

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19440

研究課題名(和文) OAS1-RNaseL axisの操作によるウイルス制御にむけての挑戦的研究

研究課題名(英文) Study on control of viral infection by manipulation of OAS1-RNaseL axis

研究代表者

森尾 友宏 (Morio, Tomohiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30239628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：OAS1-RNaseL系はウイルス防御において重要な役割を果たすが、その活性化は細胞傷害を惹起する。コウモリでは主たる抗ウイルス機能を担う。ヒト肺胞基底細胞上皮由来、単球由来、線維芽細胞株、コウモリ由来細胞株(TB1Lu)を用いてOASアイソフォームの発現解析を行った。TB1LuではOAS3のみが発現していた。またヒト由来細胞株でOAS1, 2, 3をそれぞれKOしてRNaseL活性を検討したところ、OAS3欠失で活性はほぼ消失した。コウモリ由来単球、DC等を解析するためiPS細胞樹立を試み、またOAS1 GOF病態へのRNaseLの関与を解明するため、同酵素KO iPS細胞を作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

OASの発現調節、OAS1GOF変異の病態におけるRNaseLの関与、コウモリ免疫細胞系でのOASの働きを検討する基礎的なtoolを揃えたことは1つの成果である。本研究ではまた、ヒトの肺胞上皮細胞や単球系細胞で、OAS3がRNaseL活性制御で重要な役割を果たしている可能性を提示した。さらにコウモリの肺上皮細胞由来細胞でもOAS3が主として発現していたことから、今後抗ウイルス活性/RNaseL活性制御においてOAS3へのアプローチが必要になることを示唆する所見を得た。OASは各種RNAウイルスへの生体防御や、炎症反応に関与しており、今後さらに研究が広がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The OAS1-RNaseL system plays an important role in viral defense mechanisms, but its activation also induces cellular injury. The OAS-RNaseL system is the primary antiviral function in rodents and bats, and it is not yet clear how the system works without minimal cellular damage in the species. Expression analysis of OAS isoforms in human alveolar basal cell epithelium-derived, monocyte-derived, fibroblast-derived, and bat-derived cell lines (TB1Lu) revealed that only OAS3 is expressed in TB1Lu. In addition, RNase L activity of OAS1, 2, and 3 in human-derived cell lines was examined by knocking-out each one of them. This revealed that the activity was almost abolished by OAS3 deletion. To analyze bat-derived monocytes and DCs, we attempted to establish iPS cells from TB1Lu. To directly elucidate the involvement of RNaseL in OAS1 gain-of-function mutations, we generated RNaseL KO iPS cells harboring the patient's mutation.

研究分野：免疫学

キーワード：ウイルス感染症 自然免疫 RNA分解 タイプIインターフェロン 種差

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

応募者は OAS1(2'-5'-oligoadenylate synthetase 1)変異患者の primary 細胞や患者由来 iPS 細胞の解析から、ヒト OAS1 が定常状態で ON になり、さらに呼吸器感染症に罹患して活性が増強すると、全身炎症が惹起され、一方炎症の基点となるマクロファージが細胞死に至ることを明らかにした。

OAS1 により生成した 2'-5'OligoA は RNaseL と会合し、活性化して、RNA ウイルスを切断する。一方 OAS1 の活性化、RNaseL の作用により rRNA が分解されて、広範な翻訳抑制が惹起される。切断されたウイルスは RIG-I, MDA5(IFIH)経路を刺激して type I, type III インターフェロン (IFN) を産生する。OAS1 の過剰活性化は、ウイルス排除と共に、タンパク合成休止による細胞死という結果を生み出す。感染細胞の細胞死は合目的であるが、OAS1 が活性化したその他の細胞の障害は、生体に不利となる。

RNaseL は強力な一本鎖 RNA 切断能力を有し、齧歯類やコウモリでは主たるウイルス防御機構となっている(齧歯類では 8 つの OAS1 isoform を有する)。ヒトでは、OAS1-RNaseL 経路を危険と見なし、1 つのアイソフォームを発現するのみで、LOF のバリエーションも多い。OAS1 がなくても RNA ウイルスに対応できる獲得免疫システムを有している。しかし、**未知のウイルスとの遭遇過程において、OAS1 が必要な場合があるのではないか？** OAS1-RNaseL 経路を適切に操作できれば、RNA ウイルスに対する強力な治療手段となる可能性がある。一方で、正常細胞へのリスクは最小限にすることが必須である。

2. 研究の目的

研究当初の目的は以下の通りである。

本研究では、OAS1-RNaseL 系の理解、そして操作の可能性に向けて、基礎的データを収集する。応募課題ではまず、OAS1 の発現誘導機構や、発現抑制機構について、また OAS1 によりどの程度の RNaseL 活性が誘導されるか、誘導された RNaseL による感染細胞、bystander 細胞への影響について検討を行う。具体的には以下の方法で検討することを計画した。

