

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月29日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(S)

研究期間：2008～2012

課題番号：20679003

研究課題名（和文） 認識機構に着目した感染とがんに対する生体防御システムの分子機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanisms for the detection of microbes and cancer cells in innate immunity

研究代表者

高岡 晃教 (TAKAOKA AKINORI)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号：30323611

研究成果の概要（和文）：

自然免疫系の細胞質核酸受容体に着目して解析を進めた結果、PARP-13のアイソフォーム ZAPS が、RIG-I と会合し、RIG-I を介するウイルス感染防御の強力な正の制御因子であることを見出し、ZAPS がインフルエンザウイルス由来の NS1 による免疫回避機構に関与することも明らかにした。さらに PARP-7/TIPARP と PARP-12 が、RIG-I の負の制御因子であることを見出した。また、HCMV に対する新たな DNA 認識機構を同定した。一方で、腫瘍浸潤性樹状細胞における腫瘍由来の DNA と HMGB1 を介する自然免疫シグナルの抑制機構解明の研究にも貢献した。今後、見出された核酸を介する自然免疫シグナル制御を感染症やがんのコントロールにつなげていきたい。

研究成果の概要（英文）：

In this project, we tried to elucidate a regulatory mechanism for the activation of PRRs, particularly nucleic acid sensors, and the related signaling pathways, leading to the induction of cytokine/chemokine genes in innate immune responses for host defense against viral infection and cancer. First, we found that the poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)-13 shorter isoform (ZAPS) critically functions as a potent stimulator of IFN responses in human cells mediated by RIG-I, through the physical association of ZAPS with RIG-I. Next, we revealed that ZAPS is a factor targeted by Influenza viral NS1 protein for viral innate immune evasion. In addition, we showed a role of PARP-7/TIPARP and PARP-12 as a possible negative regulator of RIG-I-mediated innate immune signalings. Furthermore, we also identified a candidate DNA sensor for human cytomegalovirus (HCMV). On the other hand, this project contributed to the research, wherein it has been shown a novel mechanism for the suppression of innate immune signalings mediated by tumor-derived DNA in tumor-infiltrating dendritic cells. These results may provide a therapeutic and preventive insight for the control of viral infection and cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	18,000,000	5,400,000	23,400,000
2009年度	15,700,000	4,710,000	20,410,000
2010年度	14,500,000	4,350,000	18,850,000
2011年度	14,500,000	4,350,000	18,850,000
2012年度	14,500,000	4,350,000	18,850,000
総計	77,200,000	23,160,000	100,360,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：パターン認識受容体, 核酸, 感染, がん, 生体防御, ウイルス, PARP

## 1. 研究開始当初の背景

感染症は人類にとって古くから大きな問題であり、感染をコントロールするためには病原体に対する生体防御機構の解明は極めて重要な課題である。この問題に取り組むべく、我々は、最も初めのプロセスである病原体の侵入に対する宿主の『感知システム』に着目した。微生物特有の分子パターンを認識するパターン認識受容体 (pattern recognition receptors; PRRs) は I 型インターフェロン (interferon; IFN) や炎症サイトカインなどの遺伝子発現を誘導し、自然免疫応答を活性化するのみならず、適応免疫応答の強力な活性化を誘導することにつながり、感染免疫の重要な “starting switch” である。この PRRs による認識機構や下流のシグナル経路を解明することにより、感染をコントロールするための有用な標的を見出すことが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、自然免疫系の PRRs の中でも細胞質核酸受容体、特にまだ十分に研究が進んでいない DNA センサーを中心とする細胞質 DNA 認識機構の解明に迫るものである。このように、核酸認識に着目し、それによって活性化される自然免疫応答を規定するシグナルの制御を明らかにすることで、特にウイルス感染の治療や予防に有効な新しい分子基盤を提示することを目標としている。一方、これらの DNA 認識機構の研究を通して、がん細胞由来の核酸認識という観点からも、がん細胞排除における自然免疫系の活性化の可能性についても探ることを計画している。

本研究は核酸認識に着目した自然免疫応答制御に基づく感染免疫や腫瘍免疫の有効な活性化をはじめ、炎症性疾患や自己免疫疾患の分子病態の研究分野にも貢献することが期待される。

