

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670236

研究課題名(和文)核酸受容体からの細胞死シグナルの免疫賦活化における役割

研究課題名(英文)Role of nucleic acids sensors-induced cell death in shaping adaptive immunity

研究代表者

河合 太郎 (Kawai, Taro)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：50456935

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)：病原体の感染により宿主細胞死が誘導されることが知られているが、免疫制御における役割については不明な点が多い。本研究では、自然免疫受容体に対する様々なアゴニストを用いてマウス樹状細胞を刺激し、その後の細胞死を解析したところ、Toll-like receptor (TLR) 7のアゴニストR837(イミキモド)刺激により高い割合で細胞死が誘導されることを見いだした。さらに、この細胞死はTLR7非依存的に誘導された。R837はウイルスに対する獲得免疫を誘導可能なアジュバントであることから、R837により死滅した樹状細胞から獲得免疫活性化に関与する内在性因子が放出されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pathogen infection triggers death of host cells, but its role in regulation of immune responses remains unclear. In this study, we examined whether cell death of murine dendritic cells is induced by stimulation with agonists for innate immune receptors, and found that treatment of dendritic cells with R837, an agonist for Toll-like receptor (TLR) 7, resulted in cell death among other TLR agonists tested. Furthermore, this cell death was independent on TLR7, suggesting that R837 induces cell death via unknown pathways. As R837 is known as an adjuvant for virus infection, these results suggest that endogenous molecules released by dying dendritic cells upon R837 stimulation play roles in shaping adaptive immunity to viruses.

研究分野：免疫学

キーワード：自然免疫 シグナル伝達 細胞死 アジュバント ウイルス核酸

### 1. 研究開始当初の背景

自然免疫はウイルスや細菌といった感染病原体の初期認識と、その後の炎症反応の惹起や獲得免疫の誘導に必須の役割を果たす生体防御機構である。こうした自然免疫応答は、病原体に存在する固有の分子構造を認識する自然免疫受容体を介して惹起される。病原体の分子構造の中で、核酸 (RNA、DNA) は、抗原提示細胞である樹状細胞やマクロファージ、あるいは非免疫細胞である上皮細胞等に発現している Toll-like receptor (TLR) ファミリー、RIG-I-like receptor (RLR) ファミリーメンバー (RIG-I、MDA5) DNA センサー群により認識され、炎症性サイトカインや I 型インターフェロン産生を惹起する。これらサイトカインは抗ウイルス応答や炎症惹起を促すことに加え、B 細胞や T 細胞に作用することで効果的な獲得免疫誘導において中心的な役割を果たす。したがって、病原体由来の核酸やそれらを模倣する合成核酸は自然免疫のアゴニストであり、獲得免疫成立の為にアジュバントとして働く。一方、ウイルス感染や核酸刺激は一部の細胞に細胞死を誘導することが知られているが、その免疫制御における位置づけは不明な点が多い。我々はこれまで自然免疫担当細胞である樹状細胞の一部がウイルス RNA 刺激により死滅し、内在性因子 HMGB1 を放出することを見いだした。興味深いことに、HMGB1 は樹状細胞活性化をさらに増強し、ウイルスに対する獲得免疫を強化する内在性のアジュバントとして機能していた (1)。したがって、感染に伴う宿主細胞の細胞死は獲得免疫誘導という点において重要な役割を果たしていると考えられる。本研究では、細胞死を誘導可能な自然免疫アゴニストの同定、細胞死誘導シグナル伝達経路の詳細な解析、それら細胞サブセットが漏出する内在性因子の解析を行うことで、これまであまり注目されてこなかった獲得免疫誘導における細胞死の役割を明らかにする。

### 2. 研究の目的

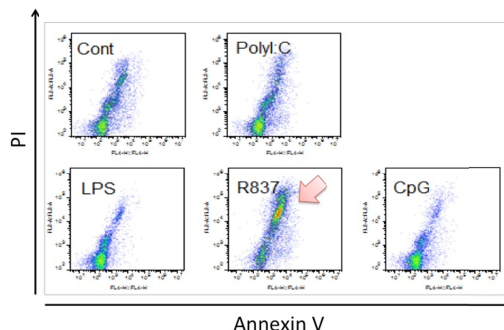
ウイルスや細菌の持つ核酸 (RNA、DNA) やそれらを模倣するような合成核酸は抗原に対する獲得免疫応答を効率よく誘導するアジュバントとして作用する。こうした核酸により惹起される自然免疫受容体シグナル活性化に伴い産生される I 型インターフェロンや炎症性サイトカインは獲得免疫誘導に重要な役割を果たす。一方、核酸は様々な細胞に対して細胞死を誘導することが知られているが、免疫応答におけるその役割は不明である。本研究では、自然免疫受容体刺激後に認められる自然免疫細胞の細胞死誘導機構を明らかにするとともに、死滅した細胞から放出される内在性因子を詳しく解析し、獲得免疫の成立において果たす役割を明らかにすることを旨とする。

