

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07162

研究課題名(和文) ウイルスに対する免疫応答を規定する非感染状態の免疫システムに関する研究

研究課題名(英文) Research on the immune system in uninfected cells that defines the immune response during viral infection

研究代表者

亀山 武志 (Kameyama, Takeshi)

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号：40569505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス感染によって大量に産生誘導されるインターフェロンIFNは、非感染状態においても非常に微量に産生されていることが知られているが、この構成的に産生されるIFNとそのシグナルは、ウイルス感染後に強力に誘導されるIFN産生に必須であることや、細胞のがん化を抑制するのに寄与することが知られている。しかしながら、この構成的に微量なIFN産生が、どのようなメカニズムで発現誘導されるのか、またこの調節機構については不明な点が多い。本研究では、この構成的なIFNが細胞内のRNA認識系を介して発現誘導されることを見出した。またウイルス感染による自然免疫応答を制御する複数の制御因子を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではウイルスに対する免疫応答を規定する非感染状態の免疫システムが内因性RNAによって構成的なIFNが制御されていることを明らかにしたという学術的意義がある。構成的IFNは、感染症予防や発がん制御に重要であることが知られているので、本研究結果はこれまでにない新しいアプローチから感染症予防や発がん制御という領域を構築するための分子基盤となると期待される。近年地球温暖化やグローバル社会により様々な感染症リスクが増加し、現在コロナ禍で世界中が脅威にさらされており、加えて超高齢社会となった日本において、予防的な観点から感染対策や抗がん対策を行うことは責務の課題であり社会的意義が高い。

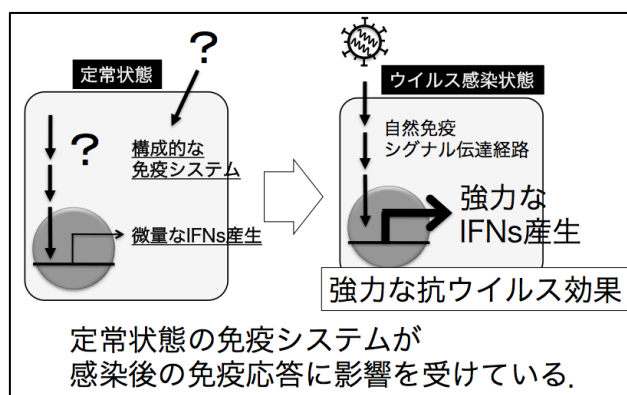
研究成果の概要(英文)：Interferons (IFNs) are the main cytokines for the innate immune response against viral infection. It is known that IFNs are constitutively induced at very low levels in the absence of viral infection. These constitutively induced IFNs and their signals are essential for the rapid and robust induction of IFN induction after viral infection and for the suppression of carcinogenesis. However, the mechanism of this constitutive IFN induction and its regulation remains unclear. In this study, we found that the constitutive IFNs are induced through an intracellular RNA sensor-dependent recognition of endogenous RNAs and the downstream signaling pathway. Furthermore, we found several regulatory factors that regulate cytosolic nucleic acid-mediated innate immune responses. These results identified a novel regulatory mechanism that controls constitutively induced IFNs, which may provide a novel prophylactic target for viral control and suppression of carcinogenesis.