## 3. 研究の方法

新たな細胞質 DNA 認識機構の存在を検証し、その存在が確認された細胞を用いて、各種 DNA リガンドに結合性を示す細胞質に局在するタンパク質分子を、質量分析を用いて検索する。候補分子について機能解析を行い、I 型 IFNs の発現誘導をはじめとする自然免疫応答への関連性を調べることで、センサーを中心とする細胞質 DNA 認識機構やシグナル経路に関わる新規のメディエーターを同定する。更に各種ウイルスを用いた感染実験を細胞およびマウス個体レベルで行うことで、感染防御における役割を明らかにする。

## 4. 研究成果

現在までに複数の候補分子を同定するに至った。その中でまず、ポリ ADP リボースポリメラーゼ (PARP) スーパーファミリーに着目した。PARP スーパーファミリーメンバーは、

ヒトでは少なくとも 17 種類が知られており、DNA 障害などの際の細胞死の誘導や DNA 修復に関与することが知られている一方で、メンバーの中には直接的な作用により、ウイルスの複製阻害や免疫応答、炎症に関わっていることが報告されていた。しかし、PARP スーパーファミリーと宿主のパターン認識受容体を介する自然免疫応答との関連性についてはこれまで明らかにされていなかった。このような理由から PARP ファミリーに焦点をあてて研究を推進させた結果、自然免疫シグナル経路と強力に活性化する新しい制御因子として、PARP ファミリーメンバーである PARP-13 のアイソフォームを同定し、ZAPS (zinc finger antiviral protein, short form) と名付けた。PARP-13 は構造的に、N 末側に 4 つの zinc フィンガーモチーフを有し、C 末に PARP ドメインをもつが、ZAPS は、その PARP ドメインを欠いた短いタイプのアイソフォームである。ZAPS の方は I 型 IFN によって選択的に誘導され、AT-rich な B 型 DNA (B-DNA) を細胞質にトランスフェクションした場合の I 型 IFNs (IFN- $\alpha/\beta$ ) mRNA のみならず、IL-6 や TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインの発現誘導を強力に増強した。一方、興味深いことに ZAPS の作用は、B-DNA 刺激のときと同様に細胞質へ RNA をトランスフェクションした際にも増強効果が確認された。従って、ZAPS は細胞質 DNA および RNA の両者の核酸刺激によって誘導される自然免疫応答の正の制御因子であることが明らかにされた。

更に我々は、ZAPS が刺激依存的に RIG-I (retinoic acid-inducible gene-1) と直接的な会合を示すことを見出した。B-DNA による IFN 応答が RIG-I 依存的であることが示され、ZAPS の細胞質 DNA および RNA の両経路への増強効果が RIG-I を作用点とするものであることが明らかとなった。このような ZAPS の RIG-I 経路に対する作用が、siRNA を用いて ZAPS の発現を抑制させた健常人の末梢血由来 CD14 陽性単球においても確認できた。最後に、ウイルス感染における ZAPS の役割をヒト細胞において検証すべく、zinc-finger nuclease によるアプローチによって独自に作製した ZAPS 遺伝子欠損ヒト細胞を用いて解析した結果、RIG-I によって認識されるニューキャッスル病ウイルスの感染時の IFN- $\beta$  mRNA 誘導が顕著に阻害された。更に ZAPS の発現レベルを増加させることで、インフルエンザウイルス感染時の IFN- $\beta$  誘導が顕著に増強され、有意な抗ウイルス効果が示された。

従って、細胞質においてウイルス由来の RNA あるいは、B-DNA が変換された RNA に対して RIG-I が認識することで活性化されるプロセスにおいて、ZAPS は RIG-I に会合し、おそらく RIG-I-RNA 複合体の安定化を導く結果、

下流のシグナル経路を介する自然免疫応答を強力に増強することが示唆された。

引き続きウイルス感染における解析を続けたところ、このZAPSがインフルエンザウイルス由来のnonstructural protein 1 (NS1)による免疫回避機構に深く関与していることを見出した。NS1をヒトの細胞に過剰発現させた場合、RIG-Iリガンドである5'-三リン酸RNA刺激によるI型IFNsや炎症性サイトカインの発現誘導が抑制されるが、ZAPSはこのNS1によるIFNsやサイトカイン発現の抑制を強力に阻害した。免疫沈降法による解析結果からRIG-IとNS1の会合をZAPSが競合的に阻害することも明らかとなった。さらに、ZAPSのトランスジェニックマウスを作製し、インフルエンザウイルス感染を行ったところ、IFNsの発現増強およびウイルス量の減少がみとめられた。これらの結果から、RIG-IとZAPSの会合の競合阻害がNS1による自然免疫回避の分子機構の1つであると考えられた。

