

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590574

研究課題名(和文)自然免疫系活性化につながる新規核酸認識機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of newly identified nucleic acid-recognition molecules in innate immunity

研究代表者

柳井 秀元 (Yanai, Hideyuki)

東京大学・生産技術研究所・准教授

研究者番号：70431765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルスや細菌などの感染に際し、病原体由来核酸は自然免疫受容体によって認識され、免疫応答を強く活性化する。この応答は感染防御に必須であり、その詳細を明らかにすることは重要である。我々は、病原体由来核酸を模した核酸アナログと結合する分子(NAS1及びNAS2)を同定した。これらの分子についてコンディショナルノックアウトマウスを作製し、NAS1が核酸による刺激時のI型IFNやIL-12p40の産生に關与することを明らかにした。また、NAS1欠損マウスではヘルペスウイルス感染、リステリア感染時の生存率が顕著に低下する。本研究から、NAS1は感染防御に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Pathogen infection induces robust innate immune responses. Nucleic acids from pathogens such as viruses and bacteria are recognized by nucleic acid-recognition receptors and evokes the activation of innate immune responses. We searched for host cell molecules which are involved in the responses and identified two RNA-binding motif-containing molecules, namely NAS1 and NAS2. In this research we established conditional knockout mice lines of NAS1 and NAS2 and analyzed the contribution of NAS1 and NAS2 to nucleic acid-mediated innate immune responses. Interestingly, we have found that the activation of type I IFN genes and IL-12p40 gene by B-DNA or CpG-B stimulation were impaired in NAS1 KO dendritic cells. In addition, NAS1 KO mice were easily succumbed to HSV-1 infection and Listeria monocytogenes infection. These results indicate that NAS1 is critical to host defense against pathogen infection.

研究分野：分子免疫学

キーワード：自然免疫 シグナル伝達 サイトカイン 核酸 ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

生体は、病原体などの異物を排除するための機構として免疫系を備えている。免疫系のうち、自然免疫系は生体防御の最前線を担当するシステムであり、病原体の侵入を察知して迅速に免疫応答を惹起する。自然免疫系における病原体認識は病原体認識受容体によって担われており、リポポリ多糖等、特有の分子パターンを認識することによって下流のシグナル伝達経路を活性化し、免疫系を発動する。これまでに多数の分子パターンが報告されており、TLR (Toll-like receptor)をはじめとしてそれぞれの分子パターンに対する受容体が同定されている。DNA、RNA など核酸も分子パターンの一つとして考えられており、実際、病原体由来核酸によって免疫系活性化が誘導されることが知られている。核酸による免疫応答の活性化は、細菌やウイルスなどに対する生体防御において重要である一方、自己の核酸によって活性化される過剰な免疫応答による自己免疫疾患とも密接な関連がある。全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus: SLE) を一例とする自己免疫疾患においては、抗核抗体複合体中の DNA、RNA によって惹起される免疫応答が病態の増悪に作用することが報告されている (Stetson, DB., *Curr. Opin. Immunol.* 21, 244-250, 2009)。また、アポトーシスなどによる死細胞中の DNA を適切に処理できない DNase 遺伝子欠損マウスにおいては、腎炎などの SLE タイプの自己免疫疾患を発症することが知られている (Napirei, M. *et al.*, *Nat. Genet.* 25, 177-181, 2000; Kawane, K. *et al.*, *Science* 292, 1546-1549, 2001)。核酸認識受容体を含め、核酸による免疫系活性化に関与するシグナル伝達系を明らかにすることは、感染防御における分子メカニズムの理解することにとどまらず、自己免疫疾患の発症機構の解明にも寄与し、さらにはそれら分子の活性化を制御することで、疾患に対する治療法の分子基盤を供することも可能になると期待される。

核酸認識受容体としては、これまで、RNA を認識する受容体について詳細な検討が為されており、TLR3、TLR7 などの膜型受容体の他、細胞質内 RNA 認識受容体として RIG-I (retinoic acid-inducible gene-I) 及び MDA5 (melanoma-differentiation associated protein 5) が同定され、そのシグナル伝達機構の概要も明らかになりつつある。一方、DNA を認識する受容体としては TLR9 が知られていたが、DNA ウイルスの一つである単純ヘルペスウイルスやリステリア菌の感染において、TLR9 非依存的な免疫系の活性化が認められることから、TLR9 以外にも DNA 認識受容体の存在が示唆されており、その詳細は不明であった。最近、申請

