

機関番号：84420

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2009～2010

課題番号：21890125

研究課題名（和文）新規細胞膜透過性シグナルポリペプチドの臨床応用と細胞活性化機序の解明に関する研究

研究課題名（英文）Research on mechanism of a novel signal polypeptide-induced innate immune activation.

研究代表者

小檜山 康司（KOBAYAMA KOUJI）

独立行政法人医薬基盤研究所研究員

研究者番号：50547700

研究成果の概要（和文）：本研究では、新たに作製した細胞膜透過性ポリペプチドである、N'-CARD-PTD の自然免疫活性化機序の解明、そして臨床応用に向けて生体内でのアジュバント効果に関して詳細なメカニズムを明らかにする事を目的としている。これまでに我々は、ヒストン H2B が二本鎖 DNA からの自然免疫活性化に関与している事を明らかにしている。そこで、自然免疫応答に重要な役割を担っている IPS-1 の CARD とヒストン H2B の核移行シグナルとの融合分子 N'-CARD を作製する事で、新規自然免疫活性化分子の作製に成功した。実際に、N'-CARD は nuclear DNA helicase II (NDH) を介して強く自然免疫応答を活性化する事を明らかにしている。今回の研究では、protein transduction domain を付加させた N'-CARD-PTD が TLR 非依存的に、I 型インターフェロン依存的に樹状細胞を活性化する事を明らかにした。また、ワクチンのアジュバントとしては Th1 型に免疫応答をシフトさせる事が示され、抗原を選択する事なく強力なアジュバントとして働く事が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this research is to clarify mechanism of a novel signal polypeptide (N'-CARD-PTD)-induced innate immune activation and adjuvanticity of N'-CARD-PTD. Previous research we identified histone H2B is involved in dsDNA-mediated innate immune activation. Recently we synthesized the newly fusion protein, N'-CARD (nuclear localization signal of H2B fused CARD of IPS-1), activated nuclear DNA helicase II (NDH)-mediated innate immune responses. In this research, we clarify that protein transduction domain fused N'-CARD (N'-CARD-PTD) activated dendritic cells depend on type I IFN, but not TLRs. As a vaccine adjuvant, N'-CARD-PTD strongly induced antigen specific antibody response against various antigen.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総 計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：感染免疫学

科研費の分科・細目：ウイルス学

キーワード：アジュバント、I 型 IFN、自然免疫

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、様々な感染症に対するワクチン開発が行われているが、生ワクチンは限られた病原体にしか用いられず、安全性の面からコンポーネントワクチンが主流となっている。しかしながら、コンポーネントワクチンでは免疫原性が低く、感染症を防ぐのに十分ではない。そのため、効果的なワクチン開発のみならず、新たなアジュバントの開発も重要な課題である。ワクチンのアジュバントはワクチンの効果の増強、そして安全性向上のためにも必須であるが、国内ではアルミニウム化合物のみ用いられている。しかしながら、アルミニウム化合物では十分な効果の得られない感染症も多い。そのため、新たな作用、そして効果の異なるアジュバントの開発が重要であり、世界中で開発研究が行われている。

(2) 自然免疫応答が獲得免疫応答に必須である事が、自然免疫研究の発展に伴い明らかとなってきた。実際に、自然免疫受容体である Toll 様受容体 (TLR) のリガンドが強いアジュバント活性を有している事が示されている。そこで我々は、自然免疫活性化分子を作製する事で新たなアジュバントの開発を試みた。自然免疫応答に重要な役割を担っている、interferon- β stimulator 1 (IPS-1) の caspase recruitment domain (CARD) にヒストンの核移行シグナルを付加させた N' -CARD を作製し、この N' -CARD が強く I 型インターフェロン産生を誘導し、自然免疫応答を活性化することを明らかにした。また、N' -CARD は Nuclear DNA helicase II (NDH) を介して自然免疫応答を活性化している事も明らかにした。次に、生体内に投与する為に Protein Transduction Domain (PTD) を付加させ細胞透過性を向上させた N' -CARD-PTD ポリペプチドをバキュロウイルスの系を用いて作製、精製した。この作製した新規ポリペプチドは自身で細胞外から細胞内に移入する事が可能となり、マウスインフルエンザモデルを用いて N' -CARD-PTD のアジュバント効果について検討したところ、ワクチンのみ投与した群に比べ高い抗体価、強い感染防御能が確認された。マウス腫瘍モデルにおいても、N' -CARD-PTD をアジュバントとして添加する事で、腫瘍の退縮を誘導したことから、N' -CARD-PTD はワクチンアジュバントとして有用である事が示唆された。

