

平成 28 年 11 月 4 日現在

機関番号：33903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24350087

研究課題名(和文) 環状ジヌクレオチドの生理活性探索・免疫機能発現機構の解明と新規免疫賦活剤の開発

研究課題名(英文) Investigation on biological activity of cyclic dinucleotides and elucidation of mechanism how the activity is expressed, directing toward invention of new immunostimulants

研究代表者

早川 芳宏 (Hayakawa, Yoshihiro)

愛知工業大学・工学部・教授

研究者番号：50022702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：ビス(3'-5')環状ジグアニル酸(c-di-GMP)および類似の構造をもつ環状ジヌクレオチドの生理活性探索を行い、c-di-GMPが乳がん転移抑制作用、実験的自己免疫性脳骨髄炎減弱作用などの重要な活性をもつことを発見した。また細胞質DNAに対する免疫応答として、これまで考えられていたcyclic-GMP-AMP(cGAMP)ではなく、天然では珍しい(2'-5')インターヌクレオチド結合をもつ2',3'-cGAMPがSTINGを活性化し、I型インターフェロン産生が誘導されることを明らかにした。これらは、今後の研究の発展と最終目的「有用な免疫賦活剤の創製」に向けて大いに役立つ成果である。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the physiological activity of bis (3'-5') cyclic diguanylic acid (c-di-GMP) and other cyclic dinucleotides having similar structure. Our results demonstrated the important bioactivity of c-di-GMP to inhibit the metastases of breast cancer and to attenuate experimental autoimmune encephalitis. During the immune response against cytosolic DNA, cyclic-GMP-AMP (cGAMP) was proposed to bind to an immunoreceptor called STING. Here we demonstrated that non-canonical cyclic dinucleotides 2',3'-cGAMP, which contains a single 2'-5' phosphodiester bond, activated STING and induced the production of type I interferons. These are valuable findings for the development of the research and our final goal "invention of useful immunostimulator".

研究分野：核酸有機化学

キーワード：環状ジヌクレオチド c-di-GMP 2',3'-cGAMP 免疫活性 がん細胞増殖抑制 STING

1. 研究開始当初の背景

1978年に細菌情報伝達のセカンドメッセンジャーとして細菌細胞から発見されたビス(3'-5')環状ジグアニル酸(c-di-GMP)は、本研究代表者によってその大量化学合成法が開発されたことをきっかけに、その後、本研究代表者と国内外の複数の研究者との共同研究をはじめ、他の多くの研究によって、細菌のバイオフィーム生合成調節機能、それに基づくバイオフィーム感染阻害作用、がん細胞増殖阻害作用、免疫活性化作用など、多くの有用な生理活性・生物機能を有する事が明らかにされた。さらに近年、c-di-GMPと類似の構造をもつ環状ビス(3'-5')ジグアニル酸(c-di-GMP)、環状ビス(3'-5')ジアデニル酸(c-di-AMP)、環状ビス(3'-5')アデニル酸・グアニル酸(c-ApMp)、環状グアニル酸(2'-5')アデニル酸(c-GAMP)(総じて環状ジヌクレオチド)が相次いで自然界から発見され、そのいずれもがc-di-GMPと同じような生理活性・生物機能をもつことが確認されたことから、現在、これらの環状ジヌクレオチドのみならずその人工誘導体について、新規生物機能の探索や機能発現機構解明研究、なかでも、重要な生理活性である免疫機能に関する研究が盛んに行なわれている。このような背景を基に、本研究は企画、実施された。

2. 研究の目的

上記のように、c-di-GMPに代表される環状ジヌクレオチドは、これまで発見された種々の生理活性・生物機能の他にも、未発見の有意義な生理活性・生物機能が多々存在する可能性が高いことが強く示唆されている。そこで、本研究では、既知の環状ジヌクレオチドはもちろん、未知の人工修飾環状ジヌクレオチドを化学合成し、それらの新規生理活性、生物機能を探索する。くわえて、生物機能が発現されるメカニズムを解明する。なかでも、全ての疾病の症状軽減や予防に有効な免疫活性化についての機能発現機構解明を重点的に行い、本研究のゴールと位置付けている「環状ジヌクレオチドをリード化合物とした新規免疫賦活剤の創製」に繋がる知見を得る。

3. 研究の方法

核酸化学合成の専門家である本研究代表者が、天然から発見された上記環状ジヌクレオチドをはじめ、天然には存在しない、あるいは未だ発見されていない種々の環状ジヌクレオチドを人工合成し、それらの新規生理活性・生物機能探索を分子生物学、細菌医学を専門とする研究分担者が行なった。くわえて、環状ジヌクレオチドの医薬品としての実用化を考えた場合に解決しなければならない大きな問題の一つである「環状ジヌクレオチドのDrug Delivery System(DDS)」の開発を、DDS研究を専門とする研究分担者が検討した。さらに、環状ジヌクレオチドの新規生理活性・生物機能探索および同機能発現機構解明に関しては、広く国内外の研究協力者と共同で研究を実施した。

4. 研究成果

(1)環状ビス(3'-5')ジグアニル酸(c-di-GMP)を認識して転写制御などの重要な機能を示すc-di-GMP Riboswitch IおよびIIが、c-di-GMPの人工修飾体(非天然型c-di-GMP)を認識して機能を発現するかどうかを、研究代表者らが化学合成した種々の非天然型c-di-GMPを用い、米国Yale大学、R. R. Breakerのグループと共同で調べた[ACS Chem. Biol., 7, 1436-1443 (2012)]。その結果、c-di-GMP Riboswitch Iは、c-di-GMPは認識し、非常に強い結合体を形成するが、非天然型c-di-GMPはあまり認識せず、結合しないこと、一方、c-di-GMP Riboswitch IIはc-di-GMPだけでなく、様々な非天然型c-di-GMPをも認識、結合し、機能を発揮する事を見出した。換言すると、c-di-GMP Riboswitch Iは基質特異性が高いが、c-di-GMP Riboswitch IIは基質特異性が低い事を明らかにした。

(2)未解決で、重要な課題である“バクテリアが光を感知するメカニズム”について、研究代表者と東工大松田真二研は以前、共同でバクテリアに光を照射すると、PapAタンパク質とPapBタンパク質が相互に作用し、セカンドメッセンジャーであるc-di-GMPを分解することを見出し、この事が上記メカニズムに何らかの関係がある事を示唆した。今回本メカニズム解明の更なる研究として、PixD-PapB融合タンパク質を創製し、その機能を調べた。その結果PapBのC末端側のタンパク質が光を感受し、PapAの活性を制御していることを、研究代表者が合成したc-di-GMPを用いて発見した[Plant Cell Physiology, 53, 1638-1647 (2012)]。

(3)生体は、リステリア菌が感染すると免疫応答を引き起こし、この菌を排除しよう働くが、この生体反応のメカニズムを知る事は重要な課題である。今回、本メカニズム解明の一助と成る事柄として、リステリア菌が哺乳細胞に感染すると細胞外に放出されるDNAおよびRNAが、細胞内においてRIG-I, MDA5, STING等に認識され、インターフェロン産生を誘起し、このことが免疫応答誘起に重要であることを、研究代表者が合成したc-di-GMPを用いて、ドイツ、ミュンヘン工科大学、P. A. Knolleらと共同で見出した[EMBO J., 31, 4153-4164 (2012)]。

(4)2013年にChenらによって発見された「細胞質に侵入したDNAを認識して免疫応答を行なう際に、シグナル伝達を担い、STINGに結合する新規小核酸化合物」について、発見当初、c-G(3'-5')pA(3'-5')pであろうと考えられていた化合物の構造は誤りであり、正しくは、天然には珍しい(2'-5')インターヌクレオチド結合をもつc-G(2'-5')pA(3'-5')p [2',3'-GAMP]である事を、米国、California大学Berkeley校のR. E. Vanceらと共同で明らかにした。さらに、この化合物は、c-di-GMPをはじめ、それまで発見された環状ジヌクレオチドが全て細菌細胞内で生合成されるのに対し、哺乳動物細胞内で生産され、ヒト由来の

STING タンパク質にも効率よく結合する事を見出した。また、この結果と、以前報告した研究成果[Nature, **478**, 515–519 (2011)]とを考えた場合、これまで不明であった DNA による免疫応答のメカニズム、すなわち、細胞内へ外来 DNA が侵入すると、それが cGAS タンパク質に認識され、その結果細胞内で 2',3'-GAMP が合成され、この化合物が STING に結合することにより TBK1-IRF3 経路を介し I 型インターフェロンを誘導するというメカニズムを解明した。この成果は、免疫研究における重要な発見として日本経済新聞、中日新聞をはじめとする多くの新聞やインターネット上で広く紹介され、一般社会に発信された [Cell Reports, **3**, 1355–1361 (2013)]。

(5) 近年大きな興味もたれている細胞質における DNA の免疫応答に関して、これまで知られていた、STING により産生される I 型インターフェロンが大きく関わって誘起される免疫応答とは異なり、インドールアミン 2,3-ジオキナーゼ (IDO) が細胞質の DNA を認識することにより誘起される免疫抑制があることを見出した。さらに、c-di-GMP 等の環状ジヌクレオチドによる STING の活性化において、I 型インターフェロンの誘導だけでなく、Th1 経路の抑制も起こっている事を明らかにした。これらの事により、環状ジヌクレオチドが DNA sensing において重要な役割を果たしている可能性がある事を示唆した [J. Immunology, **191**, 3509–3513 (2013)]。

(6) マウスを用いる腹腔ガンの治療において、c-di-GMP 免疫活性化と DDS を複合化した癌治療法を用いると、抗ガン剤の投与量を大幅に減少させても十分な効果が得られる事を、北海道大学、原島秀吉研究室との共同研究により見出した。この結果は、環状ジヌクレオチドの DDS に関するはじめての発見であり、今後の発展が期待される [J. Controlled Release, **184**, 20-27 (2014)]。

(7) c-di-GMP のレセプタータンパク質として本研究代表者らが California 大学 Berkley 校の R. E. Vance と共同で発見した STING が、実験的自己免疫性脳髄炎を減弱させる効果を持つ事を明らかにした。実験的自己免疫性脳髄炎は多発性硬化症のモデルとして実験室で使用されている疾病モデルであり、これを減弱させるという事を明らかにした事は、c-di-GMP による STING の活性化が多発性硬化症の治療法として使用できる可能性があると言う事を示すとともに、それ以外の様々な自己免疫疾患の治療法としても有望である事を示す重要な発見である [J. Immunology, **192**, 5571–5578 (2014)]。

(8) c-di-GMP が乳がんの転移予防に効果がある事を米国、Albert Einstein College of Medicine の C. Gravekamp らとの共同研究により、また、腹腔ガンの治療に有効であることを、北海道大学

原島秀吉研究室との共同研究により見出した [Cancer Immunology Research, **2**, 901–910 (2014)]。これ以前にも、本研究代表者は、c-di-GMP がヒト大腸がん細胞の増殖を抑制することを Maryland 大学の D. K. R. Karolis らと共同で見出しており、環状ジヌクレオチドの抗ガン作用は一般的なものであると思われる。がんは、現在地球上で最も深刻な病気であり、有効な抗ガン治療法の開発が強く望まれている。したがって、今回の発見を機に、今後環状ジヌクレオチドの抗ガン作用研究に拍車がかかるものと予想される。

(9) マウスモデルにおいて、c-di-GMP を用いる免疫活性化が百日咳の治療に有効であることを、カナダ、Alberta 大学、S. Elahi らと共同で見出した [PLOS ONE, **9**, e109778 (2014)]。