研究分野：免疫学、腫瘍学、細胞生物学、神経科学

キーワード：自然免疫 ウイルス インターフェロン シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

これまで研究代表者らは、ウイルス感染に対する感染防御システムの研究を推進し、ウイルス感染時に誘導されるI型およびIII型インターフェロン(IFN: interferon)の発現誘導やその制御機構に関する研究を行ってきた。これまでインフルエンザウイルスなどのRNAウイルス感染において、その侵入を最初に認識する細胞質RNAセンサー分子RIG-I (retinoic acid-inducible gene-I)を、正に制御する因子ZAPSを同定した(Nat Immunol 12:37-44 2011)。またB型肝炎ウイルス感染において、RIG-IはHBV由来のRNAを認識することでIII型IFNを誘導することや、ウイルスポリメラーゼと競合することでウイルス複製を抑制するという直接的な抗ウイルス効果を発揮する、という二つの役割を担った生体防御因子であることを見出した(Immunity 42:123-32, 2015)。さらにトリプトファン代謝産物によって定常的に活性化されたAHR (aryl hydrocarbon receptor)シグナルが、TIPARPの誘導を介してウイルス感染に対するIFN応答を負に制御していることを見出した(Nat Immunol 2016 17:687-94, 2016)。一般的にウイルスに対する免疫応答はウイルス感染後に活性化される自然免疫応答が重要であると考えられているが、こうした研究を続ける中で、感染後に活性化される自然免疫応答の重要性と同時に、非感染状態における細胞の状態が抗ウイルス応答に大きく影響を受けるのではないかと考えるようになった(下図)。実際、ウイルス感染によって大量に産生誘導されるI型IFNは、非感染状態においても非常に微量に産生されていることが知られているが、この構成的に産生されるIFNとそのシグナルは、ウイルス感染後に強力に誘導されるIFN産生に必須であることや、細胞のがん化を抑制するのに寄与していることを報告している(Nat Rev Mol Cell Biol 2:378-86, 2001)。さらに、構成的に産生されるIFNは、血球幹細胞の維持など様々な局面で重要であることが示された(Immunity 36:166-74 2012)。また無菌マウスにおいては構成的なIFN産生が認められないことから共生細菌などの関与が示唆されているが(Immunity 36:166-74 2012)、細胞レベルでの構成的に微量なIFN産生がどのようなメカニズムで発現誘導されるのか、またこの調節機構については不明な点が多い。



2. 研究の目的

ウイルス感染において必須のIFNは、非感染状態においても、非常に微量に産生されていることが知られており、この構成的に産生されるIFNとそのシグナルは、ウイルス感染後に強力に誘導されるIFN産生に寄与することが知られている。従って感染症に対する生体防御は、感染前の状態によって規定されると考えられる。本研究では、本研究では、[1] 構成的なIFNの産生誘導メカニズムとその制御機構について、[2] 非感染時の定常状態における免疫システムを制御するシグナルについての2点を中心に、定常状態の免疫システムがどのように感染後の免疫応答を制御しているかについて解明することを目的とした。

3. 研究の方法

用いた細胞株は、ヒト腎臓細胞株 HEK293T, ヒト肺がん細胞株 A549, ヒト単球性白血病細胞株

THP-1, ヒト正常線維芽細胞 MRC-5 を用いて解析を行った. また Zinc Finger Nuclease や Crispr/Cas9 システム(Science 339:819-23, 2013) による遺伝子改変技術を使用して, 自然免疫シグナルの各種ノックアウト細胞を樹立した. 核酸刺激は, RIG-I の合成 RNA リガンドである 5'-triphosphate RNA (3pRNA) に加え, 内因性 RNA (total RNA や RNA 結合タンパクに結合する RNA) を用いて, Lipofectamine 2000 にて行った. それぞれの細胞から, RNA を抽出し, IFN- β の定量的 RT-PCR を行った. 構成的インターフェロンの定量には, IFN- β のルシフェラーゼアッセイ, ELISA を用いた. また細胞内のシグナル伝達経路の解析には, Western blot 解析, 免疫染色を実施した. 核酸刺激に用いる内因性 RNA の精製は, Total RNA は Isogen を用いた. RNA 結合タンパクに結合する RNA の精製は, RNA 結合タンパクを免疫沈降法により精製し, その pellet を RNA 抽出し精製した(RIP assay). RNA 結合タンパクに結合する RNA の同定は, HITS-CLIP 法 (high-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation)を実施した. また RNA 認識経路を制御する制御因子の同定には免疫沈降法を用いて精製し質量分析解析を行った.

