

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893188

研究課題名(和文) DNase1L3の自己DNA処理機構の解明とSLEの病態形成への役割の検討

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms of DNase1L3 for the clearance of self-DNA in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus

研究代表者

三苦 弘喜(MITOMA, Hiroki)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：60467909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：全身性エリテマトーデスの数家系でDeoxynuclease 1-like-3 (DNase1L3)の機能欠失型変異が報告されているが、機能欠失による発症の機序は不明である。我々の検討ではDNase1L3は白血球全般に発現が認められ、形質細胞様樹状細胞で最も高かった。単球系細胞ではIL-4刺激でDNase1L3の顕著な発現亢進を認めた。DNase1L3蛋白は主として細胞質に分布しており、細胞外にも分泌された。分泌された培養上清中のDNase1L3蛋白はDNase活性を維持していた。以上よりDNase1L3は免疫担当細胞から分泌され、炎症局所で細胞外に放出された核酸の処理を担っていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Loss of function of deoxynuclease 1-like-3 (DNase1L3) causes the familial systemic lupus erythematosus, however the molecular mechanisms have not been clarified yet. Each of the fraction of white blood cells expressed DNase1L3 mRNA and plasmacytoid dendritic cells showed the highest expression among white blood cells. IL-4 induced a prominent induction of DNase1L3 expression in monocytes/macrophages. DNase1L3 protein mostly localized in the cytosol and was secreted into the cell culture medium. The secreted protein kept a function as a DNase. It is suggested that DNase1L3 degrades extracellular DNA released from dying cells in the inflamed tissue and keeps a tissue homeostasis.

研究分野：免疫・膠原病学

キーワード：DNase アポトーシス 自己抗原 全身性エリテマトーデス

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス(SLE)ではDNase1の遺伝子多型(SNPs)が異なる人種で認められ、患者血清で抗 double stranded (ds)DNA 抗体が病勢と相関して上昇することなどから、自己DNAが病態形成に深く関与していると考えられている。近年、DNaseの一つである TREX-1の遺伝子異常でSLE様症状を呈することが報告され(文献)、さらにDNase1L3の機能低下を伴う遺伝子異常で典型的なSLEを発症することが明らかとなり(文献)、自己DNA処理機構の異常がヒトSLE発症に関与していることが強く示唆されている。その後一般のSLE患者においてもDNase1L3のSNPsが報告され、疾患感受性遺伝子として注目されている。さらに、異なる遺伝子背景をもつループスモデルマウス(lupus-prone MRL, NZB/W F1)でDNase1L3の活性が低下していることも報告されている(文献)。DNase1 family 分子には、DNase1, DNase1L1, DNase1L2, DNase1L3の4分子があるが、DNase1L3欠損家系では他のファミリー分子の活性は保たれており、DNase1L3に特異的な機能が存在すると考えられる。これまでの報告では、DNase1L3の内因性発現がない上皮系腫瘍細胞株にDNase1L3を強制発現させると、caspase-activated DNase (CAD)との共作用でVP-16誘導アポトーシスに伴うDNAの断片化が増強することが示されている。しかしながらDNA断片化が起こらないCAD欠損マウスにおいてSLE等の自己免疫疾患の発症はなく、アポトーシス細胞のDNA断片化の障害がDNase1L3遺伝子異常患者におけるSLE発症の主因とは考えにくい。従って、既に報告されている機能以外にも何らかの生理的機能があることが推測される。

2. 研究の目的

全身性エリテマトーデス(SLE)ではアポトーシスの亢進とアポトーシス細胞の処理機構の異常により自己の核酸が細胞外へ放出され、Toll-like receptors (TLRs)のリガンドとなり、plasmacytoid dendritic cells (pDCs)等からtype 1 interferonを誘導し、直接的あるいは間接的にB細胞からの自己抗体の産生を亢進させると考えられている。しかしながらどのように自己の核酸が細胞外へ放出されpDCsのエンドゾームに局在するTLRsを刺激するかは未だ不明な部分が多い。本研究ではDNase1L3の免疫細胞における機能を明らかにし、DNase1L3の機能低下がどのように自己免疫の活性化に繋がるのかを考察し、SLEの病態の理解を深めることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 免疫細胞におけるDNase1L3の発現：ヒト末梢白血球を各分画毎にsortingし、mRNAおよび蛋白の発現を比較検討する。
- (2) 免疫細胞でのDNase1L3の発現調節：無