(10) 細菌感染に対する免疫応答において、造血幹細胞/前駆細胞 (HSPCs) の活性化は重要な鍵となる。これまでに HSPCs の活性化に病原体由来分子が関わっていることは知られていたが、詳細な機構は不明であった。我々は共同研究の成果として、細菌のセカンドメッセンジャーである c-di-GMP が STING を介して HSPC やそのニッチの調節に関わることを示した [Cell Reports, **11**, 71-84 (2015)]。c-di-GMP は HSPCs の細胞周期開始や移動を促進する一方、長期造血幹細胞 (LT-HSCs) の数や再増殖性を減少させる。これらの知見から、c-di-GMP が細菌感染時において必須の HSPCs 調節因子であることが示された。

(11) c-di-GMP は免疫療法における新しいアジュバントとしての効果が期待されているが、細胞膜を透過しにくいことを、効率よく細胞質に到達させる技術が必要となる。我々は共同研究として開発した YSK05 lipid を含むリポソームに c-di-GMP を封入することで (c-di-GMP/YSK05-Lip) NK 細胞を効率よく活性化し、悪性メラノーマに対する抗腫瘍活性を得られることを示した [J. Control. Release, **216**, 149-157 (2015)]。c-di-GMP/YSK05-Lip のマウスへの投与により、I 型インターフェロンの産生と NK 細胞の活性化が誘導され、悪性メラノーマにおいても抗腫瘍活性が得られた。これは、c-di-GMP が NK 細胞の活性化を介して MHC-I 非依存的に悪性メラノーマに対する抗腫瘍活性を発揮することを示した初めての報告である。このことから、c-di-GMP/YSK05-Lip はがん免疫療法において MHC-I 依存的・非依存的に抗腫瘍活性を示すアジュバントとして期待される。

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 13 件)

Liposomes loaded with a STING pathway ligand, cyclic di-GMP, enhance cancer immunotherapy against metastatic melanoma. T. Nakamura, H. Miyabe, M. Hyodo, Y. Sato, Y. Hayakawa, H. Harashima, *J Control Release.*, **216**, 149–157 (2015).

Bacterial c-di-GMP induces extramedullary hematopoiesis through STING. Hiroshi Kobayashi, Keiyo Takubo, Chiharu I. Kobayashi, Ayako Nakamura-Izhizu, Taku Sato, Toshiaki Ohteki, Yoshihiro Hayakawa, Mineo Kurokawa, and Toshio Suda, *Cell Reports*, **11**, 71–84 (2015).

Synthesis and biological activity of cyclic dinucleoside diphosphorothioates. Mamoru Hyodo, Shogo Ishiyama, Hiroaki Murai, Taichi Kamegaya, Michio Ohta, Stephen Lory, and Yoshihiro Hayakawa, Proceeding of the 41st International Symposium of Nucleic Acids Chemistry, 25–26 (2014).

Synthesis and biological activity of cG(2'-5')pA(3'-5')p. Mamoru Hyodo, Masahito Inagaki, Hiroko Miyabe, Takashi Nakamura, Hideyoshi Harashima, and Yoshihiro Hayakawa, Proceeding of the 41st International Symposium of Nucleic Acids Chemistry, 23–24 (2014).

c-di-GMP Enhances Protective Innate Immunity in a Murine Model of Pertussis. S. Elahi, J. Van Kessel, T. G. Kiros, S. Strom, Y. Hayakawa, M. Hyodo, L. A. Babiuk, and V. Gerdt, *PLOS ONE*, **9**, e109778 (2014).

STING Ligand c-di-GMP Improves Cancer Vaccination against Metastatic Breast Cancer, Dinesh Chandra, Wilber Quispe-Tintaya, Arthee Jahangir, Denise Asafu-Adjei, Liyssa Ramos, Herman O. Sintim, Jie Zhou, Yoshihiro Hayakawa, David K. R. Karaolis, and Claudia Gravekamp, *Cancer Immunology Research*, **2**, 901–910 (2014).

Activation of the Stimulator of Interferon Genes (STING) adaptor attenuates experimental autoimmune encephalitis. Henrique Lemos, Lei Huang, Phillip R. Chandler, Eslam Mohamed, Guilherme R. Souza, Lingqian Li, Gabriela Pacholczyk, Glen N. Barber, Yoshihiro Hayakawa, David H. Munn, and Andrew L. Mellor, *J. Immunology*, **192**, 5571–5578 (2014).

