

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790489

研究課題名(和文) T細胞の核酸認識機構の解明

研究課題名(英文) Understanding of the molecular mechanism for nucleic acid sensing by T cells

研究代表者

今西 貴之 (Imanishi, Takayuki)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：10513442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：我々は核酸が抗菌ペプチドあるいはヒストンと複合体を形成することにより、T細胞内に取り込まれ、共刺激を誘導し、T細胞の活性化を増強することを明らかにした。さらに死細胞から放出される核酸が寄生虫の排除やアレルギー応答に重要なTh2細胞への分化を誘導することを明らかにした。また、核酸によるTh2細胞への分化の分子機構を調べた結果、Th1細胞への分化を誘導すると同時にTh2関連遺伝子(GATA-3、IL-4、IL-5、IL-13)の発現を抑制する転写因子T-betの発現が核酸刺激により強く抑制され、それに伴って、Th2関連遺伝子の発現上昇が誘導されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Nucleic acids (NAs) are recognized by Toll-like receptors, RIG-I-like receptors, and inflammasomes and then activate innate immune responses. NAs also induce T cell costimulation upon T cell receptor stimulation, but the mechanism and physiological function of this response remains unclear. Unlike in innate cells, T cell costimulation is induced even by self-DNA, which is released from dead cells and complexes with antimicrobial peptides or histones. Such NA complexes are internalized by T cells and induced costimulatory responses. The recognition of NAs and subsequent activation of T cells are independent of all known NA sensors in innate system. We found, crucially, that such NA-mediated costimulation induces Th2 differentiation from naive T cells by suppressing T-bet expression, followed by the induction of GATA-3 and Th2 cytokines. These findings provide unveiled function of NA sensing by T cells to trigger and amplify allergic inflammation.

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：Th2 TLR Th1 共刺激

1. 研究開始当初の背景

病原体由来の核酸はエンドソームに局在する Toll 様受容体 (TLR3/7/8/9) あるいは細胞質内の RNA センサー RIG-I 様受容体 (RLR)、細胞質内の DNA センサー cGAS-STING 経路によって認識され、自然免疫系を活性化することがよく知られているが、最近、核酸が T 細胞にも直接作用して、T 細胞の活性化を制御することが報告されている (Immunity 25: 783-793, 2006)。しかしながら、T 細胞における核酸認識の分子機構や生理的意義に関しては不明な点が多い。

我々はこれまでの研究で TLR3 リガンドの poly(I:C) と TLR9 リガンドの CpG-B が TCR 刺激による T 細胞の活性化を増強することを見出したが、これらの共刺激が予想に反して TLR を介さないことを TLR シグナルの必須アダプター分子 MyD88/TRIF 二重欠損 T 細胞を用いて明らかにした (未発表)。さらにこれらの核酸刺激による共刺激が細胞質内 RNA センサー (RIG-I/MDA5) のアダプター分子 IPS-1 の欠損 T 細胞や DNA センサーのアダプター分子 STING の欠損 T 細胞、Inflammasome を形成する DNA センサー (AIM2/NALP3) のアダプター分子 ASC の欠損 T 細胞においても正常に認められたことから、T 細胞における核酸認識機構は自然免疫系とは異なる可能性が示唆された (未発表)。

驚くべきことに、病原体の DNA 配列に特有の CpG モチーフを持たない DNA (TLR9 を活性化できない DNA) でも T 細胞の活性化を増強できることが分かった (未発表)。さらに詳細に T 細胞における核酸認識の特異性を調べたところ、CpG-B のような直線的な DNA よりも CpG-A や GpC (CpG-A のコントロール DNA) のような凝集した構造を形成する DNA に強く反応することが明らかになった (未発表)。RNA の特異性についても poly(U) や poly(A:U) のような RNA では共刺激を誘導できないが、凝集構造を形成しやすい poly(I:C) や poly(G) のような RNA で強い共刺激の誘導が認められた (未発表)。

このような核酸の凝集構造を形成させる抗菌ペプチドとして炎症時に産生誘導され

る LL37 が報告されている (Nature 449: 564-571, 2007)。実際、ゲノム DNA 単体では T 細胞の共刺激を誘導できないが、LL37 とゲノム DNA の複合体で T 細胞を刺激すると共刺激が誘導できることを明らかにした (未発表)。このことは炎症に伴い、自己の核酸が T 細胞の活性化を増強できるようになることを示唆しており、自己免疫疾患の発症・増悪に T 細胞による核酸認識が関与している可能性が考えられる。LL37 は自己免疫疾患の 1 つである乾癬患者の皮膚で高発現していることが報告されており、乾癬が T 細胞依存的な疾患であることから T 細胞の核酸認識が重要である可能性が考えられる。

