

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15464

研究課題名（和文）HSV感染におけるTLR3リガンドの探索およびヌクレアーゼによる応答制御機構解明

研究課題名（英文）Exploration of TLR3 ligands and the regulatory mechanism of response through nucleases in HSV infection.

研究代表者

佐藤 亮太（Sato, Ryota）

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：90779703

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、「HSV感染におけるTLR3リガンド探索」と「RNaseによるTLR3リガンドの制御機構の解明」の大きく分けて2つの点に着目して研究を進めた。HSV感染後にTLR3リガンドであるdsRNAの量が増加していることが示された。また、リソソームに局在するRNaseの一つであるRNaseT2 欠損細胞では、TLR3応答が上昇しており、TLR7応答が減少していた。これらのことから、RNaseT2はエンドリソソームに到達したssRNAやdsRNAを分解することによりTLR3及びTLR7応答を制御することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自然免疫は脂質や核酸のようなリガンドをセンサーが認識してサイトカインを産生し、抗菌・抗ウイルス反応を行うと行つた単純なものだと思われていた。しかし、これらの応答は様々な分子によって緻密に制御されていることがわかってきた。先行研究では、各センサーの下流のシグナル伝達分子の解明、応答を制御する分子、各センサーの局在についての研究などリガンドを認識した後の分子機構の解明が主流であった。本研究によりRNaseが免疫応答を制御することを証明できたので、リガンドである核酸の分解、代謝を理解することで免疫応答の制御機構を解明するという新たなコンセプトが打ち立てられた。

研究成果の概要（英文）：This study focused on two main aspects: "Exploration of TLR3 ligands in HSV infection" and "Elucidation of the regulatory mechanism of TLR3 ligands through RNases." It was demonstrated that the amount of dsRNA, a TLR3 ligand, increased after HSV infection. Additionally, in RNaseT2-deficient cells localized in the lysosomes, TLR3 response was enhanced while TLR7 response was reduced. These findings suggest that RNaseT2 controls TLR3 and TLR7 responses by degrading ssRNA and dsRNA that reach the endolysosomes.

研究分野：免疫学

キーワード：RNase TLR HSV

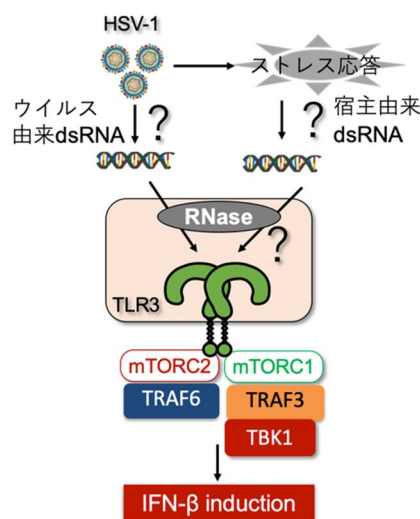
1. 研究開始当初の背景

自然免疫系では、Toll 様受容体(TLR)をはじめとする病原体センサーが、ウイルスや病原体の侵入を察知し、転写因子 NF- κ B を活性化して、感染防御反応を誘導する。これらの反応が過剰に反応すると、自己炎症、自己免疫疾患様を呈することから厳密にコントロールされる必要がある。2 本鎖 RNA(dsRNA)センサーである TLR3 は免疫細胞だけでなく線維芽細胞、神経細胞など多岐にわたる細胞に発現しウイルス感染に対する生体防御を行っている。ヒトにおいて、TLR3 およびその下流シグナル分子の機能低下遺伝子変異は、単純ヘルペスウイルス(HSV)が引き起こすヘルペス脳炎に対する感受性を高めることが報告されている (Lafaille *et al. Nature* 2012)。よって、TLR3 応答制御機構の解明は重要な課題である。申請者は代謝センサーである mTORC2 が炎症性サイトカイン、I 型インターフェロン産生、細胞内移行といった TLR3 応答の全てを制御しているマスター制御因子であることを見出した(Sato *et al. Nat Immunol.* 2018)。このように下流のシグナルについて研究が進んでいるが、dsRNA センサーである TLR3 が DNA ウイルスである HSV をどの様にして認識しているのか不明である。