### 3. 研究の方法

これまで TLR3 や RLR のアゴニストである Poly (I:C) (合成二本鎖 RNA アナログ) でマウス骨髄より GM-CSF 存在下で分化させた樹状細胞を刺激したところ 1 割程度の細胞に細胞死の誘導が認められた。そこで、同様の手法を用いて野生型マウスや様々な遺伝子改変マウスより取りだした樹状細胞を様々な TLR、RLR、NLR リガンドを用いて刺激し、その後の細胞死をアネキシン V と Propidium iodide (PI) による二重染色による FACS 解析にて検討を行った。

### 4. 研究成果

様々な TLR アゴニストを用いて検討したところ、TLR7 アゴニストであり高い I 型インターフェロン産生能を持つ抗ウイルス薬 R837 (イミキモド) の刺激により樹状細胞が死滅することを見いだした。一方、CpG DNA (TLR9)、LPS (TLR4)、Poly (I:C) (TLR3) 刺激では、細胞死は誘導されなかった。また、R837 刺激により死滅した細胞はアネキシン V と PI の両陽性であったことから、ネクロシス様の細胞死であることが示唆された (下図)。



興味深いことに、この細胞死は TLR7 の別のリガンドである R848 では誘導されなかった。さらに、TLR ファミリーからのシグナル伝達経路の活性化が起こらない MyD88 欠損マウスの樹状細胞において、R837 刺激後のサイトカイン産生は認められないものの、細胞死は誘導された。これらのことから、R837 は TLR や TLR 刺激により産生されるサイトカイン非依存的に樹状細胞の細胞死を誘導するメカニズムを持っていることが示唆された。

また、最近の研究から IL-1 や IL-33 といった炎症や獲得免疫発動に重要な役割を果たすサイトカインが細胞死に伴い放出される内在性因子として機能することが示唆されている。そこで、TLR リガンドを含め様々な自然免疫アゴニストを用いてスクリーニングしたところ、新たに Nigericin を見つけることができた。Nigericin 刺激により細胞死が誘導され、また IL-33 が放出されることが明らかとなった。以上のように、細胞死を誘導することができる自然免疫アゴニストを複数見つけることができた。

### < 引用文献 >

(1) Zou J, Kawai T, Tsuchida T, Kozaki T,

Tanaka H, Shin KS, Kumar H, Akira S. Immunity. Vol.38, 2013, pp717-728.

## 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)

<sup>1</sup> Kumar S, Ingle H, Mishra S, Mahla RS, Kumar A, Kawai T, Akira S, Takaoka A, Raut AA, Kumar H. IPS-1 differentially induces TRAIL, BCL2, BIRC3 and PRKCE in type I interferons-dependent and -independent anticancer activity. Cell Death Dis. 査読有、Vol.6, 2015, pp.e1758. doi: 10.1038/cddis.2015.122.

<sup>2</sup> Matsuda T, Murao N, Katano Y, Juliandi B, Kohyama J, Akira S, Kawai T, Nakashima K. TLR9 signalling in microglia attenuates seizure-induced aberrant neurogenesis in the adult hippocampus. Nat Commun. 査読有、Vol.6, 2015, pp.6514. doi: 10.1038/ncomms7514.

<sup>3</sup> Kitai Y, Takeuchi O, Kawasaki T, Ori D, Sueyoshi T, Murase M, Akira S, Kawai T. Negative regulation of melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5)-dependent antiviral innate immune responses by Arf-like protein 5B. J Biol Chem. 査読有、Vol.290, No.2, 2015, pp.1269-80. doi: 10.1074/jbc.M114.611053.

<sup>4</sup> Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. Front Immunol. 査読有、Vol.5, 2014, pp.461. doi: 10.3389/fimmu.2014.00461.

<sup>5</sup> Pandey S, Kawai T, Akira S. Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. Cold Spring Harb Perspect Biol. 査読有、Vo. 7, No.1, 2014, pp.a016246. doi: 10.1101/cshperspect.a016246.

