

機関番号：22701

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2010

課題番号：20200074

研究課題名（和文） ウイルス由来 B-DNA 認識機構の解明と免疫調節薬への応用

研究課題名（英文） Development immunomodulative drug based on the recognition mechanism of viral B-DNA.

研究代表者

武下 文彦 (TAKESHITA FUMIHIKO)

横浜市立大学・医学研究科・客員教授

研究者番号：60333572

研究成果の概要（和文）：

クロモソーム外に存在するコアヒストン H2B が細胞内に存在する異常な 2 本鎖 DNA を認識し、抗ウイルス自然免疫応答に関与することを見いだした。本研究では、そのシグナル伝達に重要なアダプター分子 IPS-1 とヒストン H2B の融合分子 (N'-CARD) が nuclear DNA helicase II を直接活性化し、I 型インターフェロン産生を誘導することを新たに明らかにした。また、protein transduction domain を付加した細胞透過性ポリペプチド、N'-CARD-PTD を用いることで新規アジュバントとして応用可能であることを実証した。

研究成果の概要（英文）：

Previous our data have discovered the novel H2B function to recognize non-chromosomal double stranded DNA (dsDNA), and induce antiviral innate immune response. In current research, we constructed the fusion protein, named as N'-CARD, by fusion of IPS-1 fragment with H2B fragment, and found that N'-CARD induced type I interferons (Type I IFNs) production. In addition, nuclear DNA helicase II was identified as N'-CARD associated molecules, and was indispensable for N'-CARD-mediated innate immune response. Furthermore, N'-CARD fused to protein transduction domain (N'-CARD-PTD) is a candidate of novel adjuvant. Therefore, current research revealed H2B-sensing machinery of cytoplasmic dsDNA as well as novel adjuvant candidate for vaccine development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2009年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2010年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
年度			
年度			
総計	25,100,000	7,530,000	32,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学

キーワード：感染防御・分子・基礎医学

1. 研究開始当初の背景

これまでに、H2B による抗ウイルス作用機序を解明するために、I 型インターフェロン (Type I IFNs) 産生経

路における役割を検討してきた。ヒストン H2B をノックダウンした細胞においては、外来 DNA による Type I IFNs 産生誘導が減弱していた。インターフ

エロン遺伝子の発現を調節している転写因子 IRF3、7 を直接活性化するリン酸化酵素 TBK1 や IKKi を過剰発現させた際のプロモーター活性化には影響しなかったことから、TBK1 や IKKi より上流のシグナル階層でヒストン H2B が作用している可能性が示唆された。以上の結果から、ヒストン H2B はクロモゾームの形成における役割だけでなく、外来 DNA を認識するセンサーとしての役割と抗ウイルス自然免疫応答を活性化するシグナルイニシエーターとしての役割を兼ね備えていることが示唆された。我々は、アダプター分子 IPS-1 がヒトの細胞において、外来 DNA による Type I IFNs 産生に関わることを報告している (Nat Immunol 7:40, 2006)。最近 H2B と IPS-1 との融合分子 (N'-CARD) は、非常に強力にインターフェロンを誘導することをあきらかとした。このことから、H2B と IPS-1 の複合体形成が Type I IFNs 産生シグナルに重要であることが想定された。またリコンビナント N'-CARD タンパクに pteoin transduction domain (PTD) を付加し、細胞内へ導入させることに成功した。