2. 研究の目的

(1) 我々が開発した新規細胞透過性ポリペプチド、N' -CARD-PTD の臨床応用の為に、効率的な精製方法の確立、ワクチン抗原との至適な投与方法の確立、細胞活性化機序を明

らかとすることで、免疫調節薬、ワクチンのアジュバントとして臨床応用することを目的とする。

(2) 我々は、N' -CARD-PTD が NDH と相互作用して細胞を活性化することを明らかにしている。そこで、NDH が細胞のどこに局在し、I 型インターフェロン産生シグナル分子と相互作用し自然免疫を活性化するのか分子生物学的、生化学的に検討する。また、NDH は N' -CARD-PTD 以外に、どのようなリガンドによる自然免疫活性化に関与しているか、特にウイルス感染における役割について細胞レベルで解析、自然免疫応答の作用機序を明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) これまでに作製した N' -CARD-PTD が抗ウイルス活性を有しているかを明らかにするために、繊維芽細胞である HEK293 細胞に N' -CARD-PTD を添加した。その後 RNA ウイルスである、水疱性口内炎ウイルス (VSV) または脳筋炎ウイルス (EMCV) を感染させ、24 時間培養し、その後のウイルス力価を測定した。

(2) N' -CARD-PTD がインフルエンザワクチンや腫瘍抗原に対するアジュバントとして働く事は明らかとなっていたが、他の抗原での検討は行っていなかった。実際に、LacZ タンパクを抗原としてマウスに LacZ のみ、または LacZ と N' -CARD-PTD を共に免疫し、その後の抗原特異的抗体価を ELISA 法にて測定した。

(3) N' -CARD-PTD による自然免疫活性化の詳細なメカニズムを明らかにするために、野生型または、TLR ファミリーのアダプター分子である MyD88 と TRIF のダブルノックアウトマウス (DKO) 由来樹状細胞に N' -CARD-PTD で刺激を行い、その後の樹状細胞上の表面マーカーの発現量を FACS で測定した。

(4) NDH による自然免疫シグナル活性化のメカニズムを明らかにするため、NDH に特異的な siRNA を用いて様々な自然免疫活性化アゴニストで刺激をし、I 型インターフェロンプロモーターの活性化をレポーター遺伝子アッセイを用いて測定した。

(5) NDH による自然免疫応答活性化のメカニズムを明らかにするために、共焦点顕微鏡を用いて NDH の局在を IRF3 のリン酸化酵素である、TBK1 や IKKi と共に観察した。

4. 研究成果

(1) HEK293 細胞を N' -CARD-PTD で処理する事により有意にウイルス力価が低くなっていた。これにより、N' -CARD-PTD は非免疫細胞を活性化し、I 型インターフェロン産生を誘導することで、ウイルス感染、複製を抑制していることが示唆された。

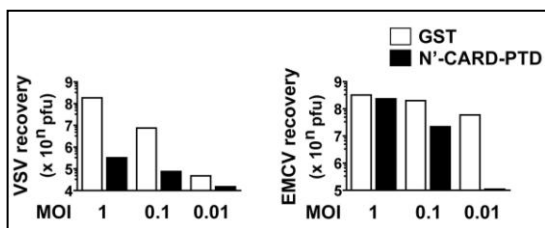


図 1. N' -CARD-PTD はウイルスの複製を抑制する。HEK293 細胞を N' -CARD-PTD (50 μ g/ml) で処理し、48 時間後に VSV、または EMCV (MOI = 1, 0.1, 0.01) を感染させた。24 時間後、細胞と培養上清を回収し、プラークアッセイを行い、ウイルス力価を測定した。

