

令和 3 年 10 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08827

研究課題名(和文) TLR7/8の一本鎖核酸認識における制御分子基盤の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism involved in TLR7/8 response to ssRNA

研究代表者

柴田 琢磨 (Shibata, Takuma)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：30554505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス由来一本鎖RNA(ssRNA)を認識することと考えられてきたTLR7やTLR8であるが、最近の我々の報告より実際はssRNAの分解産物であるグアノシンとU含有オリゴヌクレオチドを認識するセンサーであることが解ってきた。本研究において、我々はエンドリソソーム内における核酸代謝関連遺伝子であるSLC29A3がTLR7の応答を実際に制御していることを示すと共に、同遺伝子の欠損が自己炎症性疾患を引き起こすことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TLR7やTLR8は抗ウイルス応答の誘導に加えて自己免疫疾患や自己炎症性疾患の原因となっていることが以前から示唆されている。しかし、生体内においてTLR7/8の過剰応答が誘導される原因は良く分かっていなかった。本研究では、TLR7/8によるssRNA認識に核酸代謝関連遺伝子が関与することを証明すると共に、それら遺伝子のマウスにおける機能欠損が生体内でのTLR7/8過剰活性化を引き起こすことも示された。以上の事実は、核酸代謝関連遺伝子の機能異常がTLR7/8応答を介した病態の発症につながることを示唆しており、今後ヒトにおいてTLR7/8が関与した疾患の発見につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：TLR7 in the endolysosome is a sensor for single-stranded RNA (ssRNA) from viruses and it induces antiviral immune response. In addition, this receptor also responds to synthetic small molecules such as R848 and Imiquimod. However, it remains unclear how and why TLR7 can sense these two distinct ligands. We have found that TLR7 recognized guanosine (G), in the presence of uridine-containing oligoribonucleotide (U-ORN). With U-ORN, G/dG synergistically activated TLR7 and induced cytokine production in macrophages and pDCs. These results strongly suggest that TLR7 recognizes degradation products of ssRNA, G and U-ORN, but not ssRNA itself. Additionally, we have found that SLC29A3 deficient mice, which lose nucleoside transporter in endolysosomes, show autoinflammatory disease in TLR7-dependent manner. Our findings reveal that TLR7 works as a guanosine sensor and the appropriate control of nucleoside metabolism is indispensable for preventing excessive TLR7 response in vivo.

研究分野：免疫

キーワード：Toll Like Receptor TLR7 TLR8 ssRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Toll like receptor (TLR) 7 および TLR8 はウイルス由来一本鎖 RNA を認識し、強力な抗ウイルス応答を誘導する。最近我々は、TLR7/8 が ssRNA 自体ではなく、ssRNA の分解産物であるヌクレオシドとオリゴヌクレオチドの両者を同時に認識して免疫応答を誘導するという知見を見出した。実際、ssRNA にグアノシンまたはウリジンを加えて免疫細胞を刺激することで、それぞれ TLR7 と TLR8 応答を相乗的に活性化する。しかし、細胞内においても ssRNA の分解が TLR7/8 応答に必須であるかに関しては分子機構も含めて全く不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、TLR7/8 の ssRNA 応答に関わる核酸分解・代謝関連分子群を同定し、TLR7/8 の活性化に ssRNA 分解が必須であることを実証する。また、生体におけるその意義の検証を行う。

3. 研究の方法

TLR7/8 の ssRNA 認識に関与する核酸分解および核酸代謝関連分子を CRISPR/CAS システムを利用することで同定した。また、同定した分子の生体における意義を作製したノックアウトマウスを用いて検証した。具体的には、以下の研究項目を行った。

CRISPR/CAS システムを用いた核酸代謝関連遺伝子と TLR7/8 応答との関係の検証
核酸分解・代謝関連分子ノックアウト (KO) マウスの作製・解析
ノックアウトライブラリーを用いた TLR7/8 応答関連分子の同定

