

120. DNA 損傷を感知する自然免疫応答制御因子の解析

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

Key words : 自然免疫応答, 抗ガン剤, genotoxic ストレス, DNA 損傷, DNA センサー

緒 言

生命の進化は紫外線が届かない深海で行われてきたと言われるほど、DNA 損傷を引き起こす紫外線や放射線はヒトに有害である。我々ヒトの体内には DNA 変異に対しての修復機構に加えて、DNA 損傷を引き起こした細胞を排除する免疫系の仕組みが備わっている。DNA 損傷は、遺伝子変異を引き起こしガン化の原因の一つになっているが、その DNA 損傷した細胞を排除する仕組みが破綻するとガン化が一気に加速する。

一方で、現在のガンの標準的治療法である放射線療法および化学療法（抗ガン剤）は増殖速度の高いガン細胞に対して選択的な細胞死を誘導することが知られている。そのメカニズムとして、抗ガン剤がガン細胞に対して DNA 損傷を与えることに加え、細胞内に備わる自然免疫系が DNA 損傷後の細胞死を誘導することが近年報告された¹⁾。このガン細胞死を誘導する非特異的生体防御反応としての自然免疫系に着目して生体防御のコントロールにつながる新しい切り口を見出したいと考えている。

ヒトの免疫系は、生まれながら備わった系で小児でも持つ自然免疫系と後に続く適応免疫系の2つのシステムから構成されている。自然免疫は自らの生体分子の構造とわずかに異なる病原体や損傷 DNA を精巧な分子メカニズムをもつセンサータンパク質によって認識する。この「如何にして生体は異物を認識するか？」という生体防御に関わる最前線分子メカニズムを理解することで、病原体や異常な細胞に対する感染予防・治療法の新しい局面からの開発が期待される。またこのような自然免疫の活性化は後に続く、適応免疫系の効率のよい活性化を誘導することにつながり、より強力な免疫応答を起こすことで病原体や異常な細胞の排除が行われることになる。

RNA ウイルス（インフルエンザ、HCV 等）では、RIG-I を始めとする細胞内 RNA センサーがウイルス RNA を認識し自然免疫応答を誘導する。一方で、DNA 損傷や、DNA ウイルス（HIV や HSV 等）感染、細菌（Listeria）感染において DNA センサーは損傷 DNA や外来 DNA を認識し、STING（Stimulator of interferon genes ; DNA に対する自然免疫応答に関与するアダプタータンパク質）を介し下流の TBK1、IRF-3 によりインターフェロン（IFN）を誘導し生体防御応答を引き起こすと考えられている²⁾。近年、各種 DNA センサー（cGAS や DAI、IFI16 など）が同定され始めているがウイルス DNA や DNA 損傷に対する自然免疫応答はまだ不明な点が多い。

以上のような背景の中、自然免疫システム系シグナル分子 STING と結合するタンパク質群を Affinity 精製法と質量分析により同定した。そのタンパク質群の中で、SCI6 が癌細胞において、紫外線・放射線および抗ガン剤（エトポシド・ドキシソルビシン）処理後の DNA 損傷時に顕著に発現誘導され（*in vitro*）、ガン細胞のアポトーシスに抑制的に働く見解を新規に示した。SCI6 は、ミトコンドリア膜に局在するエネルギー代謝およびミトコンドリア膜透過性調節に関わる分子であることが知られていたが、私は、HSV などの DNA ウイルス感染によって、細胞内で SCI6 と STING が結合し、抗ウイルスシグナルが抑制された結果、細胞死が抑制されることも発見した。以上の結果は、*in vitro* における所見であり、本研究では、さらに詳細なメカニズムを解析すること並びに、組織及び生体レベル（*in vivo*）において SCI6 が放射線処理及び抗ガン剤投与により誘導されるガン細胞塊の細胞死にどのように関与しているかを明らかにすることを目的とする。

