる TLR7 活性化が確認できた場合には、ガイド RNA ライブラリーを導入し、内在性レトロウイルスの活性化に影響せず、TLR7 活性化による GFP の発現を低下させる遺伝子を検索する。TLR7 による内在性レトロウイルス認識に関わる分子を同定する。

3. TLR7 による内在性レトロウイルス制御機構の解明

(2)で確立した細胞について、Ro60 に加えて TLR7 を欠損させ、内在性レトロウイルスの発現が Ro60 単独欠損に比べて、さらに亢進するかどうか、検討する。TLR7 依存性に Ro60 欠損によって誘導された遺伝子をマイクロアレイで検索し、その中から、抗ウイルス応答に関わる分子を解析することで、TLR7 の内在性レトロウイルス制御機構解明を目指す。

4. 個体レベルでの TLR7 による内在性レトロウイルス制御機構についての解析

Ro60 の遺伝子欠損マウスを作成し、内在性レトロウイルス活性化を FACS で検討する。すでに作成を始めている。TLR7 応答と、自己免疫疾患の病態についても検討する。さらに TLR7 と Ro60 の両方を欠損したマウスを作成し、TLR7 依存性に誘導される遺伝子をマイクロアレイで検索する。上述の(3)で検出された遺伝子と比較することで、TLR7 によって誘導された内在性レトロウイルス制御機構の解明を目指す。

4. 研究成果

Ro60 を欠損させた細胞株、マウスを予定通り作成し、TLR7 を中心に応答性を検討した。内因性レトロウイルスが制御できなくなるために、結果として TLR7 が活性化される、あるいは応答性が亢進することを予想していたが、残念ながらそのような表現型は細胞株においても、マウスにおいても認められなかった。TLR7 の応答性に何らかの変化が認められないと、次の展開に進むことは難しいと判断した。したがって、Ro60 以外の、他の内在性レトロウイルスの制御に関わる他の分子について、TLR7 活性化との関係について検討した。さらに TLR7 の活性化を検出する感度を高めた細胞株も作成し、その細胞株において、APOBEC3 などの分子について、遺伝子欠損細胞株を作成し、TLR7 の活性化を検討した。その結果、一つの遺伝子について、欠損させると TLR7 の応答性が高くなることが明らかになった。さらに遺伝子を欠損した細胞における内在性レトロウイルスの発現を検討したところ、予想通り亢進していることが明らかとなった。今後、TLR7 を活性化している内在性レトロウイルスの同定を進める予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

1. Furusho, K., T. Shibata, R. Sato, R. Fukui, Y. Motoi, Y. Zhang, S. I. Saitoh, T. Ichinohe, M. Moriyama, S. Nakamura, and K. Miyake. 2018. Cytidine deaminase enables Toll-like receptor 8 activation by cytidine or its analogs. *Int Immunol*. doi:10.1093/intimm/dxy075 (2018)
2. Sato, R., A. Kato, T. Chimura, S. I. Saitoh, T. Shibata, Y. Murakami, R. Fukui, K. Liu, Y. Zhang, J. Arii, G. H. Sun-Wada, Y. Wada, T. Ikenoue, G. N. Barber, T. Manabe, Y. Kawaguchi, and K. Miyake. 2018. Combating herpesvirus encephalitis by potentiating a TLR3-mTORC2 axis. *Nat Immunol* 19: 1071-1082. doi:10.1038/s41590-018-0203-2 (2018).
3. Zhang, Z., U. Ohto, T. Shibata, M. Taoka, Y. Yamauchi, R. Sato, N. M. Shukla, S. A. David, T. Isobe, K. Miyake, and T. Shimizu. 2018. Structural Analyses of Toll-like Receptor 7 Reveal Detailed RNA Sequence Specificity and Recognition Mechanism of Agonistic Ligands. *Cell Rep* 25: 3371-3381.e3375. doi:10.1016/j.celrep.2018.11.081 (2018).
4. Fukui, R., C. Yamamoto, F. Matsumoto, M. Onji, T. Shibata, Y. Murakami, A. Kanno, T. Hayashi, N. Tanimura, N. Yoshida, and K. Miyake. 2018. Cleavage of Toll-Like Receptor 9 Ectodomain Is Required for In Vivo Responses to Single Strand DNA. *Front Immunol* 9: 1491. doi:10.3389/fimmu.2018.01491 (2018).
5. Ohto, U., H. Ishida, T. Shibata, R. Sato, K. Miyake, and T. Shimizu. 2018. Toll-like Receptor 9 Contains Two DNA Binding Sites that Function Cooperatively to Promote Receptor Dimerization and Activation. *Immunity* 48: 649-658.e644. doi:10.1016/j.immuni.2018.03.013 (2018).
6. Sato, R., T. Shibata, Y. Tanaka, C. Kato, K. Yamaguchi, Y. Furukawa, E. Shimizu, R. Yamaguchi, S. Imoto, S. Miyano, and K. Miyake. 2017. Requirement of glycosylation machinery in TLR responses revealed by CRISPR/Cas9 screening. *Int Immunol* 29: 347-355. doi:10.1093/intimm/dxx044 (2017).
7. Saitoh, S. I., F. Abe, A. Kanno, N. Tanimura, Y. Mori Saitoh, R. Fukui, T. Shibata, K. Sato, T. Ichinohe, M. Hayashi, K. Kubota, H. Kozuka-Hata, M. Oyama, Y. Kikko, T. Katada, K. Kontani, and K. Miyake. 2017. TLR7 mediated viral recognition results in focal type I interferon secretion by dendritic cells. *Nat Commun* 8: 1592. doi:10.1038/s41467-017-01687-x (2017).
8. Murakami, Y., R. Fukui, Y. Motoi, T. Shibata, S.-I. Saitoh, R. Sato, and K. Miyake. 2017. The protective effect of the anti-Toll-like receptor 9 antibody against acute cytokine storm

caused by immunostimulatory DNA. Sci Rep 7: 44042. doi:10.1038/srep44042 (2017).

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Mechanisms Controlling Innate Immune Responses to Nucleic Acids, U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP) 20th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, 8-11 February 2018, Shenzhen, China
2. Mechanisms Controlling Innate Immune Responses to Nucleic Acids, International Union of Biochemistry and Molecular Biology 2018 (IUBMB2018), June 4-8, 2018, Seoul, Korea
3. Mechanisms Controlling Innate Immune Responses to Nucleic Acids, 51st annual meeting of the society for leukocyte biology and 15th biennial meeting of the international endotoxin and innate immunity society, Oct 14-16, 2018, Phoenix, AZ, USA
4. Mechanisms Controlling Innate Immune Responses to Nucleic Acids, The 9th Asian congress of pediatric infectious diseases, Nov 10-12, 2018, Fukuoka, Japan
5. Mechanisms Controlling Innate Immune Responses to Nucleic Acids, The 47th annual meeting of the Japanese society for immunology, Dec 10-12, 2018, Fukuoka, Japan
6. Mechanisms Controlling Innate Immune Responses to Nucleic Acids, Korean Association of Immunologists Meeting 2017, Nov 8-10, Seoul, South Korea
7. Mechanism controlling TLR7 and their regulation in diseases, The 42nd annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Dec 15-17, Kochi City, Japan
8. Nucleic acid-sensing Toll-like receptors as therapeutic targets in inflammatory diseases, Pfizer Science Day 2017, Oct 10-11, Yokohama City, Japan

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。