

受賞者

高岡 晃教

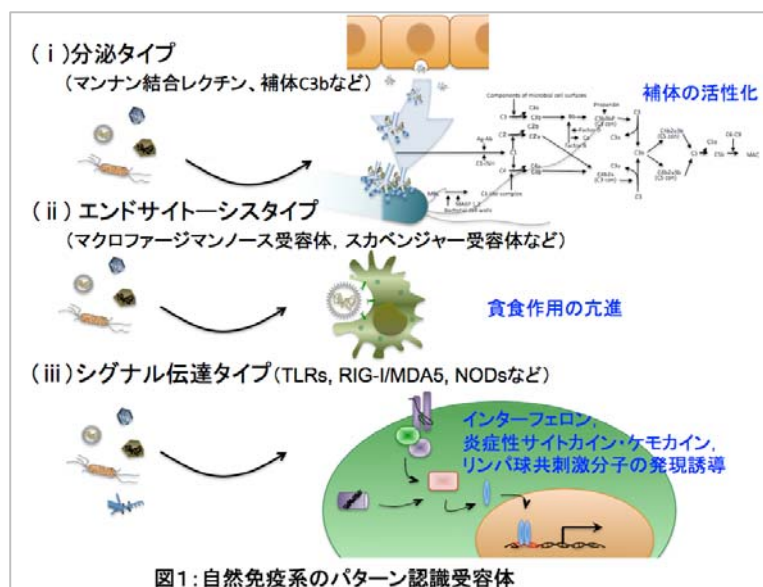
北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子生体防御分野

研究テーマ

自然免疫系の活性化を誘導する細胞内DNA感知機構の解析

### 1. 目的と背景

侵入する病原体に対する感染防御のfirst lineとして、生体はその病原体由来の分子パターンを認識する機構を備えており、自然免疫系を活性化することが明らかとなってきた。これに関連して多様なパターン認識受容体; pattern recognition receptors (PRRs)が存在することが報告されており(図1)、これらの受容体を介したシグナルがさらに適応免疫系の活性化を導くことにつながる。一方で、



がんの発生を抑制する免疫システムの1つとして、自然免疫系活性化による免疫応答の重要性を示す報告がなされている。我々は感染防御でみとめられる自然免疫系の病原体認識機構と同様のシステムががん化の抑制過程においても存在するのではないかという仮説を考えている。おそらく、がん化のプロセスにおいて、感染時と比較してその程度は弱いも

の、何らかの自然免疫活性化につながるがん細胞由来の分子パターンの認識を介して、がん細胞の排除が行われていると考えている。この自然免疫におけるがん細胞認識機構の解明により、より有効な腫瘍免疫の賦活化を実現し、新しい観点からの免疫治療を展開することを目指している。

本研究目的を遂行するために、核酸、とくに DNA に対する認識に着目して進めていくことを計画している。ごく最近、我々は、病原体認識という観点から、細胞質内の DNA に対する受容体の候補分子として DAI (DNA-dependent activator of interferon-regulatory factors)を同定するに至った (Takaoka, A. *et al.* *Nature*, **448**, 501-505, 2007)。DAI は DLM-1 と呼ばれる既知の分子であり、その遺伝子は腫瘍間質に発現増強されるものとして最初にクローニングされていた。DAI は IFN 誘導遺伝子によってコードされるタンパク質の中で DNA 結合領域を有し、細胞質内に発現していることから細胞質 DNA センサーとしての役割の可能性が予想された。実際に、DAI タンパク質の N 末端部分には Z 型 DNA(Z-DNA)結合領域 ( $Z\alpha$ ) とそれに引き続いて  $Z\alpha$  と同性的の高い領域 ( $Z\beta$ ) が存在し、ZBP1 (Z-DNA-binding protein 1) とも呼ばれていた。IFN やリポ多糖類 (lipopolysaccharide; LPS) によってマクロファージにおける DAI(DLM-1/ZBP1)の発現レベルが増強されることは示されていたが、免疫系における役割について明らかではなかった。この DAI 分子は、病原体由来の DNA のみならず、哺乳類の細胞由来の DNA によっても活性化され、自然免疫応答活性化

に關与するサイトカインの発現誘導を引き起こすことを見出している。しかし、このDAIの活性化の分子機構については、ほとんど明らかにされていなかった。今回、本研究では、まずDAI分子の活性化の分子メカニズムを明らかにする一方で、DAI分子のがん化のプロセスにおける新たな役割の可能性を追究することを目的とした。

