

TLR3活性化RNA構造の同定とアジュバント機能

研究分担者 松本 美佐子 北海道大学大学院医学研究科 特任准教授

研究要旨：細胞性免疫応答惹起のシグナルを伝達するToll-like receptor 3 (TLR3)は次世代免疫アジュバントとして有望視されている。本研究では、二本鎖RNA以外にTLR3を活性化するRNA構造について解析し、不完全なステム構造を有し細胞外で安定な構造をとるRNA (structured RNA)がTLR3リガンドとなることを明らかにした。Structured RNAはpoly(I:C)と共通の取り込みレセプターで認識され、Raftlin依存的経路でエンドソームに運ばれTLR3を活性化したが、細胞内RNAセンサーは活性化しなかった。TLR3特異的なアジュバント開発において、TLR3で認識されるRNA構造とともに取り込みレセプターにより認識されエンドソームTLR3に送達されるが細胞質RNAセンサーを活性化しない構造であることが重要である。

A. 研究目的

核酸認識自然免疫レセプターのひとつであるToll-like receptor 3 (TLR3)は、抗原提示能の高い骨髄系樹状細胞のエンドソームに高発現し、アダプター分子TICAM-1 (別名TRIF) を介してCTL, NK細胞活性化のシグナルを伝達する事から、TLR3リガンドは次世代アジュバントとして期待されている。TLR3リガンドとしてはウイルス由来の二本鎖RNA (dsRNA)や合成dsRNAのpoly(I:C)が報告されているが、poly(I:C)はエンドソームのTLR3以外に細胞質のMDA5やDDX familyも活性化し強い炎症応答を誘導するなど、dsRNAの細胞内への送達機構は不明な点が多い。また、TLR3は非感染性の炎症応答にも関与することが知られており、dsRNA以外のRNA構造も認識すると考えられる。本研究では、TLR3によって認識されるRNA構造と細胞外核酸のデリバリーシステムを明らかにし、副作用が少なく効果的に細胞性免疫応答を誘導するTLR3アジュバントを開発することを目的とした。

B. 研究方法

TLR3がdsRNA以外のRNA構造を認識するかどうかが明らかにするため、感染防御にTLR3が重要な

役割を果たすポリオウイルスのcDNAをテンプレートにし～800ntの連続したsense RNA segments(PV1～PV10), complementary RNA segments (cPV1～cPV10), それらをアニールしたdsRNA(dsRNA1～dsRNA10)をin vitro 転写合成しTLR3活性化能をレポーター遺伝子アッセイで調べた。TLR3活性化能を有するRNAのFCS存在/非存在下での安定性を調べるとともに、コンピューター解析で二次構造予測を行った。また、野生型およびTLR3欠損マウスの脾臓CD11c陽性樹状細胞を用い、RNA刺激によるIFN- α , 炎症性サイトカイン産生を測定した。更に、標識RNAを用いて樹状細胞、上皮系細胞におけるRNAの取り込みを解析し、poly(I:C)の取り込みに必須の分子ラフトリンが機能性RNAの取り込みにも関与するか否かノックダウン実験で確認した。RNA二次構造予測とdsRNA領域のマッピング実験より、TLR3を活性化できるコアなRNA構造を明らかにした。

(倫理面の配慮)

動物実験は北海道大学動物実験に関する指針に基づき行った。

C. 研究結果

PV-ssRNAのなかで一部のssRNAにTLR3活性化能があることが判明した。TLR3活性化能を有するRNAはFCSを含む溶液中で分解抵抗性であり、安定な構造をとることがわかった。こうした構造RNA (structured RNA)はpoly(I:C)の細胞内取り込みと同様にRaftlin-clathrin依存的経路で取り込まれ、ヒト上皮系細胞や繊維芽細胞からIFN- β 産生を誘導した。ノックアウトマウスを用いた解析から、structured RNAによるマウス脾臓CD11c陽性樹状細胞からのタイプI IFN, 炎症性サイトカイン産生はTLR3依存的であることが明らかになった。また、structured RNAはdsRNA同様、TLR3細胞外ドメインのN末とC末に存在するdsRNA結合サイトを介してTLR3と結合することが判明した。dsRNA特異的RNaseIIIで処理するとIFN- α 誘導活性が消失することから、structured RNA中のdsRNA領域が活性に重要であると考えられた。コンピューター解析によるRNA二次構造予測とdsRNA領域のマッピング実験から、structured RNAはbulge/internal loopをもつ比較的長い不完全なdsRNA領域を有することがわかった。興味深いことに、マウス樹状細胞のTLR3は短い長さのincomplete stemをもつRNAも認識しIFN- α 産生を誘導するがヒト細胞では誘導しないことから、マウス樹状細胞ではより柔軟にRNAを認識する可能性が示唆された。

D. 考察

TLR3 が認識する RNA 構造に関して、ウイルス由来の dsRNA 以外に、in vitro 転写ウイルス mRNA, 非感染性のネクロシス細胞からの自己由来の RNA, UV-damaged noncoding RNA などが報告されていたが、詳細は不明であった。本研究より、不完全な dsRNA 領域をもち細胞外で安定な構造の RNA (structured RNA)が TLR3 のリガンドとなりうることを明らかになった。Structured RNA は TLR3 エクトドメインの N 末と C 末側に存在する dsRNA 結合部位に結合し TLR3 をオリゴマー化する。TLR3 と 46bp-dsRNA 複合体の結晶構造解析から判断すると、structured RNA 内に存在する 11bp 以