2. 研究の目的

T 細胞は自然免疫系とは異なる独自のシステムで核酸を認識し、T 細胞の活性化を増強することによって自己免疫や感染免疫に関与している可能性が示唆されるが、その受容体や受容体の下流で重要な役割を果たすシグナル分子に関しては現在までのところ同定されていない。そこで本研究では T 細胞における核酸受容体及びその下流で必須の役割を果たすシグナル分子を同定することにより、T 細胞による核酸認識の生理的意義の解明を目指す。

LL37 以外にも核酸を凝集させる因子があることが予想され、その分子を同定することは自己免疫疾患の観点から重要な課題である。そこで核酸に結合して凝集構造を形成させる分子の同定も行う。

3. 研究の方法

(1) T 細胞の核酸受容体およびその下流のシグナル分子の同定

核酸受容体の同定

DNA による共刺激で強いリガンド活性を示す GpC に結合するタンパクと共刺激活性の弱い poly(dT) に結合するタンパクを銀染色で比較し、GpC に特異的に結合するタンパクを質量分析法により同定する。

核酸受容体の下流のシグナル分子の同定

エンドソームで核酸を認識する TLR や細胞

質内の核酸を認識するRLRおよびcGAS-STING経路の下流で型インターフェロンの産生に必須の役割を果たすセリン/スレオニンキナーゼTBK-1がT細胞の核酸受容体の下流で機能する可能性が考えられるため、TBK-1欠損マウスを用いて検討する。

TCR刺激によるT細胞の活性化にはMAPキナーゼや転写因子NF- κ B、NFATが重要な役割を果たすことが知られていることから核酸による共刺激でこれらのシグナルが活性化される可能性が考えられる。そこで核酸刺激単独および核酸+TCR刺激した時のMAPキナーゼやNF- κ B、NFATの活性化をウエスタンブロッティング法およびレポーター細胞を用いて調べる。

(2) T細胞による核酸認識の生理的意義の解明

核酸刺激がヘルパーT細胞の分化に及ぼす影響の検討

ナイーブCD4陽性細胞は活性化すると体内に侵入した病原体や抗原の種類に応じて適切なヘルパーT細胞に機能分化することが知られている。そこで核酸存在下でナイーブCD4陽性細胞を活性化した時の各ヘルパーT細胞への分化を細胞内サイトカイン染色や定量的PCR法を用いた遺伝子発現解析により調べる。

4. 研究成果

(1) T細胞の核酸受容体およびその下流のシグナル分子の同定

核酸受容体の同定

強い共刺激活性を示すGpC DNAに特異的に結合するタンパクをプロテオーム解析によりいくつか同定した。それらは核酸結合ドメインを有するタンパクであったが、それらの遺伝子の発現をshRNA法によりノックダウンしても、核酸刺激によるT細胞の活性化の増強に変化は認められなかった。

GpC特異的に結合する分子としていくつかのヒストンファミリー分子を同定し、LL37と同様に核酸と複合体を形成し、T細胞の活性化を増強する可能性を検討した。その結果、

リンカーヒストンのH1とゲノムDNAの複合体では共刺激を誘導できなかったが、コアヒストン(H2A、H2B、H3、H4)とゲノムDNAの複合体では共刺激の誘導が認められた。これと相関するようにコアヒストンとゲノムDNAの複合体はT細胞への強い取り込みが認められたが、ヒストンH1ではほとんど取り込みが認められなかった。コアヒストンとゲノムDNAの複合体がエンドソームとリソソームに蓄積するのを共焦点顕微鏡で観察した。

以上のことからコアヒストンは核酸と複合体を形成することにより、T細胞への核酸の取り込みを促進し、T細胞の活性化を増強することが明らかになった。

核酸受容体の下流のシグナル分子の同定

TBK-1欠損マウス由来のT細胞を用いて、核酸による共刺激の誘導を調べたところ、野生型と同等の共刺激の誘導が認められた。このことからT細胞の核酸受容体は自然免疫系と異なり、TBK-1を介さないシグナル伝達経路でT細胞の活性化を増強することが示唆された。