者らは RNA 認識に関わる RIG-I、MDA5 に DNA センサーとしての新たな側面を見いだした (Choi, MW. *et al.* *PNAS* 106 17870-17875, 2009)。しかしながら、それらの役割は特定の細胞、遺伝子誘導に限定されており、DNA による免疫系活性化の全体像は説明出来るものではなかった。また、RNA ポリメラーゼ III (pol-III) が外来 DNA を認識し、pol-III によって転写された RNA が RIG-I 依存的なシグナル伝達経路を活性化することが示されたが (Ablasser, A. *et al.*, *Nat. Immunol.* 10, 1065-1072, 2009; Chiu, YH. *et al.*, *Cell* 138, 576-591, 2009)。特に A、T に富む DNA のみに pol-III の寄与が限定されることから、G、C に富む DNA やランダムな配列の DNA による活性化については pol-III では説明がつかず、pol-III 以外にもこれらの応答を担っている受容体が存在すると考えられる。

2. 研究の目的

上記のように、DNA 認識受容体と免疫系活性化機構は、その一端が垣間見えつつあるものの、RIG-I、MDA5 などを受容体とする RNA のケースと異なり、複数の受容体が存在しており、それぞれが異なったシグナル伝達系を活性化する、複雑なシステムによって担われていると考えられる。これらについて、全体像を明らかにするため、私達は新規の受容体を探索すべく解析を行っていた。その結果、最近、私達は HMGB (high-mobility group box) タンパク群を中心とした、DNA、RNA を問わず核酸認識を司る機構が存在することを見出した (Yanai, H. *et al.*, *Nature* 462, 99-103, 2009)。さらに、人工的に合成した核酸アナログ PS (ホスホロチオエート骨格を有することから PS と名付けられている) によって HMGB タンパク質による核酸機構を阻害することで、様々な核酸刺激による免疫応答を抑制することが出来ることも明らかとなった。これらのことから、核酸による免疫系活性化機構には、RIG-I、MDA5 やその他の DNA 認識受容体によって個々に核酸が認識される以前に、前段階において共通に核酸を認識する、新しい機構が存在しているのではないかと考えられた。

そこで我々は、核酸アナログに結合する分子群のスクリーニングを行った。その結果、核酸認識機構に関わる可能性のある分子として NAS1 (Nucleic acid sensor 1) および NAS2 を同定した。NAS1 および NAS2 は、HMGB タンパク質が担っていると考えられる、個々の核酸認識受容体に共通する核酸認識に関与している可能性が考えられる。そこで、本研究課題においてはまず、

NAS1 および NAS2 の核酸認識機構における役割について明らかにしていきたい。
NAS1 および NAS2 について、コンディシ

ヨナルノックアウトマウスを作製する。このマウス由来の細胞等を用いて NAS1、NAS2 の核酸による応答への役割について解析する。また、NAS1 および NAS2 のウイルス感染応答、自己免疫疾患との関わりについて解析する。前述のように、核酸認識機構は感染防御のみならず、自己免疫疾患とも密接な関わりがある。これらと NAS1、NAS2 が関与する、恐らく新規の核酸認識機構との関わりについてノックアウトマウスを用いて検討を行う。

3. 研究の方法

核酸による免疫系の活性化に関与する分子を、活性化を抑制する核酸アナログに着目して探索を行い、核酸認識に関わる新規分子・メカニズムについて明らかにすることを旨とする。この機構を明らかにすることで、核酸による免疫系活性化を調節する新しい分子基盤を明らかにし、感染症や自己免疫疾患の治療応用にむけた分子基盤の提供につなげていきたい。具体的には、免疫系活性化を抑制する核酸アナログと会合する分子として得られた2つの分子について、その機能解析を行う。遺伝子欠損マウスを作製し、核酸による免疫応答、感染防御における役割、および自己免疫疾患との関連について検討する。

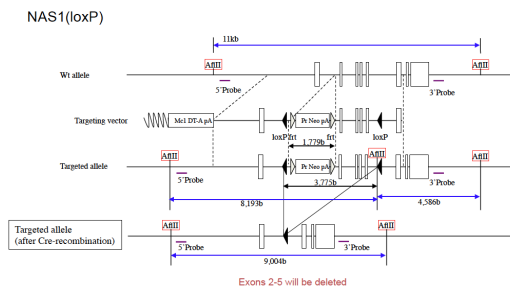
研究方法としては、核酸刺激による免疫系活性化を核酸アナログが抑制する現象に着目し、核酸アナログの核酸認識受容体シグナル伝達系への作用点を明らかにする。(i)核酸アナログと結合する分子を網羅的に解析した結果得られた二つの分子(NAS1 および NAS2) について、強発現系、ノックダウンシステムを用いて核酸認識受容体シグナル系への関与を定量的qRT-PCR 法、レポーターアッセイ、ELISA 等でサイトカイン誘導への影響を検討し、また、核酸刺激時やウイルス感染時の局在、NAS1、NAS2 の誘導、タンパク質の修飾について検討する(ii)候補分子のコンディショナルノックアウトマウスを作製し、これらのマウスより調製した細胞及び、マウス個体レベルにおいて、核酸刺激時の免疫応答について、サイトカイン誘導、感染応答について検討を行う。

4. 研究成果

我々は、病原体由来核酸を模した核酸アナログを用い、この核酸アナログと結合するタンパク質のスクリーニングから、核酸の認識に関与すると思われる RNA 結合モチーフを有する候補分子2種類(Nucleic acid sensor 1 (NAS1) 及び NAS2) を同定した。平成 24-25 年度において、RAW 細胞、およびマウス胎児線維芽細胞(mouse embryonic fibroblasts;

MEFs) において、これら2つの遺伝子発現を siRNA 法を用いてノックダウンし、B-DNA などの核酸刺激を行ったところ、これら2つの発現が低下すると、1型 IFN などのサイトカイン mRNA の誘導が顕著に低下することがわかった。そこで、これら2つの分子についてコンディショナルノックアウトマウスの作

Generation of NAS1-deficient mice



製を行った(図1、2)。

図1 NAS1 遺伝子欠損マウスの作製
Generation of NAS1-deficient mice

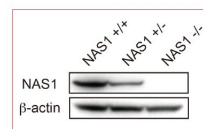
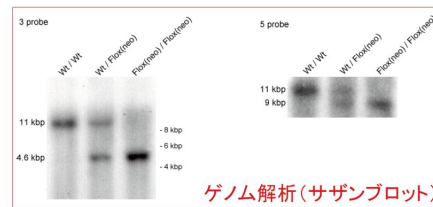


図2 NAS1 遺伝子欠損マウスの確認
野生型及び NAS1 遺伝子欠損 MEFs からゲノム DNA、RNA、タンパク質を調製し、それぞれ、サザンプロット法、ノザンプロット法、イムノプロット法にて解析した。

マウスは順調に作出された。NAS1 については、元々の ES 細胞が 129Sv 系統由来であったため、C57BL/6 マウスとの交配を行い、全身性に欠損させたところ、3 代の交配の後、生後すぐに致死となることが判明した。NAS1 は発生に重要な遺伝子であることが明らかとなった。NAS1 は定常状態において核内に局在するタンパク質であるが、MEFs において、ヘルペスウイルス(HSV-1)、および水疱性口内炎ウイルス(VSV)感染を行うと、DNA ウイルスである HSV-1 感染時において NAS1 は細胞質に移項し、スポット様構造を形成することが分かった。NAS1 は DNA 応答になんらかの関与を示すものと考えられた(図3)。

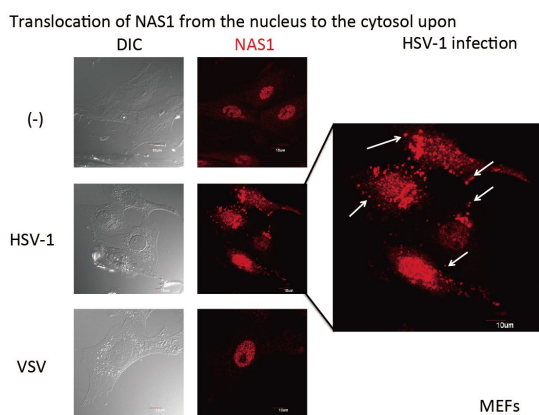


図3 ウイルス感染時のNAS1の局在変化
野生型 MEFs に HSV-1、VSV 感染 (1 m.o.i) し、NAS1 の局在について蛍光免疫染色を行った。定常状態では NAS1 は核に主に局在しているが、HSV-1 感染時において細胞質に移項し、スポット状に集積が認められた。

実際、NAS1 KO マウス由来樹状細胞、マクロファージにおいて、B-DNA 刺激、TLR9 刺激時の I 型 IFN や IL-12p40 の産生を qRT-PCR 法を用いて検討したところ、これら遺伝子の誘導が顕著に減弱することが明らかとなった。このようにサイトカイン産生に減弱が認められたため、次に、マウス個体レベルにおいて病原体感染時の NAS1 の役割について検討を行った。HSV-1 感染に加え、DNA 応答が誘導されることが知られているリステリア感染も行った。その結果、コントロールの野生型マウスと比較し、NAS1 遺伝子欠損マウスは、単純ヘルペスウイルス感染、リステリア感染時において生存率が顕著に低下することが判明した。NAS1 は DNA 刺激による免疫応答に関与し、これら病原体の感染防御に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

