

ウイルス感染における自然免疫系バックアップディフェンス機構の構築

佐藤精一

北海道大学遺伝子病制御研究所 分子生体防御分野

【研究の背景】

我々は、自然免疫系の認識機構に関わるパターン認識受容体や下流シグナル経路の制御因子の研究を行ってきた。特にウイルス感染制御への応用を目指し、薬剤耐性などの問題を回避すべく、従来のウイルスを直接ターゲットとする治療戦略ではなく、宿主の感染防御機構の強化を軸とした治療分子基盤の検索を試みてきた。B型肝炎ウイルス感染においてRIG-Iの自然免疫センサーならびに直接的な抗ウイルス因子としての生理的役割を見出した(Sato *et al.*, Immunity, 2015)。また、病原体感染に対する迅速な宿主防御のための非感染時における自然免疫アダプターSTINGのHsp90 β による安定化機構(Sato *et al.*, Cell. Immunol., 2020)、そして最近、SARS-CoV-2がどのような自然免疫センサーに認識されるのか?なぜ自然免疫応答の活性化が他のウイルスに比べ弱いのかについての分子機構を見出した(Yamada, Sato *et al.*, Nat. Immunol., 2021)。

我々の先行研究により、DNAウイルスだけではなくインフルエンザ、EMCV、NDV等のRNAウイルス感染においてもDNAセンサーcGAS依存的にcGAMP(cyclic GMP-AMP)が産生され、cGAMPが細胞外へと放出され、細胞膜局在STINGを活性化していることを見出された。細胞外cGAMP分解酵素であるENPPI(Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1)に対する阻害剤であるARL67156を投与した結果、ウイルス感染時にSTINGリガンドであるcGAMPの上昇によりモノサイトに特異的に存在している細胞膜局在STINGにより自然免疫応答が活性化され、ウイルスを抑制することを見出した。興味深いことに、RIG-Iのシグナルが働かないマウスMAVS KOにおいても、ウイルス感染時にcGAMPの上昇が認められることから、RIG-Iによる第一関門が破られた場合の、自然免疫系第二関門(バックアップディフェンス)機構であることを示唆しており、このcGASによるRNAウイルス感知という全く新しい機構の意義を探り、ウイルス感染制御に繋がる基礎研究を展開させる本研究の着想に至った。

【目 的】

病原体由来分子パターンがパターン認識受容体によって認識し自然免疫は始まる。RIG-I等による自然免疫系第一関門がウイルスに破られた場合、ウイルス複製が増悪するが、それを補填する機構は明らかとされていない。申請者は、RIG-Iシグナルが働かないMAVS KOマウスにおいてウイルス感染時に活性化される第二関門の機構を新規に見出しつつある。本研究では、生体防御としての自然免疫系第二関門(バックアップディフェンス)機構の構築とその意義を探り、ウイルス感染制御に繋がる基礎研究を展開させることを目的としている。

【方 法】

新規に見出しつつあるRNAウイルス感染時のcGAMPによる自然免疫系第二関門の機構を提示、その分子メカニズムの解析、意義の検索、ウイルス感染制御に繋がる実験を下記のように立案し、計画した。

①自然免疫系バックアップディフェンス機構の構築

申請者は、MAVS KOマウスにおいて、EMCV感染時に感染後後期に、DNAセンサーであるcGASによって産生されるcGAMPが血中に大量に出ていることを見出した。この現象は、WTマウスでも同様の結果が得られている。本研究では各種

RNA ウイルスインフルエンザ、NDV、SeV でも感染後に cGAMP が血中に放出されるのか ELISA 法や質量分析(北大獣医池中教授と共同研究)を用いて、解析した。

②RNA ウイルス感染時における cGAMP 産生機構の解明

DNA ウイルス感染の場合は感染細胞の cGAS が cGAMP を産生することが予想される。一方、RNA ウイルス感染によってなぜ、cGAS を介して cGAMP を産生するのだろうか？この問いに対して我々はまず RNA ウイルス感染時の cGAMP の産生細胞の同定を行う。cGAMP の質量分析(イメージングマス:Ultra high resolution mass spectrometry imaging system(ブルカー・ダルトニクス/solariX XR-ISH1))、cGAMP に対する抗体を使用したマウス組織免疫染色、また cell sorter により細胞集団を sorting し cGAMP 産生細胞を同定する。その RNA ウイルス感染の際のリガンドは何なのか、これについては細胞死によって産生された DNA かどうかという検討もおこなった。

申請者の予備的実験により、感染時の細胞死が cGAS を活性化させ、モノサイト系細胞が cGAMP を放出しモノサイト自身の自然免疫活性化を促進している結果を得ている。

