

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22635

研究課題名(和文)ヌクレオシドストレスに対する自然免疫応答の解明

研究課題名(英文)Studying innate immune responses to nucleoside stress

研究代表者

三宅 健介(MIYAKE, Kensuke)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：60229812

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)：最近、構造生物学的な解析から、1重鎖RNAのセンサーと考えられてきたToll-like receptor 7 (TLR7)、TLR8がヌクレオシドに結合することが明らかになった。そこで、TLR7、TLR8のヌクレオシドに対する応答がどのような応答を誘導するのか検討した。結果としてヌクレオシドにマクロファージが応答すると、結果として、マクロファージの蓄積が認められることが分かった。またその蓄積にTLR7が関与している可能性が示された。今後の解析で、TLR7がマクロファージの蓄積を誘導する分子基盤の解明を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TLR7やTLR8は病原体センサーとして感染防御反応の誘導に関与していると考えられている。また、TLR7/8の活性化は様々な炎症性疾患の病態に関与すると考えられている。本研究では、TLR7、TLR8がヌクレオシドに結合するという知見を踏まえて、TLR7、TLR8のヌクレオシド他に対する応答を調べ、マクロファージの蓄積を誘導する可能性が示された。この知見は、TLR7、TLR8が関与する疾患の病態理解に資すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Toll-like receptor 7 (TLR7) and TLR8, innate immune sensors for single-stranded RNAs (ssRNAs), are expressed in macrophages and dendritic cells. The structures of TLR7 and TLR8 showed that they directly bind to nucleosides and short oligoribonucleotides, which are generated by RNA degradation in the endosomal compartment. TLR7/8 responses to nucleosides might activate the responses that are distinct from those induced by TLR7/8 responses to ssRNAs. We here studied in vivo macrophage responses to nucleosides, and found that macrophages accumulate when they are exposed to nucleosides and that TLR7 is expressed in accumulated macrophages. We will also study the relationship between TLR7 and V600E-BRAF, the somatic mutation driving human histiocytosis. We obtained mice expressing V600E in macrophages and studied expression of TLR7 in macrophage accumulation.

研究分野：免疫学

キーワード：自然免疫

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

核酸はタンパク質を表す遺伝コードとして機能するばかりでなく、免疫コードとしても機能する。例えば、病原体コードとしてウイルス、細菌などの侵入を知らせる。また死細胞から放出され、組織損傷を表す。細胞死が起こらなくとも、核やミトコンドリアがストレスを受けると核酸が細胞質に放出される。感染や組織傷害などのストレスを受け細胞外あるいは細胞質に放出された核酸はエンドリソソームや細胞質に局在する核酸センサーに作用し、感染や組織傷害の際に炎症反応を誘導する。自然免疫系における核酸センサーは、DNA センサーと RNA センサーに大別される。最近、構造生物学的な解析から、1重鎖 RNA のセンサーと考えられてきた Toll-like receptor 7 (TLR7)、TLR8 がグアノシン(Guo)やウリジン(Uri)にも結合し、活性化されることが明らかになった。この結果には、我々も共同研究として、機能的な解析に貢献してきた。TLR7、TLR8 は1重鎖 RNA のセンサーと考えられてきたが、ヌクレオシドのセンサーでもある可能性が示された。しかしながら、ヌクレオシドによって誘導される TLR7 の応答についてはまだわかっていない。ヌクレオシドに類似した低分子 TLR7 リガンド R848 やイミキモドをマウスに繰り返し投与するとマクロファージの蓄積を誘導することが知られている。

### 2. 研究の目的

このような背景を踏まえて、ヌクレオシドに対する TLR7、TLR8 の応答を解明すること、さらにヌクレオシドの蓄積(ヌクレオシドストレス)によって TLR7、TLR8 に対する応答が過剰となったときにどのような病態が誘導されるのか、明かにすることを本研究において目指す。TLR7、TLR8 の低分子リガンドでマクロファージの蓄積が誘導されることから、ヌクレオシドも同じ活性をもつか検討するとともに、マクロファージの蓄積を特徴とするヒストチオサイトーシスについて、TLR7、TLR8 の関与を検討する。

### 3. 研究の方法

#### 3.1. マウスにおけるヒストチオサイトーシスの解析

ヌクレオシドに類似した低分子である TLR7、TLR8 リガンドでマクロファージの蓄積が誘導される。そこでヌクレオシドがリソソームに蓄積するモデルを用いて、誘導されるマクロファージの蓄積(組織球症、ヒストチオサイトーシス)の病態解明を目指す。具体的には、ヌクレオシド蓄積による病態を調べる。蓄積しているマクロファージを FACS で解析し、TLR7 の発現を検討する。さらに、TLR7 とマクロファージの蓄積との関係を分子レベルで解析する。