刺激、TLRs刺激後、サイトカイン刺激後、cytosolic DNA/RNA刺激後、細胞死誘導後のTHP-1細胞のDNase1L3蛋白量をWBで解析する。さらに、樹状細胞や単球由来マクロファージなどのprimary細胞でも同様の検討を行う。

(3) DNase1L3の局在：

細胞外：無刺激、apoptosis誘導刺激後、pyroptosis誘導刺激後のヒト単球系白血病細胞株であるTHP-1細胞の培養上清を用いて、DNase1L3蛋白が検出できるか検討する。

細胞内：apoptosis誘導刺激後、pyroptosis誘導刺激後、細胞質内dsDNA刺激後のTHP-1細胞を経時的に融解する。核と細胞質に分離し、刺激前後で分布の違いがあるか否かをWestern-blotting(WB)法で検討する。また、樹状細胞や単球由来マクロファージなどのprimary細胞でも同様の実験を行う。

(4) DNase1L3リコンビナント蛋白の精製：DNase1L3にHis-tag配列を付加した発現用プラスミドDNAをHEK293T細胞へ遺伝子導入し、DNase1L3蛋白を強制発現させる。抗His抗体とカラムを用いて蛋白を精製する。

(5) DNase1L3の各種DNAに対するDNase活性の検討：ヒトnaked DNA, nucleosomal DNA, apoptotic DNA, ミトコンドリアDNA, ウイルスDNAまたは細菌DNAと精製したDNase1L3蛋白またはDNase1蛋白をCaイオン、Mgイオン存在下で反応させる。反応後アガロースゲルで電気泳動し、DNase活性を比較検討する。

(6) DNase1L3-knockdown細胞株の作製：DNase1L3のsiRNAスクリーニングで効率的な発現抑制を示した標的シーケンスをshRNA用のプラスミドに組み込みこむ。このDNase1L3-PLK0.1プラスミドをTHP-1細胞に導入し、knockdown細胞(DNase1L3-KD細胞)を確立する。

(7) DNase1L3の機能解析：

DNase1L3の核移行が見られた場合；apoptosis誘導刺激後やpyroptosis誘導刺激後の核DNA断片化を検討する。

DNase1L3の核移行が見られなかった場合；細胞質におけるDNA認識によるサイトカイン産生経路への影響について検討する。STING依存性の細胞質DNAの認識システムの刺激では、細胞質内へdsDNAをリポフェクションによって導入する。またエンドゾーム内のTLR9-MyD88依存性の経路の刺激ではCpG-Aで刺激する。刺激前後のIFN- γ 、TNF- α 、IL-6の産生をELISA法で測定する。

内因性ミトコンドリアDNAの処理：NLRP3インフラマソームの活性化においてはミトコンドリアDNAがミトコンドリアから細胞質へ放出されることが重要であることが報告されている(文献)。DNase1L3-KD THP-1細胞またはscramble control細胞をNLRP3リガンドで刺激をして、インフラマソームの活性化(IL-1 β 、IL-18、cleavage of caspase-1)を比較検討する。

4. 研究成果

(1)免疫細胞における DNase1L3 の発現：ヒト末梢白血球を cell sorting によって各分画に分離し、定常状態での DNase1L3 mRNA の発現を real-time PCR 法で解析した。好中球、T 細胞、B 細胞、NK 細胞、単球では同程度の発現が認められた。さらに樹状細胞を形質細胞様樹状細胞と骨髄系樹状細胞に分けて解析したところ形質細胞様樹状細胞において DNase1L3 の発現が最も高かった。蛋白の発現も同様の傾向が認められた。

(2) DNase1L3 の発現調節機構：単球、骨髄系樹状細胞、単球由来マクロファージにおいて IL-4 刺激は DNase1L3 の発現を顕著に亢進させた。また TLRs 刺激でも発現亢進が認められ、IL-4 との共刺激により相加的な効果が認められた。DNase1L3 のプロモータ領域と考えられる部位には IL-4 刺激によって誘導される転写因子 STAT6 の認識配列はなく、IL-4 受容体からの直接的な作用ではなく、間接的な影響である可能性も考えられた。