#1 OAS1 発現誘導・抑制機構の解明

A549 (ヒト肺基底上皮腺癌細胞由来) を感染細胞モデルに、ヒト単球細胞株 THP-1 を bystander 細胞のモデルとする。A549 細胞及び THP-1 細胞を用い、CRISPR/Cas9 にて OAS1 に HiBiT を tagging することにより発現を LgBiT で検出するシステムを構築する。発現誘導解析に当たっては、(A)OAS1 のプロモーター解析から cis エlement を絞り込み、Yeast one hybrid システムで会合する分子を同定する方法と(B) OAS1 の 5'領域、3'領域を含む上記細胞株に、barcoding された cDNA ライブラリーを transfect して、発現誘導に関与する分子を同定し、pathway 解析や転写因子の絞り込みを行う方法、の 2 つの手法を用いる。

ヒトと齧歯類、ネズミ目では PolyIC あるいは IFN 刺激後の OAS1 の発現の差異 (ヒトでは著しく減弱) があることから、異なる細胞腫からの細胞株を用いての比較検討も行う。発現抑制については、刺激後細胞を用いて、同様の手法で OAS1 の発現抑制に関わる分子を同定し、また OAS1 の安定化、分解に関与する分子の同定も試みる。

#2 RNaseL による感染細胞死、RNaseL による bystander 細胞傷害保護機構の解明

まず RNaseL の発現レベルを正確に定量測定するために、A549 細胞、THP1 細胞を用いて HiBiT 系で感度良く検出するシステムを構築する。また 2'-5' adenylyl-oligosynthetase をタンパク導入系で直接細胞に導入して、RNaseL 活性を誘導し、高感度 rRNA degradation アッセイを構築して測定する。これに

対して cDNA ライブラリーを導入し、RNaseL 活性を増強、あるいは減弱させる分子を同定する。Bystander 細胞での特異的 rRNA 阻害分子については更に研究を進める。候補分子を用いて特異的に rRNA の分解阻止が行えるかどうかの検証を行う。RNaseL と会合する分子について、Yeast two hybrid システムを用いて明らかにし、異なる種における差異を明らかにする。

研究を進めるにあたり、さらに以下を主体とした解析を深掘りすることにより、OAS 全体の基本的性格を探索することを目的とした。

#3 OAS1, 2, 3 の各細胞株における機能的差異の検討

THP-1 細胞、A549 細胞、HT1080 細胞、コウモリ由来細胞(TB1Lu)における OAS isoform の発現と RNaseL 活性を検討する。

#4 さらなる解析にむけたコウモリ由来細胞(TB1Lu)由来 iPS 細胞の樹立

コウモリ由来の単球やそのほかの細胞種の検討を行えるように、iPS 細胞樹立条件を検討する。

3 . 研究の方法

1) OAS1 発現誘導・抑制機序解明に向けた HiBiT Tag システムの構築

A549 細胞、THP-1 細胞において OAS1 に HiBiT をタグ付けし、発現解析を行える系を構築する。

2) OAS1, OAS2, OAS3 isoform 発現とその機能的差異の検証

各種細胞を用いて OAS1, 2, 3 の発現を比較する。また各種細胞において OAS1, 2, 3 をそれぞれ knock-out する。KO 細胞においては好感度 RNA degradation 系を用いて RNaseL 活性を検討する。

3) コウモリ由来細胞とヒト由来細胞の差異の検討

HT1080 と TB1Lu を用いて OAS 発現解析を行う。

4) コウモリ由来 iPS 細胞作成の試み

転写因子の最適化により iPS 細胞樹立条件を検討する。

5) OAS1 変異患者における RNaseL 欠失の作用の検証

OAS1 変異を誘導した iPS 細胞において RNaseL を knock out して、その機能を検証する。

4 . 研究成果

1) OAS1 発現誘導・抑制機序解明に向けた HiBiT Tag システムの構築

THP-1 細胞株についてはまず、IFN 応答性を検証した。使用予定の 2 種類の細胞株、A549、HT1080 を用いて type I IFN 誘導性に OAS1, RNaseL の発現が確認されるかについて予備実験を行った。次いで、A549 細胞及び THP-1 細胞を用い、CRISPR/Cas9 にて OAS1 に HiBiT を tagging することにより、発現を LgBiT で検出するシステムの構築に向けて、コンストラクトの作成を開始した。また OAS1 発現誘導/抑制機構については、公的データベースから得た情報をもとに、発現調節に関わる領域及び会合する転写因子候補についての情報を取得した。本検討については、2) の研究成果により、いったん pending とした。