緻密なコントロールがされるのは、センサーの下流に限ったことではない。自然免疫センサーの応答は、リガンドの代謝によってもコントロールされている。近年は DNA や RNA リガンドもヌクレアーゼ(RNase)やデオキシリボヌクレアーゼ(DNase)による修飾を受けることが必要になってきた。DNase II の欠損マウスでは、代謝されない DNA がリソソームに蓄積し、DNA センサーある STING を活性化し、関節炎が誘導される。一方、DNA センサーである TLR9 はリソソームに局在する DNase II による DNA のプロセシングが応答に必要であることが示されている(M.P. Chan *et al. Nat Commun.* 2014)。よって、このように、核酸の分解・代謝は核酸応答を抑制する役割と、核酸応答に必要なプロセシングの役割の両面がある。RNA センサーにおいては、RNase T2 が ssRNA センサーの一つである TLR8 の RNA リガンドのプロセシングを行うことがわかっている(W. Greulich *et al. Cell.* 2019)。しかし、他の RNase と免疫センサーの関係性については報告がなく、特に 2 本鎖 RNA を分解、代謝し免疫応答を制御するのが不明である。

2. 研究の目的

ヒトで HSV はヘルペス脳炎や皮膚炎を引き起こす。DNA ウイルスであるため、DNA センサーである STING が重要と考えられていたが、STING-インターフェロン(IFN)シグナルが HSV 感染防御に重要ではないことも分かってきている(LH Yamashiro *et al. Nature Commun.* 2020)。一方で、ヘルペス脳炎の患者に TLR3 シグナル欠損が見つかっており、我々の結果からも TLR3-TypeI IFN 産生シグナルが HSV 感染防御に非常に大きな役割を果たしていると考えられる。HSV 感染により細胞においてリガンドである dsRNA が増えると考えられるが、これまでに報告はなく、2 本鎖 RNA センサーである TLR3 がどうやって DNA ウイルスを認識しているのか不明である。そこで、本研究では、まず、HSV 感染における TLR3 リガンドの探索を行う。ウイルス由来の dsRNA の可能性、ストレス応答によって誘導された宿主由来の核酸を認識する可能性の 2 つについて検討する。同定できれば、世界初であり、HSV 感染防御機構を解明する上で非常に有用である。



核酸リガンドは、ヌクレアーゼにより常に分解、代謝が行われている。ヌクレアーゼと自然免疫については、Regnase-1 が IL-12p40 や IL-6 などコードする mRNA を安定化していることで過剰な応答が抑えられていることが報告されている(Akira *et al. Nature*. 2009)。近年では、DNase が DNA リガンドを正にも負にも制御し、免疫応答自体も制御することが分かってきている。本研究では、合成リガンドである Poly(I:C)もしくは、同定した TLR3 のリガンドを RNase がどのようにプロセッシング、分解するのか TLR3 応答をアウトプットにして解析を進める。本研究により RNase が免疫応答を正負に制御することを証明し、リガンドである核酸の分解、代謝を理解することで免疫応答の制御機構を解明する。

3. 研究の方法

本研究では、「HSV 感染における TLR3 リガンド探索」と「RNase による TLR3 リガンドの制御機構の解明」の大きく分けて 2 つの点に着目して研究を進めた。

(1) HSV 感染における TLR3 リガンドの同定

HSV 感染時の TLR3 応答の挙動は繊維芽細胞と神経細胞が同じであるため、繊維芽細胞を用いて検証を行った。具体的には、非感染、感染細胞から total RNA を抽出後、dsRNA 精製キットを用いて dsRNA を精製した。得られた RNA をライブラリ化、次世代シーケンサーにより配列解析を行う。HSV のゲノム配列と比較することで、ウイルス由来のどこの配列が同定する。また、ウイルス感染はストレス応答により細胞死を引き起こす。それにより放出された核酸が免疫センサーを刺激することがあるため、HSV 感染においてもストレス応答依存的に増幅された宿主の dsRNA が TLR3 を刺激することが考えられる。次世代シーケンスで得られた配列をマウスのゲノム配列と比較解析し、宿主由来 TLR3 リガンド配列の同定を行う。

(2) TLR3 応答制御に関わる RNase の同定

宿主細胞における RNase の役割を検討する。合成 TLR3 リガンド poly(I:C)および、1.で同定した HSV 感染における TLR3 リガンドを使用し検証を進める。

a. RNase 欠損または強制発現細胞における TLR3 応答

予備的な解析で real time PCR により RNase4,6,T2 の発現がマクロファージ細胞株 J774 で確認できた。CRISPR/Cas9 の系を用いて各 RNase の機能欠損株を作成する。TLR3 が応答する場であるリソソームに局在する RNaseT2 に着目して解析したところ、poly(I:C)刺激における応答が RNaseT2 の機能欠損株において増強された。これは、マクロファージにおいて RNaseT2 が 2 重鎖 RNA を分解することで TLR3 応答が過剰に応答しないよう制御していると推測できる。RNA 染色により、RNaseT2 の機能欠損株において TLR3 リガンド刺激後の RNA 蓄積量を検討する。また、TLR3 と RNaseT2 が共局在するかどうか共焦点顕微鏡または、細胞内小器官分画法により TLR3 リガンド刺激後に継時的に観察する。RNase4 や 6 の機能欠損株、強制発現株についても同様の検討を行う。

b. TLR3 における RNase 活性の重要性

TLR 応答に関与している RNase を *in vitro* で精製し、TLR3 リガンドと混合、電気泳動することで RNase のリガンド分解・代謝能について検証する。a.で行なった TLR 応答変化と照合することで、リガンド分解・代謝能と TLR 応答の関係性を明らかにする。

RNaseT2 は 3 つ、RNase4 や 6 は 2 つの RNase 活性部位が予測されている。RNase 活性部位をアラニン置換した変異体を作成し、リガンド刺激における TLR3 応答の検討を行い RNase 活性の有無による TLR3 応答への寄与を検証する。また、*in vitro* 実験において精製した RNase 野生型及び活性部位変異体とリガンドを混ぜ、RNA 分解の違いを電気泳動により検出する。

c. RNaseT2 変異における TLR3 応答の変化

RNaseT2 の遺伝子欠損はヒトで脳炎の一種である Cystic Leukoencephalopathy の原因であるが、原因については解明されていない。RNaseT2 変異により、神経細胞における TLR3 応答が変化することで脳炎様の症状を呈していることが考えられる。そこで、RNaseT2 の変異株を作成し、TLR3 応答、RNA 染色、RNase 機能の検証、TLR3 および RNaseT2 変異体の局在を検証する。

(3) HSV に対する免疫応答における RNase の役割

MEF 細胞では、HSV 感染における Type I IFN 産生は TLR3 依存的であることがわかっているため、MEF RNase 機能欠損株を用いて HSV 感染における TLR3 応答を検証する。

4 . 研究成果

(1) HSV 感染における TLR3 リガンドの同定

HSV感染時のTLR3応答の挙動は繊維芽細胞と神経細胞が同じであるため、繊維芽細胞を用いて検証を行った。非感染、感染細胞からtotal RNAを抽出後、dsRNA精製キットを用いてdsRNAを精製したところ、感染後にdsRNAの量が増加していた。次世代シーケンスによる解析では、HSVおよび宿主細胞の配列どちらも確認できていることから、ウイルス、宿主細胞ともにリガンドとなる可能性があることが示唆された。しかし、特異的な配列は濃縮されていなかった。

(2) TLR3 応答制御に関わる RNase の同定

予備的な解析でマクロファージ細胞株J774においてreal time PCRによりRNase4,6,T2の発現が確認できた。J774細胞において、RNase4,6,T2の欠損細胞におけるTLR3応答を検証したところ、RNaseT2欠損細胞において、TLR3応答が上昇、TLR7応答は減弱した。RNaseT2欠損細胞にRNaseT2の野生型を強制発現した細胞では、上昇していたTLR3応答が減弱し、減弱していたTLR7応答が上昇した。酵素活性がTLR3応答に重要かどうか検証するために、RNase活性部位アラニン置換変異体を作製した。野生型では、TLR3リガンドであるdsRNAおよびTLR7リガンドであるssRNAが分解されたのに対し、変異体では分解が見られなかった。RNaseT2欠損細胞に活性部位変異体を強制発現した細胞では、TLR3応答が変化なかったことから、RNase活性がTLR3応答に重要だということが示された。共焦点顕微鏡によりRNaseT2の局在を観察したところ、TLR3や7と同様、エンドリソソームに局在していることがわかった。これらのことから、RNaseT2はエンドリソソームに到達したdsRNAやssRNAを分解することによりTLR3応答やTLR7応答を制御することが示された。