③自然免疫系バックアップディフェンス機構の生理的意義

RNA ウイルス感染により cGAS が活性化されるというこの新規知見についてその意義は何なのか。ウイルス感染時の細胞死をトリガーにし、抗原提示細胞(APC)であるモノサイトが自己の活性化のために cGAMP を放出している仮説を構築した。それに基づいて、ウイルスに対する中和抗体産生量を測定することでその検証を進めたいと考えている。一方で、細胞外 cGAMP により刺激した CD14 陽性モノサイト hPBMCs の RNAseq データから、細胞内 cGAMP と応答性が異なる遺伝子についてその機能解析を進めていく予定である。マウス脾臓における免疫細胞の細胞表面 STING 陽性の解析の結果、F4/80⁺ マクロファージ、CD11c⁺ 樹状細胞において、細胞表面 STING 陽性であり、CD335⁺ NK 細胞、CD19⁺ B 細胞、CD3⁺ T 細胞では陰性であった。さらなる詳細な免疫細胞集団を同定するため、その他組織(腹腔、リンパ節)における細胞を採取し、各種 CD マーカーとの FACS 解析によって、免疫細胞における細胞表面 STING 陽性集団の subset 特定を行う。

【結 果】

①自然免疫系バックアップディフェンス機構の構築

申請者は、MAVS KO マウスにおいて、EMCV 感染時に感染後後期に、DNA センサーである cGAS によって産生される cGAMP が血中に大量に出ていることを見出した。この現象は、WT マウスでも同様の結果が得られている。本研究では各種 RNA ウイルスインフルエンザ、NDV、SeV でも感染後に cGAMP が血中に放出されていることを見出した。

②RNA ウイルス感染時における cGAMP 産生機構の解明

感染時の Caspase 依存的な細胞死が cGAS を活性化させ、モノサイト系細胞が cGAMP を放出しモノサイト自身の自然免疫活性化を促進している結果を得た。

③自然免疫系バックアップディフェンス機構の生理的意義

細胞外 cGAMP により刺激した CD14 陽性モノサイト hPBMCs の RNAseq データを現在解析しており、細胞内 cGAMP と応答性が異なる遺伝子についてその機能解析を進めている段階である。F4/80⁺ マクロファージ、CD11c⁺ 樹状細胞において、細胞表面 STING 陽性であり、CD335⁺ NK 細胞、CD19⁺ B 細胞、CD3⁺ T 細胞では陰性であった。

【考 察】

今回、我々は、DNA ウイルスのみならず、RNA ウイルス感染によって、cGAMP が顕著なレベルで血中や組織中に存在し、それらが、マクロファージや樹状細胞が保持している細胞膜局在 STING によって認識され、抗ウイルス活性を担っていることを見出した。興味深いことに、RNA 抗ウイルス応答に必須な MAVS KO マウスでも cGAMP 産生が行われていることを示す結果が得られており、本機構の解明は、自然免疫応答を補填するバックアップの役割を示唆する結果が得られている。また興味深いのは、この細胞膜 STING のリガンドについてであり、現在まで知られている cGAMP や c-di-GMP などの他にもリガンドの存在の可能性も考えられる。さらに、現在、STING の活性化を利用したがん治療が注目されつつあるが、この場合においても STING のリガンドの投与や活性化の方法といった局面においても、impact を与えるものと期待される。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

RNA ウイルス感染時の cGAS の活性化による cGAMP の誘導は、自然免疫応答を補填するバックアップの役割を示唆する結果が得られている。今回の結果に基づき、細胞外に存在する環状ジヌクレオチド(CDNs)にフォーカスし、その生物学的意義について追究し、炎症性疾患、自己免疫疾患、がんなどの各種疾患の病態との関連性について解析することで、バイオマーカーや治療ターゲットとしての可能性について調べていきたい。実際に、cGAS-STING 経路はこのような疾患病態に深く関与することが報告されている現在極めて注目されている研究領域である。中でも自己の核酸による I 型 IFN 誘導が病態形成に関与していることが報告されている全身性エリテマトーデス(SLE)などの自己免疫疾患や、内因性や外因性に活性化される自然免疫応答がセンサーを介するシグナルが病態や免疫療法に関わることが知られているがんにおいて、今回我々が見出した細胞外 CDN の役割の可能性を調べることは、病態や治療の新しいバイオマーカーとしてあるいは治療介入ターゲットとしての可能性を見出すことにつながると期待している。

【参考・引用文献】

Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, Watanabe T, Iijima S, Sakurai Y, Watashi K, Tsutsumi S, Sato Y, Akita H, Wakita T, Rice CM, Harashima H, Kohara M, Tanaka Y, Takaoka A. The RNA sensor RIG-I dually functions as an innate sensor and direct antiviral factor for hepatitis B virus. *Immunity*. 2015 Jan 20;42(1):123-32.

Sato S, Li K, Sakurai N, Hashizume M, Baidya S, Nonaka H, Noguchi K, Ishikawa K, Obuse C, Takaoka A. Regulation of an adaptor protein STING by Hsp90 β to enhance innate immune responses against microbial infections. *Cell Immunol*. 2020 Oct;356:104188.

Yamada T, Sato S, Sotoyama Y, Orba Y, Sawa H, Yamauchi H, Sasaki M, Takaoka A. RIG-I triggers a signaling-abortive anti-SARS-CoV-2 defense in human lung cells. *Nat Immunol*. 2021 Jul;22(7):820-828.