方 法

1. 細胞培養

本研究で用いた MEF は、DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, Nissui) に、0.1%炭酸水素ナトリウム水溶液、4 mM L-glutamine (Gibco)、10%FBS (Fetal bovine serum; ウシ胎児血清 Gibco) を製品プロトコルに従い 37℃、CO₂ 濃度 5.0%に設定されたインキュベーターで培養した。実験に用いる際は前日に、MEF を 12 well プレート (BD Biosciences) に 2×10⁵ 個播種した。CRISPR/Cas 9 の系を使用して、*SCI6* を KO した。Etoposide や doxorubicin は Sigma より購入した。

2. RNA 解析

細胞処理後、ISOGEN を用いてチオシアン酸グアニジンフェノールクロロホルム法にて RNA の回収を行い、DNase および RNase free の水に溶解した。抽出した RNA に DNase I (Invitrogen) を加え 25℃で 15 分間反応させることで DNase 処理を行い、DNA を分解させた。反応後 25 mM EDTA 1 μl を加え 65℃で 10 分間反応させることで、DNase I を失活させた。その後、ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit (Toyobo) を用いて RNA を逆転写し cDNA を合成した。

定量的 PCR は SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Takara) を用いてインターカラー法にて行い、StepOnePlus[™] Real-Time PCR System (Applied Biosystems) で定量し、 $\Delta\Delta C_t$ 法にて解析した。なお、反応条件は、95℃ 10 秒間の初期変性後、95℃ 5 秒間の変性反応、60℃ 30 秒間のアニーリング及び伸長反応の 2 ステップを 50 サイクル行った。

3. 精製タンパク質

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) が融合した STING や *SCI6* は、Bac-to-Bac baculovirus expression system (Invitrogen) を使用し昆虫細胞である Sf-9 細胞で発現させ、Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) で GST タンパクを精製した。

4. 血清の解析

SCI6 肝臓特異的 KO マウスの血清の ALT と AST は、株式会社モノリス受託サービスにより解析した。

結 果

自然免疫システム系シグナル分子 STING と結合するタンパク質群を Affinity 精製法と質量分析により同定した。そのタンパク質群の中で、*SCI6* が MEF やガン細胞において、紫外線・放射線および抗ガン剤 (エトポシド・ドキシソルビシン) 処理後の DNA 損傷時に顕著に発現誘導された (図 1)。このことより、*SCI6* は DNA 損傷刺激によって発現誘導される分子であることがわかった。興味深いことに、IFN 誘導も起こっており、DNA 損傷刺激により自然免疫応答が活性化されることがわかった。

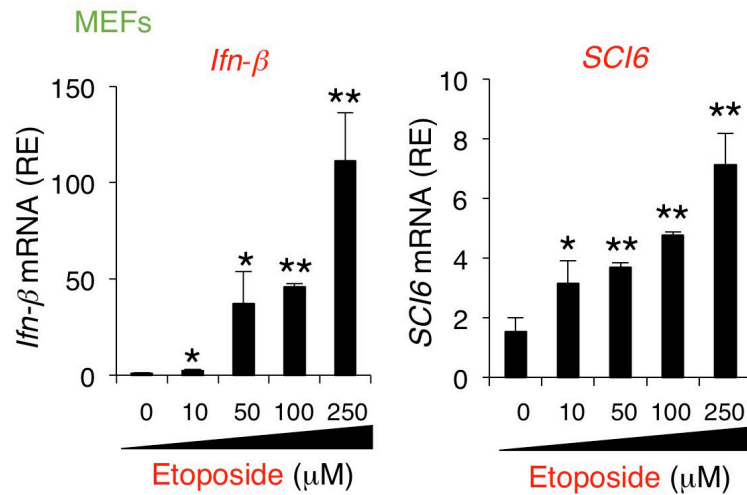


図1. *SCI6* は DNA 損傷刺激により誘導される分子である

MEF に 0、10、50、100、250 μ M のエトポシドを処理し、24 時間後の RNA をリアルタイム PCR により解析した。*IFNBI* のみならず、*SCI6* が誘導された。t 検定により統計処理を行い、** : $P < 0.01$ 、* : $P < 0.05$ 。

