

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890088

研究課題名（和文） 細胞内 DNA センサーの探索とその機能解析

研究課題名（英文） Searching and functional analysis of an intracellular DNA sensor

研究代表者

茂谷 康 (KOU MOTANI)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：70609049

研究成果の概要（和文）：自己の不要となった DNA が分解されずに細胞内に蓄積すると、慢性的な炎症により関節リウマチが発症する。本研究は自己の DNA による炎症誘導機構の解明を目的とした。未知の細胞内 DNA センサーを同定するため DNA の刺激に強く応答する細胞の選別を行ったところ、DNA に対する応答性が非常に高い細胞を単離することに成功した。また、STING という分子が 自己の DNA による炎症応答に関与しており、DNA の刺激に応じて二量体化し活性化されることを見出した。

研究成果の概要（英文）：Accumulation of undigested self-DNA in cells causes chronic inflammation and rheumatoid arthritis. The purpose of this study is to elucidate the mechanism in which undigested self-DNA is recognized and causes inflammation. To identify an unknown intracellular DNA sensor, cells were screened and I obtained cell clones which produced high amount of inflammatory cytokines in response to DNA. Moreover, I found that STING molecule was activated by DNA and required for self-DNA-induced inflammatory response.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：STING

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの身体では毎日不要となった死細胞の DNA がマクロファージにより分解されてい

る。我々の研究室では、DNA 分解酵素である DNase II の欠損はマクロファージ内での DNA の蓄積およびそれに伴う自然免疫応答の持続的活性化による炎症を誘導し、関節リウ

マチを引き起こすことを明らかにした。この知見より、マクロファージには死細胞由来の未分解 DNA を認識し自然免疫応答を誘導する「DNA センサー」が存在していると考えられたが、現在まで真の DNA センサーと呼ばれる分子は見つかっていない。また、STING と呼ばれる分子は DNA センサーそのものではないが、病原体由来の DNA に対する自然免疫応答に重要な分子であることが既に報告されている。しかしながら、STING の活性化因子や活性化機構、および自己の DNA に対する応答に関しての役割は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では未分解の自己の DNA がマクロファージを活性化するメカニズムを明らかにし、ヒトの関節リウマチの病態の解明や治療につなげるための基盤研究を行う。特に DNA を認識する未知の DNA センサーを探索、同定し、その機能解析を行うとともに、関節リウマチの病態への関与を調べることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞内 DNA センサーの探索

DNA を認識するセンサーの探索を発現クローニング法により行い、細胞内に存在する DNA センサーの実体を明らかにする。具体的には、DNA によく応答する細胞から遺伝子発現ライブラリーを作製し、これを応答性の低い細胞に導入する。応答性が高くなった細胞のみを網羅的に選別、分取した後、これらの細胞に導入された遺伝子の配列を決定することで、DNA センサー分子を同定する。

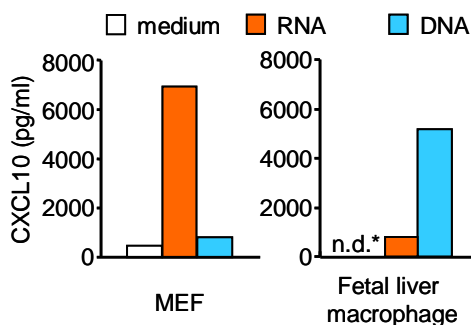
### (2) STING 分子の役割および機能解析

まず、自己の DNA による自然免疫応答の誘導に STING が関与しているかどうかを検討する。以前の研究で DNase II 欠損マウス由来のマウス胎児線維芽細胞 (MEF) に死細胞を貪食させると、わずかではあるが自然免疫応答が誘導されることを見出している。この MEF に STING を過剰発現させた時に自然免疫応答が増強されるかどうかを確認する。もし確認できれば、さらにこの分子の機能について解析を進める。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞内 DNA センサーの探索

① 発現クローニング法を成功させる上で重要な点は、cDNA 発現ライブラリーをどの細胞から作製するか、である。我々の研究室では DNase II 欠損マウスの解析から、未分解の DNA によるサイトカインの過剰な産生は主として fetal liver macrophage において起こることを示した。そこで申請者は、fetal liver macrophage と MEF の DNA や RNA に対する応答性を *in vitro* で比較した。その結果、fetal liver macrophage は MEF に比べ、DNA 刺激に応じて大量の CXCL10 を産生したが、RNA に対する応答性は低かった (図 1)。細胞内で DNA と RNA は別々のセンサーによって認識されるが、下流では共通の経路を介して CXCL10 などのサイトカイン遺伝子を活性化することが知られている。従って、fetal liver macrophage は DNA に特異的に応答する分子、つまり DNA センサーの発現が高い可能性が示唆された。



