

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03451

研究課題名(和文) 自己免疫/自己炎症性疾患における内在性レトロトランスポゾン活性化の意義の解明

研究課題名(英文) Elucidating the significance of amplified expression of endogenous retrotransposon in autoimmune/autoinflammatory diseases

研究代表者

柴田 琢磨 (Shibata, Takuma)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：30554505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：エンドリソソームに分布するTLR7はウイルス由来一本鎖RNA(ssRNA)を認識し、抗ウイルス応答を誘導する。一方、TLR7の過剰活性化は自己免疫疾患や自己炎症性疾患の発症にも関与する。しかし、感染と関連がないこれら病態においてTLR7が過剰活性化する理由は全く不明である。本研究において、内在性レトロトランスポゾンの発現量上昇はTLR7応答を亢進させることが判明した。この事実は、生体内におけるレトロトランスポゾンの発現が自己炎症性疾患や自己免疫疾患といった病態の発症に関わる可能性を強く示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物モデルを用いた研究から、TLR7は自己免疫疾患や自己炎症性疾患の原因となることが示されており、ヒトにおいてもTLR7変異を有するSLE患者が最近報告されている。しかし、生体内においてTLR7の過剰応答が誘導される理由は未だ不明なままである。本研究では、レトロトランスポゾンの発現上昇によりTLR7が過剰活性化することが示された。この事実は、レトロトランスポゾンの発現制御がヒト疾患の制御につながる可能性を示しており、新たな治療法の確立が期待される。

研究成果の概要(英文)：Endolysosomal TLR7 recognises virus-derived single-stranded RNAs (ssRNAs) and induces antiviral responses. On the other hand, TLR7 hyperactivation plays an important role in the development of autoimmune and autoinflammatory diseases in vivo. However, the reason why TLR7 is activated in these pathologies, which are not associated with infection, is largely unknown. In this study, we found that TLR7 can be activated by elevated endogenous retrotransposon expression. Our findings strongly suggest that retrotransposon expression in vivo is important for the onset of autoinflammatory and autoimmune diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：TLR7 トランスポゾン 自己炎症性疾患 自己免疫疾患 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

Toll Like Receptor (TLR)ファミリーは病原体センサーの一つであり、ウイルス由来の一本鎖 RNA (ssRNA)により活性化する TLR7 はウイルス感染時の生体防御において重要である。この免疫賦活化作用の一方で、TLR7 の過剰活性化は様々なヒト疾患の発症に関与する可能性が知られている。

TLR7 応答が増強される TLR7 Tg マウスや Yaa 変異遺伝子を保有する BXSB 雄マウス (Yaa マウス)では、致死的な全身性エリテマトーデス(Systemic Lupus Erythematosus, SLE)様糸球体腎炎を自然発症する。また、他の SLE モデルである MRL/lpr マウスでも、TLR7 欠損により抗 U1-snRNP (ssRNA とタンパク質の複合体)自己抗体の産生量が低下することで病態が緩和される。加えて、TLR7 応答が上昇する Unc93B1 の D34A 変異体ノックインマウスでは全身性に炎症が引き起こされる。(Marshak-Rothstein et al., *Annu Rev Immunol*, 2007、Deane et al., *Immunity*, 2007、Fukui et al., *Immunity*, 2011)。これらの報告は自己免疫疾患や自己炎症性疾患における TLR7 の重要性を強く示唆しており、ヒトの SLE 患者においても応答性を亢進させる TLR7 変異体が最近報告されている (Brown et al., *Nature*, 2022)。しかし、これら病態の発症にウイルス感染は関与しておらず、非感染性に生体内で TLR7 が活性化される理由は全く解っていない。

2. 研究の目的

我々は、TLR7 が ssRNA そのものではなく、ssRNA 分解産物であるオリゴリボヌクレオチド(ORN)とグアノシン (G) の両者を認識することを発見した。また、G や dG を過剰蓄積した SLC29A3 欠損マウスでは自己炎症性疾患が引き起こわれることを見出した。しかし、TLR7 を過剰活性化させるには G/dG の蓄積だけでは不十分であり、感染以外の ORN 供給源があると考えられる。本研究では、TLR7 を活性化する ORN の原因となり得る内在性レトロトランスポゾンに着目し、レトロトランスポゾンの発現変化が TLR7 の活性化を誘導し得るのかを検証する。