#### 3.2. ヒトにおけるヒストチオサイトーシスの症例由来の末梢血の解析

マクロファージの蓄積を特徴とするヒトのヒストチオサイトーシスにおいて、TLR7、TLR8 が関与するか検討する。ランゲルハンス細胞組織球症(Langerhans Cell Histiocytosis, LCH)、非 LCH の症例から採取された末梢血細胞を解析する。また、BRAF-V600E という体細胞変異はヒストチオサイトーシスで認められていることから、この変異が TLR7/8 に及ぼす影響について検討する。具体的には細胞株に BRAF-V600E と TLR7、TLR8 を発現させ、増殖、TLR7/TLR8 応答について検討する。

### 4. 研究成果

#### 4.1. マウスにおけるヒスチオサイトーシスの解析

ヒスチオサイトーシスにおいて、蓄積している単球・マクロファージにおいて、TLR7の発現を確認したことから、TLR7がマクロファージの蓄積に関与している可能性が示された。そこで、IL-3依存性細胞株であるBa/F3細胞にTLR7を発現させ、TLR7リガンドで刺激したところ、NF- $\kappa$ B活性化は認められたが、IL-3非存在下での生存・増殖は認められなかった。そこで、TLR7が直接生存・増殖を誘導するためには、NF- $\kappa$ B活性化とは異なる分子が必要である可能性を考えて、検討する。現在までに、いくつかの候補分子を得ており、検討している。

#### 4.2. ヒトにおけるヒスチオサイトーシスの症例由来の末梢血の解析

ヒトの解析については、ヒトの検体を用いた解析を進め、TLR7、TLR8の発現を検討した。健常人に比べて、大きな差は現在まで認められていない。引き続き検討を進めてゆく。できれば末梢血だけでなく、骨髄など、他の検体の解析が可能かどうか、検討する。さらにこれらの解析と並行して、上述のマウスと同様な細胞株を用いた解析をヒトTLR7、TLR8についても進めた。具体的には、IL-3依存性に増殖するBa/F3細胞にヒトTLR7、TLR8を発現させ、生存・増殖の誘導を検討する。今までに得られたマウスTLR7についての知見を参考にしながら進めてゆく。

また、ヒトのヒスチオサイトーシスで認められているBRAF-V600Eという変異とTLR7、TLR8との関係については、ヒトTLR7、TLR8を発現させた細胞株にBRAF-V600Eを発現させ、ヌクレオシドに対する応答が影響されるかどうか、検討する。また、細胞株を用いた解析に加えて、BRAF-V600Eを発現させたマウスを解析のために入手した。発現のためのCre-driverとして、Lyz2, CD11cを用いていた。現在、Lyz2 Creのほうは解析が始まっている。また、CD11c Creのほうは生後すぐに死んでしまうために、胎仔肝由来細胞をAdoptive transferしたマウスを解析する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Furusho Katsuhiko, Shibata Takuma, Sato Ryota, Fukui Ryutaro, Motoi Yuji, Zhang Yun, Saitoh Shin-ichiroh, Ichinohe Takeshi, Moriyama Masafumi, Nakamura Seiji, Miyake Kensuke	4. 巻 31
2. 論文標題 Cytidine deaminase enables Toll-like receptor 8 activation by cytidine or its analogs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 167 ~ 173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxy075	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Miyake Kensuke, Saitoh Shin ichiroh, Sato Ryota, Shibata Takuma, Fukui Ryutaro, Murakami Yusuke	4. 巻 106
2. 論文標題 Endolysosomal compartments as platforms for orchestrating innate immune and metabolic sensors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Leukocyte Biology	6. 最初と最後の頁 853 ~ 862
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/JLB.MR0119-020R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 5件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Kensuke Miyake
2. 発表標題 Mechanisms Controlling Innate Immune Responses to Nucleic Acids
3. 学会等名 The 3rd annual Chiba-UCSD symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kensuke Miyake
2. 発表標題 Mechanisms Controlling Innate Immune Responses to Nucleic Acids
3. 学会等名 5th workshop in biosciences, International Alliance of Research Internship (IARI) 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kensuke Miyake
2. 発表標題 Mechanisms Controlling Innate Immune Responses to Nucleic Acids
3. 学会等名 The 26th international symposium on molecular cell biology of macrophages (MMCB2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kensuke Miyake
2. 発表標題 Mechanisms Controlling Innate Immune Responses to Nucleic Acids
3. 学会等名 52nd annual meeting of the society for leukocyte biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三宅 健介
2. 発表標題 核酸特異的Toll様受容体と自己免疫疾患
3. 学会等名 第47回日本臨床免疫学会 (招待講演)
4. 発表年 2019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
---------	---------