

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. 研究実施体制

谷口グループ

① 研究代表者: 谷口 維紹 (東京大学・医学系研究科・教授)

② 研究項目

研究実施項目 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 遺伝子 conditional knock-out マウスの作成と解析
- HMGB1 結合蛋白の機能解析と遺伝子欠損マウスの作製

研究実施項目 2. 低分子化合物による免疫系の制御法の開発

- HMGB アンタゴニストの改良とマウス疾患モデルにおける評価
- IMF001 の作用機序の解析

研究実施項目 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
- RIG-I 非依存性経路を担う新規 DNA センサーの探索

研究実施項目 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

- 壊死細胞による自然免疫系活性化機構の解析

研究実施項目 5. DNA 認識受容体 DAI の機能解析

- DAI 下流シグナル伝達経路および DAI の生理的機能の解析

研究実施項目 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

- 両経路の違い・クロストークを制御する分子機構の解析

## § 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)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

我々は細胞質内DNAの認識受容体を同定するため、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解析し、主要タンパクとしてHMGB1, 2, 3を同定した。既に、HMGBタンパクがB-DNAやウイルス由来DNAのみならずRNAにも結合し、このHMGBタンパクのDNAまたは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”として機能することを報告した(Yanai et al, *Nature* 462: 99-103, 2009)。しかしながら、HMGBによる一見無差別的な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、といった仕組みは未知である。従って、本研究では細胞内の核酸認識による免疫系活性化システムが無差別認識機構から識別機構へと伝達されるメカニズムの解明を目指すと共に、*in vivo*でのHMGBの機能解析をも推進する。本研究の実施にあたり、HMGB遺伝子欠損マウス及び細胞の作製が必要であるが、*Hmgb1*遺伝子を欠損したマウスは致死性であるため、平成21年度より*Hmgb1* conditional knock-outマウスの作製を開始した。平成22年度において*Hmgb1*遺伝子conditional knock-outマウス作製を完了し、平成23年度においては、LPS誘導性敗血症ショックモデルおよびリンパ球系細胞の分化について解析を行い、それらにおけるHMGB1の重要性について新知見を得つつある。特にB細胞分化において、*Hmgb1* conditional knockout マウスでは分化初期に異常を来す表現系が得られた。また、全身性にHMGB1を欠損させたマウスにおいてはLPS誘導性敗血症ショックに抵抗性を示す結果を得ている。今後、HMGB1が敗血症などの病態の炎症にどのように関与しているか、その分子メカニズムを解明し、また、核酸刺激及びウイルス感染時における*Hmgb1*遺伝子conditional knock-outマウスの解析を行う予定である。

### (2) 低分子化合物による免疫系の制御法の開発と実用化の研究

HMGBタンパク群、特にHMGB1に関しては既に関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis : RA) や全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus : 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ることから、これらの病態への関与が示唆されている (Lotze MT et al, *Nat Rev Immunol* 5:331-342, 2005)。しかし、そのメカニズムについては壊死細胞からの流出や、活性化マクロファージから分泌されNFκBを介する炎症性サイトカイン産生を促す、等の仮説は出されているものの、HMGB1と核酸による免疫応答との関係は未知である。一方、SLE患者では血中の抗核抗体、DNA抗体、免疫複合体などの値が高いことはよく知られており、この病態の発症あるいは増悪にType I IFNが深く関与している、との報告もある (Sibbitt et al, *Arthritis Rheum* 28:624-629, 1985)。我々が見いだしたHMGBと核酸認識受容体活性化の成果を総合すれば、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。従って、本研究ではHMGBタンパクを標的とした化合物をスクリーニングし、HMGBを介した核酸免疫応答シグナルを調節する新たな免疫制御システムの構築を目指す。さらにこれらの研究成果をもとに、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。我々はHMGBタンパクを標的としたアンタゴニストを同定したが、平成23年度において、本アンタゴニストをさらに改良したISM ODNを作製し、それが*in vitro*において核酸刺激による免疫応答の活性化を抑制するとともに、ヒト多発性硬化症モデルであるEAE (experimental autoimmune encephalitis; EAE) の発症を抑制すること、及び、LPS誘導性敗血症ショックに抵抗性を付与するという結果を得た (3-1-1)。平成24年度においては、HMGB1が関与すると考えられている炎症モデルにおいて、ISM ODNの

効果について更なる検討を行い、「HMGB1標的阻害剤による炎症反応抑制法の確立」を目指す。

さらに、我々は炎症性サイトカインの誘導を抑制する化合物として IMF001 を開発したが、平成 22-23 年度の研究によって、IMF001 が敗血症および関節炎マウス実験モデルにおいて、病態を抑制する事を見いだした。また、IMF001 が生存や増殖に関わる NF- $\kappa$ B の活性化を抑制するとともに、アポトーシスの誘導を増強する p38/JNK を活性化することで、強力な抗がん作用を示すことが、細胞レベルおよびマウス個体レベルで示された。さらに平成 23 年度の研究において、IMF001 処理によってリン酸化が阻害される TLR4 下流の蛋白群を網羅的に解析した結果、IMF001 は IRAK1/4 下流蛋白のリン酸化を著明に阻害することが明らかとなった。一方で、IMF001 単独の処理でリン酸化が増強される蛋白を網羅的に解析したところ、細胞死に関わる多くの蛋白のリン酸化が増強される事を明らかにした。今後、これらの網羅解析の結果から IMF001 の作用点を予測し、直接の標的分子の同定に重点をおいて解析を進めていく予定である。