一方、RIG-I以外のRLRファミリーメンバーであるMDA5を介するシグナルにおいてZAPSとの関連性を検討した結果、MDA5と会合し、MDA5の正の調節因子として機能する結果が得られた。この場合、MDA5のリガンドであるpoly(I:C)へと直接結合する可能性が示唆されておりRIG-Iに対する作用メカニズムとは異なる関与を考え、その詳細なメカニズムについて解析中である。

我々はさらにこのZAPS分子に着目し、MALDI-TOF/MSを用いてZAPS会合因子の同定を試みた。その結果、hnRNP A1を同定した。hnRNP A1はRIG-Iリガンドである3pRNA刺激依存性に、ZAPSと会合し、RIG-I経路に対して抑制的に作用する事を明らかにし、hnRNP A1がRIG-I経路の新たな調節因子としての役割が示唆された。

次にPARPスーパーファミリーの中でもPARP-13以外のいくつかのメンバーについて検討したところ、PARP-7/TIPARPとPARP-12については、RIG-Iを介するI型IFNs誘導に対して抑制的に機能する結果が得られた。とくにPARP-7/TIPARPについてはほぼ解析が終了し、RIG-Iシグナル経路を負に制御することを新たに見出した。おそらくTBK1キナーゼとリガンド依存的に会合し、その活性を阻害することで、下流のIRF-3やNF- $\kappa$ B転写因子の活性化、I型IFNsや炎症性サイトカインの発現誘導を抑制している結果が得られた。また実際に、ニューキャッスル病ウイルスなどのRNAウイルスの感染に対する自然免疫応答を抑制し、感染防御に対して負に調節していることが示された。一方、PARP-7/TIPARは、ダイオキシンなどの受容体で知られるアリアル炭化水素受容体 (AHR) を介するシグナルの下流でその発現が誘導されることが知られており、AHRを介する免疫抑制の分子メカニズムの一端と

してPARP-7/TIPARが関わっている結果を見出し、現在論文をまとめているところである。

さらに日本の成人の9割以上が感染していることで知られるDNAウイルスのサイトメガロウイルス (CMV) 由来のDNA認識に関与すると考えられる自然免疫核酸受容体候補を見出した。加えて、この受容体に会合するCMVウイルス由来の特定のタンパク質を同定した。見出したDNAセンサーを介するシグナルにおける、このウイルスタンパク質の作用について検討を進めた結果、大変興味深い結果が得られ、引き続き詳細な解析を進めている。

一方、がんに対する生体防御としての自然免疫認識の研究としては、がん細胞由来のDNAが非ヒストンタンパク質であるHMGB1と会合して自然免疫系の活性化を誘導する際に、腫瘍組織に浸潤する樹状細胞は、TIM3タンパク質を介してこのDNAを介する自然免疫シグナルを抑制することを見出した研究にも貢献した。

## 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8件)

- 1) Nakagawa S, Hirata Y, Kameyama T, Tokunaga Y, Nishito Y, Hirabayashi K, Yano J, Ochiya T, Tateno C, Tanaka Y, Mizokami M, Tsukiyama-Kohara K, Inoue K, Yoshiba M, Takaoka A, Kohara M., Targeted induction of interferon- $\lambda$  in humanized chimeric mouse liver abrogates hepatotropic virus infection., *PLoS One.*, **8**(3):e59611., 2013. 査読有
- 2) Chiba S, Baghdadi M, Akiba H, Yoshiyama H, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Fujioka Y, Ohba Y, Gorman JV, Colgan JD, Hirashima M, Uede T, Takaoka, A, Yagita H, Jinushi M. Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. *Nat Immunol.* **13**(9): 832-842, 2012 査読有
- 3) Jinushi, M., Chiba, S., Baghdadi, M., Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H., Ito, K., Yoshiyama, H., Yagita, H., Uede, T., Takaoka, A. ATM-mediated DNA damage signals mediate immune escape through integrin  $\alpha v \beta 3$ -dependent mechanisms. *Cancer Res.*, **72**, 56-65, 2011. 査読有
- 4) Jinushi, M., Chiba, S., Yoshiyama, H., Masutomi, K., Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H., Yagita, H., Takaoka, A., Tahara, H. Tumor-associated macrophages regulate tumorigenicity and anticancer drug responses of cancer stem/initiating cells.

