

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689030

研究課題名(和文)自然免疫によるDNA認識と活性化メカニズムの解明

研究課題名(英文)Recognition mechanism of DNA by innate immunity

研究代表者

河合 太郎 (Kawai, Taro)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号：50456935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,100,000円、(間接経費) 6,330,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルスや細菌の二重鎖DNAが自然免疫系により認識されると、生体はI型インターフェロン産生や炎症反応を惹起し生体防御を行う。しかしながら、DNA認識メカニズムの詳細は分かっていない。また、細胞障害に伴い宿主細胞から放出されたDNAの異常認識が、炎症性疾患や自己免疫疾患の発症に関わることも示唆されている。本研究では、病原体や自己DNAの認識に関わるDNAセンサーのスクリーニングを行った結果、DNA修復制御因子MRE11が自己DNA認識に関与する可能性を示し知見を得た。本研究により自己DNAが起因となる自己免疫疾患等の発症機序の理解が進むと期待される。

研究成果の概要(英文)：Upon recognition of double-stranded DNA derived from virus or bacteria by innate immunity, host cells produce type I interferon or other inflammatory mediators essential for host defense. However, mechanisms involved in DNA recognition are unclear. In addition, it is suggested that self-DNA derived from damaged cells are recognized by innate immunity and this is considered to be responsible for development of inflammatory and autoimmune diseases. In this research, we identified MRE11, a protein involved in repair responses, as a candidate protein involved in self-DNA recognition and induction of type I interferon and inflammatory cytokines. MRE11 binds to and colocalizes with immunostimulatory DNA, and cells that do not express MRE11 have defects in induction of these cytokines by immunostimulatory DNA. These findings may shed light on our understanding of pathogenesis of autoimmunity in which aberrant DNA recognition is involved.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学.免疫学

キーワード：自然免疫 DNAセンサー シグナル伝達 インターフェロン ウイルス 自己免疫疾患

1. 研究開始当初の背景

自然免疫は病原体感染の初期認識や、それに引き続く炎症反応ならびに獲得免疫の活性化に必須の役割を果たしている。我々はこれまで Toll-like receptor (TLR) ファミリーが細菌、ウイルス、寄生虫などのタンパク質、脂質、核酸成分を認識するセンサーとして機能し、自然免疫系を活性化することを見出してきた。近年、RIG-I-like receptor (RLR) ファミリー、NOD-like receptor (NLR) ファミリーといった細胞質内で病原体成分を認識する新たな細胞内センサーが発見されている。RLR はウイルスの複製産物である RNA を認識し、I 型インターフェロン (IFN) や炎症性サイトカインを誘導しウイルスに対する免疫反応を誘導する。一方、NLR ファミリーの多くの機能はまだ不明であるものの、その中のいくつか (例えば、NLRP3) は様々な病原体成分刺激に応じて Caspase-1 を活性化し、炎症性サイトカイン IL-1 の前駆体を活性化型へと変換させるインフラマゾームとして機能している。また、これら以外の新規自然免疫センサーの存在が近年明らかにされつつある。DNA ウイルスや細菌のゲノム中に存在する二重鎖 DNA は宿主細胞内において認識され、I 型 IFN や炎症性サイトカインを誘導するが、この誘導は TLR や RLR 以外の何らかの細胞内 DNA センサーにより担われていることが示唆されている。興味深いことに、DNA センサーは、病原体 DNA 以外にも細胞障害に伴い細胞外へ放出された自己 DNA の認識にも関わり、この異常認識が炎症性疾患や自己免疫疾患の引き金となっていることが考えられている。例えば、自己 DNA とそれに対する自己抗体の免疫複合体が樹状細胞により取り込まれると、TLR9 や細胞内 DNA センサーを活性化することが知られている。これにより、I 型 IFN や炎症性サイトカインが持続的に産生され、自己免疫疾患の一つ全身性エリテマトーデスの悪化に関与していると考えられている。さらに、DNase (DNase I, II, III) を欠損したマウスではサイトカインが上昇し、自己免疫疾患やリウマチ関節炎を発症することが報告されている。DNase の欠損により生じた長鎖 DNA が何らかの DNA センサーのリガンドとして機能していると推測される。このように、DNA センサーは自己 DNA を認識し、自己免疫疾患等の発症や悪化に寄与すると考えられている。また、ストレスや障害により死滅した細胞から漏出した自己 DNA および DNA を含む複合体が、何らかの DNA センサーを刺激し、炎症反応を誘導することが示唆されている。一方、DNA ワクチンによる自然免疫発動と獲得免疫誘導には DNA センサーからの情報伝達が必要であることも示唆されており、DNA はアジュバントとしての利用も期待されている。