(3) DNase1L3 の細胞内外の局在；DNase1L3 を強制発現した HEK293T 細胞の培養上清中の DNase1L3 蛋白を WB 法で解析したところ、細胞内と同じ分子量の DNase1L3 蛋白を認めた。さらにその培養上清は naked DNA に対して DNase 活性を示し、コントロールプラスミドを導入した細胞の培養上清は活性も持たなかったことから、細胞外に分泌された DNase1L3 による作用であることが示された。また THP-1 細胞を用いて細胞内の局在を検討したところ、無刺激さらにアポトーシス誘導刺激後、pyroptosis 誘導刺激後、細胞質内 dsDNA 刺激後も核内には存在せず、細胞質内に局在していた。IL-4 誘導によって誘導される単球由来樹状細胞でも同様の結果であった。

(4) DNase1L3 リコンビナント蛋白の精製：DNase1L3 の C 末端に His-Tag を付加し、強制発現した HEK293T 細胞より DNase1L3 蛋白を精製し、純度をゲル染色で確認した。

(5) DNase1L3 の各種 DNA に対する DNase 活性の検討：得られた DNase1L3 は DNase1 と同様に Ca, Mg イオン存在下で naked DNA に対して DNase 活性を示すことを確認した。しかしその活性は DNase1 と比較して低かった。また、DNase1L3 は LL-37 と genomic DNA の複合体、NETs 由来 DNA、ウイルス DNA、細菌 DNA いずれに対しても DNase 活性を有するが、その活性も DNase1 と比して弱い傾向にあった。

(6) DNase1L3-knockdown 細胞株の作製：shRNA 法で THP-1 細胞において DNase1L3 蛋白の発現を抑制した細胞を作製した。しかし knockdown の効果は一時的で長期間維持できず、DNase1L3 が細胞の増殖や生存に必要な分子である可能性が示唆された。

(7) DNase1L3 の機能解析：

核での作用：上皮系腫瘍細胞とは異なり骨髄系細胞ではアポトーシス誘導刺激後に DNase1L3 蛋白の核への移行は認められず、

DNase1L3-KD-THP-1 細胞においてアポトーシス誘導刺激に伴う DNA ladder の形成は scramble control と同様であった。従って少なくとも骨髄系細胞においては上皮系細胞とは異なり、DNase1L3 はアポトーシス細胞の核 DNA の切断化には関与していないと考えられた。

細胞質での作用：DNase1L3-KD-THP-1 細胞において細胞質 DNA 及び M1 マクロファージにおいて CpG-A 刺激に対する IFN- γ 、TNF- α 、IL-6 産生は scramble control と同等であり、DNase1L3 は細胞質あるいは endosome の DNA 認識とそれに伴うサイトカイン産生には関与していないと考えられた。

内因性ミトコンドリア DNA の処理：DNase1L3-KD-THP-1 細胞を LPS+ATP または nigericin で刺激をして、インフラマゾームの活性化 (IL-1 β 、IL-18, cleavage of caspase-1) を検討したところ、scramble control 細胞とほぼ同等であり、DNase1L3 は NLRP3 リガンド刺激によってミトコンドリアから細胞質に放出されるミトコンドリア DNA の処理には関与していないと考えられた。

<引用文献>

Rice G, et al. Clinical and molecular phenotype of Aicardi-Goutieres syndrome. *Am J Hum Genet.* 2007 80(4):811-5

Al-Mayouf SM, et al. Loss-of-function variant in DNASE1L3 causes a familial form of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2011 43(12):1186-8

Wilber A, et al. Dnase1l3 deficiency in lupus-prone MRL and NZB/W F1 mice. *Clin Exp Immunol.* 2003 134(1):46-52

Nakahira K et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol.* 2011 12(3):222-30

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

中野 翔太, 三苫 弘喜, 猪口 翔一郎, 綾野 雅宏, 塚本 浩, 大田 俊一郎, 植木 尚子, 久本 仁美, 上田 彰, 押領司 大助, 廣崎 友里, 中川 仁, 村上 哲晋, 高木 綾子, 中山 剛志, 田中 淳, 赤星光輝, 有信 洋二郎, 新納 宏昭, 赤司 浩一、関節リウマチにおける血小板の活性化と活性化血小板が末梢血単核球に与える影響の解析、第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会、平成 27 年 4 月 23 日 - 25 日、名古屋

〔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

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K005447/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三苫 弘喜 (MITOMA, Hiroki)
九州大学病院 免疫・膠原病・感染症内
科・助教
研究者番号：60467909

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：