(2) LacZ 単独免疫群に比べ、N' -CARD-PTD と共に免疫する事により、強く抗原特異的抗体価の上昇が確認された。特に IgG2a が強く誘導されていたことから、抗原を選択することなく、Th1 型のアジュバントとして働く事が示唆された。

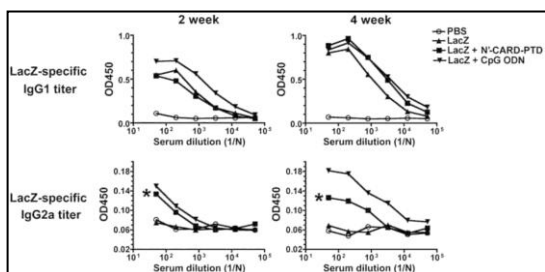


図 2. N' -CARD-PTD は LacZ 特異的 Th1 反応を誘導する。BALB/c マウスに LacZ (5 μ g)、LacZ + N' -CARD-PTD (5 μ g)、LacZ + CpG ODN (5 μ g) を皮下に投与した (0, 2 週目)。免疫後 2, 4 週目に採血し、採取した血清を用いて ELISA を行った。

(3) N' -CARD-PTD での刺激により、野生型のマウス由来の樹状細胞同様、MyD88/TRIF DKO 由来の樹状細胞でも IFN- α 、IFN- β 、IL-12 p40 の産生が確認された。また、樹状細胞の表面マーカーである CD40 と CD86 の発現量を FACS で解析したところ、MyD88/TRIF DKO 由来の樹状細胞においても、発現量の増大が確認された。MyD88/TRIF 由来の樹状細胞では TLR9 のリガンドである CpG ODN 刺激による、サイトカイン産生、樹状細胞の活性化が確認されなかったことから、TLR 非依存的に N' -CARD-PTD は自然免疫応答を活性化している事が示唆された。

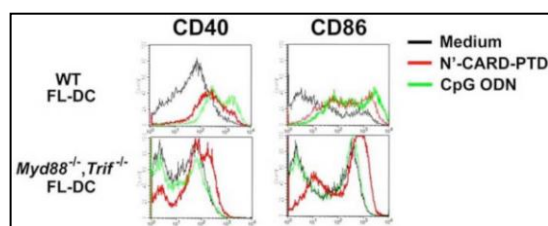


図 3. N' -CARD-PTD は TLR 非依存的に樹状細胞の成熟を誘導する。WT または *Myd88*^{-/-}, *Trif*^{-/-} マウス骨髄由来細胞を GM-CSF を用いて分化させ、N' -CARD-PTD (50 μ g/ml)、または CpG ODN (10 μ g/ml) で処理し、48 時間後の CD40、CD86 の発現レベルを FACS を用いて解析した。

(4) NDH 特異的 siRNA 細胞を処理し、その後 dsDNA で刺激を行った結果。dsDNA による I 型インターフェロンプロモーターの活性化が抑制された。この結果により、NDH な N' -CARD のみではなく、他の経路においても自然免疫応答に関与している可能性が示唆された。

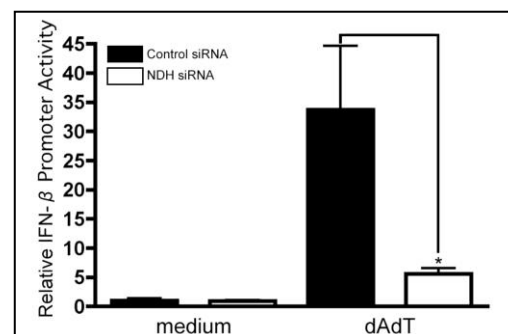


図 4. NDH は dAdT による IFN- β プロモーターの活性化に関与している。Control または NDH に特異的な siRNA をトランスフェクションした HEK293 細胞に、TK-RL と IFN- β -FFL をトランスフェクションし、その後、dAdT で刺激し、24 時間後ルシフェラーゼアッセイを行った。*, $p < 0.05$

