

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670235

研究課題名(和文) 一本鎖RNAによるTLR7/TLR8の新規制御機構の解明

研究課題名(英文) Novel regulatory mechanism of TLR7/8 by ssRNA

研究代表者

三宅 健介 (MIYAKE, Kensuke)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：60229812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：TLR7およびTLR8は一本鎖RNAを認識するセンサーとして知られます。一方、これらのTLRにはCL075やR848などの人工合成低分子リガンドも存在しますが、天然の低分子リガンドの存在はこれまで知られていません。我々はTLR7が一本鎖核酸存在下でグアノシンを認識することを発見しました。またグアノシンに加え、TLR7は疾患マーカーとして知られる修飾型グアノシン類にも応答性を示しました。我々の結果は、TLR7の内因性低分子リガンドを明らかにすると共に、これまで機能不明であった生体内グアノシンアナログに自然免疫応答を誘導する役割があることを示しています。

研究成果の概要(英文)：Toll-like receptor 7 (TLR7) and 8 were considered to recognize single-strand RNA (ssRNA). Although these receptors also respond to synthetic small chemical ligands, such as CL075 and R848, it remains to be determined whether these receptors sense natural small molecules or not. We find that TLR7 work as the sensor for guanosine (G) / 2'-deoxyguanosine (dG) in the presence of ORN where ORN strengthens TLR7 interaction with G/dG. In addition, modified nucleosides such as 7-methylguanosine, 8-hydroxyguanosine and 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), activated TLR7 with ORNs. Importantly, 8-OHdG - a well-known oxidative DNA damage marker with unknown function- induced strong cytokine production comparable to G and dG both in mouse and human immune cells. Our results shed light on the biological function of guanosine and modified guanosines in innate immune response.

研究分野：免疫学

キーワード：自然免疫 TLR7 TLR8 一本鎖核酸

1. 研究開始当初の背景

免疫細胞に高発現する病原体レセプターの Toll Like Receptor (TLR) は侵入病原体を感知し、早期の炎症およびその後の獲得免疫応答を誘導することで侵入病原体を効率的に排除する役割を担う。その為、TLR を標的としたアジュバントなどの免疫賦活化剤の開発が数多く進められている。しかし、過剰な TLR 応答は自己免疫疾患の発症につながり、生体にとっての脅威にもなり得る。このことから、認識するリガンドを含めて TLR 応答を正確に理解することが必要不可欠である。

ウイルス由来の一本鎖 RNA (ssRNA) を認識する TLR7 や TLR8 (TLR7/8) は、ウイルス感染防御に必要不可欠である。また、TLR7/8 には強力に免疫応答を誘導する人工の低分子合成リガンド (CL097, R848, Loxoribine および Imiquimod など) も知られており、Imiquimod のように免疫賦活化剤として市販されているものもある。しかし、病原体内や生体内に TLR7/8 の低分子リガンドが存在するという報告はなく、低分子リガンドの生理的な意義は全く不明である。

2. 研究の目的

申請者らは TLR8/ssRNA の結晶構造解析結果を基に ssRNA が TLR8 による低分子リガンド応答を相乗的に増強する可能性を見出した。本研究では、ssRNA による TLR7/8 の応答制御機構を解明すると共に、これまでに報告のない TLR7/8 の内因性低分子リガンドを同定する。

3. 研究の方法

TLR7 や TLR8 は ssRNA に対するセンサーである。一方、低分子リガンドに対しても応答する。TLR8/ssRNA の構造解析結果より、TLR8 は Uridine (U) に結合する事、オリゴヌクレオチド (分解された ssRNA) が Uridine とは異なる部位に結合する事で Uridine (U) と TLR8 の結合を強くすることが明らかになっている。本研究では、主に TLR7 の Nucleoside に対する応答性を中心に調べた。以下に検討方法を記す。

TLR7 と Nucleoside との応答性の検討

TLR8 の ssRNA 認識において、実際に TLR8 が認識していたのは U とオリゴヌクレオチドであったことより、TLR7 も ssRNA の分解産物を認識している可能性が考えられた。この点を検討するために、HEK293 細胞を用いた NF- κ B レポーターアッセイを行った。構造解析結果に一致して、TLR8 と NF- κ B luciferase レポーターを発現した細胞では ssRNA と U を加えた時にのみ強い NF- κ B シグナルの活性化が認められた。

(図 1)

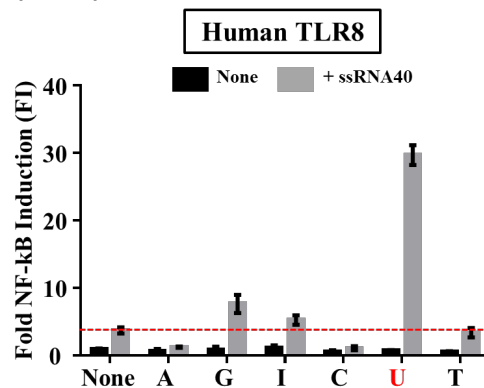


図1: ヒトTLR8を発現するHEK293T細胞を用いたNF- κ Bレポーターアッセイ。

一方、TLR7/Unc93B1 と NF- κ B luciferase を発現させた細胞において様々な Nucleoside と一本鎖 RNA の共刺激に対する応答性を検討した結果、TLR7 は U ではなく Guanosine (G) に応答することが明らかとなった。(図 2)

