

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659177

研究課題名(和文) 免疫性核酸複合体の同定

研究課題名(英文) Identification of immunogenic nucleic acid-protein complex

研究代表者

根岸 英雄 (Negishi, Hideo)

東京大学・生産技術研究所・特任助教

研究者番号：60514297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円、(間接経費) 900,000 円

研究成果の概要(和文)：私は今までの研究の中で、核酸に結合する化合物を同定していました。その中にはマウスを使った実験で、炎症性疾患を強く抑える化合物がありました。化合物の治療効果と様々な知見から、私は体の中に炎症を引き起こす特殊な核酸-蛋白の複合体が存在し、化合物がこの複合体を阻害しているのではないかと考え、複合体の単離を試みました。その結果、炎症を引き起こす核酸と蛋白の想定に成功しました。これらの解析をさらに進める事で、様々な病気の新しい治療法が確立できる可能性があります。

研究成果の概要(英文)：In my previous study, I isolated chemical compounds which bound to nucleic acid. Some of them had strong therapeutic effect on inflammatory diseases in the mice model. From this and other results, I hypothesized that the compounds targeted the endogenous immunogenic nucleic acid-protein complex. In this study, I tried to identify them and successfully identified both immunogenic nucleic acid and protein. Further study may provide the new strategy for the therapy of inflammatory diseases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 実験病理学

キーワード：免疫性核酸 炎症

1. 研究開始当初の背景

パターン認識受容体経路の活性化は免疫応答の起点となる重要なイベントであるが、過剰に活性化すると自己免疫、炎症性疾患の引き金となることが知られている。パターン認識受容体リガンドの中でも特に核酸は強い免疫性を持ち、自己免疫、炎症性疾患に深く関わると考えられている。そのため、通常、自己核酸への応答は厳密に制御され、核酸そのものだけでは強い免疫性を発揮できないことも知られており、免疫性付与に関わる蛋白がいくつか同定されている。すなわち、死細胞などから放出された核酸は特定の蛋白と共存した場合のみ免疫性をもち、複合体形成の有無が免疫性を決定すると考えられているが、自己核酸の免疫性における核酸側の配列や構造などの重要性はほとんど不明である。

私は先行研究において、核酸結合化合物であり、死細胞由来の核酸刺激によるサイトカイン誘導を抑制し、マウス疾患モデル系において強力な自己免疫、炎症性疾患の治療能をもつ低分子化合物(K77253:申請当時の仮称)を同定していた。同時に基本骨格の異なる核酸結合化合物を複数同定していたが、いずれも核酸に対して結合を示すにも関わらず、治療効果を持つ化合物はごく一部であり、内在性の自己核酸に対しては、単に化合物が結合できれば抑制がおこる訳ではない事が分かっている。つまり、著明な抑制能を持つ化合物は、内在性核酸に対して、免疫性の抑制に重要な特定の作用点を持つ事が考えられる。さらに、K77253の核酸結合能は、核酸の配列や長さ、非メチル化 CpG 構造と関連せず、核酸のバックボーンの化学修飾を変化させると著明に変化することが分かっている。

このような背景から、私は K77253 が未知の特殊なバックボーンを持つ免疫性核酸に結合し、内在性自己核酸の免疫性を抑制しているのではないかと考え、本研究を発想するに至った。

2. 研究の目的

生体を持つ自己の核酸(主に DNA)は通常、免疫性を持たないよう制御されているが、特定の状況下では自己核酸に対する強い免疫応答が惹起されることが知られており、死細胞から放出される自己核酸とそれによる免疫応答/炎症は、多くの自己免疫や炎症性疾患に関わると考えられている。しかしながら、免疫性自己核酸とその免疫性を制御する結合蛋白との複合体(免疫性核酸複合体)の実態は多くの部分が未知であり、しかもそれらを直接同定、解析する有効な手段がない。

本研究の目的は、強力な自己免疫、炎症性疾患の抑制剤として同定した、核酸結合化合物を用いて、その標的となる免疫性核酸複合

体を同定、解析することである。

3. 研究の方法

まず、ビオチン化合物を用いて、免疫性核酸複合体に含まれる核酸の同定を試みた。K77253(申請当時の仮称)およびこれに構造が近いが治療効果のない核酸結合化合物について、ビオチン化し、細胞のライゼートと混合後、免疫沈降を行い、沈降物から核酸を抽出後、薬剤処理により核酸を塩基ごとに分解した状態で Mass 解析を行ったが、特殊な核酸構造は同定できなかった。そのため、核酸構造から配列に焦点を変更し、同様の方法で免疫沈降した核酸を網羅的にシーケンスした。さらに同定した核酸について、人工的に合成し、免疫性を検証した。

また、化合物を用いて、免疫性核酸複合体に含まれる蛋白の同定を試みた。既に治療効果のある化合物とない化合物に結合する蛋白群の同定を行っていたため、その中から、これまでに得られている知見や単離された蛋白の既知情報を元に候補を絞り、遺伝子をクローニングし、細胞に過剰発現した際に、死細胞の免疫性に与える影響を検証した。また、siRNA を用いて、ノックダウンにより同様の解析を行った。

上記の検討によって単離された蛋白、核酸はいずれも免疫性という観点からの解析が全くされていない事などから、今回の発見は非常に興味深く、新しい概念の創出に繋がる事が示唆された。一方で、このような状態で *in vivo* の解析を行うには、その情報量の少なさから、多くの不測の事態(そもそも Tg マウスが産まれないなど)が起こる可能性がある。そのため、*in vivo* で個体レベルの重要性をただ確認するよりも、現時点では *in vitro* の解析の方がより多くの概念的進歩に繋がる興味深い知見が得られると予想されたため、*in vitro* の解析をさらに深く推進した。核酸の解析は主に人工合成した核酸を用いて行い、免疫細胞からの遺伝子誘導を RT-PCR によって解析した。一方で、蛋白の解析は主に siRNA を用いたノックダウンによって行い、ノックダウン細胞の性質(死細胞の免疫性や細胞自体の応答性)を後述の方法で解析した。