## 2. 研究計画

今回、主に以下の2点について解析を行うことを計画した。

### (1) DNAによるDAI分子の活性化メカニズムを明らかにする：

DAIの下流におけるI型IFN産生誘導については、TBK1キナーゼやそれによるIRF3転写因子の活性化が重要であることが示されているが、DAI自体の活性化機構についてはまだ明らかではなかった。DAI分子自体がDNA刺激によりリン酸化を受けるということをすでに見出しており、今回、DAIの活性化との関連性やキナーゼの同定について検討を進めることを計画した。またDAI分子の下流でNF- $\kappa$ Bが活性化されることも見出しているがその詳細は不明である。これらに関わる活性化経路についての検討も計画した。

### (2) がん細胞由来のDNAによるDAIの活性化誘導の可能性について検討する：

実際にかん細胞由来のDNAがDAIのリガンドに成り得ることを調べ、その場合に、どのような性質のDNAがDAIを効率よく活性化させるのか解析を加える。さらに、このようなDNAによるDAIを介するシグナルが実際にナチュラルキラー細胞やマクロファージの活性化を誘導するのかについても検討を加える。

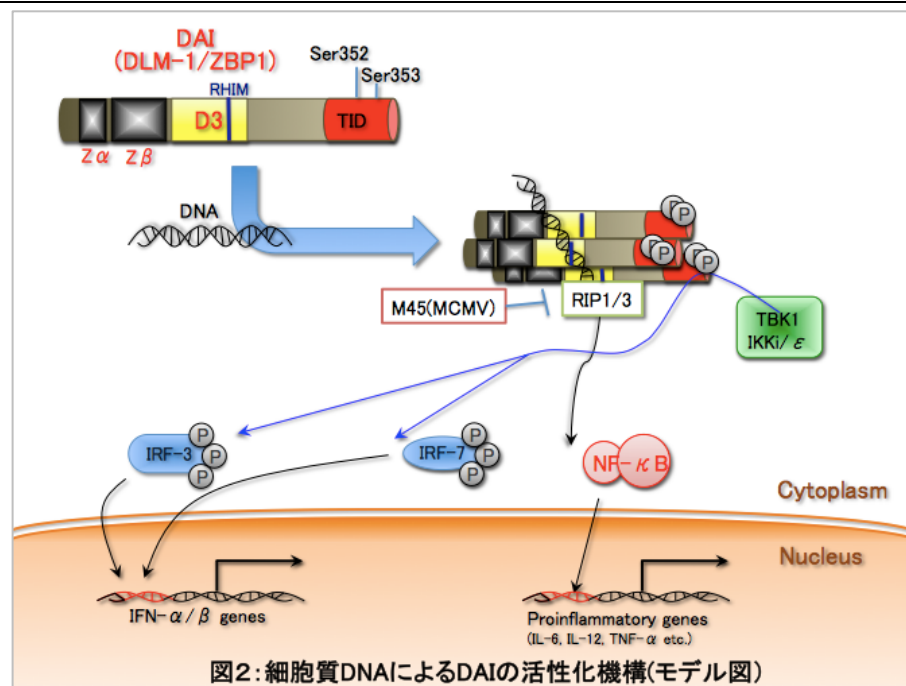
## 3. 方法及び結果

### (1) DNAによるDAI分子の活性化メカニズムを明らかにする：

まず、DAI分子のDNA認識の特性について、検討を行った。リコンビナントのDAIタンパク質を作製して解析を行った結果、*in vitro*の系においてB型DNA (poly(dA:dT)・poly(dT:dA))との直接的な結合が示され、かつこの結合はB型DNAをはじめ、ISD(IFN-stimulatory DNA)やZ-DNAをとることが知られているpoly(dG-dC)の過剰投与によって競合阻害されることが示された。DAIの十分な活性化にはリガンドとして、少なくとも500bp以上の長いDNAが必要であることが示された。また、DAIの様々な部分欠損変異体を作製し、B-DNAに磁気ビーズをつないだpull downアッセイの系を用いて、解析を行った結果、DAIのN末側の2つのZ $\alpha$ 、Z $\beta$ ドメインに加え、新たに、DAIのZ $\beta$ 領域のC末端側に存在する80ほどのアミノ酸からなる領域(D3)が主要なDNA結合領域であることを示唆する結果が得られた(図2)。さらに、DAIタンパク質がB-DNA刺激によってリン酸化を受けると見出していたが、DAIの下流のIFN経路の活性化に重要なキナーゼであるTBK1とDAIを共発現させることで、DAIがリン酸化を受けることが明らかとなった。予想されたDAIのC末端領域にある352番目と353番目のセリン残基をアラニンに置換した変異体では、TBK1やIRF-3との会合が阻害されるという結果が得られた(図2)。したがって、この2つのセリン残基のリン酸化がDAIの活性化制御に関わっていることが示唆された。また、Fvタンパク質とDAIとの融合タンパク質を発現させ、FK506誘導体であるAP20187を用いて、人工的に二量体化を誘導する実験系を用いて解析を進めた。その結果、DAIの二量体化を誘導するだけで、DNA刺激非存在下で、I型IFNの発現誘導が起こることを定量的RT-PCRによって確認した。このこ

とは、図2に示すように、おそらくDNAによって、DAIが集合体を形成することで、下流のシグナル伝達経路の活性化が引き起こされると予想される。

また、DAIのZ $\alpha$ およびZ $\beta$ 領域と相同性のあるZ-DNA結合領域を持つタンパク質としてadenosine deaminase acting on RNA 1 (ADAR1) に着目して、