3. 研究の方法

これまでの知見から正常細胞においてレトロトランスポゾンの発現を上昇させても明確な免疫応答の誘導は引き起こされない。我々は ORN に対する TLR7 応答を亢進させた状態にしないとレトロトランスポゾンによる TLR7 応答は検出できないと考えた。そこで TLR7 の分布するエンドリソソームにヌクレオチドが過剰に蓄積する SLC29A3 欠損細胞を用いることでレトロトランスポゾンに対する TLR7 応答の検討を行うこととした。具体的には、以下の研究項目を行った。

- ① レトロトランスポゾンが TLR7 を活性化することの証明
- ② TLR7 を活性化するレトロトランスポゾンの種類の検証
- ③ 自己免疫/自己炎症性疾患におけるレトロトランスポゾンの意義の検証

4. 研究成果

本研究の結果、TLR7 リガンドである G や dG を過剰に蓄積する SLC29A3 欠損マクロファージにおいて、内在性レトロトランスポゾンの発現量が上昇させることにより、TLR7 依存的にサイトカインが産生されることが判明した。これらマクロファージでは内在性レトロトランスポゾンの一種の発現が特異的に上昇しており、一部の内在性レトロトランスポゾンの発現上昇が TLR7 活性化の原因となり得ると考えられた。また、内在性レトロトランスポゾンによる TLR7 の活性化にはリソソーム内に分布するヌクレアーゼ X が必須であることも見出されている。SLC29A3 欠損マウスでは TLR7 依存的にマクロファージの増殖などが引き起こされるが、ヌクレアーゼ X 欠損マウスでは G や dG の蓄積が起こっているにも関わらず TLR7 依存的な症状はほとんど引き起こされなかった。この事実は、レトロトランスポゾンによる TLR7 の活性化にはヌクレアーゼによるレトロトランスポゾンゲノムの分解が必要不可欠であることを強く示唆している。以下、予定していた研究内容の達成度の詳細を記載する。

- ① レトロトランスポゾンが TLR7 を活性化することの証明
G や dG などのヌクレオチドをエンドリソソームに過剰に蓄積する SLC29A3 欠損 J774 細胞においてレトロトランスポゾンの発現を亢進させる試薬で処理したところ、TLR7 依存的

なサイトカイン産生が誘導された。また、レトロトランスポゾンの発現を抑制することが知られる分子群を SLC29A3 欠損 J774 細胞において更に欠損させた際にも、TLR7 を介したサイトカイン産生が誘導された。この結果より、TLR7 が分布するエンドリソソーム内にヌクレオシドが蓄積した状態で細胞内におけるレトロトランスポゾンの発現量が上昇することで TLR7 の活性化が誘導される可能性が強く示唆された。

② TLR7 を活性化するレトロトランスポゾンの種類の検証

内在性レトロトランスポゾンはレトロウイルス、LINE、SINE の 3 種類に大きく分類することができる。本研究では、レトロトランスポゾンによる TLR7 の恒常的活性化が引き起こされた SLC29A3 欠損細胞においてどのタイプのレトロトランスポゾンが発現上昇するのかを網羅的に検証した。その結果、どちらの細胞においても一部のレトロトランスポゾンの発現量が特異的に上昇することが見出され、一部の内在性レトロトランスポゾンの発現上昇が TLR7 活性化の原因となると考えられた。現在、更に SLC29A3 欠損マウスの体内において TLR7 依存的に増殖する脾臓マクロファージにおいてどのタイプのレトロトランスポゾンの発現が上昇するのかを検証中である。