A new adjuvant delivery system 'cyclic di-GMP/YSK05 liposome' for cancer immunotherapy. Hiroko Miyabe, Mamoru Hyodo, Takashi Nakamura, Yusuke Sato, Yoshihiro Hayakawa, and Hideyoshi Harashima, *J. Controlled Release*, **184**, 20–27 (2014).

Cutting Edge: DNA Sensing via the Stimulator of Interferon Genes (STING) Adaptor in Myeloid Dendritic Cells Induces Potent Tolerogenic Responses. Lei. Huang, Lingqian Li, Henrique Lemos, Phillip R. Chandler, Gabriela Pacholczyk, Babak Baban, Glen N. Barber, Yoshihiro Hayakawa, Tracy L. McGaha, David H. Munn, and Andrew L.

Mellor, *J. Immunology*, **191**, 3509–3513 (2013).

The innate DNA sensor cGAS produces a non-canonical cyclic-di-nucleotide that activates human STING. Elie J. Diner, Dara L. Burdette, Stephen C. Wilson, Kathryn M. Monroe, Colleen A. Kellenberger, Mamoru Hyodo, Yoshihiro Hayakawa, Ming C. Hammond, and Russell E. Vance, *Cell Reports*, **3**, 1355–1361 (2013).

RIG-I detects infection with live *Listeria* by sensing secreted bacterial nucleic acids. Zeinab Abdullah, Martin Schlee, Susanne Roth, Mobarak Abu Maraheli, Winfried Barchet, Jan Bottecher, Torsten Hain, Sergej Geiger, Yoshihiro Hayakawa, Jörg H. Fritz, Filiz Civril, Karl-Peter Hopfner, Chrisyian Kurts, Jurgen Ruland, Gunther Hartmann, Trinad Chakraborty, and Percy A. Knolle, *EMBO J.*, **31**, 4153–4164 (2012).

A PixD-PapB Chimeric Protein Reveals the Function of the BLUF Domain C-Terminal α -Helices for Light Signal Transduction. Shukun Ren, Masahiro Sawada, Koji Hasegawa, Yoshihiro Hayakawa, Hiroyuki Ohta, and Shinji Masuda, *Plant Cell Physiology*, **53**, 1638–1647 (2012).

Identification of Ligand Analogs that Control c-di-GMP Riboswitches. Kazuhiro Furukawa, Hongzhou Gu, Narasimhan Sudarsan, Yoshihiro Hayakawa, Mamoru Hyodo, and Ronald R. Breaker, *ACS Chem. Biol.*, **7**, 1436–1443 (2012).

{学会発表}(計 2件)

(1) Synthesis and biological activity of cG(2'-5')pA(3'-5')p. Mamoru Hyodo, Masahito Inagaki, Hiroko Miyabe, Takashi Nakamura, Hideyoshi Harashima, and Yoshihiro Hayakawa, The 41st International Symposium of Nucleic Acids Chemistry, Kitakyushu, Nov. 5–7 (2014)

(2) Synthesis and biological activity of cyclic dinucleoside diphosphorothioates. Mamoru Hyodo, Shogo Ishiyama, Hiroaki Murai, Taichi Kamegaya, Michio Ohta, Stephen Lory, and Yoshihiro Hayakawa, The 41st International Symposium of Nucleic Acids Chemistry, Kitakyushu, Nov. 5–7 (2014)

{図書}(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早川芳宏（Hayakawa, Yoshihiro）
愛知工業大学・工学部・教授
研究者番号：50022702

(2) 研究分担者

西村聡子（Nishimura, Akiko）
愛知工業大学・工学部・准教授
研究者番号：90609322

太田美智男（Ohta, Michio）
椋山女学園大学・看護学部・教授
研究者番号：20111841

兵藤 守（Hyodo, Mamoru）
愛知工業大学・工学部・講師
研究者番号：30548186

(3) 連携研究者

なし
研究者番号：