

谷口 維紹
東京大学大学院医学系研究科・教授

核酸を主体とした免疫応答制御機構の解明とその制御法の開発

§1. 研究実施の概要

核酸を主体とした免疫応答活性化とその制御機構の解明によって、自然免疫系と適応免疫系の連携メカニズムの理解を深め、免疫病態の抑制法の原理の確立とその応用を目指す。当該年度は前年度に引き続き、進行中の研究課題について解析を行った。

まず、転写因子 **IRF5** に関する前年度までの研究を更に推進し、マウスにおいて **IRF5** が **SLE** 様の自己免疫疾患の発症に関与していることを明確に示す結果を得て発表した。核酸認識による自然免疫系の活性化全体を担う共通のメカニズムとして同定した **HMGB** 分子の生体内での役割について評価するため、*Hmgb1* 遺伝子コンディショナルノックアウトマウスの作製が完了した。さらに **HMGB1** 結合蛋白の同定と機能解析、**DAI** の機能解析、死細胞の免疫応答活性化機構の解析についても、一定の予備知見を得る事ができた。更に、本プロジェクト遂行中に生まれた新しい研究として、細胞質核酸認識受容体と **Toll-like receptor** の免疫シグナルの違い・クロストークについて新規のメカニズムの存在を発見した。

また、開発研究の側面では、核酸による免疫応答を制御するアンタゴニストのスクリーニングを行い、強力な **HMGB** アンタゴニストを同定した。さらに、すでに得られている **IMF001** 化合物については、その治療効果を評価し、作用機序の一端を明らかにした。

これら一連の結果をさらに発展させる事で、今後、自己免疫疾患・敗血症などの免疫病態の制御に有効な抑制化合物の開発に繋げていく。本年度は人員の入れ替えに加え、開発研究における候補化合物のスクリーニング作業やコンディショナルノックアウトマウスの作製など、時間を要する研究課題が多かったことから、未だ論文としての発表には至っていないものが多く、十分な取り纏めには至っていないが、研究は順調に進捗しており、論文を執筆中である。すなわち、各研究課題とも基盤となる重要な多くの結果が得られ、一定の目標を達成した。今後は更にこれまでに得られた知見をもとに核酸認識受容体の機能を中心に据えながら免疫シグナル伝達系の解明およびそれらを制御する候補化合物の改良、作用機序の解析を進めていく。

§2. 研究実施体制

(1)「谷口」グループ(研究機関別)

① 研究者名

研究分担グループ長:谷口 維紹(東京大学大学院医学系研究科・教授)(研究代表者)

② 研究項目

1.HMGB タンパク群による核酸認識と下流で機能する核酸認識受容体の活性化機構の解析

- ・HMGB1 コンディショナルノックアウトマウスの作製と生体での役割の解析
- ・HMGB1 結合タンパクの機能解析と生体での役割の解析

2.低分子化合物による免疫系の制御法の開発

- ・核酸認識受容体アンタゴニストのスクリーニング
- ・IMF001 の作用機序の解析と疾患モデルマウスを使用した *in vivo* 投与における効果の評価

3.細胞質内 DNA による自然免疫系の活性化における RIG-I 様受容体依存性経路と非依存性経路の分岐メカニズムの解析

- ・RIG/MDA5 両欠損細胞の解析
- ・新規 DNA センサーの探索

4. 壊死細胞による免疫系惹起のメカニズムとその生物学的意義の解析

- ・死細胞(壊死細胞)による免疫系活性化機構の解析

5. DNA 認識受容体 DAI の機能解析

- ・DAI の機能解析と *Dai* 遺伝子欠損マウス、細胞を用いた解析

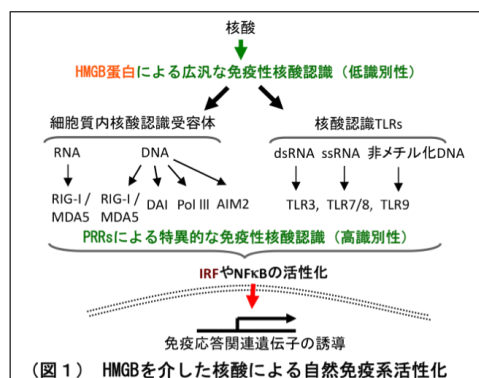
6. 細胞質核酸認識受容体と Toll-like receptor の免疫シグナルの違い・クロストークメカニズムの解析