現在、こうした DNA 認識に関わる細胞内 DNA センサー候補分子として DAI、DDX41、IFI16、cGAS が同定されている。それらの機能的差異

や他に新たなセンサーが存在するかについてははっきりとしていない。

2. 研究の目的

DNA に対する自然免疫応答を理解するため、新たな DNA センサーや、その下流シグナル伝達分子の同定ならびに機能解析を行う。また、DNA が起因となる自己免疫疾患におけるこれら分子の役割を主にマウスモデルを用いることで、生体レベルで明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

DNA センサー下流のシグナル伝達分子として、STING が同定されている。STING は未刺激では小胞体膜に局在しているが、DNA 刺激に伴い核膜周辺の小胞へと移行するタンパク質である。その過剰発現により I 型 IFN プロモーターを活性化することができることや、欠損マウス由来細胞では、DNA 刺激後のサイトカイン産生が顕著に減少していることから、STING が DNA に対する自然免疫応答に必須の役割を果たすことが知られている。また、STING は TBK1 キナーゼと結合すること、活性化した TBK1 は転写因子 IRF3 のリン酸化を誘導し、最終的に活性化型 IRF3 が I 型 IFN 遺伝子発現を誘導することが示されている。一方、我々は STING の活性化に関わる制御因子として TRIM56 を同定した (Tsuchida et al., *Immunity*, 33:765. 2010)。TRIM56 は DNA に結合する活性を有していないことから、DNA センサーではなく、その下流において STING のユビキチン化修飾を施すユビキチンリガーゼである。したがって、本研究ではまず STING や TRIM56 に結合する分子中に DNA センサーが存在していると仮定し、スクリーニングを行った。実際には、STING や TBK1 をベイトとして用いた酵母ツーハイブリッドスクリーニングや、これら分子に対する抗体を用いた段階的免疫沈降法による結合タンパク質の精製を行い、DNA センサーの同定を目指した。しかしながら、これらスクリーニングの結果、DNA 結合ドメインを有する候補分子を得ることができなかった。一方、人工合成二重鎖 DNA 刺激により、DNA 損傷への応答に関与するキナーゼの一つ ATM の自己リン酸化が誘導されることを見いだした。しかしながら、ATM は DNA 刺激による I 型 IFN 産生に関与しないことが既に報告されている。このため、ATM の上流に位置する MRN (MRE11-RAD50-NBS) 複合体の関与に注目し解析を行った。

4. 研究成果

MRN 複合体の構成成分である Mre11 は、毛細血管拡張性運動失調症の一種である Ataxia telangiectasia like disorder (ATLD) の原因

遺伝子の一つである。MRE11 の発現が欠如している ATLD 患者由来の細胞(以下 ATLD 細胞)を入手し、合成二重鎖 DNA に対する応答性を解析したところ、I 型インターフェロン産生が欠如していることが判明した。一方、MRE11 を発現させた ATLD 細胞では、I 型 IFN の反応性が認められた。また、合成二重鎖 RNA に対する I 型 IFN 産生は両細胞で同程度であったことから、MRE11 は二重鎖 DNA に対する自然免疫応答に関与すると考えられた。さらに詳しく調べると、ATLD 細胞では IRF3 の活性化や STING のゴルジ体への移動が認められなかった。また、Mre11 が合成二重鎖 DNA と直接結合することや一部細胞質において局在が一致していることを見いだした。これらのことから、MRE11 は二重鎖 DNA に結合し、STING 活性化に関わる DNA センサーとして機能していると考えられた。興味深いことに、ATLD 細胞では、DNA ウイルスに対する自然免疫応答は正常であった。したがって、Mre11 はウイルス DNA よりむしろ自己 DNA の認識に関わっているとセンサーと考えられた。この点は、他の DNA センサーが DNA ウイルスに対する応答にも関与することとは異なっており、自己 DNA に対する応答と自己免疫疾患発症機序を検討する上で興味深い。将来的には、MRE11 の阻害剤であり実際 DNA に対する I 型 IFN 産生を抑制できることを我々が既に細胞レベルで確認している Mirin が、DNA が起因となるような自己免疫疾患モデルマウス(例、プリスタン誘導性自己免疫疾患モデル)の病態を制御可能かどうか検討していく必要がある。