下の短い dsRNA が bulge や internal loop で分断されタンデムに並んだ領域で TLR3 と結合していると考えられた。細胞外から TLR3 を活性化するには、取り込まれて TLR3 が存在するエンドソームに送達されることが必要であるが、structured RNA は poly(I:C)と共通の取り込みレセプターで認識され Raftlin 依存的に取り込まれた。TLR3 特異的アジュバント開発においては、TLR3 で認識される RNA 構造とともに取り込みレセプターで認識されエンドソーム TLR3 に送達されるが細胞質 RNA センサーを活性化しない構造であることが重要である。また、リガンド構造によるヒトとマウス細胞での応答性の違い、さらには細胞種間での違いなどを注意深く調べる必要があると考えられた。

E. 結論

細胞外から TLR3-TICAM-1 経路のみ活性化し、自然免疫応答を誘導する新規 TLR3 リガンド、structured RNA を同定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tatematsu, M., F. Nishikawa, T. Seya, and M. Matsumoto. 2013. Toll-like receptor 3 recognizes incomplete stem structures in single-stranded viral RNA. *Nat. Commun.* 4:1833.

2. Oshiumi, H., M. Miyashita, M. Matsumoto, and T. Seya. 2013. A Distinct role of Riplet-mediated K63-linked polyubiquitination of the RIG-I repressor domain in human antiviral innate immune responses. *PLoS Pathog.* 9(8): e1003533.

3. Tanaka Y., T. Suenaga, M. Matsumoto, T. Seya, and H. Arase. 2013. Herpesvirus 6 Glycoproteins B (gB), gH, gL and gQ are Necessary and Sufficient for Cell-to-Cell Fusion. *J. Virol.* 87: 10900-10903.

4. Shime, H., A. Kojima, A. Maruyama, Y. Saito, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2013. Myeloid-derived suppressor cells confer tumor-suppressive functions on natural killer cells via polyinosinic:polycytidylic acid treatment in mouse tumor model. *J. Innate. Immun.* Published Online: Oct. 29.
5. Takaki, H., M. Takeda, M. Tahara, M. Shingai, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2013. The MyD88 pathway in plasmacytoid and CD4⁺ dendritic cells primarily triggers type I interferon production against measles virus in a mouse infection model. *J. Immunol.* 191(9): 4740-4747.
6. Takaki, H., K. Honada, K. Atarashi, F. Kobayashi, T. Ebihara, H. Oshiumi, M. Matsumoto, M. Shingai, and T. Seya. 2013. MAVS-dependent IRF3/7 bypass of interferon β -induction restricts the response to measles infection in CD150Tg mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Mol Immunol.* 57(2): 100-110.
7. Enokizono, Y., H. Kumeta, K. Funami, M. Horiuchi, J. Sarmiento, K. Yamashita, D. Standley, M. Matsumoto, T. Seya, and F. Inagaki. 2013. Structures and interface mapping of the TIR-domain-containing adaptor molecules involved in interferon signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110(49): 19908-19913.
8. Suzuki, T., H. Oshiumi, M. Miyashita, H. H. Aly, M. Matsumoto, and T. Seya. 2013. Cell type-specific subcellular localization of phospho-TBK1 in response to cytoplasmic viral DNA. *PLoS ONE* 8(12): e83639.
9. Tatematsu M, T. Seya, and M. Matsumoto. 2014. Beyond double-stranded RNA: TLR3 signaling in RNA-induced immune responses. *Biochem. J.* 45 (2): 195-201. (Review)
10. Kumeta, H., H. Sakakibara, Y. Enokizono, K. Ogura, M. Horiuchi, M. Matsumoto, T. Seya, and F. Inagaki. 2014. The N-terminal domain of TIR domain-containing adaptor molecule-1, TICAM-1. *J. Biomolec. NMR*, 02/2014; DOI: 10.1007/s10858-014-9819-1
11. Okamoto, M., H. Oshiumi, M. Azuma, M. Matsumoto, and T. Seya. 2014. IPS-1 is essential for type III interferon production by hepatocytes and dendritic cells in response to hepatitis C virus infection. *J. Immunol.* Feb 14. [Epub ahead of print]
- 2.学会発表
1. Megumi Tatematsu, Fumiko Nishikawa, Tsukasa Seya and Misako Matsumoto. TLR3 recognizes single-stranded RNA with incomplete stem structures. 15th International Congress of Immunology. August 22-27/2013. Milan, Italy.
2. Masahiro Azuma, Misako Matsumoto, Tsukasa Seya. TLR3/BATF3 axis in CD8a⁺DC induces anti-tumor CTLs by dsRNA. (同上)
3. Hiroaki Shime, Misako Matsumoto, Tsukasa Seya. Supportive involvement of tumor-associated myeloid cells in RNA adjuvant therapy for cancer. (同上)
4. Jun Kasamatsu, Hiroyuki Oshiumi, Takashi Ebihara, Misako Matsumoto, and Tsukasa Seya. INAM plays a critical role in rapid NK-accessory cell interaction leading to IFN γ induction. 第42回日本免疫学会学術集会.2013年12月11日.千葉(幕張メッセ)
5. Tsukasa Seya and Misako Matsumoto. Development of ideal adjuvant for cancer

vaccine: Beyond the scope of current immunotherapy for cancer. The 4th International Symposium on Carcinogenic Spiral. Infection, Immunity, and Cancer. 2014年2月10日.札幌(京王プラザホテル)

H.知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし