

## 認識機構に着目した感染とがんに対する生体防御システムの分子機構の解明

Molecular mechanisms for the detection of microbes and cancer cells in innate immunity

高岡 晃教 (TAKAOKA AKINORI)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授



### 研究の概要

自然免疫系における DNA センサーを中心とした細胞質核酸認識機構およびそれを介して活性化される自然免疫応答を規定するシグナルの制御を明らかにする研究を推進することで、特にウイルス感染の治療や予防に有用な新しい分子基盤を提示し、感染症のコントロールに寄与することを目指す。

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：パターン認識受容体，核酸，感染，がん，生体防御，ウイルス，PARP

### 1. 研究開始当初の背景

感染症は人類にとって古くから大きな問題であり、感染をコントロールするためには病原体に対する生体防御機構の解明は極めて重要な課題である。この問題に取り組むべく、我々は、最も初めのプロセスである病原体の侵入に対する宿主の『感知システム』に着目した。微生物特有の分子パターンを認識するパターン認識受容体 (pattern recognition receptors; PRRs) は I 型インターフェロン (interferon; IFN) や炎症サイトカインなどの遺伝子発現を誘導し、自然免疫応答を活性化するのみならず、適応免疫応答の強力な活性化を誘導することにつながり、感染免疫の重要な “starting switch” である。この PRRs による認識機構や下流のシグナル経路を解明することにより、感染をコントロールするための有用な標的を見出すことが期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では、自然免疫系の PRRs の中でも細胞質核酸受容体、特にまだ十分に研究が進んでいない DNA センサーを中心とする細胞質 DNA 認識機構の解明に迫るものである。このように、核酸認識に着目し、それによって活性化される自然免疫応答を規定するシグナルの制御を明らかにすることで、特にウイルス感染の治療や予防に有効な新しい分子基盤を提示することを目標としている。一方、これらの DNA 認識機構の研究を通して、がん

細胞由来の核酸認識という観点からも、がん細胞排除における自然免疫系の活性化の可能性についても探ることを計画している。

本研究は核酸認識に着目した自然免疫応答制御に基づく感染免疫や腫瘍免疫の有効な活性化をはじめ、炎症性疾患や自己免疫疾患の分子病態の研究分野にも貢献することが期待される。

### 3. 研究の方法

新たな細胞質 DNA 認識機構の存在を検証し、その存在が確認された細胞を用いて、各種 DNA リガンドに結合性を示す細胞質に局在するタンパク質分子を、質量分析を用いて検索する。候補分子について機能解析を行い、I 型 IFNs の発現誘導をはじめとする自然免疫応答への関連性を調べることで、センサーを中心とする細胞質 DNA 認識機構やシグナル経路に関わる新規のメディエーターを同定する。更に各種ウイルスを用いた感染実験を細胞およびマウス個体レベルで行うことで、感染防御における役割を明らかにする。

### 4. これまでの成果

現在までに複数の候補分子を同定するに至った。その中でまず、ポリ ADP リボースポリメラーゼ (PARP) スーパーファミリーに着目した。PARP スーパーファミリーメンバーは、ヒトでは少なくとも 17 種類が知られており、DNA 障害などの際の細胞死の誘導や DNA 修復に関与することが知られている一方で、メンバーの中には直接的な作用により、ウイルス

の複製阻害や免疫応答, 炎症に関わっていることが報告されていた. しかし, PARPスーパーファミリーと宿主のパターン認識受容体を介する自然免疫応答との関連性についてはこれまで明らかにされていなかった. このような理由から PARP ファミリーに焦点をあてて研究を推進させた結果, 自然免疫シグナル経路と強力に活性化する新しい制御因子として, PARP ファミリーメンバーである PARP-13 のアイソフォームを同定し, ZAPS (zinc finger antiviral protein, short form) と名付けた. PARP-13 は構造的に, N 末側に 4 つの zinc フィンガーモチーフを有し, C 末に PARP ドメインをもつが, ZAPS は, その PARP ドメインを欠いた短いタイプのアイソフォームである. ZAPS の方は I 型 IFN によって選択的に誘導され, AT-rich な B 型 DNA (B-DNA) を細胞質にトランスフェクションした場合の I 型 IFNs (IFN- $\alpha/\beta$ ) mRNA のみならず, IL-6 や TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインの発現誘導を強力に増強した. 一方, 興味深いことに ZAPS の作用は, B-DNA 刺激のときと同様に細胞質へ RNA をトランスフェクションした際にも増強効果が確認された. 従って, ZAPS は細胞質 DNA および RNA の両者の核酸刺激によって誘導される自然免疫応答の正の制御因子であることが明らかにされた.