(5) 共焦点顕微鏡を用いて NDH の局在を観察したところ、NDH が核に局在している事が明らかとなった。また一部は細胞質にも局在しており、TBK1 や IKKi とのリン酸化酵素との共局在が確認された。また、免疫沈降法により、分子間相互作用を確認したところ、NDH は TBK1 や IKKi と相互作用している事が明らかとなった。これらの結果により、N' -CARD-PTD は核に移行する事で NDH を介し、TBK1 や IKKi を活性化、IRF3 のリン酸化を誘導する事で、I 型 IFN 産生を誘導している事が示唆された。

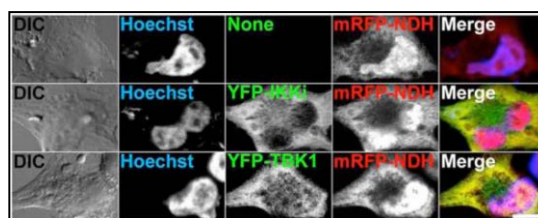


図 5. NDH は細胞質で IKKi、TBK1 と共局在している。HeLa 細胞に mRFP-NDH 発現 plasmid のみ、または YFP-IKKi、YFP-TBK1 発現 plasmid と共にトランスフェクションした。48 時間後

ゲノム DNA を染色するために、Hoechst 33258 を添加し、共焦点顕微鏡を用いて観察を行った。スケールバー = 10 μ m

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 4 件)

- ① Jounai N, Kobiyama K, Shiina M, Ogata K, Ishii KJ, and Takeshita F. NLRP4 negatively regulates autophagic processes through an association with Beclin1. *J. Immunol.*, 186: 1646-1655, 2011. 査読あり
- ② Kobiyama K, Jounai N, Ishii KJ, Horii T, Suzuki K, Ryo A, and Takeshita F. Modulation of intracellular signaling using protein transduction technology. *Crit Rev Immunol.*, 30: 395-421, 2010. Review. 査読あり
- ③ Koyama S, Aoshi T, Tanimoto T, Kumagai Y, Kobiyama K, Tougan T, Sakurai K, Coban C, Horii T, Akira S, and Ishii KJ. Plasmacytoid dendritic cells delineate immunogenicity of influenza vaccine subtypes. *Sci Transl Med.*, 2, 25ra24, 2010. 査読あり
- ④ Kobiyama K, Takeshita F, Jounai N, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Ishii KJ, Kawai T, Sasaki S, Hirano H, Ishii N, Okuda K, and Suzuki K. Extra-chromosomal histone H2B mediates innate antiviral immune responses induced by intracellular double-stranded DNA. *J. Virol.*, 84: 822-832, 2010. 査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)

- ① Kobiyama K, Takeshita F, Jounai N, Suzuki K, and Ishii KJ.

Extra-chromosomal histone H2B mediates innate antiviral immune responses induced by intracellular double-stranded DNA. 14th International Congress of Immunology. August 22-27, 2010, Kobe, Japan.

〔図書〕(計 3 件)

- ① 小檜山 康司、石井 健、DNA センサーとその生理的意義、細胞工学、Vol.29 No.10 (2010.9.22) 1004-1013
- ② 小檜山 康司、石井 健、自然免疫とワクチン開発、医学のあゆみ、Vol.234 No.5 (2010.7.31) 608-614
- ③ 小檜山 康司、石井 健、アジュバントに関する最新の話、臨床と微生物、37 巻 (2010) 003-010

〔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 2 件)

名称：染色体外ヒストン H2B を介する二本鎖 DNA 認識機構の利用
発明者：武下文彦、小檜山康司、吉田篤司
権利者：公立大学法人横浜市立大学
種類：
番号：特開 2011-109982
取得年月日：2011-06-09
国内外の別：国内

名称：カスパーゼリクルートメントドメインを応用した新規リコンビナントタンパク及びその用途
発明者：武下文彦、小檜山康司、奥田研爾
権利者：公立大学法人横浜市立大学
種類：
番号：WO 2010/024118
取得年月日：2010-03-04
国内外の別：国際

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

()

研究者番号：

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：