つぎに、*SCI6* の DNA 損傷により誘導される、IFN 誘導すなわち、自然免疫応答への関与を調べるために、CRISPR により *SCI6* を KO した細胞を樹立した。Doxorubicin による IFN 誘導が、WT よりも有意に増加しており、*SCI6* は DNA 損傷刺激に対する、自然免疫応答の抑制因子であることがわかった (図 2)。

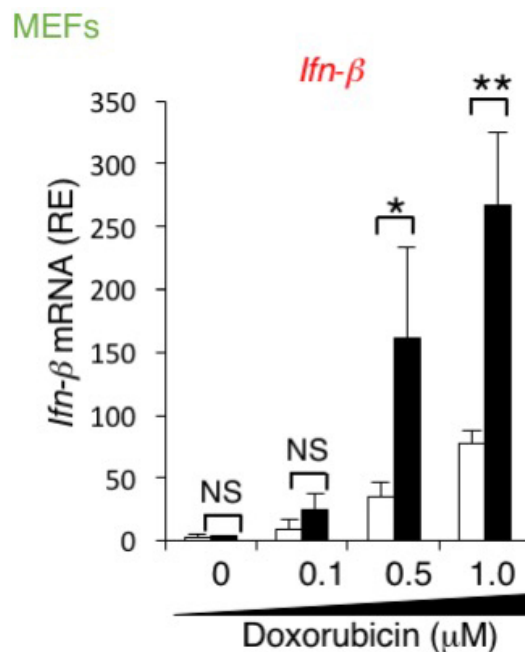


図2. *SCI6* は DNA 損傷による IFN 誘導の抑制因子である

野生型 MEF (open bar) もしくは *SCI6* を KO した MEF (solid bar) に対して、Doxorubicin を処理し、*IFNBI* を測定した。t 検定により統計処理を行い、** : $P < 0.01$ 、* : $P < 0.05$ 。

また SCI6 の DNA 損傷刺激に対する、自然免疫応答の抑制メカニズムを検証した。STING の活性化として、現在考えられている中で主要な DNA センサーである cGAS によって生産されるセカンドメッセンジャー cGAMP が STING と結合し、STING 自身の多量体形成後、下流の TBK1 との結合シグナルが伝達されると考えられている。SCI6 は STING と TBK1 の会合を阻害させる結果を得ている。STING の SCI6 結合部位は cGAMP 結合部位であることが判明したので、SCI6 は STING の cGAMP への結合を阻害していることも想定できた。実際、リコンビナントの実験により、STING の cGAMP の結合を SCI6 は阻害している結果が得られた。(図 3)

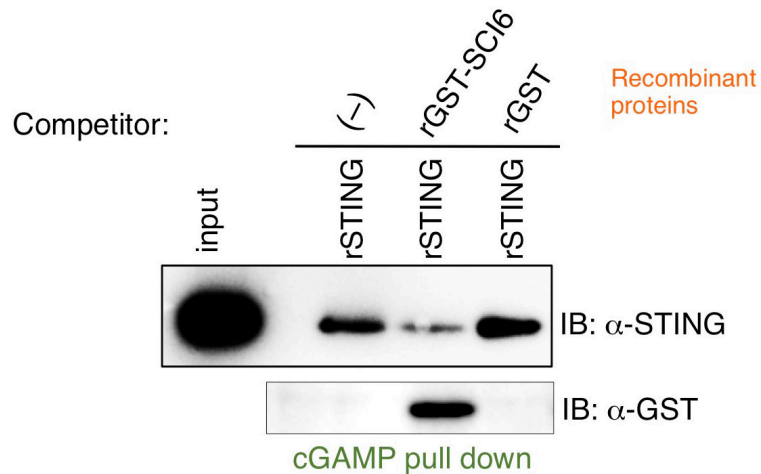


図 3. SCI6 は STING の cGAMP 結合を阻害させる

cGAMP を固定化したビーズをリコンビナント STING (rSTING) と SCI6 (rGST-SCI6) もしくは、コントロールタンパク質として GST (rGST) と混合し、cGAMP と結合する STING の量を WB で解析した。

最後に、肝臓特異的 *SCI6* KO マウスを作製し、doxorubicin 投与による肝障害マーカーの検出を行った。KO マウスでは、WT に比べ、肝障害のマーカーが増加していた (図 4)。

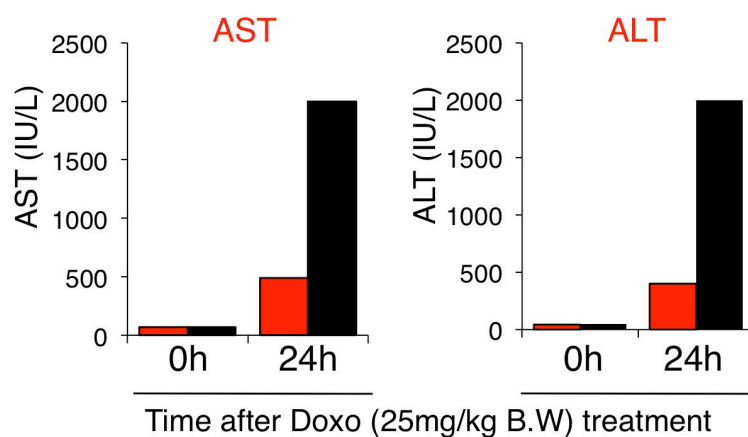


図 4. SCI6 は DNA 損傷シグナルによる肝障害を抑制する

肝臓特異的 *SCI6* KO マウスを作製し、doxorubicin に投与による肝障害マーカーである ALT ならびに、AST の検出を行った。Red Bar: 野生型マウス、Black Bar: 肝臓特異的 *SCI6* KO マウス。

考 察

本研究では組織及び生体レベル (*in vivo*) において SCI6 が、DNA ウイルス感染ならびに、放射線処理、抗ガン剤投与により誘導される自然免疫応答にどのように関与し制御するかを明らかにした。“SCI6 の自然免疫応答に対する新機能 (ネガティブレギュレーター) の発見”のみならず、ウイルス感染症治療や腫瘍監視機構の発展に、新たな知見を与え得ると考えられる。すなわち未だ克服されていない HIV をはじめとする DNA ウイルスに特化した自然免疫シグナルの制御機構を構築する点、DNA 損傷によって引き起こされる発ガンに対して SCI6 の作用を介した抗サイトカイン効果によって引き起こされる抗炎症効果を利用し、臨床応用出来るような基礎研究を展開することを目標としている点に学術的、独創的特徴がある。本研究の成果として、DNA 損傷誘発ガン細胞死と自然免疫系防御機能との詳細な関連が解明されれば、ガン治療及び HBV ウイルス等の感染性ガンの治療のメカニズムが明らかとなり、さらなる治療向上へと発展させることが期待される。

共同研究者

本研究の共同研究者は、北海道大学遺伝子病制御研究所分子生体防御分野の高岡晃教教授である。

文 献

- 1) Sistigu A, Yamazaki T, Vacchelli E, Chaba K, Enot DP, Adam J, Vitale I, Goubar A, Baracco EE, Remédios C, Fend L, Hannani D, Aymeric L, Ma Y, Niso-Santano M, Kepp O, Schultze JL, Tüting T, Belardelli F, Bracci L, La Sorsa V, Ziccheddu G, Sestili P, Urbani F, Delorenzi M, Lacroix-Triki M, Quidville V, Conforti R, Spano JP, Puzstai L, Poirier-Colame V, Delaloge S, Penault-Llorca F, Ladoire S, Arnould L, Cyrta J, Dessoliers MC, Eggermont A, Bianchi ME, Pittet M, Engblom C, Pfirsche C, Prévile X, Uzè G, Schreiber RD, Chow MT, Smyth MJ, Proietti E, André F, Kroemer G, Zitvogel L. Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nat Med.* 2014 Nov;20(11):1301-9. doi: 10.1038/nm.3708.
- 2) Barber GN. STING-dependent cytosolic DNA sensing pathways. *Trends Immunol.* 2014 Feb;35(2):88-93. doi: 10.1016/j.it.2013.10.010.