(3) HSV に対する免疫応答における RNase の役割

MEF 細胞では、HSV 感染における Type I IFN 産生は TLR3 依存的であることがわかっているため、MEF RNaseT2 欠損細胞を作製した。HSV 感染させ、realtimePCR 解析を行ったところ、Type I IFN 産生が減弱していた。このことから、HSV 感染において、RNaseT2 が TLR リガンド制御することで、TLR3 応答を制御することがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Murakami Yusuke, Fukui Ryutarō, Tanaka Reika, Motoi Yuji, Kanno Atsuo, Sato Ryota, Yamaguchi Kiyoshi, Amano Hirofumi, Furukawa Yoichi, Suzuki Hitoshi, Suzuki Yusuke, Tamura Naoto, Yamashita Naomi, Miyake Kensuke	4. 巻 12
2. 論文標題 Anti-TLR7 Antibody Protects Against Lupus Nephritis in NZBWF1 Mice by Targeting B Cells and Patrolling Monocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.777197	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 -
1. 著者名 Miyake Kensuke, Saitoh Shin-Ichiroh, Fukui Ryutarō, Shibata Takuma, Sato Ryota, Murakami Yusuke	4. 巻 33
2. 論文標題 Dynamic control of nucleic-acid-sensing Toll-like receptors by the endosomal compartment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 835 ~ 840
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab037	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Liu Kaiwen, Sato Ryota, Shibata Takuma, Hiranuma Ryosuke, Reuter Tatjana, Fukui Ryutarō, Zhang Yun, Ichinohe Takeshi, Ozawa Manabu, Yoshida Nobuaki, Latz Eicke, Miyake Kensuke	4. 巻 33
2. 論文標題 Skewed endosomal RNA responses from TLR7 to TLR3 in RNase T2-deficient macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 479 ~ 490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab033	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
1. 著者名 Kuchitsu Yoshihiko, Mukai Kojiro, Uematsu Rei, Takaada Yuki, Shinjima Ayumi, Shindo Ruri, Shoji Tsumugi, Hamano Shiori, Ogawa Emari, Sato Ryota, Miyake Kensuke, Kato Akihisa, Kawaguchi Yasushi, Barber Glen N., Arai Hiroyuki, Waguri Satoshi, Taguchi Tomohiko	4. 巻 25
2. 論文標題 STING signalling is terminated through ESCRT-dependent microautophagy of vesicles originating from recycling endosomes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 453 ~ 466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-023-01098-9	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 -

1. 著者名 Miyake Kensuke, Shibata Takuma, Fukui Ryutaro, Sato Ryota, Saitoh Shin-Ichiroh, Murakami Yusuke	4. 巻 13
2. 論文標題 Nucleic Acid Sensing by Toll-Like Receptors in the Endosomal Compartment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.941931	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 -

1. 著者名 Maeda Fumio, Kato Akihisa, Takeshima Kosuke, Shibasaki Misato, Sato Ryota, Shibata Takuma, Miyake Kensuke, Kozuka-Hata Hiroko, Oyama Masaaki, Shimizu Eigo, Imoto Seiya, Miyano Satoru, Adachi Shungo, Natsume Tohru, Takeuchi Koh, Maruzuru Yuhei, Koyanagi Naoto, Jun Arii, Yasushi Kawaguchi	4. 巻 96
2. 論文標題 Role of the Orphan Transporter SLC35E1 in the Nuclear Egress of Herpes Simplex Virus 1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jvi.00306-22	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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Ryota Sato, Kaiwen Liu, Takuma Shibata, Ryutaro Fukui, Katsuaki Hoshino, Tsuneyasu Kaisho, Kensuke Miyake
2. 発表標題 The role of RNase T2 in macrophage homeostasis.
3. 学会等名 日本免疫学会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryota Sato, Kaiwen Liu, Takuma Shibata, Ryutaro Fukui, Katsuaki Hoshino, Toshikazu Kondo, Yuko Ishida, Toru Miyazaki, Tsuneyasu Kaisho, Kensuke Miyake
2. 発表標題 The role of RNase T2 in macrophage homeostasis.
3. 学会等名 日本免疫学会 (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------	---------