

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16320

研究課題名(和文)がん細胞が発現する二本鎖RNAに対する自然免疫応答制御機構の解明

研究課題名(英文)Study about the innate immune response against double-stranded RNAs in cancer cells

研究代表者

町谷 充洋(Machitani, Mitsuhiro)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：90759523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：二本鎖RNA(double-stranded RNA: dsRNA)に対する自然免疫応答は、ウイルスなどの外来核酸に対する防御反応として広く知られているが、細胞内に自然免疫を誘導するdsRNAが内在的に存在するかは未解明である。本研究では、レポーター遺伝子としてLuciferase(Luc)遺伝子を発現させると同時に、Tet-ONシステムを用いて、Doxycycline添加時のみLuc mRNAに対するアンチセンスRNAを発現するコンストラクトを搭載した細胞を作製した。すなわち、内在性dsRNAの発現に重要である、センス鎖とアンチセンス鎖を同時に発現誘導可能な細胞の取得に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのdsRNA関連の研究は、外部から一過的に導入したdsRNAに対する自然免疫応答の研究が進められてきた。一方で、内在性dsRNAに着目した研究は少なく、内在性dsRNAに対する自然免疫応答、および、その制御機構に関しては未知の領域である。本研究では、外部からdsRNAを遺伝子導入するのではなく、独自に細胞内でゲノムからdsRNAを発現する細胞の作製に成功した。近年、内因性dsRNAに対する自然免疫誘導が、免疫チェックポイント阻害剤によるがん治療奏功に重要だと報告され始めていることから、本研究成果は、新たながん免疫賦活化法の開発に大きく貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Although the innate immune response against double-stranded RNA (dsRNA) is widely known as a protective response against exogenous nucleic acids in infection with RNA viruses, it remains unknown whether mammalian cells express endogenous dsRNAs that can induce innate immunity. In this study, we generated cells carrying a construct that constitutively expresses sense luciferase (Luc) mRNA and inducibly expresses antisense RNA against Luc mRNA. Thus, we succeeded to develop cells which can concurrently induce the expression of the sense and antisense strands of Luc genes, which are important for production of endogenous dsRNAs.

研究分野：分子生物学

キーワード：二本鎖RNA がん 自然免疫

## 1. 研究開始当初の背景

近年、がん細胞が発現する二本鎖 RNA (double-stranded RNA: dsRNA) が、細胞内の核酸センサー分子によって認識され、自然免疫を誘導すること、また、この自然免疫応答を RNA 編集酵素である ADAR1 が抑制していることが報告された。さらに、がん細胞での ADAR1 発現の抑制は、dsRNA による自然免疫誘導、ひいては、がん免疫賦活化につながることを示唆する報告がなされた。しかしながら、これらは ADAR1 による自然免疫応答の制御に着目した研究であり、肝心の「実際に細胞内に自然免疫を惹起しうる内在性 dsRNA が存在するか」に関して解析されなかった。さらに、細胞株を用いて ADAR1 をノックアウトしても、自然免疫は惹起されなかったことから、ADAR1 とは別の自然免疫抑制機構の存在が示唆された。

一方で、申請者の所属研究室は、テロメラーゼの触媒サブユニットとして知られる TERT が RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性を有することを発見し、アンチセンス RNA の合成を介して様々な生物学的現象に関わることを示してきた (Maida *et al. Nature*, 2009; Okamoto *et al. PNAS*, 2011; Maida *et al. Mol. Cell. Biol.*, 2014 他)。TERT によってセンス RNA から合成されたアンチセンス RNA は、dsRNA を形成すると考えられるので、内在性 dsRNA の存在が強く示唆された。

これまでの dsRNA 関連の研究は、dsRNA ウイルスに関する研究が中心だったこともあり、外部から一過的に導入した dsRNA に対する自然免疫応答の研究が、申請者を含めた多くのグループによって進められてきた (Machitani *et al. Sci Rep*, 2016; *Pharmaceutics*, 2011 他)。一方で、内在性 dsRNA に着目した研究は少なく、内在性 dsRNA に対する自然免疫応答、および、その制御機構に関しては未知の領域である。