2. 研究の目的

本研究課題では、ヒストン H2B を介する naked DNA (ヌクレオソームに取り込まれていないフリーな DNA) 認識機序について分子生物学・生化学的に解析し、このシグナル活性化経路を調節する分子を応用した新規免疫調節薬開発の基盤的研究を行うことを目的とする。特に最近発見した H2B と IPS-1 との融合分子 (N'-CARD) は、非常に強力にインターフェロンを誘導することがあきらかとなっている。このことから、H2B と IPS-1 の複合体形成が Type I IFNs 産生シグナルに重要であることが想定された。またリコンビナント N'-CARD タンパクに pteoin transduction domain (PTD) を付加し、細胞内へ導入させることに成功した。このことによりタンパク製剤として、細胞外からの単独投与で、Toll 様受容体などを介することなく幅広い細胞種においてインターフェロンを誘導させることに成功している。この分子はわれわれが解明しようとしている H2B を介したシグナル経路を活性化していることが想定されることから、相互作用分子の解析を行うツールとして利用すると同時に、インターフェロン誘導剤としてアジュ

バント、抗ウイルス薬、抗がん薬として応用可能か検討していくことも本研究課題の目的とする。

3. 研究の方法

*新規ヒストン H2B 融合シグナル分子 (N'-CARD) の機能解析

前述のように、ヒストン H2B とインターフェロン産生シグナル分子 IPS-1 の融合分子 (N'-CARD) を作製し機能解析したところ、非常に強いインターフェロン誘導作用があることが確認できた (ページ数都合上により割愛)。またこの分子は、核内に移行することが確認でき (ページ数都合上により割愛)、ヒストン H2B と IPS-1 を介する新たなシグナル伝達経路の存在が示唆された。この分子と相互作用する分子をタンデムアフィニティー法により精製、TOF-MS 解析により網羅的に同定する。同定した分子については、siRNA を用いたノックダウン法によりシグナルへの関与を解析する。

*N'-CARD のワクチンアジュバントとしての評価

バキュロウイルスを用いて昆虫細胞にリコンビナント N'-CARD-PTD タンパクを発現させ精製した。N'-CARD-PTD タンパクは、培養系への添加で細胞内へ導入され核まで到達することを確認した。さらに、細胞の IFN-beta プロモーター活性を強く増強させることもあきらかとなった。また、樹状細胞における表面マーカー (MHC ClassI, ClassII, CD86, CD40) の発現を誘導することが FACS で確認された。インフルエンザワクチン抗原として用いたマウスインフルエンザ感染モデルで、N'-CARD-PTD のアジュバント効果を評価する。

*N'-CARD の抗がん薬としての評価

同様に精製した N'-CARD-PTD を用いて、マウス移植がんモデルにおいてのがん退縮効果を評価する。

4. 研究成果

*N'-CARD による細胞活性化機序について

図 1A に示す様々な IPS-1 CARD の融合分子の発現プラスミドを作製し、293 細胞にトランスフェクション後、インターフェロン関連プロモーターの活性化をルシフェラーゼアッセイにて評価した (ページ数都合上により割愛)。その結果、CARD 領域のみを発

現させた場合にはプロモーター活性化が認められなかったが、CARD とヒストン H2B の NLS の融合分子 (N'-CARD) または IPS-1 自身の TMD との融合分子 (CARD-TMD) は著明な活性化が認められた。これら融合分子の細胞内局在を調べると、N'-CARD は核に局在し、野生型 IPS-1 もしくは CARD-TMD はミトコンドリアに局在することがあきらかとなった (ページ数都合上により割愛)。IPS-1 は下流のキナーゼ TBK1 にシグナルを伝え、インターフェロンプロモーターの活性化を誘導することが知られている。N'-CARD が TBK1 と相互作用するか否か、免疫沈降法により解析した。その結果、野生型 IPS-1 もしくは CARD-TMD は TBK1 と相互作用したが、N'-CARD はしなかった (図 1A)。これらの結果から、N'-CARD による細胞活性化機序は、核からはじまることが想定され、IPS-1 とは異なるシグナル経路が示唆されたため、N'-CARD の相互作用分子を tandem affinity purification 法で精製し、TOF-MS にて網羅的に解析した。その結果、核小体に存在する分子などが同定された他、nuclear DNA helicase II (NDH) が同定された (図 1B)。この分子の N'-CARD による細胞活性化における役割を検討するために、siRNA を用いたノックダウン系を確立した。NDH をノックダウンした HeLa 細胞においては、N'-CARD による IFN- β プロモーター活性化が有意に抑制された (図 1C)。また、NDH はユビキチン化された N'-CARD と共沈し、また、TBK1 とともに共沈することがあきらかとなった。共焦点顕微鏡を用いた解析から、NDH は細胞質内で TBK1 と相互作用してインターフェロンの産生に関与していることが示唆された (データは示していない)。これらの結果から、N'-CARD は、IPS-1 とは異なるシグナル経路を介してインターフェロンの産生を誘導していることがあきらかとなった。

*N'-CARD-PTD ポリペプチドの自然免疫活性化機序について

上記のように、独自のシグナル経路を活性化する N'-CARD を細胞活性化ポリペプチドとして応用可能か検討するため、C 末端に PTD を融合した N'-CARD-PTD ポリペプチドを調製した。この分子を細胞培養系に添加すると、30 分以内に細胞核に侵入し (図 2A)、マクロファージ細胞株 RAW264.7 を活性化して IFN- α や IFN- β の産生を誘導

することがあきらかとなった (図 2B)。LPS とは異なり、MAP キナーゼの活性化は微弱であった (図 2B)。また、GM-DC と FL-DC の両者を活性化し、インターフェロンの産生を誘導し (図 2C)、細胞表面マーカー (MHC class I, II, CD40, CD86) の発現を増強した (図 2D)。この細胞活性化は、*Myd88*^{-/-}, *Trif*^{-/-} GM-DC でも認められたことから、TLR を介したシグナルは N'-CARD-PTD ポリペプチドのシグナルに必須でないことがあきらかとなった (図 2E)。

*N'-CARD-PTD ポリペプチドのアジュバント作用について

アジュバント効果について検討するため、マウスインフルエンザ感染モデル、腫瘍移植モデルを用いた。BALB/c マウスにインフルエンザワクチン (Flu vax) 単独投与した場合に比べ、Flu vax と N'-CARD-PTD ポリペプチドを同時投与した際には、有意に高い抗原特異的 IgG2a 抗体価が誘導された (図 3A)。このことから、N'-CARD-PTD ポリペプチドは Th1 有意の免疫応答にシフトさせる調節作用があることが示唆された。また、免疫後のインフルエンザのチャレンジでは、Flu vax 単独と比べて、高い生存率が認められ、インフルエンザワクチンの抗原性を増強させ、防御的免疫応答を誘導することがあきらかとなった (図 3B, 3C)。マウスに HPV の E7 抗原ペプチドを投与した際の E7 抗原特異的細胞性免疫応答の検討では、ペプチド単独にくらべて、N'-CARD-PTD ポリペプチド併用群において有意に、免疫マウスの脾臓細胞における IFN- γ 産生の増強が認められた (図 4A)。マウスに E7 抗原発現腫瘍を移植し、腫瘍の退縮効果を検討した際も、N'-CARD-PTD ポリペプチドの併用で強い腫瘍退縮効果が認められた (図 4B)。このことから、N'-CARD-PTD ポリペプチドはワクチンアジュバントとして作用し、Th1 有意の特異的液性および細胞性免疫応答を増強し、感染症および腫瘍に対する生体防御を増強でき得ることがあきらかとなった。

<結論>

われわれの研究により、自然免疫シグナル分子の変異体を用いることで、NDH を介した新規シグナル経路があきらかとなり、この分子を細胞透過性ポリペプチドとして応用することで、ワクチンアジュバントとして作用する