§3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

(1) HMGB タンパク群による核酸認識と下流で機能する TLR、細胞質内受容体の活性化機構の解析

細胞質内DNAの認識受容体を同定するため、我々は細胞質で免疫系を強く活性化するB型DNA、poly(dA-dT)・poly(dT-dA)(以下B-DNA)に結合するタンパクを網羅的に解析し、主要タンパクとしてHMGB1, 2, 3を同定した(Yanai H et al,



Nature 462: 99-103, 2009)。興味深いことにHMGBはB-DNAやウイルス由来DNAのみならずRNAにも結合することを見出し、HMGBのDNA、RNAへの結合がすべての核酸認識TLRや細胞質内核酸センサーによる自然免疫系惹起の開始となること、すなわちHMGBが“common sentinel”として機能していることを見出している(図1)。しかしながら、HMGBを介した核酸認識が如何にして下流のTLR、細胞質内受容体といったパターン認識受容体の活性化に繋がるのか、その仕組みは未知であった。これらの知見を基に、このHMGB1を介した免疫系活性化のメカニズムを解明するため、平成21年度においてHMGB1に結合する2つのタンパクを同定したが、平成22年度はこの2つの分子について、遺伝子の過剰発現系、ノックダウン系を構築し、解析を行った結果、これら2分子が核酸認識に関わるという予備的知見を得た。また、HMGB1の生体内での免疫応答惹起における役割について検討を行うため、*Hmgb1*遺伝子のconditional knock-outマウスの作製を行い、完了した。現在、様々な細胞で特異的にHMGB1を欠損したマウスを作成中である。今後、これらの解析をさらに進め、核酸認識機構の根幹を担うシステムを明らかにするとともに、核酸認識とアレルギー疾患・自己免疫疾患との関わりについてモデルマウスを用いた検討を進めていく。更に、HMGB1の関与が示唆されているものの、実際の役割が証明されていない様々な炎症性疾患やリンパ球の分化等についても解析を行なう予定である。

(2) 低分子化合物による免疫系の制御法の開発

HMGB1は関節リウマチや全身性エリテマトーデス(SLE)などの自己免疫疾患症例において発現の亢進が認められ、これらの病態への関与が示唆されている。しかし、そのメカニズムについては壊死細胞からの放出や、活性化マクロファージから分泌されるHMGB1のNF- κ Bを介した炎症性サイトカイン産生への関与が示唆されているものの、HMGB1と核酸による免疫応答との関係は未知である。SLE患者では血中の抗核抗体、DNA抗体などの値が高いことはよく知られており、我々が見いだしたHMGBと核酸認識受容体活性化の結果から、マクロファージ・樹状細胞といった免疫細胞がHMGBと核酸の複合体を介して上記のような免疫の異常応答を担っている可能性が考えられる。そこで、HMGBタンパクを標的とした化合物をスクリーニングすることで、自己免疫疾患の病態改善に有用な薬剤の実用化を目指す。平成22年度は平成21年度において確立した、核酸受容体を標的としたアンタゴニストのスクリーニング系を用いて候補化合物のスクリーニングを行なった結果、強力なHMGBアンタゴニスト(合成オリゴヌクレオチド)を得ることができた。既に、マウス疾患モデル(SLE、EAE等)において本アンタゴニストがその発症を抑制するという知見を得つつある。今後、この化合物をさらに改良、または類縁の化合物をスクリーニングし、より強力なHMGBアンタゴニストの同定を試み、有用性を検証する。特にSLEについては最近の我々の研究でB細胞における自己抗体産生の分子制御機構が明らかとなったが(Savitsky et al, *PNAS* 107:10154-10159, 2010)、今後HMGBアンタゴニストがSLEへの治療効果を示した場合、このようなB細胞での自己抗体産生への影響についても解析を行う予定である。本研究は、既に応用開発研究の段階に達しつつあることから、企業との連携を模索したいと考えている。

一方で、最近の我々の研究で特定の種類の腸内細菌が腸管内T細胞の分化制御に重要な役割を果たし、炎症性腸疾患の発症に関わる事が明らかとなったが(Atarashi et al, *Science*, in press)、これらの腸内細菌は免疫性核酸を多量に含む事から、腸内細菌による炎症性腸疾患の制御には核酸が深く関連する可能性がある。そこで、今後、炎症性腸疾患についても、上記HMGBアンタゴニストの治療効果を検証していく予定である。

さらに、我々は炎症性サイトカイン誘導を抑制する化合物としてIMF001を開発したが、平成22年度の研究によって、この化合物がマウス疾患モデルにおいて敗血症やコラーゲン誘導性の関節炎を抑制することを見出した。また、細胞レベルおよびマウス個体レベルでIMF001が強力な抗がん作用を持つことも示された。さらにIMF001の抗炎症機構について解析を進めたところ、免疫系細胞およびがん細胞のいずれにおいても、NF- κ Bの活性化を抑制すると同時に、p38/JNKの活性化を誘導する性質を有している事が示され、このようなIMF001の機能が薬効に結びついていることが明らかとなった。今後、IMF001のより詳細な作用機序を解析し、標的分子の解明を目指すとともに、実用化に向けた研究を進めていく予定である。また、状況が許せば、化合物の構造改変により効果的な薬剤開発の研究にも着手していく。本研究も応用開発研究として企業との連携を視野に入れながら進める予定である。

(3) 細胞質内DNAによる自然免疫系の活性化におけるRIG-I様受容体依存性経路と非依存性経路の分岐メカニズムの解明

RIG-I様受容体、RIG-I、MDA5は細胞質内RNA認識受容体として知られており(Yoneyama et al, *Nat Immunol* 5:730-737, 2004)、これまでDNAによる応答に関与しないとされてきた(Ishii et al, *Nat Immunol* 7:40-48, 2006)。しかしながら、我々の詳細な解析によってこれらの分子がDNAにも結合すること、これらの分子が欠損すると自然免疫系応答の中でType I IFN経路が選択的に抑制されることが新しく判明した。すなわち、細胞質内RNAによる免疫応答はすべての経路がRIG-I様受容体依存性に活性化されるのに対し、DNAによる応答経路は複雑に分岐していると予想される(Choi et al, *PNAS* 106:17870-17875, 2009)。

この報告はRIG-I/MDA5遺伝子ノックダウン系による検討であるが、我々は平成22年度の研究において、この結果をRIG-I/MDA5両欠細胞を用いた系で再検討し、様々な種類の細胞質内DNA刺激、DNAウイルス感染についてRIG-I/MDA5の重要性を検討した。その結果、RIG-I/MDA5両欠損細胞では細胞質内RNA刺激による遺伝子誘導が完全に阻害される一方で、DNA刺激、HSV感染においてはI型IFNの誘導のみが顕著に減弱しており、IL-6やTNF- α など炎症性サイトカインを含め多くの遺伝子は正常に誘導されることが判明した。今後はRIG-I/MDA5がなぜIFNに特異的に関与しているのか、そのメカニズムの詳細とRIG/MDA5非依存的経路を明らかにするため、免疫性DNAに結合する蛋白の探索を行う予定である。

(4) 壊死細胞による免疫系惹起のメカニズムとその生物学的意義の解析

最近、死細胞、特に壊死細胞が引き起こす免疫系の惹起が注目を集めており、がん細胞の死、臓器移植に伴って生じる細胞死などが免疫反応を惹起する可能性が示唆されている。我々は平成21年度の研究により、死細胞によって誘導される免疫応答に、HMGB1が関与していることを明らかにしたが、さらに平成22年度の研究において、上記(2)で単離したHMGB蛋白と核酸の結合を阻害するアンタゴニストを用いて解析を行ったところ、ある種の細胞株の死細胞による免疫系細胞の活性化を、このアンタゴニストが抑制する現象を見いだした。この結果は核酸とHMGB蛋白との結合が、死細胞による免疫応答活性化に重要である事を示唆している。今後さらに、死細胞が免疫応答を惹起する分子機構を解析するとともに、死細胞による免疫応答活性化を効果的に制御する方法を見いだしていきたい。