4. 研究成果

平成 28 年度～平成 30 年度において、TLR7/8 の ssRNA 応答に関与する可能性のあるエンドリソソーム内核酸代謝関連分子の検証を *in vitro* および *in vivo* において行った。その結果、核酸トランスポーター SLC29A3 が TLR7 応答を制御する因子として見出された。SLC29A3 ノックアウト (KO) マウスを作製したところ、これらマウスでは顕著なマクロファージの増殖および蓄積 (Histiocytosis) を認めた。SLC29A3KO マウスにおける Histiocytosis は TLR7 とのダブル KO マウスにおいて完全に消失したことから、生体内において TLR7 依存的な Histiocytosis が引き起こされることが明らかとなった。以下、予定していた研究内容の達成度の詳細を記載する。

CRISPR/CAS システムを用いた核酸代謝関連遺伝子と TLR7/8 応答との関係の検証：TLR7/8 応答に関係がある可能性のある核酸代謝関連遺伝子に関して 40 種類以上のノックアウト (KO) 細胞を作製し、TLR7/8 応答に変化が認められるのか否かを検証した。その結果、核酸トランスポーター SLC29A3 の欠損細胞において TLR7 応答が変化することを見出した。

核酸分解・代謝関連分子ノックアウト (KO) マウスの作製・解析：
in vitro において TLR7 応答を制御することが示されていた核酸トランスポーター SLC29A3 KO マウスを作製し、同マウスでは Histiocytosis が生じることを示した。特に SLC29A3 KO マウスはヒト疾患モデルとしても知られており、Histiocytosis が TLR7 依存的であったことよりヒト疾患において TLR7 が治療ターゲットとなる可能性が示された。

ノックアウトライブラリーを用いた TLR7/8 応答関連分子の同定：
平成 28 年度に Ba/F3 レポーター細胞を、平成 30 年度に J774 レポーター細胞を用い、ノックアウトライブラリースクリーニングを行った。その結果、TLR7 を強制発現した Ba/F3 レポーター細胞を用いたスクリーニングでは、R848 による TLR7 活性化を制御する新規遺伝子を複数得ることができた (Sato R, Shibata T et al. II, 2017)。しかし、J774 レポーター細胞を用いたスクリーニングでは、ssRNA 応答にのみ関与する新規分子は未だ得られていない。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件)

Zhang Z, Ohto U, **Shibata T**, Taoka M, Yamauchi Y, Sato R, Shukla NM, David SA, Isobe T, Miyake K, Shimizu T.

“Structural Analyses of Toll-like Receptor 7 Reveal Detailed RNA Sequence Specificity and Recognition Mechanism of Agonistic Ligands.”

Cell Rep. 25(12):3317-3381.e5 (2018) (doi: 10.1016/j.celrep.2018.11.081.)

Furusho K, **Shibata T**, Sato R, Fukui R, Motoi Y, Zhang Y, Saitoh SI, Ichinohe T, Moriyama M, Nakamura S, Miyake K.

“Cytidine deaminase enables Toll-like receptor 8 activation by cytidine or its analogs.”

Int Immunol. in press (2018) (doi: 10.1093/intimm/dxy075.)

Sato R, Kato A, Chimura T, Saitoh S, **Shibata T**, Murakami Y, Fukui R, Liu K, Zhang Y, Ariei J, Sun-Wada G, Wada Y, Ikenoue T, Barber G, Manabe T, Kawaguchi Y & Miyake K.

“Combating herpesvirus encephalitis by potentiating a TLR3–mTORC2 axis”

Nature Immunology. 19:1071-1082 (2018) (doi: 10.1038/s41590-018-0203-2.)

Ishida H, Ohto U, **Shibata T**, Miyake K, Shimizu T.

“Structural basis for species-specific activation of mouse Toll-like receptor 9.”

FEBS Lett. 592(15):2636-2646 (2018) (doi: 10.1002/1873-3468.13176.)

Fukui R, Yamamoto C, Matsumoto F, Onji M, **Shibata T**, Murakami Y, Kanno A, Hayashi T, Tanimura N, Yoshida N, Miyake K.

“Cleavage of Toll-Like Receptor 9 Ectodomain Is Required for In Vivo Responses to Single Strand DNA.”

Front Immunol. 9:1491 (2018) (doi: 10.3389/fimmu.2018.01491)

Ohto U*, Ishida H*, **Shibata T***, Sato R, Miyake K, Shimizu T. (* equally contributed)

“Toll-like Receptor 9 Contains Two DNA Binding Sites that Function Cooperatively to Promote Receptor Dimerization and Activation”

Immunity. 48(4):649-658 (2018) (doi: 10.1016/j.immuni.2018.03.013.)