③ 自己免疫/自己炎症性疾患におけるレトロトランスポゾンの意義の検証

構造生物学的解析の結果より、TLR7 をヌクレオシドと一緒に活性化する ORN は非常に短い配列であることが示唆されていた。そこでエンドリソソーム内に存在する種々のヌクレアーゼが内在性レトロトランスポゾンによる TLR7 の活性化に与える影響の検証を行った。その結果、リソソーム内のヌクレアーゼ X が TLR7 のレトロトランスポゾンに対する応答に必須である可能性が見出された。そこで SLC29A3 欠損マウスにおいて更にヌクレアーゼ X を欠損させたところ、TLR7 依存的に引き起こされるマクロファージの増殖などの症状がほとんど引き起こされなくなった。同知見は、レトロトランスポゾンによる TLR7 の活性化にヌクレアーゼによるレトロトランスポゾンゲノムの分解が必要不可欠であることを示唆しており、現在ヌクレアーゼ X のファミリー分子についても検証を続けている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5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 Ryota Sato, Tatjana Reuter, Ryosuke Hiranuma, Takuma Shibata, Ryutaro Fukui, Yuji Motoi, Yusuke Murakami, Hiroki Tsukamoto, Satoshi Yamazaki, Kaiwen Liu, Shin-Ichiroh Saitoh, Eicke Latz, Kensuke Miyake	4. 巻 32
2. 論文標題 The impact of cell maturation and tissue microenvironments on the expression of endosomal Toll-like receptors in monocytes and macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 785-798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxaa055	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 Shingo Tojo, Zhikuan Zhang, Hiroyuki Matsui, Masahiro Tahara, Mitsunori Ikeguchi, Mami Kochi, Mami Kamada, Hideki Shigematsu, Akihisa Tsutsumi, Naruhiko Adachi, Takuma Shibata, Masaki Yamamoto, Masahide Kikkawa, Toshiya Senda, Yoshiaki Isobe, Umeharu Ohto, Toshiyuki Shimizu	4. 巻 11
2. 論文標題 Structural analysis reveals TLR7 dynamics underlying antagonism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-19025-z	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 Shibata Takuma, Taoka Masato, Miyake Kensuke et al.	4. 巻 December 16
2. 論文標題 Nucleosides drive histiocytosis in SLC29A3 disorders by activating TLR7	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 1-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2019.12.16.877357	査読の有無 無
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 Ishiguro Noriko, Moriyama Masafumi, Furusho Katsuhiko, Furukawa Sachiko, Shibata Takuma, Nakamura Seiji et al.	4. 巻 72
2. 論文標題 Activated M2 Macrophages Contribute to the Pathogenesis of IgG4 Related Disease via Toll like Receptor 7/Interleukin 33 Signaling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arthritis & Rheumatology	6. 最初と最後の頁 166 ~ 178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.41052	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 Miyake Kensuke, Saitoh Shin-ichiroh, Sato Ryota, Shibata Takuma, Fukui Ryutaro, Murakami Yusuke	4. 巻 106
2. 論文標題 Endolysosomal compartments as platforms for orchestrating innate immune and metabolic sensors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Leukocyte Biology	6. 最初と最後の頁 853 ~ 862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/JLB.MR0119-020R	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 Liu Kaiwen, Sato Ryota, Shibata Takuma, Hiranuma Ryosuke, Reuter Tatjana, Fukui Ryutaro, Zhang Yun, Ichinohe Takeshi, Ozawa Manabu, Yoshida Nobuaki, Latz Eicke, Miyake Kensuke	4. 巻 33
2. 論文標題 Skewed endosomal RNA responses from TLR7 to TLR3 in RNase T2-deficient macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 479 ~ 490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab033	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 Miyake Kensuke, Saitoh Shin-ichiroh, Fukui Ryutaro, Shibata Takuma, Sato Ryota, Murakami Yusuke	4. 巻 33
2. 論文標題 Dynamic control of nucleic-acid-sensing Toll-like receptors by the endosomal compartment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 835 ~ 840
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab037	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 柴田 琢磨
2. 発表標題 SLC29A3異常症における発症メカニズムの解明
3. 学会等名 第43回日本小児皮膚科学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田 琢磨
2. 発表標題 Nucleosides drive histiocytosis in SLC29A3 disorders by activating TLR7
3. 学会等名 第50回日本免疫学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学医科学研究所・感染遺伝学分野 https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/kanseniden/</p>
--

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	山口 貴世志 (Yamaguchi Kiyoshi) (50466843)	東京大学・医科学研究所・講師 (12601)	
研究分担者	竹本 経緯子 (Takemoto Keiko) (90243104)	京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教 (14301)	

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