ことがあきらかとなった。

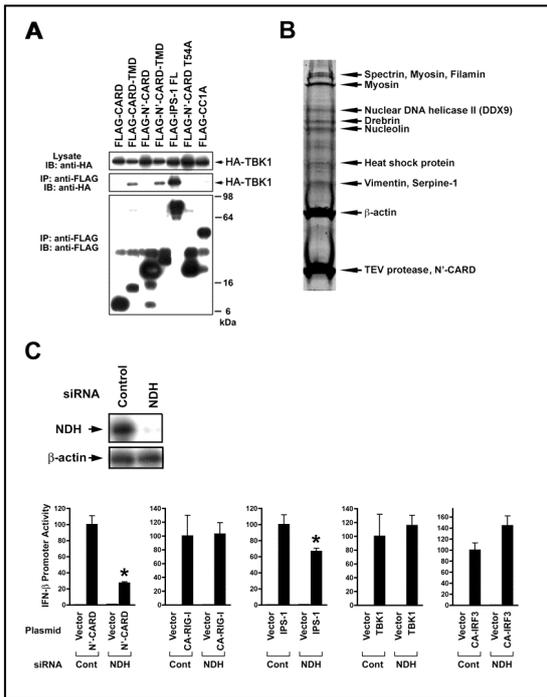


図 1

A) 293 細胞に CARD 変異体 (FLAG タグ) 発現プラスミドと TBK1 (HA タグ) 発現プラスミドをトランスフェクションし、48 時間後に細胞を溶解後抗 FLAG 抗体で免疫沈降し、抗 HA もしくは抗 FLAG 抗体でウエスタンブロッティングにより解析した。B) 293 細胞に N^o-CARD-TEV-FLAG 発現プラスミドをトランスフェクションし、48 時間後に細胞を溶解した。抗 FLAG 抗体で免疫沈降後、複合体を SDS-PAGE にて分画した。各 band をゲル内消化し、TOF-MS にて解析した。C) HeLa 細胞にコントロールもしくは NDH に対する siRNA をトランスフェクションし、48 時間後に細胞に発現する NDH タンパクレベルをウエスタンブロッティングにより解析した。同様に、siRNA 処理した細胞に、N^o-CARD, constitutive active (CA)RIG-I, IPS-1, TBK1, または CA-IRF-3 発現プラスミドをトランスフェクションし、IFN-β プロモーター活性をルシフェラーゼアッセイにて解析した。