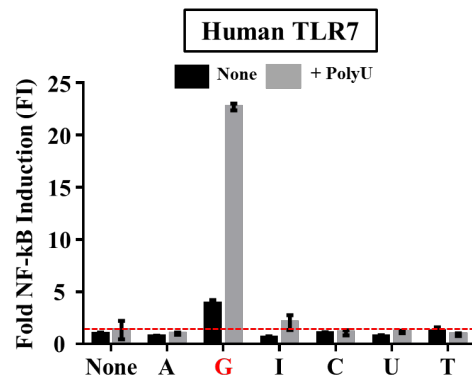


図2: ヒトTLR7/ヒトUnc93B1を発現するHEK293T細胞を用いたNF- κ Bレポーターアッセイ。

修飾型 Nucleoside に対する応答性の検討

TLR7, TLR8 は病原体に特異的に応答するために、病原体と宿主の核酸の違いを認識仕分けしている事が報告されている。例えば、宿主はメチル化など、核酸を修飾することが多いが、細菌などの病原体ではその様な修飾まれである。興味深いことに、TLR7, TLR8 は修飾された RNA に対する応答性が低い。その為、自己と非自己を認識可能であると考えられている。

我々の研究結果より、ssRNA 存在下において TLR7 と TLR8 は Nucleoside に応答する事が明らかとなった。そこで、様々な修飾型 U や G に対する応答性をレポーターアッセイやマクロファージなどの免疫細胞を用いて検証した。その結果、一部の修飾型 G や U がそれぞれ TLR7 と TLR8 のリガンドになり得ることが判明した。特に酸化型の Guanosine や 2'-deoxyguanosine は ssRNA 存在下において強力な TLR7 リガンドであった。以上の結果より、TLR7/8 は修飾の有無に関わらず遊離 Nucleoside をリガンドとして認識し得ることが証明された。

4. 研究成果

これまで TLR7/8 は ssRNA センサーであると考えられてきたが、ssRNA 単独では非常に弱い免疫応答しか誘導することができなかった。また、強力に TLR7/8 応答を誘導する人工低分子リガンドの存在は知られていたが、実際に低分子リガンドが存在するのか否かは不明であった。

本研究成果より、TLR7/8 はオリゴヌクレオチドと低分子リガンドの両方が共存する際に非常に強い免疫応答を誘導し得るレセプターであることが判明した。またオリゴヌクレオチド存在下において、TLR7 と TLR8 はそれぞれ G と U のレセプターであることも判明した。特に酸化ストレスマーカーであり、様々な疾患において血中および尿中濃度の上昇が報告されている 8-OHdG に TLR7 が応答したことより、TLR7 が生体内において酸化ストレスセンサーとして機能する可能性が示唆された。今後、今回発見された TLR7/8 の低分子リガンドが実際に疾患の発症と関わるか否かの検証が必要である。

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 3 件)

(1) Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA (2015)

Tanji, H., Ohto, U., Shibata, T., Taoka, M., Yamauchi, Y., Isobe, T., Miyake, K., and Shimizu, T.

Nature Struct. Mol. Biol. **22**, 109-115
(doi: 10.1038/nsmb.2943)

(2) Targeting cell surface TLR7 for therapeutic intervention in autoimmune diseases. (2015)

Kanno A, Tanimura N, Ishizaki M, Ohko K, Motoi Y, Onji M, Fukui R, Shimozato T, Yamamoto K, Shibata T., Sano S, Sugahara-Tobinai A, Takai T, Ohto U, Shimizu T, Saitoh S, Miyake K.

Nat. Commun. 6 (6119)
(doi: 10.1038/ncomms7119)

(3) Chan MP, Onji M, Fukui R, Kawane K, Shibata T., Saitoh S, Ohto U, Shimizu T, Barber GN, Miyake K. (2015)

“DNase II-dependent DNA digestion is required for DNA sensing by TLR9.”

Nat. Commun. 6 (5853)
(doi: 10.1038/ncomms6853)

〔学会発表〕(計 3 件)

三宅健介、Mechanisms regulating Nucleic acid-sensing Toll-like receptors、日本細菌学会(招待講演)、長良川国際会議場、2015 年 3 月 26 日-28 日

三宅健介、自然炎症における核酸代謝と核酸センサーの役割、第 8 回 IgG4 関連疾患研究会(招待講演)、福岡リーセントホテル、2015 年 3 月 21 日

柴田琢磨、Human TLR7/TLR8 are sensors for nucleoside derivatives、日本免疫学会、国立京都国際会館、2014 年 12 月 10 日-12 日

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/kanseniden/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 健介 (MIYAKE KENSUKE)

東京大学医科学研究所・教授

研究者番号：60229812

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

柴田 琢磨 (SHIBATA TAKUMA)

東京大学医科学研究所・助教
研究者番号：30554505