T細胞をTCR \pm 核酸で刺激して下流のシグナル分子の活性化を調べたところ、核酸刺激によるERKやJNK、p38などのMAPKの活性化の増強は認められなかった。一方、レポーター細胞を用いて、NF- κ BとNFATの活性化を検討したところ核酸刺激単独ではどちらの活性化も認められなかったが、TCRと同時に刺激することによりNF- κ BとNFATの活性化の増強が認められた。以上の結果から、T細胞の核酸受容体はTCR刺激によるNF- κ BとNFATの活性化増強を介してT細胞の共刺激を誘導することが明らかになった。

(2) T細胞による核酸認識の生理的意義の解明

核酸刺激がヘルパーT細胞の分化に及ぼす影響の検討

核酸存在下でナイーブCD4陽性細胞を活性化し、6日後のヘルパーT細胞の分化を調べたところ、対照細胞に比べIL-4産生細胞(Th2細胞)の割合が著明に増加し、逆にIFN- γ 産生細胞(Th1細胞)の割合が減少した。そこでTh1細胞とTh2細胞のマスター転写因子の発現を調べたところ、Th2細胞の必須転写因子GATA-3の発現が核酸刺激により増加し、Th1細胞の必

須転写因子T-betの発現が核酸刺激で著明に減少することが分かった。このことから核酸刺激はTh2細胞の分化を誘導すると同時にTh1細胞への分化を抑制することが明らかになった。

核酸は生体内では炎症に伴い誘導される死細胞から放出することが知られているため、死細胞の存在下でヘルパーT細胞の分化を解析したところ、Th2細胞への分化が促進することが認められた。また、このTh2細胞への分化がDNA分解酵素の添加により阻害されることから、死細胞から放出されるDNAがTh2細胞への分化に重要であることが示唆された。

これまでTh2細胞への分化にはIL-4が重要なことが分かっているため、IL-4受容体欠損マウスを用いて核酸刺激によるTh2細胞への分化を調べたところ、IL-4受容体欠損マウス由来のT細胞では核酸刺激によるIL-4産生細胞の誘導は認められなかったが、IFN- γ 産生細胞の減少は認められた。この結果と一致して、IL-4受容体欠損マウス由来のT細胞では核酸刺激によるGATA-3の発現誘導は認められなかったが、T-betの発現抑制は認められた。このことから核酸刺激によるTh2細胞への分化にはIL-4が重要であるが、核酸刺激によるTh1細胞への分化の抑制にはIL-4非依存的な経路があることが示唆された。

核酸刺激によるTh2細胞への分化の分子機構を遺伝子転写レベルで解析したところ、核酸刺激によりT-betの発現が最初に強く抑制され、それに引き続いてTh2細胞の関連遺伝子のGATA-3とIL-4、IL-5、IL-13の発現が誘導されることが明らかになった。興味深いことに核酸刺激によるGATA-3とIL-4の発現誘導はIL-4受容体欠損マウス由来のT細胞ではほとんど認められなかったのに対して、T-betの発現抑制とIL-5とIL-13の発現誘導はIL-4受容体欠損マウス由来のT細胞でも野生型とほとんど同程度に認められた。

以上のことからT細胞は死細胞から放出された核酸を取り込み、認識することにより、T-betの発現抑制を介して、Th2細胞関連遺伝子の発現を誘導し、自ら産生したIL-4によりTh2細胞への分化が確立されることが明らかになった。

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1件)

Takayuki Imanishi, Chitose Ishihara, Mohamed El Sherif Gadelhaq Badr, Akiko Hashimoto-Tane, Yayoi Kimura, Taro Kawai, Osamu Takeuchi, Ken J. Ishii, Shun'ichiro Taniguchi, Tetsuo Noda, Hisashi Hirano, Frank Brombacher, Glen N. Barber, Shizuo Akira & Takashi Saito

Nucleic acid sensing by T cells initiates Th2 cell differentiation

NATURE COMMUNICATIONS

査読 有り

2014年4月10日

10.1038/ncomms4566

[学会発表](計2件)

1. 今西貴之 審良静男 斉藤隆

Nucleic acid-mediated T cell activation through a novel sensing mechanism induces Th2 responses

第15回国際免疫学会議

2013年8月26日

イタリア・ミラノ

2. 今西貴之 審良静男 斉藤隆

Direct recognition of nucleic acids by T cells initiates Th2 cell differentiation

第42回日本免疫学会学術集会

2013年12月11日

千葉市幕張メッセ

[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〕

研究成果に関するwebページ

http://www.riken.jp/pr/press/2014/20140410_1/

<http://www.ifrec.osaka-u.ac.jp/jpn/research/2014/04/20140410-natcommun-saito.php>

6. 研究組織

(1)研究代表者

今西 貴之 (IMANISI TAKAYUKI)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：10513442