(5) DNA認識受容体DAIの機能解析

核酸認識受容体による免疫応答の惹起という観点において、我々は新規細胞質内 DNA 認識受容体として DAI を同定した (Takaoka A et al, *Nature* 448:501-506, 2007)。平成 21 年度には DAI の DNA 認識機構における役割を更に明らかにするため、*Dai* 遺伝子欠損マウスを作成した。*Dai* 遺伝子欠損マウスは正常に繁殖し、脾臓、胸腺における T 細胞、B 細胞等の免疫担当細胞の細胞集団も野生型マウスと比較して異常は認められなかった。*Dai* 遺伝子欠損マウス由来の繊維芽細胞、樹状細胞においては、DAI の細胞種依存的な機能を明らかにした我々のこれまでの知見と一致し (Wang Z et al, *PNAS* 105:5477-5482, 2008)、B-DNA などの核酸刺激によって誘導される IFN には野生型細胞と同様の誘導が認められたが、平成 21 年度の研究により、DAI が核酸刺激時に、特定の遺伝子の誘導に関わる事が示された。さらに平成 22 年度の研究により、より多くの DAI 依存的遺伝子群の存在が明らかとなった。また、核酸刺激によるこれら遺伝子群の DAI への依存性は細胞種特異的であった。今後さらに、DAI 下流の遺伝子発現制御機構の詳細を解析するとともに、DNA ウイルスまたは細菌感染時の免疫応答における DAI の役割についても検討を行う予定である。最近になって DAI 欠損マウスがある種の細菌感染に対する応答に重要であるとの知見を得つつあり、その詳細についても解析を始めている。

(6) 細胞質核酸認識受容体と Toll-like receptor の免疫シグナルの違い・クロストークメカニズムの解析

核酸認識自然免疫受容体には RIG-I/MDA5 (RIG-I-like receptors; RLRs) をはじめとする細胞質内受容体と TLR3, 7, 9 といった Toll-like receptor (TLRs) が関与するが、それらの経路から誘導される遺伝子発現プログラムの違いについて、免疫応答の方向付け、といった観点からの研究を推進している。興味深いことに、RLR のシグナルが I 型インターフェロン (IFN- α/β) 遺伝子を強く誘導する一方で、IL-12p40 遺伝子を抑制することを見いだした。一方で、TLR シグナルは IFN- α/β 遺伝子を誘導せず、IL-12p40 遺伝子を強く誘導することも判明し、これら異なったクラス免疫受容体からのシグナルが免疫応答の方向性を指示していることを示す知見を得た。現在、これらの遺伝子調節のメカニズムと免疫応答の方向性 (polarization) について更なる解析を行っ

ているが、最近の研究により、ウイルス、バクテリアでは異なった T 細胞応答が惹起されるという知見を得ており、種々の病原体感染による疾患の発症との関係についても解析を計画している。本プロジェクトは CREST 発足時には予見していなかった新しい展開であるが、免疫応答と遺伝子発現調節の仕組みの根幹に迫る研究と位置づけられる可能性があるため、是非推進していきたい。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Savitsky D., Yanai H., Tamura T., Taniguchi T.* and Honda K. Contribution of IRF5 in B cells to the development of murine SLE-like disease through its transcriptional control of the IgG2a locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107 10154-10159 (2010) (DOI: 10.1073/pnas.1005599107)
2. Ebihara T., Azuma M., Oshiumi H., Kasamatsu J., Iwabuchi K., Matsumoto K., Saito H., Taniguchi T., Matsumoto M. and Seya T. Identification of INAM, a polyI:C-inducible membrane protein, that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *J. Exp. Med.* 207, 2675-2687.2010 (DOI: 10.1084/jem.20091573)
3. Atarashi K., Tanoue T., Shima T., Imaoka A., Kuwahara T., Momose Y., Cheng G., Yamasaki S., Saito T., Ohba Y., Taniguchi T., Takeda K., Hori S., Ivanov I., Umesaki Y., Itoh K. and Honda K. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 331, 337-341 (2011) (DOI: 10.1126/science.1198469)
4. Tsushima K., Osawa T., Yanai H., Nakajima A., Takaoka A., Manabe I., Ohba Y., Imai Y., Taniguchi T. and Nagai R. IRF3 regulates cardiac fibrosis but not hypertrophy in mice during angiotensin II-induced hypertension *The FASEB Journal* (DOI: 10.1096/fj.10-174615)

(4-2) 知財出願

平成 22 年度特許出願件数 (国内 1 件)

CREST 研究期間累積件数 (国内 2 件)