Miyake K, **Shibata T**, Ohto U, Shimizu T, Saitoh SI, Fukui R, Murakami Y.

“Mechanisms controlling nucleic acid-sensing Toll-like receptors.”

Int Immunol. 30(2):43-51 (2018) (doi: 10.1093/intimm/dxy016.)

Sato R*, **Shibata T***, Tanaka Y, Kato C, Yamaguchi K, Furukawa Y, Shimizu E, Yamaguchi R, Imoto S, Miyano S, Miyake K. (* equally contributed)

“Requirement of glycosylation machinery in Toll-like receptor responses revealed by CRISPR/Cas9 screening.”

Int Immunol. 29(8):347-355 (2017) (doi: 10.1093/intimm/dxx044.)

Saitoh S, Abe F, Kanno A, Tanimura N, Saitoh Y, Fukui R, **Shibata T**, Sato K, Ichinohe T, Hayashi M, Kubota K, Kozuka-Hata H, Oyama M, Kikko Y, Katada T, Kontani K, and Miyake K

“TLR7 mediated viral recognition results in focal type I interferon secretion by dendritic cells”

Nat. Commun. 8(1), 1592 (2017) (doi: 10.1038/s41467-017-01687-x.)

Murakami Y, Fukui R, Motoi Y, **Shibata T**, Saitoh SI, Sato R, Miyake K.

“The protective effect of the anti-Toll-like receptor 9 antibody against acute cytokine storm caused by immunostimulatory DNA.”

Sci Rep. 7: 44042. (2017) (doi: 10.1038/srep44042.)

Zhang Z, Ohto U, **Shibata T**, Krayukhina E, Taoka M, Yamauchi Y, Tanji H, Isobe T, Uchiyama S, Miyake K, and Shimizu T

“Structural analysis reveals that Toll-like receptor 7 is a dual receptor for guanosine and single-stranded RNA”

Immunity. 45(4):737-748 (2016) (doi: 10.1016/j.immuni.2016.09.011)

Miyake K, **Shibata T**, Ohto U, Shimizu T

“Emerging roles of the processing of nucleic acids and Toll-like receptors in innate immune responses to nucleic acids.”

J Leukoc Biol. 101(1):135-142 (2017) (doi: 10.1189/jlb.4MR0316-108R)

Tanji H, Ohto U, Motoi Y, **Shibata T**, Miyake K, Shimizu T.

“Autoinhibition and relief mechanism by the proteolytic processing of Toll-like receptor 8”

Proc Natl Acad Sci U S A. 113(11), 3012-3017 (2016) (doi: 10.1073/pnas.1516000113)

Shibata T, Ohto U, Nomura S, Kibata K, Motoi Y, Zhang Y, Murakami Y, Fukui R, Ishimoto T, Sano S, Ito T, Shimizu T, and Miyake K

“Guanosine and its modified derivatives are endogenous ligands for TLR7”

Int Immunol. 28(5), 211-22 (2016) (doi:10.1093/intimm/dxv062)

〔学会発表〕(計 4件)

- * 柴田 琢磨 「Guanosine and its analogs are endogenous ligands for TLR7」, 第39回 日本分子生物学会、2016年12月1~3日、パシフィコ横浜、日本
- * Takuma Shibata 「Nucleosides are endogenous ligands for TLR7 and TLR8」, Keystone Symposia, Viral Immunity: Mechanisms and Consequences(B4)、2017年2月19~23日、Santa Fe、USA
- * Takuma Shibata 「Guanosine sensing by TLR7 and its implication in inflammatory disease」, 第46回 日本免疫学会学術集会、2017年12月12~14日、仙台国際センター
- * 柴田 琢磨 「TLR7によるグアノシン認識とその病態における意義」, 第39回 日本炎症・再生医学会-炎症と再生の融合-, 2018年7月11~12日、京王プラザホテル

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1件)

名称:

発明者: 三宅 健介、柴田 琢磨

権利者: 三宅 健介、柴田 琢磨

種類: 特許

番号: 215043

出願年: 2017

国内外の別: 国内

○取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

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)研究分担者

研究分担者氏名: なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：佐藤 亮太、劉 凱文

ローマ字氏名：Ryota Sato, Liu Kaiwen

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。