*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **108**, 12425-30, 2011. 査読有

5) Sasaki, S., Ishida, T., Toyota, M., Ota, A., Suzuki, H., Takaoka, A., Yasui, H., Yamamoto, H., Takagi, H., Maeda, M., Seito, T., Tsujisaki, M., Shinomura, Y., Imai, K. Interferon- $\alpha/\beta$  and anti-fibroblast growth factor receptor 1 monoclonal antibody suppress hepatic cancer cells in vitro and in vivo. *PLoS One.*, **6**, e19618, 2011. 査読有

6) Tsushima, K., Osawa, T., Yanai, H., Nakajima, A., Takaoka, A., Manabe, I., Ohba, Y., Imai, Y., Taniguchi, T., Nagai, R. IRF3 regulates cardiac fibrosis but not hypertrophy in mice during angiotensin II-induced hypertension. *FASEB J.*, **25**, 1531-1543, 2011. 査読有

7) Hayakawa, S., Shiratori, S., Yamato, H., Kameyama, T., Kitatsuji, C., Kashigi, F., Goto, S., Kameoka, S., Fujikura, D., Yamada, T., Mizutani, T., Kazumata, M., Sato, M., Tanaka, J., Asaka, M., Ohba, Y., Miyazaki, T., Imamura, M., and Takaoka, A. ZAPS is a potent stimulator of signaling mediated by the RNA helicase RIG-I during antiviral responses. *Nat. Immunol.*, **12**, 37-44, 2011. 査読有

8) Chen, H.M., Tanaka, N., Mitani, Y., Oda, E., Nozawa, H., Chen, J.Z., Yanai, H., Negishi, H., Choi, M.K., Iwasaki, T., Yamamoto, H., Taniguchi, T., and Takaoka, A. Critical role for constitutive type I interferon signaling in the prevention of cellular transformation. *Cancer Sci.*, **100**, 449-456, 2009. 査読有

[学会発表] (計 17 件)

1) 高岡晃教, Helicobacter pylori pathogenic factor CagA dependent induction of interleukin-1 $\beta$  from macrophages, 日本免疫学会, 2012.12.5-7, 神戸国際会議場

2) Takaoka, A., ZAPS potentiates RIG-I signaling to drive type IFN production for antiviral response, ICAR2012, 2012.11.20-24, Universidade de Lisboa (ポルトガル)

3) Takaoka, A., Nucleic acid sensors for detecting viral infection, IEIIS2012 Homeostatic Inflammation Symposium, 2012.10.23-26, 学術総合センター

4) 高岡晃教, Innate immune signaling and cancer, 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012.9.21, ホテルロイトン札幌

5) Takaoka, A., ZAPS functions as an antiviral regulator in innate immunity,

Istanbul International Immunology Forum, 2012.3.1-2, CROWNE PLAZA ISTANBUL-OLD CITY HOTEL (イスタンブール)

6) Takaoka, A., Zaps as a booster of innate immune signalling for antiviral defense against influenza virus infection, 4th INTERNATIONAL CONFERENCE ON DRUG DISCOVERY & THERAPY, 2012.2.12, Dubai Mens College (ドバイ)

7) Takaoka, A., Roles of ZAPS as an antiviral regulator in innate immunity, 2nd CSI/JSI/KAI Joint Symposium on Immunology, 2011.12.4-6, 千里阪急ホテル

8) Takaoka, A., Identification of a novel regulator of the innate signaling activated by virus-derived nucleic acids, 2010 annual meeting of the french society for immunology, 2010.11.25, Palais du Pharo (フランス)

9) Takaoka, A., Regulation of cytosolic nucleic acid-activated innate responses by the IFN-inducible protein SCI2, The 14th International Congress of Immunology, 2010.8.25, 神戸国際展示場

10) Takaoka, A., A Novel Regulator of the Innate Signaling Activated by Cytoplasmic Nucleic Acids, BIT's 1st World Congress Of Virus and Infections-2010, 2010.7.31, Busan Exhibition & Convention Center (韓国)

11) 高岡晃教, 核酸を介する自然免疫活性化機構の解析, 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 2009.12.3, 大阪国際会議場

12) 高岡晃教, 自然免疫における IFN 応答の新たな制御メカニズム, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009.12.10, パシフィコ横浜