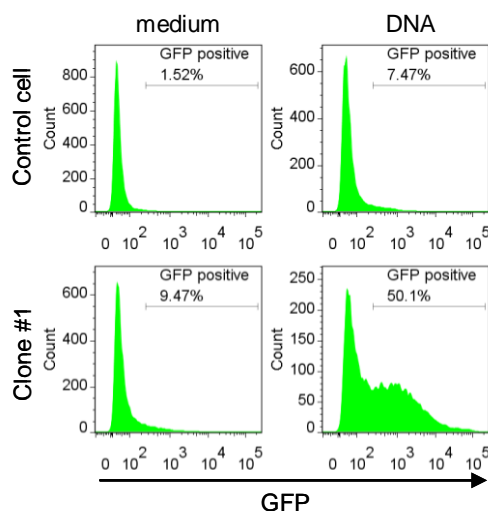
**図1. 各細胞における核酸に対する応答性の比較**  
MEF に比べ fetal liver macrophage では DNA 刺激による CXCL10 の産生量が高い。一方、RNA 刺激に対しては逆に MEF の方が応答性が高い。この時、MEF ではほとんど応答しない低い濃度の DNA を使用している。

\*n.d., not detected

② 発現クローニング法によるスクリーニングの系を構築するため、株化した DNase II 欠損 MEF に CXCL10 のプロモーターの下流で GFP が発現するレポータープラスミドを発現する細胞を作製した。しかしながら、この細胞に DNA の刺激を与えても GFP の発現は全く認められなかった。そこで、系の感度を上げるため、CXCL10 の転写因子として知られている IRF3 を細胞に強制発現させたところ、DNA に応答して GFP を弱く発現する細胞が認められた。この細胞を用いることで DNA センサーのスクリーニングを行うことが可能であると考えた。

③ 以上より、②で作製した細胞に元々 DNA の応答性が強い fetal liver macrophage より調製した cDNA ライブラリー (レトロウイルスベクターに組み込んだもの) を導入し、DNA 刺激後に GFP を強く発現する数パーセントの細胞集団を FACS により分取した。分取後の細胞を増やし、DNA による刺激、GFP 強発現細胞の分取といった工程を数回繰り返すと DNA への応答性が強い細胞集団がある程度濃縮された。その細胞集団を最終的にシングルセルに分けて調べてみると、DNA に

対する応答性が非常に高い細胞クローンをいくつか単離することに成功した (図 2)。これらの細胞に挿入された cDNA の同定を試みたところ、残念ながら DNA センサーと思われる遺伝子の cDNA は挿入されていなかった。この結果は cDNA ライブラリー非依存的に単離された細胞クローンになんらかの遺伝子変化が起きたと考えられた。今後はこの細胞クローンに生じた内在性の遺伝子変化をマイクロアレイなどで検出し、DNA センサー遺伝子の同定を試みたいと考えている。DNA センサーを同定し、DNA の認識機構を明らかにすることで、関節リウマチの病態解明につながることを期待される。



**図2. DNA への応答性が高い細胞クローンの単離**  
Control cell (ライブラリーは導入したが FACS による選別を行っていない細胞) と比較して clone #1 (ライブラリーを導入し FACS による選別を繰り返した後、クローン化した細胞) は DNA 刺激で CXCL10 のプロモーターが強く活性化され GFP 陽性細胞が多く認められる。

(2) STING 分子の役割および機能解析  
DNase II 欠損 MEF に死細胞を食食させたときの自然免疫応答が STING の過剰発現により増強されたことから、STING が自己の DNA に対する応答に関与していると考えられた。

そこで STING 分子の挙動を検討した結果、DNA の刺激に応じて STING が二量体化し活性化することが判明した。STING の二量体形成のメカニズムは不明であるが、我々は STING の二量体化を引き起こす分子が DNA センサーではないかとの予想のもと、現在生化学的アプローチにより STING 活性化因子の同定を試みている。