## 2. 研究の目的

本研究では、外部から dsRNA を遺伝子導入するのではなく、独自に細胞内でゲノムから dsRNA を発現する細胞を作製する。さらに、本細胞を用いて、内在性 dsRNA が自然免疫を誘導するかどうかを明らかにし、内在性 dsRNA に対する自然免疫応答を抑制する機構の同定・解明を試みる。詳細は後述するが、Doxycycline (Dox) 依存的に dsRNA 発現を誘導できるシステムを用いることで、恒常的な自然免疫誘導による悪影響を排除する。このような発現誘導型の dsRNA 発現細胞は過去に報告されておらず、本研究は極めて独創性が高いと思われる。

背景で述べたように、dsRNA が自然免疫応答を惹起し、がん免疫賦活化につながることを示唆されている。そのため、本研究で内在性 dsRNA に対する自然免疫応答制御機構が解明されれば、新たながん免疫賦活化方法の開発につながることを期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) dsRNA 高発現カセットを有するレンチウイルスベクターの作製と細胞の樹立

レポーター遺伝子として Luciferase (Luc) 遺伝子を発現させると同時に、Luc mRNA に対するアンチセンス RNA を発現するレンチウイルスベクターを作製する。この時、恒常的にアンチセンス RNA を発現させると自然免疫応答が過剰に誘導されてしまう可能性があるため、Tet-ON システムを用いて、Dox 添加時のみアンチセンス RNA が発現するように設計する。さらに、本システムを用いることで、Dox の濃度でアンチセンス RNA の発現量を制御することが可能であり、解析の際に条件を微調整することが可能になる。

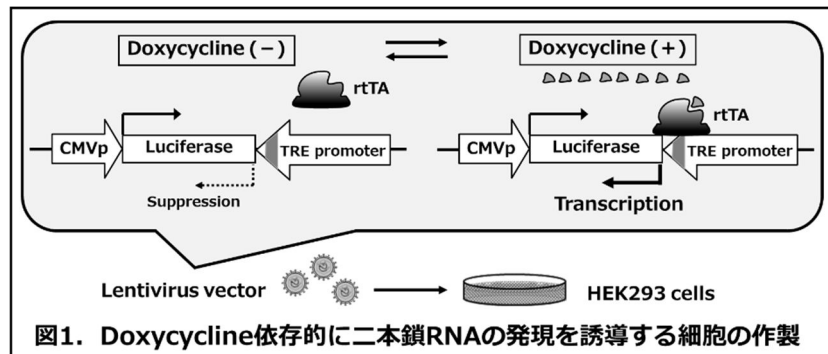
### (2) 作製した細胞における dsRNA 発現の確認

様々な濃度の Dox で本細胞を処理し、Luc mRNA、および、アンチセンス RNA の発現を解析する。細胞内で発現させた dsRNA は細胞内で分解される可能性がある。そこで、Dox 濃度依存的にアンチセンス RNA を発現誘導することで、Luc mRNA 発現量・安定性に影響があるか解析する。

## 4. 研究成果

内在性 dsRNA に対する自然免疫応答、および、その制御機構に関しては未知の領域である。そこで、本研究では、内在性 dsRNA を解析する系を構築するために、外部から dsRNA を遺伝子導入するのではなく、細胞内でゲノムから dsRNA を発現する細胞の作製を試みた。まず、レポーター遺伝子として Luciferase (Luc) 遺伝子を発現させると同時に、Tet-ON システムを用いて、Doxycycline 添加時のみ Luc mRNA に対するアンチセンス RNA を発現するコンストラクトを搭載したレンチウイルスベクター (LV) を作製した。また、導入細胞をセクションするために、本ベクターにはマーカー遺伝子として、Kusabira-Orange (KO)

遺伝子も搭載した。本 LV を増幅・精製し、HeLa 細胞に導入したところ、遺伝子導入細胞における KO 遺伝子の発現を確認した。そこで、フローサイトメーターを用いて、KO 遺伝子を発現する遺伝子導入細胞をソーティングし、得られた遺伝子導入細胞における Luc 遺伝子の発現を解析したところ、Doxycycline 添加によって、Luc 遺伝子のセンス鎖だけでなく、アンチセンス RNA の発現も確認した。以上より、内在性 dsRNA の発現に重要である、センス鎖とアンチセンス鎖を同時に発現誘導可能な細胞の取得に成功した (図 1)。本細胞を用いることで、内在性 dsRNA に対する自然免疫応答に関する新たな知見を得ることができると期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Mitsuhiro Machitani, Kenkichi Masutomi
2. 発表標題 Phosphorylated hTERT regulates expression of a tumor suppressor gene.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------