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7件)

1. Chiba S, Ikushima H, Ueki H, Yanai H, Kimura Y, Hangai S, Nishio J, Negishi H, Tamura T, Saijo S, Iwakura Y and Taniguchi T.; Recognition of tumor cells by Dectin-1 orchestrates innate immune cells for anti-tumor response. *eLife* e04177, 2014. doi: 10.7554/eLife.04177 査読有り
2. Yanai H and Taniguchi T.; Nucleic acid sensing and beyond: Virtues and vices of HMGB1. *J. Int. Med.* 276: 444-453, 2014. doi: 10.1111/joim.12285 査読有り
3. Yanai H, Matsuda A, An J, Koshiba R, Nishio J, Negishi H, Ikushima H, Onoe

T, Ohdan H, Yoshida N and Taniguchi T.; Conditional ablation of HMGB1 in mice reveals its protective function against endotoxemia and bacterial infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110: 20699-20704, 2013. doi: 10.1073/pnas.1320808110 査読有り

4. Negishi H, Matsuki K, Endo N, Sarashina H, Miki S, Matsuda A, Fukazawa K, Taguchi-Atarashi N, Ikushima H, Yanai H, Nishio J, Honda K, Fujioka Y, Ohba Y, Noda T, Taniguchi S, Nishida E, Zhang Y, Chi H, Flavell RA and Taniguchi T.; Beneficial innate signaling interference for anti-bacterial responses by a TLR-mediated enhancement of the MKP-IRF3 axis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110: 19884-19889, 2013. doi: 10.1073/pnas.1320145110 査読有り
5. Negishi H, Miki S, Sarashina H, Taguchi-Atarashi N, Nakajima A, Matsuki K, Endo N, Yanai H, Nishio J, Honda K and Taniguchi T.; Essential contribution of IRF3 to intestinal homeostasis and microbiota-mediated Tslp gene induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109: 21016-21021, 2012. doi: 10.1073/pnas.1219482110 査読有り
6. Yanai H, Ban T and Taniguchi T.; High-mobility group box family of proteins: ligand and sensor for innate immunity. *Trends Immunol.* 33: 633-640, 2012. doi: 10.1016/j.it.1012.10.005 査読有り
7. Negishi H, Yanai H, Nakajima A, Koshiba R, Atarashi K, Matsuda A, Matsuki K, Miki S, Doi T, Aderem A, Nishio J, Smale ST, Honda K and Taniguchi T.; Cross-interference of RLR and TLR signaling pathways modulates antibacterial T cell responses. *Nat. Immunol.* 13: 659-666, 2012. doi: 10.1038/ni2307 査読有り

[学会発表](計5件)

1. 柳井秀元 自然免疫受容体 Dectin-1 の抗腫瘍応答における役割. 日本癌学会シンポジウム, 2015年1月21日. 金沢
2. Yanai H. Recognition of tumor cells by Dectin-1 induces NK cell-dependent anti-tumor responses. 第14回日独がんワークショップ, 2014年11月15日. ドイツ, ベルリン
3. 柳井秀元 自然免疫応答・炎症性疾患におけるHMGB1の役割. 日本生化学会, 2014年10月18日. 京都
4. Yanai H. Recognition of tumor cells by

Dectin-1 induces NK cell-dependent anti-tumor responses. 第14回日独がんワークショップ, 2014年11月15日. ドイツ, ベルリン

5. 柳井秀元 自然免疫応答・炎症性疾患におけるHMGB1の役割. 第35回日本分子生物学会 2012年12月12日. 福岡

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
東京大学生産技術研究所 炎症免疫制御学
社会連携研究部門
<http://www.iis.u-tokyo.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者
柳井 秀元 (Yanai, Hideyuki)
東京大学・生産技術研究所・特任准教授
研究者番号：70431765

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

6. 柳井秀元 自然免疫応答・炎症性疾患におけるHMGB1の役割. 第35回日

本分子生物学会 2012年12月12日.
福岡

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
東京大学生産技術研究所 炎症免疫制御学
社会連携研究部門
<http://www.iis.u-tokyo.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者
柳井 秀元 (HIDEYUKI YANAI)
東京大学・生産技術研究所・特任准教授

研究者番号：70431765

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：