DAIを介するシグナルとの関連性を検討したところ、ADAR1は細胞質DNA刺激によるIFN $\beta$ 応答を負に制御する因子であることが示された。一方、Z $\alpha$ 領域をもつウイルスタンパク質E3Lは、ADAR1と同様に細胞質DNAに $\beta$ 応答して発現されるIFN $\beta$ の誘導を抑制することが示され、自然免疫応答を逃れるウイルス側の戦略の1つと考えられた。

この項目においては、もう1つの課題を提示していた。我々が見出していたDAIを介するNF $\kappa$ B経路の活性化の分子機構の解析である。しかしこの課題については、研究の途中において、我々のアプローチと同様な流れで、別の2つのグループから論文が報告されてしまったため、これ以上進めることが困難になった。

(2) がん細胞由来のDNAによるDAIの活性化誘導の可能性について検討する：

本項目に関連して、興味深いことに癌患者においては、健常人と比較し、血中のDNA濃度が有意に高値であることを示す報告が以前からなされている(Chan, K.C. *et al.*, *Br J Cancer*, **96**, 681-5, 2007; Tsuang, J.C. *et al.*, *Pathology*, **39**, 197-207, 2007; Xue, X. *et al.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1075**, 154-64, 2006)。今回、これに基づいて、nudeマウスにB16メラノーマを担癌させた系を作製した。すなわち、マウスに担癌した腫瘍がある程度の大きさになった時点で、この担癌マウスから採血を行い、フィルターを通して血球成分を除去した上で、血中のDNAを採取した。担癌していないnudeマウスからも同様に血中DNAを採取して比較検討を行った。この採取したDNAを、陽イオン性脂質であるリポフェクトアミンを用いてマウス胎仔線維芽細胞内にトランスフェクトさせた後に、I型IFNであるIFN $\beta$ の発現誘導を、定量性RT-PCRによる解析で検討した。その結果、正常マウス由来の血中DNAも、担癌マウス由来の血中DNAもIFN $\beta$ 応答を誘導するという結果が得られた。しかし、その作用は、正常マウスと比較し、担癌マウス由来のDNAの方が、応答性が高いという結果であった。まだpreliminaryなdataではあるが、この応答性の違いは、正常マウス由来のDNAと担癌マウス由来のDNAとの質的な違いであるか、今後明らかにすべき興味深い課題である。さらに、担癌マウスにおける腫瘍径のサイズと血中DNAの量との関連性を調べたところ、正の相関があることも明らかとなった。現在、実際に腫瘍由来のDNAであるか確認する実験を進めているとともに、他の免疫細胞を使った実験系で検討中である。

#### 4. 考察

パターン認識受容体による認識機構は、自然免疫系の活性化を引き起こす上で大変重要であり、病原体の侵入を感知する各種センサーは感染の最前線において自然免疫応答の始動スイッチとして働く。さらにこのセンサーを介するシグナルは、より特異的な病原体排除機構である適応免疫応答の項活性化へとリンクさせるという点から、効果的な病原体の排除を誘導するために大変重要な役割があると考えられる。本研究で対象としたDAI分子は、特定の細胞において細胞質に存在するDNAに対して直接結合して認識することでその下流にI型IFNsをはじめとする自然免疫系のサイトカイン遺伝子の発現誘導を引き起こすパターン認識受容体の1つと考えられている。

図2にまとめのモデル図を示したように、DAIの十分な活性化には少なくとも500塩基以上長さのリガンドDNAが必要であり、DAI分子がおそらくオリゴマーを形成することで下流シグナルが活性化されることが明らかとなった。さらにDAIタンパク質はDNAの刺激によってリン酸化を受けることが示されており、そのC末端領域にある352番目と353番目のセリン残基がリン酸化の候補部位と考えられた(図2)。またこれらの残基は、DAIの活性化に必要なTBK1キナーゼによってリン酸化を受けていることを示唆する結果が得られた(図2)。このようにDAIシグナルの活性化にはDAI分子自身のリン酸化による修飾によって制御されている可能性が示唆される結果が得られた。今後は、このDAIのリン酸化修飾がTBK1やIRF-3との会合とどのように関連づけられるのか、このリン酸化を認識するアダプター分子が存在するのか等の詳細なメカニズムの解析が必要と考えている。さらに、DAIと共通の保存された領域をもつ宿主由来のタンパク質ADAR1やウイルス由来のE3Lについて検討した結果、共に細胞内DNA応答について負に制御していることが明らかとなった。また、DAI分子の下流でNF- $\kappa$ B経路が活性化される

ことを見出していたが、その詳細な活性化メカニズムは明らかではなく、この点についても研究を計画していたが、研究の途中において、別の2つのグループが、我々に先立って(Kaiser, W.J. *et al. J. Immunol.*, **181**, 6427-34, 2008; Rebsamen, M. *et al. EMBO Rep.*, **10**, 916-2, 2009)論文が発表された。これらのグループによる

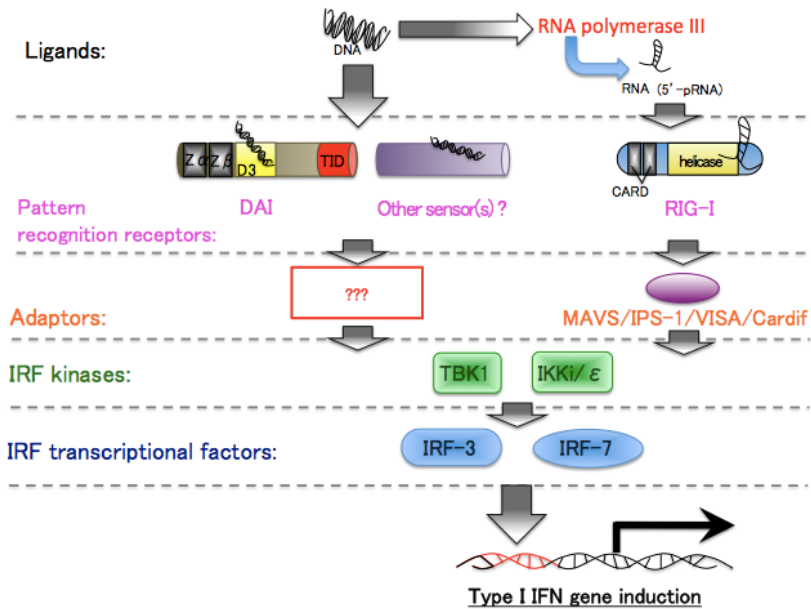


図3: I型IFN遺伝子発現を誘導する細胞質DNA経路

と、DAIのD3領域内にreceptor-interacting protein kinase (RIP) homotypic interaction motif (RHIM)が存在することを見出し、このRHIMモチーフを介してRIP1およびRIP3がDAIに会合することで、その下流でNF- $\kappa$ B経路が活性化されることが明らかにされた(図2)。さらに、興味深いことに、マウスサイトメガロウイルス由来のRHIMモチーフをもつM45タンパク質が、DAIとRIPキナーゼとの会合に対して阻害作用を示すことが報告された(図2)。