更に我々は, ZAPS が刺激依存的に RIG-I (retinoic acid-inducible gene-I) と直接的な会合を示すことを見出した. B-DNA による IFN 応答が RIG-I 依存的であることが示され, ZAPS の細胞質 DNA および RNA の両経路への増強効果が RIG-I を作用点とするものであることが明らかとなった. このような ZAPS の RIG-I 経路に対する作用が, siRNA を用いて ZAPS の発現を抑制させた健常人の末梢血由来 CD14 陽性単球においても確認できた. 最後に, ウイルス感染における ZAPS の役割をヒト細胞において検証すべく, zinc-finger nuclease によるアプローチによって独自に作製した ZAPS 遺伝子欠損ヒト細胞を用いて解析した結果, RIG-I によって認識されるニューキャッスル病ウイルスの感染時の IFN- $\beta$  mRNA 誘導が顕著に阻害された. 更に ZAPS の発現レベルを増加させることで, インフルエンザウイルス感染時の IFN- $\beta$  誘導が顕著に増強され, 有意な抗ウイルス効果が示された.

従って, 細胞質においてウイルス由来の RNA あるいは, B-DNA が変換された RNA に対して RIG-I が認識することで活性化されるプロセスにおいて, ZAPS は RIG-I に会合し, おそらく RIG-I-RNA 複合体の安定化を導く結果, 下流のシグナル経路を介する自然免疫応答を強力に増強することが示唆された.

#### 5. 今後の計画

今回同定された ZAPS がウイルスに対する

感染防御として有用な標的分子である可能性が示唆され, 近年, 特に社会的に大きな問題となっているインフルエンザ感染のコントロールという観点から ZAPS の役割が注目される. また, RIG-I を活性化するウイルスは, インフルエンザウイルスに留まらず, C 型肝炎ウイルスや麻疹ウイルスなどヒトに感染症を引き起こし大きな問題となっている多くのウイルスが RIG-I によって認識されることが知られており, 広くウイルス感染防御という観点から今回明らかにされた ZAPS の役割は発展性・応用性があると期待される. 従って, 今後, マウスを用いて ZAPS の *in vivo* での感染防御の役割についての解析を進める予定である. また, ZAPS が DNA 認識に関わる可能性についても検証する予定である.

一方で, 他の候補分子の解析の結果, 現在, ヒトに感染する DNA ウイルスであるサイトメガロウイルス (CMV) の DNA 認識に関与すると考えられるセンサーを同定しつつある. 更に興味深いことに, このセンサー分子が CMV ウイルス由来の特定のタンパク質の標的となっている可能性が考えられることから, ウイルスによる自然免疫回避を阻害するといった視点からの CMV に対する感染防御の治療ターゲットを提示したいと考えている.

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む) 発表した論文:

- 1) Hayakawa, S., Shiratori, S., Yamato, H., Kameyama, T., Kitatsuji, C., Kashigi, F., Goto, S., Kameoka, S., Fujikura, D., Yamada, T., Mizutani, T., Kazumata, M., Sato, M., Tanaka, J., Imamura, M., Asaka, M., Ohba, Y., Miyazaki, T., and Takaoka, A. ZAPS is a potent stimulator of RIG-I-mediated signaling during antiviral response. *Nat. Immunol.*, **12**, 37-44, 2011.
- 2) Chen, H.M., Tanaka, N., Mitani, Y., Oda, E., Nozawa, H., Chen, J.Z., Yanai, H., Negishi, H., Choi, M.K., Iwasaki, T., Yamamoto, H., Taniguchi, T., and Takaoka, A. Critical role for constitutive type I interferon signaling in the prevention of cellular transformation. *Cancer Sci.*, **100**, 449-456, 2009.
- 3) Takaoka, A., and Taniguchi, T. Cytosolic DNA recognition for triggering innate immune responses. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 847-857, 2008.
- 4) Wang, Z., Choi, M.K., Ban, T., Yanai, H., Negishi, H., Lu, Y., Tamura, T., Takaoka, A., Nishikura, K., and Taniguchi, T. Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 5477-5482, 2008.

ホームページ URL :

<http://www.igm.hokudai.ac.jp/sci/>