4. 研究成果

構成的な微量な IFN の発現誘導には, RNA センサー分子 RIG-I を正に制御する因子 ZAPS が関与することが予想された(Nat Immunol 12:37-44, 2011)ことから, まずこれを調べた. 各種細胞に siRNA を用いた ZAPS のノックダウンを行い, 構成的に発現誘導される IFN- β mRNA を定量的 RT-PCR で測定した. その結果, HEK293T 細胞, A549 細胞, THP-1 細胞において ZAPS ノックダウンにより IFN- β mRNA が有意に低下した. またヒト正常線維芽細胞である MRC-5 を用いても同様の傾向を認めた. さらに, HEK293T の ZAPS KO 細胞株においても, KO 細胞では構成的に発現誘導される IFN- β mRNA が低かったことから, ZAPS が構成的な IFN- β の発現に関与していることが考えられた.

次に, 構成的に発現誘導される IFN- β は, 細胞内 RNA 認識経路である RIG-I シグナル経路を介するのかを, IFN- β のルシフェラーゼアッセイにより検証した. その結果, それぞれのシグナル伝達因子のノックダウンにより IFN- β の promoter 活性が減少することが明らかになった. また, RIG-I, ZAPS, MAVS, TBK1 の過剰発現により IFN- β の promoter 活性が上昇した. さらに, CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子改変技術を用いて RIG-I シグナル経路の各種ノックアウト細胞を樹立して, 構成的な IFN- β の発現を調べたところ, 低下していることが見出した. これらの結果から, 構成的に発現誘導される IFN- β は RIG-I を介する RNA 認識経路が関与することが示唆された.

ウイルス感染においては, RIG-I は, ウイルス由来の RNA と結合し, IFN を発現誘導することが知られている. そこで我々は, RIG-I の RNA 結合が構成的な IFN- β の発現誘導に関与しているかどうかについて検証した. RIG-I の RNA 結合能は C 末端側が重要であり, 下流のシグナル伝達には N 末端側が重要であることが知られている. そこで, C 末端側のみを過剰発現させて構成的な IFN- β の promoter 活性を測定したところ, C 末端側のみを過剰発現によって抑制された. また C 末端側の一部の領域ではこの抑制は認められなかった. さらに RNA 結合領域の変異体では, 構成的な IFN- β の promoter 活性の抑制が軽度であった. 一方で, total RNA を用いた pull down assay によって, RIG-I の過剰発現タンパクやリコンビナントタンパクが total RNA と結合したことから, RIG-I に結合する endogenous RNA が構成的な IFN- β の発現誘導に関与するのではないかと考えた. さらにこの仮説を検証するために, 我々は RIP assay を用いて RIG-I に結合する RNA の精製を行

い、この精製した RNA (RIG-I 結合 RNA) を用いて細胞を刺激し IFN- β の発現誘導が亢進するかを調べた。その結果 RIG-I をごく微量に過剰発現させた HEK293T 細胞を用いて、RIG-I 結合 RNA で刺激すると IFN- β の promoter 活性の上昇が認められた。さらに RNase 処理した RIG-I 結合 RNA を用いて刺激したところ、IFN- β promoter 活性の上昇は認められなかった。一方で total RNA を用いて刺激しても IFN- β の promoter 活性の顕著な上昇が認められなかったことから、RIG-I に結合する endogenous RNA が構成的な IFN- β の発現誘導に重要であることが示唆された。

そこで、我々は HITS-CLIP assay によって RIG-I に結合する endogenous RNA を探索した。その結果 1,966 遺伝子が候補 RNA として同定された。候補 RNA から、RNA の結合力が高いと考えられた RPKM 値のスコアが高いものから順に焦点をあて、構成的な IFN 産生に関与する内因性 RNA について解析を行った。また一方で得られた配列の相同性や二次構造予測を行い、内因性 RNA の共通性について調べた。これらの解析から、一部の ncRNA や mRNA を過剰発現すると構成的な IFN- β の発現が誘導されたことから、これらの詳細について解析を続けている (投稿準備中)。

並行して RIG-I を介するシグナルが構成的な IFN の発現誘導に関与することが示唆されることから、我々は RIG-I の活性を制御する因子の探索を行った。RIG-I シグナル経路では CARD ドメイン (caspase activation and recruitment domain) が重要な役割を担っていることから、我々は CARD ドメインを持つタンパク質がこのシグナルを制御しているのではないかと考え、BinCARD isoform2 (BinCARD2) に着目した。BinCARD2 をノックダウンすると RIG-I を介する自然免疫応答が抑制された。さらに BinCARD2 は RIG-I 下流のアダプター分子である MAVS と結合すること、RIG-I と MAVS の結合には関与しないこと、MAVS のオリゴマー化に関与することが免疫沈降法の実験から明らかになった。また水疱性口内炎ウイルス感染によって誘導される IFN- β や IL-6 の発現が BinCARD2 をノックダウンによって低下することが明らかになった。従って、BinCARD2 は MAVS と結合しオリゴマー化を促進することで自然免疫系に関与することが示した (Biochem Biophys Res Commun 511:287-93, 2019)。BinCARD2 のノックダウンで転写因子 IRF や NF- κ B のレポーター活性が低下することから、構成的な IFN の発現誘導にも関与することが示唆された。

また我々は各種細胞の RIG-I シグナルを調べるなかで、IFN の発現誘導に必須のある転写因子の発現が低いことがわかり、その転写因子の promoter 領域を調べたところ、DNA メチル化されていることを見出しており、この DNA メチル化による自然免疫応答の低下に関する詳細な解析を行った (投稿準備中)。

一方で、細胞内 RNA や DNA 認識経路におけるアダプター分子として知られている STING は、核酸を介した自然免疫応答に重要な役割であるが、STING の安定化の制御メカニズムは十分には解明されていない。そこで我々は、STING と相互作用する新規タンパク質を探索し、シャペロンタンパク質である Hsp90 を同定した。Hsp90 阻害剤 17-AAG で処理や、Hsp90 β をノックダウンすると、STING がタンパクレベルで減少し、cyclic GMP-AMP 刺激によって誘導される IFN 応答が抑制された。さらに HSV-1 および *Listeria monocytogenes* を用いたウイルスや細菌感染によって誘導される自然免疫応答が抑制されることを見出した (Cell Immunol 356:104188 2020)。

本研究によって、非感染時の定常状態における細胞の免疫システムの制御機構と、感染後の免疫応答について新たな知見が明らかになった。SARS-CoV-2 が世界中で猛威を振るう現在、このような免疫システムの制御機構を応用することで、元々体に備わっている免疫機能をうまく引き出し効果的に感染予防するという新たなアプローチの創出につなげたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Suzuki Hiraku, Kameyama Takeshi, Takaoka Akinori	4. 巻 511
2. 論文標題 BinCARD2 as a positive regulator of interferon response in innate immunity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 287 ~ 293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.02.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Akinori Takaoka, Taisho Yamada	4. 巻 31
2. 論文標題 Regulation of signaling mediated by nucleic acid sensors for innate interferon-mediated responses during viral infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 477 ~ 488
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Seiichi, Li Kai, Sakurai Nozomi, Hashizume Mei, Baidya Sunanda, Nonaka Hirofumi, Noguchi Koki, Ishikawa Kozo, Obuse Chikashi, Takaoka Akinori	4. 巻 356
2. 論文標題 Regulation of an adaptor protein STING by Hsp90 to enhance innate immune responses against microbial infections	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular Immunology	6. 最初と最後の頁 104188 ~ 104188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellimm.2020.104188	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 郷 俊寛、亀山 武志、高岡 晃教
2. 発表標題 癌細胞におけるIL-32の直接的な作用の検討
3. 学会等名 第22回日本がん免疫学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高岡 晃教 (Takaoka Akinori) (30323611)	北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授 (10101)	
研究分担者	山田 大翔 (Yamada Taisho) (10779333)	北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教 (10101)	
研究分担者	佐藤 精一 (Sato Seiichi) (60459724)	北海道大学・遺伝子病制御研究所・講師 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------