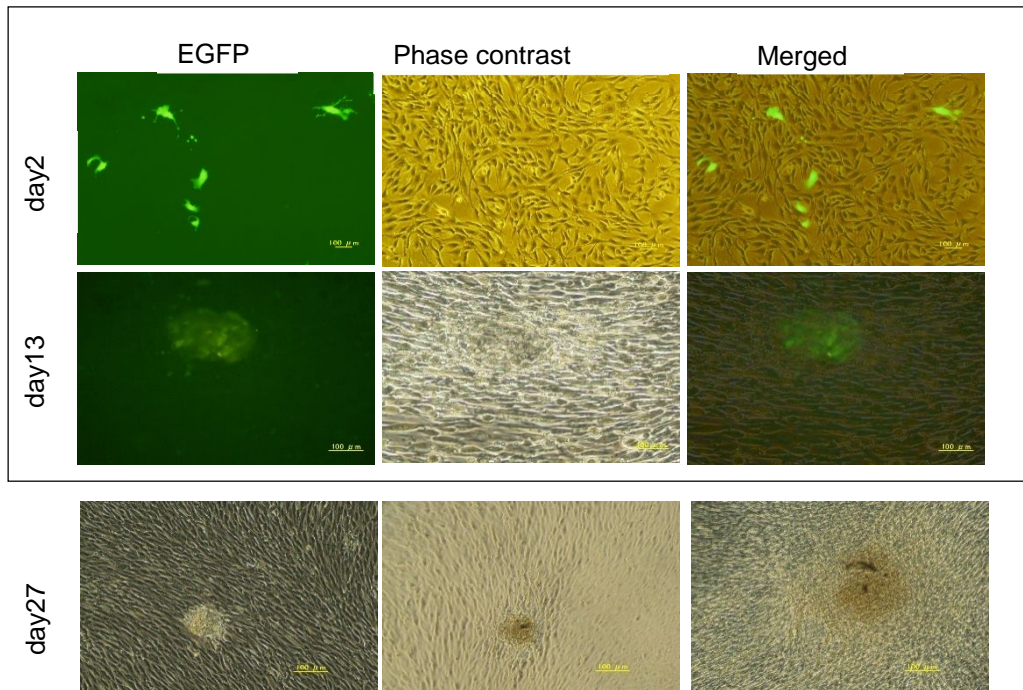
2) OAS1, OAS2, OAS3 isoform 発現とその機能的差異の検証及び 3) コウモリ由来細胞とヒト由来細胞の差異の検討

A549 細胞、THP-1 細胞、コウモリ由来細胞(TB1Lu)等を用いて基礎的データを収集した。A549、THP-1 にて OAS1, OAS2, OAS3 をそれぞれ KO し、Poly-IC あるいは WNV で刺激し、高感度 RNA degradation 解析を行ったところ、OAS1, OAS2 KO では RNA 分解に影響がなかった。A549 では OAS3 KO でのみ RNaseL 活性が低下し、THP-1 細胞では OAS3 KO でのみ RNaseL 活性が消失した。これらは各細胞株で OAS3 が主たる RNaseL inducer であることを示唆するデータである。

TB1Lu 細胞についてはまた OAS, RNaseL の遺伝子配列解析を確認すると共に、OAS1 抗体、RNaseL 抗体がそれぞれ work するか検討を行った。また同細胞において OAS1 アイソフォーム、OAS2、OAS3 の発現を検討したところ、予想に反し、TB1Lu では OAS3 のみが発現していた。コウモリ細胞においても OAS3 が主たる OAS である可能性があることが明らかになった。

4) コウモリ由来 iPS 細胞作成の試み

今後、単球、マクロファージ、樹状細胞 (DC) における検討が重要と考え、TB1Lu (NBL-12) から iPS 細胞を樹立するべく、検討を開始した。OCT3/4, KLF4, SOX2, CMYC, NANOG, LIN28 を搭載した SRV-iPC4-vector を用いたが、現時点では small cluster 形成が認められるものの、形態上は iPS 細胞とはまだ乖離がある状況である。



5) OAS1 変異患者における RNaseL 欠失の作用の検証

私たちが報告した OAS1 異常症の解析では、RNaseL 阻害薬であるクルクミンによる単球系細胞死の阻害を示している。より直接的に、RNaseL 活性亢進の細胞死への関与を検討するため、野生型、L198V、C109Y iPS 細胞で、RNaseL を KO した。これらの iPS 細胞では複数以上のクローンをとることができ、単球系への分化実験にまで進んだ。

2) ~ 5) の検討では、OAS1, 2, 3 で更に機能の違いを検討する余地があることが判明し、また TB1Lu では OAS3 の発現が優位であることから、OAS3 の機能について、特にその初期抗ウイルス応答における機能について検討する必要性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Magg T, Okano T, Koenig LM, Boehmer DFR, Schwartz SL, Inoue K, Heimall J, Licciardi F, Ley-Zaporozhan J, Ferdman RM, Caballero-Oteyza A, Park EN, Calderon BM, Dey D, Kanegane H, Cho K, Montin D, Reiter K, Griese M, Albert MH, Rohlf M, Gray P, Walz C, Conn GL, Sullivan KE, Klein C, Morio T, Hauck F.	4. 巻 6
2. 論文標題 Heterozygous OAS1 gain-of-function variants cause an autoinflammatory immunodeficiency.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Immunol.	6. 最初と最後の頁 eabf9564.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciimmunol.abf9564.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Morio T.
2. 発表標題 Elucidation of the molecular pathogenesis of human inborn errors of immunity.
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of Japanese Society of Immunology
4. 発表年 2021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
---------	---------