### (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)。平成 22-23 年度の研究によって、RIG/MDA5 両欠損細胞で細胞質内 RNA 刺激による遺伝子誘導が完全に阻害される一方で、細胞質内 DNA 刺激、DNA ウイルス感染においては I 型 IFN をのぞき、多くの遺伝子が正常に誘導されることが分かった。この結果は細胞質内 DNA を認識する未知の DNA センサーの存在を示唆していると考えられる。我々は平成 23 年度において、新規核酸認識分子として 2 種類の分子を同定し、これら 2 分子は主として核内に局在していることを見いだした。そして、2 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスの作製をほぼ完了した。今後、これら分子が核内でのみ機能するのか、細胞質で機能するのか、如何にして核酸を認識し、免疫シグナルの惹起に関与するのか、についてさらに詳細な解析を行なうとともに、当該遺伝子欠損マウスの免疫病態発症などについて解析を行う。

### (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いる。中でも、臓器移植に伴って生じる壊死細胞が拒絶免疫反応を惹起する可能性が指摘されている。壊死細胞から放出された HMGB1 が免疫担当細胞の活性化に重要であることは様々に報告されているが、我々は平成 21-23 年度において HMBG アンタゴニストを用いた検討により、ある種の細胞株を用いて調製した壊死細胞による免疫系細胞の活性化が HMGB アンタゴニストによって抑制され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と考えられる。今後、この免疫応答活性化が核酸・HMGB 複合体によって担われているかどうか、その分子機構を解析するとともに、死細胞による免疫担当細胞の活性化に関わるシグナル経路を我々が同定した核酸認識受容体を含めて解明する。また、HMGB1 コンディショナルノックアウトマウスにおいて、死細胞による免疫応答の活性化における HMGB1 の役割について検討する。また、我々は最近、過剰発現によってその壊死細胞由来の核酸の免疫原性を増強させるタンパク候補を同定したので、免疫疾患との関わりについて更に解析を進めたい。

### (5) DNA 認識受容体 DAI の機能解析

我々は細胞質内 DNA 認識受容体として DAI を同定した (Takaoka A et al, *Nature* 448:501-506, 2007)。DAI の機能を更に明らかにするため、最近作製に成功した *Dai* 遺伝子欠損マウスを使用し、免疫応答における DAI の役割を詳細に解析する。平成 21-23 年度の研究により、DAI が核酸による特定の遺伝子の誘導に関わる事が示された。今後、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、その生理的意義を解析するため、*Dai* 遺伝子欠損マウスあるいは他の核酸認識受容体遺伝子との二重欠損マウスを使用し、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、自己免疫疾患や炎症応答への DAI の関与について検討する。

(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。既に平成 22 年度の研究により、RLR のシグナルが I 型インターフェロン (IFN- $\alpha/\beta$ ) 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ており、さらに TLR シグナルが IFN- $\alpha/\beta$  遺伝子を誘導せず、IL-12p40 遺伝子を強く誘導することも分かっている。この結果は上記の異なったクラスの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示す知見である。平成 23 年度の研究では、上記の遺伝子発現の違いにより、RLR 経路は Th2 応答、TLR 経路は Th1/17 応答をより強く活性化することを明らかにした (3-1-5)。さらに背景にある分子メカニズムでは、転写因子 IRF3 が中心的な役割を果たしており、RLR 経路下流で活性化された IRF3 は I 型 IFN 遺伝子の誘導を活性化すると同時に、IL12p40 遺伝子の転写を強力に抑制するというユニークな機能を持つことを明らかにした。また、この機構により、ウイルス感染は Th1/17 型の抗バクテリア応答を抑制し、バクテリア重感染に対する感受性を高めることを明らかにした。さらに、このような機構は、ウイルス感染による Th1/17 型自己免疫疾患や Th2 型アレルギー疾患の誘導に関与する可能性があることから、今後、これらの知見を基に、アレルギー、自己免疫疾患との関係をも解析し、それらの疾患の新たな制御法の確立を目指す。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ●論文詳細情報

1. Yanai H., Chiba S., Ban T., Nakaima Y., Onoe T., Honda K., Ohdan H. and Taniguchi T. “Suppression of immune responses by nonimmunogenic oligodeoxynucleotides with high affinity for high-mobility group box proteins (HMGBs)”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 108, pp.11542-11547, 2011.
2. Matsuda A., Ogawa M., Yanai H., Naka D., Goto A., Ao T., Tanno Y., Takeda K., Watanabe Y., Honda K. and Taniguchi T. “Generation of mice deficient in RNA-binding motif protein 3 (RBM3) and characterization of its role in innate immune responses and cell growth.”, Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 411, pp.7-13, 2011.
3. Tsushima K., Osawa T., Yanai H., Nakajima A., Takaoka A., Manabe I., Imai Y., Taniguchi T. and Nagai R. “IRF3 regulates cardiac fibrosis but not hypertrophy in mice during angiotensin II-induced hypertension.”, FASEB J., vol. 25, pp.1531-1543, 2011.
4. 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 II., Umesaki Y., Itoh K. and Honda K. “Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species.”, Science, vol. 331, pp.337-341, 2011.
5. Hideo Negishi, Hideyuki Yanai, Akira Nakajima, Ryuji Koshiba, Koji Atarashi, Atsushi Matsuda, Kosuke Matsuki, Shoji Miki, Takahiro Doi, Alan Aderem, Junko Nishio, Stephen T. Smale, Kenya Honda, and Tadatsugu Taniguchi “Cross-interference of antiviral RLR signaling against TLR pathways modulates antibacterial T cell responses”, Nat. Immunol. (Accepted).

#### (3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 0件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1件)