4. 研究成果

まず、ビオチン化合物に結合する核酸について、Mass 解析による同定を試みたが、化合物から核酸を引きはがす際の buffer 条件が Mass 解析に適しておらず、精度の良い Mass 解析は出来なかった。精度が悪いながらも解析によって結果は得られたが、そこでは特殊な核酸構造と予測できるものは検出されなかった。この解析結果については、解析の精度が問題である可能性と本質的に単離

した免疫性核酸の中に特殊な核酸構造が含まれていない可能性の二つが考えられた。そのため、これらいずれの可能性にも対処するため、解析方法を別の方法に変更した。すなわち、解析手法を単離した核酸の網羅シーケンスへ変更することで、特殊な核酸が含まれていない場合(配列が重要な場合)に対応しつつ、「特殊な核酸構造があるとすれば、その構造を生み出す酵素が結合するための特異的な配列構造が存在するのではないか」という考えのもと、特殊構造の可能性にも対応し、化合物に結合する核酸の網羅シーケンス解析を行った。

シーケンスを行う前に、単離した核酸の性質を解析したところ、RNase に非常に強い感受性を示し、ほとんどが RNA であることが分かった。また、サイズは 100~300 塩基前後である事が分かり、様々な RNase への感受性の解析結果から、一本差および二本差の両方の構造を持つ事も示唆された。そのため、化合物で核酸を単離後、DNA ではなく、RNA を対象とした網羅シーケンスを行い、シーケンスは成功した。シーケンスの結果から、治療効果のある化合物に特異的に一定量以上結合する RNA が既知遺伝子だけでも数十種類同定された。中でもある種の non-coding RNA が特に多量に検出され、上記の情報から考えると、これこそが免疫性核酸の本体である可能性が示唆された。

さらに、得られた免疫性核酸候補について、その免疫性を検証した。まず、化合物が結合する核酸について、結合する量や結合の方法(蛋白を介した関節的な結合もしくは直接的結合)、化合物を使って単離した際の増幅率、治療効果のある化合物とない化合物の間での結合量の差、などを解析し、これらを総合的に評価したうえで、免疫性核酸候補を 10 種類前後に絞った。それらの中で検出された絶対量の多い遺伝子から着目し、さらに RNA 配列中のどの部分に化合物に結合しているかを解析し、化合物が結合している部分の配列情報を考慮して、最終的に 5 つの RNA 断片に絞り、その修飾も含めて人工的に合成した。FLT3 ligand を用いて骨髄から培養した細胞を応答細胞として解析を行った結果、これらの RNA 断片はそのまま細胞に振りかけた際は全く免疫性を持たなかった。一方で、Dotap や Iyovec といった核酸導入試薬との混合によって、強く刺激性を発揮する 1 つの RNA 断片の同定に成功した。RNA 断片の刺激性に核酸導入試薬が必要という結果は免疫性核酸が単独では免疫性を示さず、蛋白と複合体を形成した時に免疫性を発揮するという考えと一致する興味深いものである。

核酸の解析と平行して、免疫性核酸複合体に含まれる蛋白の同定を行った。当初の仮説に従い、治療効果のない化合物と結合した蛋白群の中で特に興味深いもの 12 個を選び、発現ベクター、siRNA を作成した。これらを

用いて、候補遺伝子の過剰発現およびノックダウンを行い、死細胞の免疫性を検証したところ、免疫性に関わる蛋白を 1 つ同定する事に成功した。この蛋白は免疫性との関連は全く報告がないが、RNA 結合蛋白であり、上記の検討で同定した noncoding-RNA と結合する事が報告されている。この RNA 結合蛋白はファミリーを形成することから、siRNA を用いて、他のファミリー分子についても細胞の免疫性における役割を解析したところ、他のファミリー分子は細胞の免疫性にほとんど寄与しない事が分かった。これらのファミリー蛋白は複合体を形成して機能を発揮するが、それぞれが複合体全体の機能に必要である事が分かっている。そのため、これらのファミリー蛋白が細胞の免疫性に関わらないことから、同定した RNA 結合蛋白は、もともと持っている既知の機能とは別の新しい機構によって、細胞の免疫性を制御している事が示唆された。また、この RNA 結合蛋白をノックダウンした細胞は外来の核酸に対する応答も減弱する事が明らかとなり、内在性および外来の両方の核酸の免疫性を制御する興味深い蛋白である事が示唆された。

このように本研究では新規の免疫性核酸および細胞の免疫性に関わる蛋白をそれぞれ 1 つずつ同定した。研究を開始した当初の予想とはいくつか異なる部分もあり、想定していなかった部分で興味深い研究結果も得られたが、少なくとも同定した核酸と蛋白は複合体を形成する事が分かっていることから、目的は達成する事ができたと考えられる。既に得られている結果から、この研究は学術的な側面と応用的な側面の両方においてさらに大きく発展する事が予想されることから、現時点では取り纏めを行わず、継続する事とした。化合物に端を発した本研究は治療薬開発への発展も特にスムーズに行えると考えられ、基礎研究としての新規性もさることながら、応用への期待が非常に高い研究であることから、2014 年度、本研究課題を中心課題の一つとして、CREST への応募を予定している。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 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 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根岸 英雄 (NEGISHI, Hideo)
東京大学・生産技術研究所・特任助教
研究者番号：60514297

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：