13) 高岡晃教, SCI2 を介した自然免疫応答制御, 第 82 回日本生化学会大会, 2009.10.24, 神戸ポートアイランド

14) Takaoka, A., Activation of Innate Immune Response Mediated by DNA-triggered Danger Signals, The 36th Congress of the International Society of Oncology & BioMarkers, 2008.10.6, インターコンチネンタル東京ベイ

15) Takaoka, A., Novel function of DNA triggered innate immune responses, The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2008.9.2-5, 淡路島夢舞台国際会議場

16) Takaoka, A., DNA Sensing Mechanism for the Activation of Innate Immune Responses, BIT's 2nd World Congress of Gene 2008, 2008.12.6, Foshan Sanshui Garden Hotel (中国)

17) Takaoka, A., DNA-mediated activation of innate of immune responses; its

possible involvement in tumor immunity, BIT's 1st Annual World Vaccine Congress 2008, 2008.12.3, Foshan Sanshui Garden Hotel (中国)

〔図書〕(計 15 件)

- 1) 山田大翔, 高岡晃教, 日本臨床社, 分子標的薬, NF- $\kappa$ B シグナル経路と炎症, 2012, 70 巻 増刊号 8, 225-230
- 2) 中村亨, 高岡晃教, 日本臨床社, 分子標的薬, IFN と受容体を介するシグナル経路, 2012, 70 巻 増刊号 8, 181-185
- 3) 亀山武志, 中村亨, 高岡晃教, 科学評論社, 臨床免疫・アレルギー科, 2012, Vol. 57 No. 2 216-226
- 4) 高岡晃教, 山田大翔, 林真寛, 生物の科学 遺伝, 自然免疫系における核酸認識機構-核酸センサーRIG-I と制御因子 ZAPS, 2011, 第 65 巻 第 6 号 80-91
- 5) 高岡晃教, 中村亨, 林隆也, Jpn. J. Clin. Immunol., 自己炎症疾患の新しい知見総説パターン認識受容体-Pattern recognition receptors-, 2011, 34 巻 5 号 329-345
- 6) 太宰昌佳, 高岡晃教, 医薬の門社, 感染・炎症・免疫, RIG-I シグナルの正の制御因子“ZAPS”, 2011, 第 41 巻 第 3 号
- 7) 高岡晃教, 鈴木絵里加, 浦山優輔, 木口舞美, 金原一郎記念医学医療振興財団/医学書院, 生体の化学, 自然免疫系における DNA センサーとインフラマソーム, 2011, 62(3), 188-201
- 8) 高岡晃教, 亀山武志, 亀岡章一郎, 疾患モデルの作製と利用-免疫疾患, 第 3 章第 3 節第 2 項 IRF ファミリー, 2011, 405-441
- 9) 高岡晃教, 浦山優輔, 鈴木絵里加, 実験医学, 自然免疫系における核酸センサーとサイトカイン誘導経路, 2010, 28(12), 34-47
- 10) 高岡晃教, 「生化学」誌, DAI (DNA 依存性 IRF 活性化因子; DNA-dependent activator of interferon-regulatory factors; 別名 DLM-1/ZBP1), 2009, 81(3), 237
- 11) 高岡晃教, 榎木英美, 後藤翔平, 数馬田美香, 「生化学」誌, 自然免疫における核酸センサー分子, 2008, 81(3), 165-181
- 12) 白鳥聡一, 高岡晃教, 先端医学社, 分子細胞治療, 用語解説より 「DAI」, 2008, 7(6), 62-66
- 13) 高岡晃教, 大和弘明, メディカルレビュー社, ゲノム医学, 自然免疫とウイルス感染, 2008, 8(3), 27-42
- 14) 高岡晃教, 佐藤昇志, 宮崎忠昭, 南山堂, がんの分子標的治療, IFN, サイトカイン-2 がん治療の分子標的となる IFN-IRF 系のシグナル伝達分子, 2008, 358-362
- 15) 高岡晃教, 後藤翔平, 榎木英美, 化学

評論社, 臨床免疫・アレルギー科, 自然免疫の DNA 認識機構とそのセンサー分子, 2008, 49 (6), 723-732

〔その他〕

ホームページ;

<http://www.igm.hokudai.ac.jp/sci/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高岡 晃教 (TAKAOKA AKINORI)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号: 30323611