<sup>6</sup> Imanishi T, Ishihara C, Badr Mel S, Hashimoto-Tane A, Kimura Y, Kawai T, Takeuchi O, Ishii KJ, Taniguchi S, Noda T, Hirano H, Brombacher F, Barber GN, Akira S, Saito T. Nucleic acid sensing by T cells initiates Th2 cell differentiation. Nat Commun. 査読有、Vol.5, 2014, pp.3566. doi: 10.1038/ncomms4566.

<sup>7</sup> Kuniyoshi K, Takeuchi O, Pandey S, Satoh T, Iwasaki H, Akira S, Kawai T. Pivotal role of RNA-binding E3 ubiquitin ligase MEX3C in RIG-I-mediated antiviral innate

immunity. Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有、Vol.111, No.15, 2014, pp.5646-51. doi: 10.1073/pnas.1401674111.

<sup>8</sup> Schmolke M, Patel JR, de Castro E, Sánchez-Aparicio MT, Uccellini MB, Miller JC, Manicassamy B, Satoh T, Kawai T, Akira S, Merad M, García-Sastre A. RIG-I detects mRNA of intracellular Salmonella enterica serovar Typhimurium during bacterial infection. MBio. 査読有、vol.5, No.2, 2014, pp.e01006-14. doi: 10.1128/mBio.01006-14.

### [学会発表](計10件)

<sup>1</sup> 村瀬本 弥、川崎拓実、河合太郎. ELMO domain-containing protein 2 (ELMOD2)による抗ウイルス自然免疫制御機構の解析. 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会合同大会. 2015.12.03. 神戸ポートアイランド(兵庫神戸市)ポスター発表

<sup>2</sup> 河合太郎、國吉佳奈子、竹内理、審良静男. ウイルスRNAに対する自然免疫応答におけるユビキチンリガーゼ Mex3c の役割. 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会合同大会. 2015.12.03. 神戸ポートアイランド(兵庫神戸市)ワークショップ

<sup>3</sup> Sueyoshi T, Kawasaki T, Kawai T. Identification of HuR as a molecule that mediates antiviral innate immune responses. 第44回日本免疫学会学術集会 2015.11.19. 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)ポスター発表

<sup>4</sup> Kawasaki T, Kawai T. Role of the lipid kinase PIKfyve in alveolar macrophage. 第44回日本免疫学会学術集会. 2015.11.18. 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)口頭発表、ポスター発表

<sup>5</sup> Sueyoshi T, Murase M, Murata R, Kawasaki T, Kawai T. Identification of HuR as a molecule that mediates antiviral innate immune responses. 第43回日本免疫学会学術集会. 2014.12.12. 国立京都国際会館(京都府京都市)ポスター発表

<sup>6</sup> Kawasaki T, Tanaka R, Ito K, Akira S, Kawai T. Physiological role of the lipid kinase PIKfyve in innate immune responses. 第43回日本免疫学会学術集会. 2014.12.11. 国立京都国際会館(京都府京都市)ポスター発表

<sup>7</sup> Kitai Y, Ori D, Sueyoshi T, Murase M, Kawasaki T, Kawai T. Negative regulation of Mda5-mediated antiviral response by Arl5B. 第43回日本免疫学会学術集会

2014.12.11. 国立京都国際会館（京都府京都市）口頭発表、ポスター発表

8 鍛代悠一、織大祐、末吉拓也、村瀬本弥、川崎拓実、竹内理、審良静男、河合太郎. Arl5B-mediated negative regulation of MDA5-dependent innate immune signaling. 第13回あわじしま感染症・免疫フォーラム. 2014.9.23-26. 奈良県新公会堂（奈良県奈良市）ポスター発表

9 鍛代悠一、織大輔、末吉拓也、村瀬元弥、川崎拓実、竹内理、審良静男、河合太郎. Arl5B negatively regulates Mda5-mediated innate immune signaling. 第66回日本細胞生物学会大会. 2014.6.11-13. 奈良県新公会堂（奈良県奈良市）ポスター発表

10 川崎拓実、武村直紀、ダロンスタンドリー、審良静男、河合太郎. 免疫応答におけるホスファチジルイノシトール5リン酸の役割. 第66回日本細胞生物学会大会. 2014.6.11-13. 奈良県新公会堂（奈良県奈良市）. ポスター発表

〔図書〕(計1件)

1 末吉拓也、村瀬本弥、河合太郎. TRIM分子による核酸に対するパターン認識レセプターの制御反応. 臨床免疫・アレルギー科 62(1), 120 (科学評論社) 2014年7月

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://bsw3.naist.jp/kawai/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河合 太郎 (Taro Kawai)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：50456935

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：