今後の方向性として、図3に示したように、予想されるDAIのアダプター分子の同定をはじめ、DAI以外の細胞質DNA認識受容体の存在 (Muruve, D. A. *et al.* *Nature* **452**, 103-107, 2008; Roberts, T. L. *et al.* *Science* **323**, 1057-60, 2009; Hornung, V. *et al.* *Nature*, **458**, 514-8, 2009; Fernandes-Alnemri, T. *et al.* *Nature*, **458**, 509-13, 2009; Bürckstümmer, T. *et al.* *Nat. Immunol.*, **10**, 266-72, 2009) やRNA ポリメラーゼ依存性の新しい認識経路 (Chiu, Y.H. *et al.*, *Cell*, **138**, 576-91, 2009; Ablasser, A. *et al.*, *Nat Immunol.* **10**, 1065-72, 2009) も報告されてきており、これらのDNA認識受容体の同定やその役割を解明することは大変注目すべき、重要な課題であると認識している。一方で、このDAI分子が、実際に感染防御系においてどのような微生物に対して細胞質内DNAセンサーとして機能するか、遺伝子欠損マウスの解析などを通して今後明らかにすべき課題であると考えている。さらにこのような細胞質DNAセンサーは自己のDNAに対しても応答性を示すが、微生物由来のDNA認識との違いが存在するのか、また宿主のDNAに対する応答がどのように制御されているのか、今後追究することは、腫瘍細胞の認識や自己免疫疾患の病態を考える上で大変興味深い点である。さらに、近年、DNAワクチンの有効性に、プラスミドDNAによるTBK1キナーゼを介した自然免疫系の活性化が重要であるという報告がなされた (Ishii, K. J. *et al.* *Nature*, **451**, 725-729, 2008)。この場合の自然免疫系活性化はDAI分子非依存性経路によることが示されており、ここでも未知なるDNA認識受容体の存在が示唆されている。したがって、DNAセンサーをさらに追究することは、疾患の病態や治療を考える上でも解決すべき重要な研究課題であると認識される。

さらに、本研究においては、自然免疫系における腫瘍細胞の認識の1つに腫瘍由来のDNAを介するシステムが存在するのではないかと仮定し、その認識システムの存在の証明を行った。その結果、preliminaryではあるが、腫瘍径のサイズと血中DNA濃度との正の相関関係が認められ、担癌マウスの血中由来のDNAを*in vitro*で細胞にトランスフェクトすることにより、IFN- $\beta$ の発現増強がメッセージレベルで検出された。現在、その他のサイトカインやケモカイン遺伝子の発現誘導を検討している。また、担癌マウスの血中で検出されるDNAが癌細胞由来であるか確認するために、ヒト癌細胞を担癌することによって検討している。次に、この腫瘍細胞由来のDNAと正常細胞由来のDNAとの間にサイトカイン応答性の違いがあるのか、もし応答性に違いがみとめられたら、それらのDNAに質的な差異があるのか検討する予定である。実際に、がんでは、通常、がん抑制遺伝子等のプロモーター領域に異常な高メチル化がみとめられることが知られているが、一方で、癌細胞の全ゲノムワイドなCpGアイランドのDNAメチル化量は低下していることも知られている。最終的には、どのDNAセンサーを介するものか今後検討を進める予定である。また将来的には、実際の癌患者由来の血中DNAを用いた実験も検討したいと考えている。このように癌細胞由来のDNAの質的あるいは量的な変化がtriggerとなり、自然免疫応答を活性化することで、いわゆる免疫監視のようなプロセスへつながっているという新しい局面が見えてくることも期待される。逆に核酸の質的な変化が腫瘍細胞にとって、免疫回避という意味をもつ可能性も考えられる。今後、腫瘍細胞由来のDNAに着目し、どのような病原体センサーを介するものであるか明らかにすることにより、腫瘍形成の病態との新たな関連性を提示することにつなげたい。前半のDAI関連の研究は東京大学免疫学講座の谷口維紹教授および、王志超、崔明権両君をはじめとする多くの研究者の方々のご協力のもとになされたものであり、ここに深く感謝申し上げます。

##### 5. 発表論文、参考文献

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.

Takaoka, A., and Taniguchi, T. Cytosolic DNA recognition for triggering innate immune responses. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 847-857, 2008.

引き続き、この流れに沿って現行の研究を推進させており、今回の報告に間に合わなかったものは、当該論文が受領された時点で再度ご報告させて頂きたく存じます。どうぞよろしくお願い申し上げます。

最後になりましたが、病態代謝研究会の研究助成を頂きましたことに対し、深く感謝の意を表します。