

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08406

研究課題名(和文) 炎症・自己免疫疾患の発症・増悪を惹起する内在性RNA複合体の解析

研究課題名(英文) Analysis of endogenous RNA related to autoimmune diseases

研究代表者

根岸 英雄 (Negishi, Hideo)

東京大学・医科学研究所・特任講師

研究者番号：60514297

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)：免疫応答の活性化作用を有する内在性のRNAについて解析を行い、RNAを中心とした内在性の核酸の放出、放出された核酸への応答、それらを引き起こす物質について多くの知見が得られ、さらに、それらの重要性を示唆する知見が疾患モデルマウスやヒトサンプルから得られた。また、一連の研究を通して、細胞外に放出された核酸を解析する解析系の構築が推進された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症・免疫応答を活性化する内在性RNAは、今までに多様な疾患との関わりが示唆されており(SLE、RA、強皮症、乾癬、すい臓がん、糖尿病など)、疾患の増悪・発症の原因になり得る重要な因子だと考えられるが、その実態には不明な点が多く残されている。本研究によって内在性核酸の放出、核酸への応答、それらを引き起こす物質について得られた多くの知見やそれらの解析系は、関連する様々な疾患の病態解明や創薬に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：We analyzed endogenous RNAs that have activating effects on immune responses, and obtained many findings on the release of endogenous nucleic acids, responses to released nucleic acids, and substances that cause these responses, as well as findings suggesting their importance in disease model mice and human samples. Through a series of studies, the construction of an analytical system to analyze extracellularly released nucleic acids was promoted.

研究分野：免疫学

キーワード：RNA 核酸 DNA DAMPs 自己免疫

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

様々な内因性及び外因性の分子が、主に抗原提示細胞に発現する Toll 様受容体(TLR)をはじめとしたパターン認識受容体(pattern recognition receptors; PRRs)によって認識されることで、炎症・免疫応答が惹起される。この応答は生体防御に必須のイベントであるが、近年、疾患の発症や増悪とも関連することが解明されつつある。すなわち、自己細胞中には PRR リガンドとなつて、不利益な炎症・免疫応答を引き起こす danger-associated molecular patterns (DAMPs) が含まれており、様々な疾患との関連が注目されている。

DAMPs の中でも特に強力な炎症誘導能を持つのが核酸であり、それらの主な受容体である TLR9(DNA 受容体)及び TLR7(一本鎖 RNA 受容体)が非常に広範な疾患の発症・増悪に関与することが報告されている。特に内在性 DNA の知見が蓄積されており、NETosis、Necrosis 等の細胞死に伴いミトコンドリア DNA やゲノム DNA が放出され、抗菌ペプチド、抗核抗体等と複合体を形成することで、炎症誘導能を発揮すると考えられている。一方で、内在性 RNA についても、多種多様な疾患との関わりが報告されており(SLE、RA、強皮症、乾癬、すい臓がん、糖尿病など)、DNA と同じかそれ以上に重要な疾患の増悪・原因因子と考えられるが、DNA と比較してその解析は進んでいない。

このような中、私は PRRs 応答に関する基礎研究を推進するとともに、その知見を生かしたスクリーニング系において、核酸に対する PRR 応答を制御する薬剤のスクリーニングを推進した結果、関節リウマチ(RA)、全身性エリトマトーデス(SLE)、急性肝炎等のマウスモデルで抑制効果を示す化合物群の単離に成功した。興味深いことに特に薬効の強い化合物 KN69 が一本鎖 RNA に結合する作用を有しており、その TLR7 活性化能を阻害することが判明した。そこで内在性の標的 RNA を探索したところ、強い炎症誘導能を持つ U11snRNA を同定した。

さらに U11snRNA の放出機構の解析を進めたところ、いくつかの予備的な知見が得られた。それらの予備的な知見から、ある種の細胞群から TLR7 刺激活性を有する核酸が放出されること、そこには U11snRNA だけでなく、さらなる炎症性 RNA が含まれることが示唆された。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、炎症性 RNA の実態と放出機構、及び生理的重要性を解明することで、広範な疾患の発症・増悪に関わる原因因子の特定および分子機構を解明することである。

### 3. 研究の方法

#### (3)-1. 炎症性 RNA 複合体を放出する細胞群とその分子機構の解析

ある種の細胞群から炎症性 RNA が放出されることを示唆する予備的知見が得られている。そのため、どのような細胞から、どのような刺激で RNA の放出が引き起こされるかについて、可視化も含めていくつかの手法で詳細に解析するとともに、放出の分子機構の解析を行う。

#### (3)-2. 細胞外に放出される炎症性 RNA 複合体の実態解明

一本鎖 RNA は単独では安定性が低く、炎症誘導能がないことが知られており、実験的には Dotap 等の細胞内導入試薬を用いて、その炎症誘導能を解析するのが一般的である。生理的には抗核抗体、抗菌ペプチド等がこの役割を担っていると考えられ、実際、U11snRNA も LL37 等と複合体を作らない限り、炎症誘導能を発揮しない。そのため、細胞から放出される炎症性 RNA 群も蛋白と複合体を作って TLR7 刺激活性を示すと考えられる。このような炎症性 RNA/蛋白複合体の実態を解明するため、RNA および結合蛋白の同定と解析を行う。炎症性 RNA 複合体を回収し、その内容の解析結果や、過去の報告も含め、関与が疑われる分子の解析を行う。

#### (3)-3. 炎症性 RNA によって活性化される炎症・免疫応答の解析と疾患との関わり

炎症性 RNA は TLR7 に認識されると考えられるが、高次構造や結合蛋白によっては、二本鎖 RNA 受容体や細胞質内 RNA 受容体、さらに蛋白の受容体経路を活性化する可能性がある。細胞種によって発現する受容体も異なるため、炎症性 RNA 複合体の種類によって応答細胞とその機構は様々であると予想される。そのようなことを加味しつつ、RNA 複合体が炎症・免疫応答を惹起する機構の解析を行う。同時にマウスやヒトサンプルを用いて生理的重要性の解析を進める。

### 4. 研究成果

免疫応答の活性化作用を有する内在性の RNA 複合体について解析を行い、好中球等にある種のストレス刺激を行うと TLR7 刺激活性を持った RNA の放出が起こることを示唆する結果が得られた。さらにその機構について詳細を解析し、これまでに DNA 放出に関わるとされる機構と類似の経路の関与を示唆する結果を得た。また、RNA 複合体には、いくつかの snRNA が相対的に多く含まれることが判明し、さらにヒトサンプルの解析から、その中で関節リウマチ及び SLE 患者

血清中で増加し、疾患との関連が示唆される RNA は先行研究で同定した U11snRNA のみであることが判明し、U11snRNA の重要性がより明確になった。さらに RNA 放出の解析の中で、核酸を介して I 型 IFN の誘導を引き起こす化合物の同定に成功した。さらにこれらの化合物を含めて解析を推進したところ、RNA だけでなく DNA も含めた核酸の放出とその機構、それらへの応答機構について多くの知見を得ることができた。また、RNA の TLR7 刺激活性に関わるタンパクについて解析したところ、リコンビナントタンパクを用いた検討では、LL37 以外にもいくつかの抗菌ペプチドの関与が示唆されたが、過去の報告と我々の検討結果から、RNA とともに放出される分子の中には、抗菌ペプチドが含まれないことが示唆された。そこで、RNA の TLR7 刺激活性に与える分子の検討をさらに推進したが、検討した分子については RNA の TLR7 刺激活性に関与しないことを示唆する結果が得られた。このような結果から、放出される RNA 複合体自体をより高度に分類、分画し、それらを精製して解析する手法が必要と示唆されたため、RNA 複合体を解析、分離する方法の構築を進めた。その結果、RNA 陽性/DNA 陰性の未知の RNA 分画が放出されることがいくつかの異なる手法で確認できた。さらにこの RNA 陽性分画の解析を進めたところ、疾患モデルマウス由来の体液中にも同様の分画が含まれることを示唆する予備的な知見を得た。

本研究によって RNA を中心とした内在性の核酸の放出、核酸への応答、それらを引き起こす物質について多くの知見が得られ、それらの重要性を示唆する知見が疾患モデルマウスやヒトサンプルから得られた。さらに、核酸の解析系の構築が推進された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Negishi Hideo, Endo Nobuyasu et al.	4. 巻 116
2. 論文標題 Identification of U11snRNA as an endogenous agonist of TLR7-mediated immune pathogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 23653 ~ 23661
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1915326116	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11件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 根岸英雄
2. 発表標題 核酸に対するハターン認識受容体応答の研究と制御法の開発
3. 学会等名 IMG Immunology Seminar（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 根岸英雄
2. 発表標題 自己免疫疾患に関わる内在性TLR7リガンドの同定とアジュバントへの応用
3. 学会等名 第13回次世代アジュバント研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hideo Negishi, Nobuyasu Endo, Yuki Nakajima, Tatsuaki Nishiyama, Junko Nishio, Takeshi Doi, Tadatsugu Taniguchi
2. 発表標題 Identification of U11snRNA as an endogenous TLR7 ligand related to autoimmune disease
3. 学会等名 第48回本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 根岸 英雄、遠藤 信康、中島 由希、西山 達明、西尾 純子、土肥 武、谷口 維紹
2. 発表標題 内在性RNAによる炎症誘導機構の解明と抑制方法の開発
3. 学会等名 第84回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 根岸 英雄、遠藤 信康、中島 由希、西山 達明、西尾 純子、土肥 武、谷口 維紹
2. 発表標題 炎症誘導性RNAを標的としてマウス疾患モデルで治療効果を示す新規化合物とその内在性標的RNAの解析
3. 学会等名 第83回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 根岸 英雄、遠藤 信康、中島 由希、西山 達明、西尾 純子、土肥 武、谷口 維紹
2. 発表標題 新たな機序で炎症・自己免疫疾患を抑制する薬剤とその標的RNAの解析
3. 学会等名 第4回日本骨免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 根岸英雄、和田雄祐、石井健
2. 発表標題 I型IFN誘導作用を有する低分子化合物の探索と分子機序の解明
3. 学会等名 日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 根岸英雄、和田雄祐、石井健、
2. 発表標題 STING依存的にI型IFNを誘導する低分子化合物の同定と分子機序の解明
3. 学会等名 第25回日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yusuke Wada, Hideo Negishi, Ken Ishii.
2. 発表標題 Low molecular compound-induced anti-ciral response via STING.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林智哉、根岸英雄、小檜山康司、Burcu Temizoz、日置仰、Cevayir Coban、石井健
2. 発表標題 ワクチン効果の新規評価方を旨とした高解像度フローサイトメトリーによる細胞外微粒子解析の構築
3. 学会等名 第25回日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoya Hayashi, Hideo Negishi, Kouji Kobiyama, Burcu Temizoz, Kou Hioki, Cevayir Coban, Ken Ishii.
2. 発表標題 Multi-parametric analysis of extracellular particles during viral infection by high resolution flow cytometry.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 根岸 英雄, 和田 雄佑, 石井 健	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Geriatric Medicine(老年医学)	5. 総ページ数 141-145
3. 書名 ワクチンの新しいモダリティー	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------