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 12 件)

1 Kawasaki T, Takemura N, Standley DM, Akira S, Kawai T. The second messenger phosphatidylinositol-5-phosphate facilitates antiviral innate immune signaling. *Cell Host Microbe*. 2013 Aug 14;14(2):148-58.
doi: 10.1016/j.chom.2013.07.011. 査読あり

2 Dorner M, Horwitz JA, Donovan BM, Labitt RN, Budell WC, Friling T, Vogt A, Catanese MT, Satoh T, Kawai T, Akira S, Law M, Rice CM, Ploss A. Completion of the entire hepatitis C virus life cycle in genetically humanized mice. *Nature*. 2013 Sep 12;501(7466):237-41.
doi: 10.1038/nature12427. 査読あり

3 Zou J, Kawai T, Tsuchida T, Kozaki T, Tanaka H, Shin KS, Kumar H, Akira S. Poly

IC triggers a Cathepsin D- and IPS-1-dependent pathway to enhance cytokine production and mediate dendritic cell necroptosis. *Immunity*. 2013 Apr 18;38(4):717-28.
doi: 10.1016/j.immuni.2012.12.007. 査読あり

4 Kondo T, Kobayashi J, Saitoh T, Maruyama K, Ishii KJ, Barber GN, Komatsu K, Akira S, Kawai T. DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Feb 19;110(8):2969-74.
doi: 10.1073/pnas.1222694110. 査読あり

5 Oldenburg M, Kruger A, Ferstl R, Kaufmann A, Nees G, Sigmund A, Bathke B, Lauterbach H, Suter M, Dreher S, Koedel U, Akira S, Kawai T, Buer J, Wagner H, Bauer S, Hochrein H, Kirschning CJ. TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. *Science*. 2012 Aug 31;337(6098):1111-5.
doi: 10.1126/science.1220363. 査読あり

6 Kondo T, Kawai T, Akira S. Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. *Trends Immunol*. 2012 Sep;33(9):449-58.
doi: 10.1016/j.it.2012.05.002. 査読あり

[学会発表](計 2 件)

1 Kawai T. Role of RIG-I-like receptor signaling for mounting antiviral immunity. 第 42 回日本免疫学会学術集会. 2013 年 12 月 13 日(千葉). シンポジウム

2 河合太郎. Poly IC のアジュバント効果における細胞死の役割. 第 6 回寄生虫感染免疫研究会. 2013 年 3 月 8 日(大分). 招待講演

[図書](計 2 件)

1 國吉佳奈子、鍛代悠一、審良静男、河合太郎. 南山堂. パターン認識受容体 (PRR) の展開. *The Frontiers in Life Sciences シリーズ 免疫学 Update*. 2012 年. p2-9.

2 河合太郎. 科学評論社. Poly I:C の免疫アジュバント作用とその機序. *臨床免疫・アレルギー科* 58(4). 2012 年. p490-495.

[その他]

ホームページ

<http://bsw3.naist.jp/kawai/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

河合 太郎 (Taro Kawai)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・准教授
研究者番号：5 0 4 5 6 9 3 5

(2)研究協力者

Jian Zou. 大阪大学大学院医学系研究科
博士課程 (2013 年 3 月まで参画)

Surya Pandey. 大阪大学大学院医学系研
究科博士課程 (2014 年 3 月まで参画)

近藤 豪 (Takeshi Kondo). 大阪大学大学
院医学系研究科博士課程 (2013 年 3 月ま
で参画)