



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	自然免疫応答を活性化する新規リガンドとしての環状ADPRの同定 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	石, 姝珣
Description	配架番号 : 2700
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14959号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85828
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	SHI_Shuxun_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨 (Summary of Dissertation)

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏名 石姝珣
(Degree conferred: Doctor of Philosophy) (Name Shi shuxun)

学 位 論 文 題 名 (Dissertation Title)

自然免疫応答を活性化する新規リガンドとしての
環状ADPRの同定

(Identification of Cyclic ADP-Ribose as a Novel Ligand for Innate Immune Activation)

【背景と目的】

自然免疫は、侵入したウイルスや細菌などの病原体を迅速に認識および排除し、感染拡大を防止する最前線の生体防御機構である。細胞膜や細胞質に局在し、病原体特有の病原関連分子パターン(pathogen-associated molecular patterns; PAMPs)を認識するパターン認識受容体(pattern recognition receptors; PRRs)を認識すると、下流のシグナル伝達し、抗ウイルス活性をもつインターフェロン (Interferon; IFN) を含むサイトカインの発現を誘導する。このような PRRs のうち、細胞質において二本鎖 DNA を認識するセンサーである cGAS(cyclic GMP-AMP synthase; cGAS) は、細胞質で DNA を認識すると活性化し、環状ヌクレオチド cGAMP(cyclic-GMP-AMP)を合成することで、下流のアダプター分子 STING 依存的にサイトカインの発現を誘導する。近年、このように環状ヌクレオチドを介して自然免疫応答を活性化や制御に関与する事例がいくつか報告された。外因性および内因性環状ヌクレオチドはさまざまなセンサーやそのシグナル伝達経路の制御に関わっていることから、環状ヌクレオチドに着目してさらに検討することは自然免疫応答への理解のための重要な課題である。

環状 ADP-リボース (Cyclic ADP-ribose; cADPR) は、従来の狭義の環状ヌクレオチドや環状ジヌクレオチドであるリン酸基-リボース (OH) 結合構造は異なり、リボースの 5'位 (OH) が 2つのリン酸基とつながり、1つのアデニンだけで環状になっているユニークな特徴を有している。マウス個体の血清、脾臓、胸腺、骨髄組織など様々な組織で検出される。cADPR の合成酵素としては、主に造血系および非造血系細胞において発現する CD38 や CD157、主に脳などの組織で局在している SARM1 が知られる。cADPR は、小胞体に局在するリアノジン受容体 (Ryanodine receptor; RyR) と結合して活性化させ、そのチャネル活性依存的に Ca^{2+} を放出させることで、インスリン分泌の調節、心筋や骨格筋、平滑筋の収縮、好中球の走化性と T 細胞の活性化、神経分泌細胞の増殖の促進と分化の抑制など様々な作用を持つが、いずれの cADPR の機能もその Ca^{2+} 調節の機能で説明付けられてきた。そのため、cADPR が Ca^{2+} 非依存的な機能を持つかについてはこれまで明らかにされておらずまた、自然免疫系での役割についても不明である。そこで私は、cADPR という環状ヌクレオチドが病原体に対する自然免疫応答に関与すると仮説を立て、自然免疫シグナル経路への関与の検討を試みた。

【材料と方法】

本研究では、がん単球細胞系 THP-1 や初代培養細胞 HELF, HcoEpiC および PBMC を用いた。細胞への環状ヌクレオチドや各種核酸リガンドや siRNA の導入にはそれぞれ Lipofectamine 2000 や

Lipofectamine RNAiMAX を用いた。細胞内の Ca^{2+} 濃度調節にはカルシウムキレート剤 BAPTA-AM を用いた。細胞培養上清に分泌された IFNs や炎症性サイトカインは、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で測定した。遺伝子発現量の検証は細胞から抽出した全 RNA を用いて cDNA を合成し RT-qPCR で解析した。タンパク質発現量の確認は SDS-PAGE で分離し、immunoblotting や CBB 染色で確認した。cGAS 欠損 THP-1 細胞は LentiCRISPRv2 システムを用いて作成し、in vitro 実験に持ちいたリコンビナントタンパク質は大腸菌に発現させ精製した。ISD のビオチン化には *Label IT*[®] Biotin Labeling Kit を用いた。分子間の相互作用は、バイオレイヤー干渉法 (Bio-Layer Interferometry; BLI) やプルダウンアッセイを行った。

【結果】

環状ヌクレオチドである cADPR、cGAMP を THP-1 細胞に導入すると IFN- β 、IFN- λ 、および IL-6 の誘導が認められた。一方で、ADPR や cAMP の場合はそれらの誘導産生は認めなかった。さらに直接培地に cADPR を添加しても IFN- β は確認できなかった。このことから cADPR は細胞内で自然免疫応答を活性化することが示唆された。そこで、カルシウムキレート剤の投入や、cADPR による Ca^{2+} 濃度制御応答に重要な受容体である RYRs をノックダウンしても、その IFN- β の誘導に変化が見られなかった。つまり、細胞内 cADPR による IFN- β の誘導は、 Ca^{2+} 濃度の変化に依存しないことが示唆された。次に、cADPR が活性化する自然免疫シグナル経路を探索するため、細胞内 PRRs とその下流タンパク質の関与を検討したところ、IRF-3, STING, cGAS の関与は有意に認められた。さらに cGAS 欠損細胞株樹立し、それを用いて確認すると、cADPR による IFN 応答が喪失した。これらの結果から、cGAS シグナル経路依存的に IFN 応答が誘導されることが明らかとなった。次に、cADPR を細胞内に導入することで、cGAMP 量の増加が確認された。バイオレイヤー干渉法やプルダウンアッセイにより、cADPR と cGAS の直接結合が認められ、特に cGAS の DNA 結合部位の 1 つである Zn-thumb 構造で結合することが示唆され、cADPR が DNA と同じ部位で cGAS に結合することが明らかとなった。

【考察】

cADPR は直接結合することで cGAS の cGAMP 産生能を活性化することを見出したが、まだその詳細な分子機構については明らかにできていない。cGAS の DNA 結合部位のうち二量体化に重要な Zn-thumb 構造部位で結合することから、おそらく二量体化に関わることが予想される。一方で、この生体システムはなぜ存在するのかについてはまだ検討できていない。cADPR は①どの生体条件で誘導され、②どこで合成され、③どこで cGAS を活性化するか、など多くの課題が残されている。将来的には、病原体感染、がん、自己免疫疾患などの病態理解や治療法などの観点から、臨床に応用できる分子基盤を引き続き探究していきたい。

【結論】

cADPR は cGAS の DNA 結合部位に直接結合することで cGAS を活性化し、cGAMP の合成を促すことで、STING-IRF-3 経路を介した IFNs や炎症性サイトカインを誘導することがわかった。