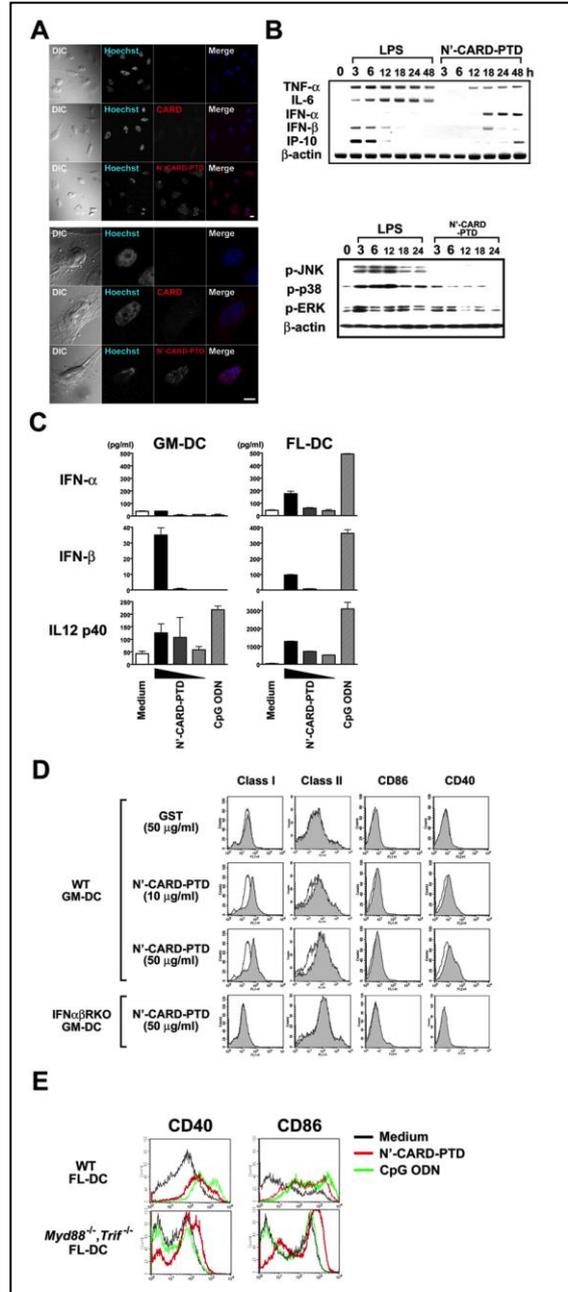


図 2

A) HeLa 細胞培養系に CARD もしくは N^o-CARD-PTD タンパクを添加し、30 分後に Hoechst で核染色および Cy3 標識抗 FLAG 抗体で染色後、PBS で洗浄し、共焦点顕微鏡で解析した。B) マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 に LPS もしくは N^o-CARD-PTD で刺激し、total RNA を回収後 RT-PCR で TNF-α, IL-6, IFN-α, IFN-β, IP-10 の mRNA の発現を解析した。同様に細胞質溶解液を調整し、MAP キナーゼ (JNK, p38, ERK) のリン酸化を解析した。C) B6 マウス骨髄細胞より GM-CSF または Flt3L で樹状細胞 (GM-DC または FL-DC) を誘導した。N^o-CARD-PTD も

しくは CpG ODN で刺激 24 時間後に培養上清中の IFN- α , IFN- β , IL-12 p40 の発現量を ELISA にて定量した。D) 野生型 (WT) もしくは *Ifn α β R*^{-/-} マウスより調製した GM-DC を GST もしくは N' -CARD-PTD で刺激し、48 時間後に MHC class I, class II, CD40, CD86 の細胞表面発現量を FACS で解析した。E) WT もしくは *Myd88*^{-/-}, *Trif*^{-/-} マウスより調製した FL-DC を N' -CARD-PTD もしくは CpG ODN で刺激後 24 時間の CD40 または CD86 の発現を FACS で解析した。

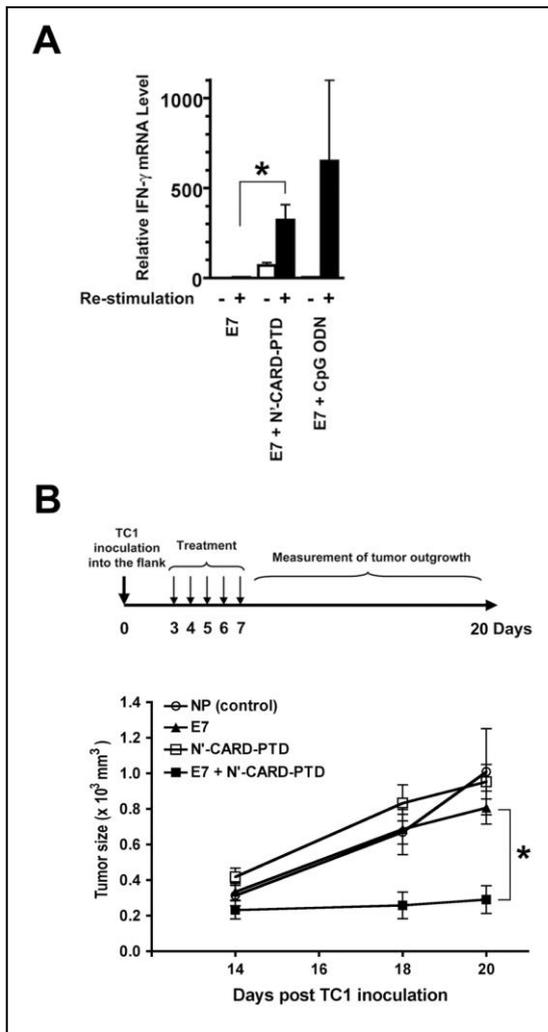


図 3

A-C) BALB/c マウスに PBS, N' -CARD-PTD, CpG ODN, Flu vax, Flu vax + N' -CARD-PTD, Flu vax + CpG ODN を免疫した。A) その 10 日後に採血し、抗原特異的抗体価 (IgG1 または IgG2a) を ELISA で測定した。B-C) その 10 日後に 8 LD₅₀ 量のインフルエンザウイルス A/P/R8 株 (H1N1) を経鼻感染させ、その後の体重の変化 (B)

および生存率 (C) を観察した。*, p < 0.05。

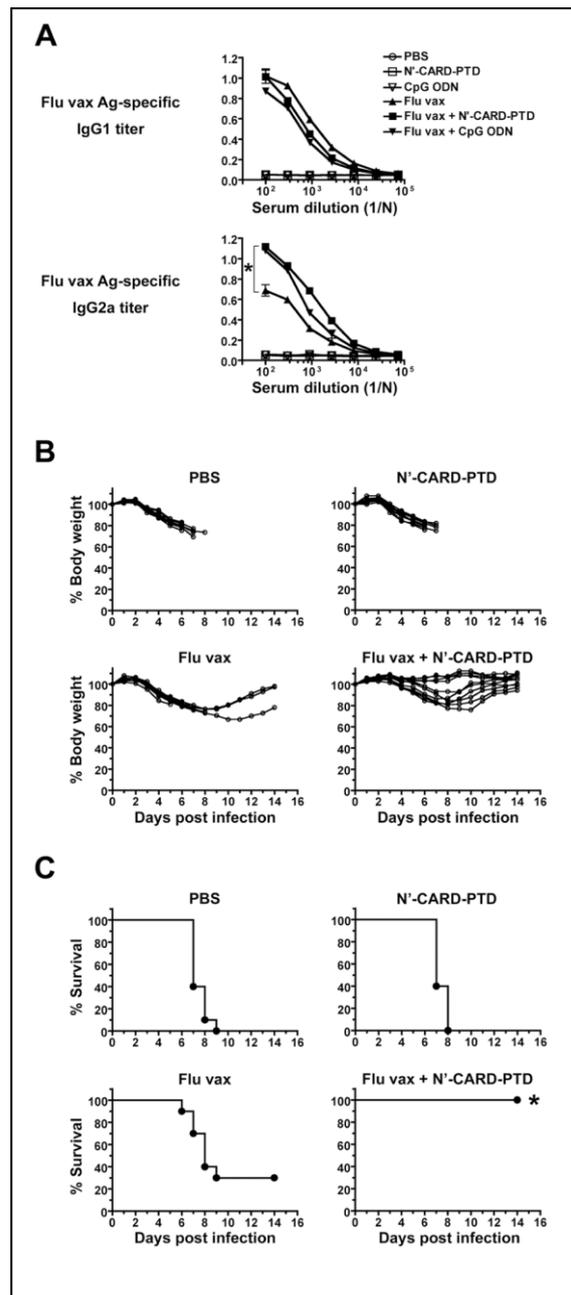


図 4

A) B6 マウスに E7 ペプチド (E7), E7 + N' -CARD-PTD, または E7 + CpG ODN を 2 週間毎に 3 回皮下投与した。最終免疫より 2 週間後に脾臓細胞を調製し、コントロール NP ペプチドもしくは E7 で刺激した。24 時間後に細胞より total RNA を抽出し、リアルタイム PCR により IFN- γ mRNA の相対値を定量した。B) B6 マウスの背部皮下に、マウス肺がん細胞株 TC1 (1 x 10⁵) を移植した。その 3-7 日後に毎日 E7 (3 μ g), N' -CARD-PTD, または E7 + N'

-CARD-PTD を皮下投与した。その後の皮下腫瘍の大きさを測定した。*, p < 0.05。

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 7 件)

1. Kobiyama, K., N. Jounai, K. J. Ishii, T. Horii, K. Suzuki, A. Ryo, and **F. Takeshita**. 2010. Modulation of intracellular signaling using protein-transduction technology. *Crit Rev Immunol* 30:395-421.

2. Coban, C., Y. Igari, M. Yagi, T. Reimer, S. Koyama, T. Aoshi, K. Ohata, T. Tsukui, **F. Takeshita**, K. Sakurai, T. Ikegami, A. Nakagawa, T. Horii, G. Nunez, K. J. Ishii, and S. Akira. 2010. Immunogenicity of whole-parasite vaccines against *Plasmodium falciparum* involves malarial hemozoin and host TLR9. *Cell Host Microbe* 7:50-61.

3. Kobiyama, K., **F. Takeshita**, N. Jounai, A. Sakaue-Sawano, A. Miyawaki, K. J. Ishii, T. Kawai, S. Sasaki, H. Hirano, N. Ishii, K. Okuda, and K. Suzuki. 2010. Extrachromosomal histone H2B mediates innate antiviral immune responses induced by intracellular double-stranded DNA. *J Virol* 84:822-832.

4. Tanooka, H., K. Tatsumi, H. Tsuji, Y. Noda, T. Katsube, H. Ishii, A. Ootsuyama, **F. Takeshita**, and T. Ochiya. 2010. Mutant mouse p53 transgene elevates the chemical induction of tumors that respond to gene silencing with siRNA. *Cancer Gene Ther* 17:1-10.

5. Tanigawa, K., K. Suzuki, H. Kimura, **F. Takeshita**, H. Wu, T. Akama, A. Kawashima, and N. Ishii. 2009. Tryptophan aspartate-containing coat protein (COR01A) suppresses Toll-like receptor signalling in *Mycobacterium leprae* infection. *Clin Exp Immunol* 156:495-501.

6. Kobiyama, K., **F. Takeshita**, K. J. Ishii, S. Koyama, T. Aoshi, S. Akira, A. Sakaue-Sawano, A. Miyawaki, Y. Yamanaka, H. Hirano, K. Suzuki, and K.

Okuda. 2009. A signaling polypeptide derived from an innate immune adaptor molecule can be harnessed as a new class of vaccine adjuvant. *J Immunol* 182:1593-1601.

7. **F. Takeshita**, and K. J. Ishii. 2008. Intracellular DNA sensors in immunity. *Curr Opin Immunol* 20:383-388.

[学会発表] (計 2 件)

1. **Takeshita F**, Kobiyama K. A signaling polypeptide derived from an innate immune adaptor molecule can be harnessed as a new class of vaccine adjuvant. International Workshop co-sponsored by Yokohama City University & FDA. March 4. 2009. Yokohama.
2. **武下文彦** 自然免疫活性化機序の解明と応用. 第 8 回プロテオーム医療創薬研究会. 横浜. 2009. 1.

[産業財産権]

○ 取得状況 (計 2 件)

1. 名称: 染色体外ヒストン H2B を介する二本鎖 DNA 認識機構の利用
発明者: **武下文彦**、小檜山康司、吉田篤司
権利者: 公立大学法人 横浜市立大学
種類:
番号: 特開 2011-109982
出願年月日: 平成 21 年 11 月 27 日
国内外の別: 国内

2. 名称: カスパーゼリクルートメントドメインを応用した新規リコンビナントタンパク及びその用途
発明者: **武下文彦**、小檜山康司、奥田研爾
権利者: 公立大学法人 横浜市立大学
種類:
番号: 特許出願 2009JP064218
出願年月日: 平成 21 年 8 月 12 日
国内外の別: 国内外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武下文彦 (TAKESHITA FUMIHIKO)
横浜市立大学・医学研究科・客員教授
研究者番号: 60333572

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし