

Toll 様受容体による RNA 認識の抑制:ヌクレオシド修飾の影響と RNA の進化的起源

カタリン・カリコ、マイケル・バックシュタイン、ハウピン・ニー、ドリュー・ワイスマン

概要

DNA と RNA は、Toll 様受容体(TLR)の活性化を通じて哺乳類の自然免疫系を刺激する。しかし、メチル化 CpG モチーフを含む DNA は刺激されない。天然に存在する RNA 内の選択されたヌクレオシドもメチル化され、そうでなければ修飾されているが、これらの変異による免疫調節効果はテストされないままである。私たちは、RNA はヒト TLR3、TLR7、TLR8 を通じてシグナル伝達するが、修飾ヌクレオシド m5C、m6A、m5U、s2U、またはシュードウリジン、の取り込みが活性を阻害することを示す。このような修飾 RNA に曝露された樹状細胞(DC)は、未修飾 RNA で処理されたものよりも、サイトカインや活性化マーカーの発現が著しく少ない。DC と TLR 発現細胞は、細菌とミトコンドリア RNA によって強力に活性化されるが、修飾ヌクレオシドに豊富に含まれる哺乳類のトータル RNA によっては活性化されない。私たちは、ヌクレオシド修飾は、DC を活性化する RNA のポテンシャルを抑制する、と結論する。すなわち、自然免疫系は、細菌や壊死組織に選択的に応答する手段として、ヌクレオシド修飾を欠いている RNA を検出する。

導入

自然免疫系は、侵入する病原体に対する第一の防御線である(メジトフ、2001 年)。この系は TLR を活用して、保存された病原体関連分子パターンを認識し、免疫応答の開始を組織化する。TLR は、細胞外のロイシン・リッチ・リピートと、細胞内のシグナル伝達ドメインとを有する、生殖細胞系にコード化されたシグナル伝達受容体である。ヒトの場合、10 の異なる TLR ファミリー・メンバーが同定されており、その殆どで、対応する微生物リガンドが同定されている。いくつかの TLR は核酸を認識し、それに応答する。細菌 DNA とウイルス DNA に特徴的な非メチル化 CpG モチーフを含む DNA は、TLR9 を活性化する(邊見ら、2000 年)。しばしば見られるウイルス構成要素である二本鎖(ds)RNA は、TLR3 を活性化することが示されており(アレクソポウローら、2001 年、ワンら、2004 年)、一本鎖(ss)RNA はマウス TLR7 を活性化し(ディボールドら、2004 年)、ホスホロチオエート・クレオチド間結合を有する RNA オリゴヌクレオチドは、ヒト TLR8 リガンドである(ハイルら、2004 年)。構造類似性と配列類似性に基づき、TLR7、TLR8、TLR9 は垂族を形成する。これらの受容体の活性化はエンドソーム酸性化に依存し、インターフェロン産生を引き起こす。ヒト TLR7 と TLR8 は合成抗ウイルス化合物 R-848 によって刺激される(ジャークら、2002 年)が、天然のリガンドはまだ同定されていない。

選択された DNA 分子と RNA 分子が免疫系を活性化する独特の特性を持つことは何十年も前から知られていた。ごく最近になって、DNA に応答する際のインターフェロンの分泌が、

免疫細胞に存在する TLR9 に作用する非メチル化 CpG モチーフによって媒介されることが発見された(邊見ら、2000 年)。長年にわたり、細菌 DNA と哺乳類 DNA は、同じ化学構造を持つと描写され、なぜ細菌 DNA だけが免疫原性であり、哺乳類 DNA は免疫原性でないのか、の理解を妨げていた。しかし近年では、DNA の配列や構造の微小異質性が認識されるようになってきた。例えば、DNA の CpG モチーフに含まれるメチル化シチジンは、自然免疫系の認識の構造的基盤であることが証明された。この発見に光を照らし、複数の TLR が RNA に応答することを踏まえると、RNA の免疫原性は類似の修飾タイプの制御下にあるのかどうか、という疑問が生じる。RNA がほぼ 100 のヌクレオシド修飾を施されることを考えれば、この可能性は不合理なものではない(ローゼンスキーら、1999 年)。重要なのは、RNA 修飾の範囲と質は、RNA サブタイプに依存し、RNA が単離される生命体の進化レベルと直接関連している点である。細胞 RNA の主要構成要素(~80%)であるリボソーム RNA は、細菌よりも哺乳類の細胞から得られる場合、極めて多くのヌクレオシド修飾を含んでいる。例えば、ヒト rRNA は、細菌 rRNA の 10 倍のシュードウリジン(Ψ)と 25 倍の 2'-O-メチル化ヌクレオシドを有するが、ミトコンドリア ー真細菌の残余物である細胞小器官ー rRNA は、修飾が非常に少ない(バシェレリとカヴァイユ、1998 年)。転移 RNA は、RNA の中で最も激しく修飾されたサブグループである。哺乳類 tRNA では、ヌクレオシドの最大 25%が修飾されるが、原核生物 tRNA では、修飾が著しく少ない。細菌 mRNA にはヌクレオシド修飾が含まれないが、哺乳類 mRNA は、5'末端キャップの一部である N7-メチルグアノシン(m7G)に加え、5-メチルシチジン(m5C)、N6-メチルアデノシン(m6A)、イノシン、多くの 2'-O-メチル化ヌクレオシドといった修飾ヌクレオシドを有する(ボカーとロットマン、1998 年)。修飾ヌクレオシドの存在は、インフルエンザ、アデノ、単純ヘルペスを含む多くのウイルス RNA の内部領域でも示されている。驚くべきことに、修飾ヌクレオシドは、mRNA 細胞よりもウイルス細胞の中に頻繁に検出された(ボカーとロットマン、1998 年)。多くのヌクレオシド修飾は、細菌 RNA または哺乳類 RNA のいずれかに、他に類を見ないほど存在し、結果として、免疫細胞が微生物 RNA と宿主 RNA を識別するための追加の分子的特徴を提供する。細胞は通常、DNA の 5 倍から 10 倍の RNA を含んでいることを考えると、RNA にこのような独特の特徴が存在することで、細胞は、免疫系がサンプリングする際の豊富な分子源となり得る。この見解は、RNA に応答する際の複数の TLR シグナル伝達を同定することで明らかになりつつある。しかし、ヌクレオシド修飾が RNA の免疫刺激能に果たす役割は不明である。

近年、私たちは、RNA がヒト DC に及ぼす免疫調節効果を調査してきた。これらの研究は、試験管内で転写された RNA が、部分的に、RNA の二本鎖領域が TLR3 を通じてシグナル伝達するメカニズムによって、DC を活性化/成熟させること示した(カリコら、2004 年)。最近では、試験管内転写産物、すなわち細菌由来だが真核細胞由来ではないトータル RNA が、高レベルの IL-12 分泌に対して DC をプライミングすることが注目された(コスキラ、2004 年)。これらの様々な RNA 間の識別に対する分子的基盤は、完全には理解されていない

い。本報告において、天然に存在するヌクレオシド修飾が、RNA の免疫刺激能を調節するかどうか、また TLR がこのプロセスで果たすかもしれない役割を究明しようとした。

結果

天然に存在する RNA は、DC の強力な活性剤と同じではない

最近、私たちは、試験管内で転写された RNA や壊死した哺乳類細胞から放出された RNA が、ヒト DC を活性化することを示した(カリコら、2004 年)。独立した研究で、私たちは、試験管内で転写された RNA は効果的であるものの、真核生物 mRNA や tRNA は、培養されたヒト DC を刺激しないことも究明した(カリコら、2004 年)。この知見は、異なる細胞 RNA サブタイプの免疫刺激能を調査するよう私たちを促した。その目的は、元の実験環境で DC を活性化した壊死細胞から、尤もらしい RNA 成分を同定することだった。私たちはまず、異なる細胞内コンパートメント(細胞質、核、ミトコンドリア)から RNA を単離した。これらの RNA 単離物、並びにトータル RNA、tRNA、ポリ A テール選択 mRNA 一すべて哺乳類由来一 は、リポフェクチンと複合化され、GM-CSF と IL-4 で生成された単球由来 DC(MDDC)に添加された。私たちは、哺乳類のトータル RNA、核 RNA、細胞質 RNA、mRNA はすべて TNF- α 分泌を誘導するが、T7 RNA ポリメラーゼ(RNAP)によって試験管内で合成された RNA に比べて非常に低いレベルであることを究明した(図 1)。興味深いことに、哺乳類 tRNA は検出可能なレベルの TNF- α を誘導しなかったのに対し、ミトコンドリア(mt)RNA は、MDDC を刺激する最も強力な RNA タイプだった。mtRNA が他の哺乳類 RNA タイプよりも細菌 RNA と多くの特徴を共有していることを考えると、細菌のトータル RNA も MDDC の非常に強力な活性剤であることが明らかになったところで、驚くには値しない(図 1)。修飾されているとは言え、その程度が哺乳類 tRNA より少ない細菌 tRNA は、低レベルの TNF- α を誘導するのに対し、他に由来(酵母、小麦胚、牛)する tRNA は非刺激性だった(図 1、但しデータ未表示)。同様の結果は、他の哺乳類由来の RNA をテストした場合や、GM-CSF+IFN- α 生成 MDDC を用いて RNA レポートリーを分析した場合でも観察された(データ未表示)。ssRNA と dsRNA の両方を開裂できるベンゾナーゼにより RNA サンプルが分解されると、MDDC 内で RNA シグナル伝達が無効にされ、以上のことから、RNA が TNF- α 分泌を引き起こす活性成分であることが確認された(図 1)。これらの知見は、免疫刺激の観点から、天然に存在するすべての RNA が同じではないことを示す。修飾をわずかしか含まない細菌 RNA や mtRNA は、DC の最も強力な活性剤であるのに対し、夥しく修飾された tRNA は活性がないに等しいことから、RNA の活性化能は、ヌクレオシド修飾の程度と逆相関しているように思える。

試験管内で転写された RNA は、ヒト TLR3、TLR7、TLR8 を刺激するが、殆どのヌクレオシド修飾 RNA は刺激性ではない

当然ながら、すべての RNA は 4 つの塩基性リボヌクレオチドである ATP、CTP、UTP、

GTP から合成されるが、組み込まれたヌクレオシドの一部は、ほぼすべての RNA タイプで転写後に修飾される。修飾の範囲や性質は異なり、RNA タイプ、並びに RNA が由来する生命体の進化レベルに依存する。天然の RNA に関する知見から、ヌクレオシド修飾は、DC を活性化する RNA の能力に影響を与えているかもしれないと示唆されることから、私たちは、この可能性を更に調査しようと試みた。まず、選択された修飾を有する RNA を得るために、私たちは試験管内転写反応を実施して、4つのヌクレオチド三リン酸(NTP)のうち1つまたは2つを、対応するヌクレオシド修飾 NTP に置換した。長さが 0.7~1.9kb の範囲にある一次配列を有し、修飾ヌクレオシドがまったくないタイプ、1つあるタイプ、2つあるタイプのいずれかを含む複数の RNA セットを転写した。ゲル電気泳動を変性することにより分析された修飾 RNA は、すべてが完全なままで、そのサイズに基づいて予想されたとおりに移動したという点で、未修飾 RNA と見分けがつかなかった(図 2A)。

私たちと他の研究者らは最近、試験管内で転写された RNA が、ヒト TLR3(カリコら、2004 年)とマウス TLR7(ディボールドら、2004 年)を活性化し、化学的に合成されたオリゴボヌクレオチド(ORN)が、マウス TLR7 とヒト TLR8 を刺激する(ハイルら、2004 年)ことを示した。従って、ヌクレオシド修飾が、RNA を媒介した TLR の活性化に影響を与えるかどうかを究明するために、私たちは、ヒト TLR3、TLR7、TLR8 を発現するよう安定的に転換させたヒト 293 細胞株を利用して、IL-8 の放出を通じて TLR 活性化をモニタリングした。まず、TLR3 転換細胞をリポフェクチン複合化 RNA(RNA-1571、RNA-730、RNA-1866)で処理したところ、過去の研究(カリコら、2004 年)に基づいて予想されたとおり、高レベルの IL-8 分泌が測定された。m6A または s2U 修飾を含む RNA は、検出可能なレベルの IL-8 を誘導しなかった(図 2B、但しデータ未表示)。RNA 内に m5C、m5U、Ψ、m5C/Ψ といった他のヌクレオシド修飾が存在しても、顕著な抑制は殆どなかった、すなわち、TLR3 を活性化する RNA のポテンシャルにまったく効果を及ぼさなかった(図 2B)。

私たちは以前、親株の 293 細胞は低レベルの内因性 TLR3 を発現することを指摘した(カリコら、2004 年)。従って、TLR3 固有の短ヘアピン(sh)RNA を発現するプラスミドとともに、293-hTLR8 細胞株をトランスフェクションすることで、内因性 TLR3 の不要な発現を排除した。ポリ(I):(C)に応答しない、新たに生成されたこの細胞株は、更なる研究に用いられた(図 2B)。TLR3 標的 shRNA を発現する 293-hTLR8 細胞が、試験管内で転写された RNA とともにトランスフェクションされると、大量の IL-8 を分泌した。しかし、いかなるヌクレオシド修飾を含む RNA をトランスフェクションしても、これらの細胞は刺激されなかった(図 2B)。いくつかの実験で、私たちは、RNA 内の m6A 修飾が、限定的な量の IL-8 の放出を許すことを観察した。対照細胞(293、293-pUNO ヌル、293-TLR3-sh、293-hTLR9)は、RNA トランスフェクションに応答しなかった(図 2B と 2C、但しデータ未表示)。クローン・アーティファクトが RNA 誘導刺激の原因であることを除外するため、TLR 発現細胞株ごとに少なくとも 3つの別々のクローンを分析し、同様の結果を得た。

過去の研究では、ホスホロチオエート・ヌクレオチド間結合を有するグアノシン・リッチ、

およびウリジン・リッチな ssRNA オリゴマーに応答してシグナル伝達するのは、ヒト TLR8 であって、ヒト TLR7 ではないことが示された(ハイルら、2004 年)。TLR7 と TLR8 は R-848 をリガンドとして共有していることから、私たちは、天然のホスホジエステル・ヌクレオチド間結合を有する長い RNA も、これらヒト TLR に対する共有リガンドであるかどうかを究明しようとした。試験管内で転写されたすべての RNA は、TLR3 標的 shRNA を発現する 293-hTLR7 細胞にトランスフェクションすると、R-848 と同等のレベルで IL-8 を誘導した。しかし、修飾ヌクレオチドを含む RNA のトランスフェクションでは、IL-8 の誘導は見られなかった(図 2B)。hTLR7 を発現する、異なる構成要素から成る細胞株で実施した実験でも同様の結果が得られた。総じて、これらの実験は、RNA がヒト TLR3、TLR7、TLR8 を活性化し、ヌクレオチド修飾がこれらの TLR を刺激する RNA の能力を制限していることを示している。具体的には、m6A と s2U の修飾は、TLR3 を刺激する RNA の能力を抑制し、m6A、m5C、m5U、s2U、 Ψ の修飾は、TLR7 と TLR8 の刺激を阻害する。次の実験では、天然源から単離された RNA をテストした。まず、異なる哺乳類種の RNA を、ヒト TLR3、TLR7、TLR7、TLR8 を安定的に発現する 293 細胞にトランスフェクションした(TLR7 と TLR8 細胞株も TLR3 標的 shRNA を発現した)。これらの RNA はいずれも十分な IL-8 分泌を誘導しなかった。しかし、2 つの異なる大腸菌由来の細菌のトータル RNA は、ロバストな IL-8 分泌を誘導した(図 2C)。これらの結果と追加の実験的証拠 — 一つ目は、293-hTLR9 にトランスフェクションされた細菌 RNA は IL-8 分泌を誘導しなかった(図 2C)、というものの、二つ目は、細菌 RNA 単離物内の考えられ得る混入物質である LPS と非メチル化 DNA(CpG ODN)が、テストされた TLR を活性化しなかった(図 2C)、というもの — はいずれも、細菌 RNA が TLR3、TLR7、TLR8 の活性剤であることを示している。ヒト血小板から単離されたミトコンドリア RNA もヒト TLR8 を刺激したが、TLR3 や TLR7 を刺激しなかった(図 2C)。全体的に、これらのデータは、細菌やミトコンドリアから単離された RNA といった、修飾ヌクレオチドの中でも希少な RNA が、選択されたヒト TLR を刺激する一方で、ヌクレオチド修飾に豊富に含まれる哺乳類のトータル RNA は非刺激性または刺激性が最小であることを直接的に示している。

修飾ヌクレオチドは、DC によるサイトカイン分泌および活性化マーカー発現を誘導する RNA の能力を低下させる

修飾ヌクレオチドまたは未修飾ヌクレオチドを含む RNA を DC 上でテストした。MDDC と IFN- α 生成 MDDC を用いて得られた代表的なデータ・セット(図 3A と 3B)は、ヌクレオチド修飾が、TNF- α と IL-12 の分泌を誘導する RNA の能力を低下させることを示している。同じ塩基修飾を持ちながら異なる一次配列と長さを有する他の RNA セットをテストした場合や、5'キャップ構造および/または 3'末端ポリ A テールを添加したり、過去にインターフェロン産生を促進すると報告された(キムら、2004 年)5'三リン酸部位を除去したりすることで RNA を更に修飾した場合も、結果は同じだった(データ未表示)。異なる長さ

配列の RNA は DC から様々な量の TNF- α を誘導するが、通常その差は 2 倍未満だった (図 3C)。しかし、異なるドナーの MDDC を使用したところ、私たちはより大きな変動を検出した。殆どの実験では、図 3A に示されるように、MDDC は RNA 処理に反応したが、 \sim 25%の確率で、m6A の存在が、RNA を媒介した MDDC の活性化を m5C や Ψ よりも強力に減少させた。そのような環境下では、ポリ (I):(C) と R-848 の処理に対する MDDC の相対感度も異なっていた (図 S1 は本論文に付随するオンライン上の[補足データ](#)で入手可能)。この変動は、以下に述べる初代 DC に対して観察されなかった。ノーザン分析を用いることで、私たちは、トランスフェクションされた RNA の細胞内取り込みと安定性が、ヌクレオシド修飾に影響されないことも確認した (データ未表示)。

初代血液 DC がサイトカイン生成 DC と同様の方法で RNA に応答するかを究明するため、私たちは、末梢血液から初代単球様 DC (DC1、BDCA-1+) と形質細胞様 DC (DC2、BDCA-4+) を精製した。どちらの細胞タイプも R-848 曝露時に TNF- α を産生したが、非常に低いレベルとは言うものの、ポリ (I):(C) に応答したのは DC1 のみで、DC2 では TLR3 活性が見られなかった。試験管内転写産物のトランスフェクションにより、DC1 と DC2 の両方で TNF- α 分泌が誘導された (図 3D)。修飾 RNA を用いたデータによると、ウリジンを m5U、 Ψ 、s2U に置換した転写産物のみが刺激性を示さなかった一方で、m5C と m6A を含む RNA は、対応する未修飾 RNA とほぼ同じくらい強力なサイトカイン誘導因子であることが明らかとなった。DC2 は TLR3 や TLR8 を発現せず、それ自体は 293-hTLR7 細胞で観察される応答に似ているはずなので、このことは予想外だった。m5C と m6A が優位な刺激効果を発揮するかどうかを究明するために、m6A/ Ψ の二重修飾を有する転写産物をテストしたところ、非刺激性であることが判明したが、一方で単一タイプの修飾を含む RNA の混合物 (m6A+ Ψ) は、強力なサイトカイン誘導因子だった。このことは、m5C 修飾 RNA と m6A 修飾 RNA を認識し、U 残基の修飾によってシグナル伝達が阻害される、追加の RNA シグナル伝達物質を初代 DC が有している可能性が高いことを示唆する。

RNA-1571 とその修飾バージョンで処理された MDDC の FACS 分析により、m5C、m6A、 Ψ 、s2U、m6A/ Ψ といった修飾ヌクレオシドが、CD80、CD83、CD86、MHC クラス II の細胞表面発現を誘導する DNA の能力を低下させることが明らかとなった (図 4)。全体的に、これらの結果は、サイトカインを成熟させ、分泌するよう DC を誘導する RNA の能力は、RNA 内に存在し、刺激を阻害する修飾の一般的な傾向を有するヌクレオシド修飾の特徴だけでなく、DC のサブタイプにも依存していることを示している。

RNA を媒介した免疫刺激の抑制は、RNA 内に存在する修飾ヌクレオシドの数に比例する

天然の RNA の成分であるヌクレオシド修飾の重要性を理想的に定義するには、ネイティブ RNA のヌクレオシド修飾の範囲と多様性を正確にモデル化する試験管内 RNA の構築と、天然の RNA 単離物に存在する修飾を選択的に除去する能力が必要だが、いずれも現行の技術では不可能である。本研究で利用されたヌクレオシド修飾 RNA の多くは、RNA 内の全

ヌクレオチドの~25%を寄せ集めた1タイプの修飾を含んでいた。特定の修飾ヌクレオシドのいずれか一つの比率は、ばらつきはあるものの、ネイティブ RNA の 25%よりはるかに小さいので、私たちは、特定の修飾ヌクレオシドのいずれか一つの、RNA の免疫刺激能を制限するのに十分な最小頻度とは何か、と問うた。この疑問に答えるにあたって、修飾ヌクレオシドの数に制約を設けた RNA を生成するために、2つのアプローチが用いられた。まず、私たちは、m6A、 Ψ 、m5C の量を減らし、対応する未修飾 NTP の量を増やすようにして、試験管内で RNA を転写した。私たちは、T7 RNAP とともに得られた事前の RNA 収量が、酵素が塩基性 NTP とほぼ同等の効率で m6A、 Ψ 、m5C といった NTP を利用していることを示唆することから、修飾ヌクレオシド・リン酸の RNA への組み込みは、転写反応に含まれる比率に比例する、と予想した。HPLC 分析により、この考えが裏づけられ、例えば、UTP: Ψ TP が 50:50 の割合で存在する中で転写された RNA が分解すると、組み込まれた UMP と Ψ MP のほぼ同量の放出が示された(図 5A)。修飾ヌクレオシド含有量を増加させつつ RNA-1571 を MDCC にトランスフェクションした際、私たちは、修飾ヌクレオシドの量が増加すると、TNF- α を誘導する RNA の能力が比例的に阻害されることを検出した(図 5B)。RNA 内に、1,571 長鎖非コード RNA 一分子あたり約 3~6 の修飾ヌクレオシドに相当する 0.2%~0.4%の m6A、 Ψ 、m5C が存在すれば、検出可能なサイトカイン分泌の阻害を引き起こすのに充分だった(図 5B)。一分子あたり 14~29 の修飾ヌクレオシドに相当する 1.7%~3.2%の修飾ヌクレオシド・レベルを有する RNA をテストしたところ、RNA は、TNF- α の発現を誘導する能力の半分しか維持できなかった。TLR 発現 293 細胞で同様のトランスフェクション実験を行った際、RNA を媒介したシグナル伝達イベントを阻害するために、通常、高い割合(~25%)の修飾ヌクレオシド含有量が必要だった(データ未表示)。2つ目のアプローチで、私たちは、ホスホジエステル・ヌクレオチド間結合、5'-リン酸塩、同一の一次配列だが単一の部位に存在する m5C、 Ψ 、2'-O-メチル-U(Um)といった修飾ヌクレオシド、で化学合成された 21 塩基 ORN を利用した(図 6A)。合成 ORN を用いて MDCC をトランスフェクションした後で得られた結果は、短い未修飾 ORN が顕著な TNF- α 分泌を誘導できることを示していたが、この効果を無効とするのに、単一のヌクレオシド修飾があれば充分だった(図 6B)。TLR3 標的 siRNA を発現する TLR 転換 293 細胞で実験を繰り返したところ、対照 ORN は、IL-8 を分泌するよう 293-hTLR8 細胞を誘導した一方で、修飾ヌクレオシドを含む ORN はそうでないことが分かった。しかし、hTLR3 または hTLR7 発現細胞株で ORN をテストしたところ、いかなる条件下でも IL-8 分泌は認められなかった(データ未表示)。最後に、ノーザン・アッセイを用いて、私たちは、MDCC 内で TNF- α mRNA を誘導する能力に対し、試験管内の 31 塩基転産物と一緒に化学合成された 21 塩基 ORN をテストした。ORN5 と ORN6(31 塩基)はロバストな誘導を生じ、対照の 21 塩基 ORN1 は、TNF- α mRNA を殆ど誘導しなかったが、特に、選択された mRNA の分解を阻害することでも知られている、タンパク質合成阻害剤のシクロヘキシミドに曝露すると、依然として良好に検出可能だった。更に重要なのは、単一の修飾ヌクレオシドを含む ORN は、

TNF- α mRNA を殆ど誘導せず、2'-O-メチル化 ORN である ORN2-Um が一貫して最低の刺激性を示した点である(図 6C)。これらの結果を総合すると、これらの結果は、RNA を媒介した免疫刺激が、RNA に存在する修飾ヌクレオシドの数に比例して抑制されることを示している。MDDC、および個別の TLR を発現する 293 細胞、に及ぼす RNA の刺激効果を阻害するのに、修飾は、RNA の長さに応じて単一またはごく少数の位置に存在すれば充分だった。

考察

ここで私たちは、様々な天然の RNA が免疫細胞を活性化する異なる能力を有することを示す。最も強力な RNA とは、修飾ヌクレオシドの数が最少の RNA であり、このことから、私たちは、ヌクレオシド修飾が RNA の免疫刺激効果を抑制する、と仮説を立てる。これを証明しようとする中で、RNA を媒介した免疫活性化に関するいくつかの新しい証拠が発見された。まず、私たちは、RNA がヒト TLR7 のリガンドであることを立証した。次に、天然の RNA の全構成要素である m5C、m5U、s2U、m6A、 Ψ 、2'-O-メチル-U といった修飾ヌクレオシドを有する RNA を用いることで、私たちは、U、A、C ヌクレオシドを修飾することが、TNF- α と IL-12 の分泌によって、また CD80、CD83、CD86、HLA-DR の発現によって測定されたように、サイトカイン生成 DC を活性化する RNA の能力を一般的に抑制することを示した。興味深いことに、m5C や m6A ではなく、m5U、s2U、 Ψ といったウリジン修飾のみが、血液由来の初代 DC を活性化する RNA の能力を無効にできた。異なる TLR は、異なる修飾ヌクレオシドを含む RNA に対して異なる応答を示した。m6A と s2U で修飾された RNA は TLR3 を活性化しなかったし、m5C、m5U、s2U、m6A、 Ψ で装飾された RNA は TLR7 や TLR8 を活性化しなかったが、未修飾 RNA は、これらすべてのヒト TLR を活性化させることができた。最後に、私たちは、RNA を媒介した免疫刺激は、RNA 内に存在する修飾ヌクレオシドの数に比例して抑制され、わずかな修飾でも抑制効果を発揮するのに充分であることを示した。

ヌクレオシド修飾は最も古い「免疫」メカニズムの基盤である。細菌は自らのゲノム内で選択されたヌクレオシドをメチル化し、ヌクレオシドが制限酵素を使って侵入者の未修飾 DNA を識別し、破壊することを可能にする。進化の過程で、DNA のメチル化の特徴に基づく宿主と病原体の識別は、免疫系の重要な要素であり続けている。哺乳類 DNA では、CpG モチーフ内のシトシンは主にメチル化されているが、微生物病原体のゲノム内にそのような修飾がないことは TLR9 によって認識され、これが哺乳類の自然免疫応答の誘導を媒介する(邊見ら、2000 年)。

RNA の免疫刺激活性は、そのようなことが DNA で同定される数十年前に発見されており、RNA には多数の修飾ヌクレオシドが含まれている(ローゼンスキーら、1999 年)、という事実にも拘らず、ヌクレオシド修飾が RNA 免疫に及ぼす効果はまだ探求されていない。免疫活性化の観点から見ると、RNA と DNA は多くの特徴を共有している。私たちは、DNA と

同様に、RNAは哺乳類細胞由来よりも細菌由来の方が、免疫原性が高いことを示した(図1、図2)(コスキラ、2004年)。哺乳類DNAと同様に、哺乳類RNAも、限定的だが検出可能なレベルの免疫活性化を發揮する(図1)。他の研究者らは、哺乳類RNAが免疫細胞に送達されると、IFN- α を誘導する、と報告した(ディボールドら、2004年)。哺乳類RNAはどうして免疫原性であるのかを説明するために、これらの実験では、トランスフェクションされたRNAが免疫細胞のエンドソーム・コンパートメントに入り込み、その結果、免疫系は、病原体に関連するいくつかの独特な分子パターンではなく、細胞部位に基づいて、自己RNAと非自己RNAを区別しているのかもしれない、と推論された(クロザとポイトラー、2004年)。しかし、ヒト自然免疫系は、真核生物と細菌のmRNAの分子特性を識別し、ポリAテールを有さないmRNAを刺激性として認識することもできることが示された(コスキラ、2004年)。本報告で私たちは、細菌のトータルRNAで強力な免疫刺激を觀察し、哺乳類のトータルRNAでは觀察しなかったのも、これは修飾ヌクレオシド含有量の違いによるものである、と結論づけた。このことは、トータルRNAの大部分がrRNAであり、修飾ヌクレオシドは哺乳類rRNAでは3%と豊富にあるが、細菌rRNAでは0.8%とそうではない、という觀察結果によって裏づけられている(バシェレリとカヴァイユ、1998年)。また、私たちは、RNAを媒介した免疫刺激の抑制が、修飾ヌクレオシド含有量のこの差のレベルと相関していることも觀察した(図5C)。本研究では、ヌクレオシド修飾を自然免疫系、特にTLR3、TLR7、TLR8によって認識されるRNAの新規特性として同定している(図2)。以前、私たちは、壊死細胞由来のRNAはDCを活性化するのに、アポトーシス細胞由来のRNAは活性化しないことを觀察した(カリコら、2004年)。本報告書で示された結果に基づき、私たちは、哺乳類RNA、特に最も修飾の少ないmtRNAが、觀察された効果に寄与した可能性が高い、と提案している。哺乳類RNAの免疫能は、アポトーシス中のRNAの分解がなぜ非常に重要か、も説明するかもしれない。ゲノムDNAの断片化は確立されたプロセスであり、アポトーシスそのものを定義する技術として一貫して用いられている。殆ど記述されていないが、細胞RNAの十分に組織化された分解はアポトーシス細胞でも起こるのに、壊死細胞では起こらない。興味深いことに、最も免疫原性の高いmtRNAは、細胞質RNAの分解、DNAラダーリング(ホーグら、1995年)、アポトーシスに関連する形態変化、を検出できる数時間前の、アポトーシスの非常に早い段階で分解される(クローフォードら、1997年)。RNAとDNAのいずれも、DNA、RNA、核酸に関連するタンパク質、に対する自己抗体の産生を特徴とする自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)の中心的な免疫原性決定因子である(ロンブロムら、2003年)。SLEの発症に関する研究により、低メチル化CpGモチーフを有する哺乳類DNAによるTLR9の活性化が関与していることが立証された(ブールら、2004年)。SLEにおけるもう一つの顕著な標的分子は、最近、TLR3を活性化することが示されたU1核内低分子RNAであり(ホフマンら、2004年)、このことは、疾患プロセスにおいてRNAに反応しやすいTLRの関与の可能性を示唆する。ネイティブRNAのヌクレオシドは、成熟プロセスの一環として転写後に修飾される。RNA

内で約 100 の異なるタイプの修飾ヌクレオシドが同定されているが、これらの変化の生理学的意義は十分に解明されていない。修飾の多くは、多様な種で保存されている部位で非ランダムに存在し、このことは、これらの修飾が重要であることを意味する。しかし、驚くべきことに、広範に修飾された tRNA でさえ、いかなる修飾がなくても機能することができ(Sampson と Uerlenbeck, 1988 年)、これがヌクレオシド修飾の役割を非常に難解なものにしている。

シュードウリジンは RNA 内で最も豊富な修飾ヌクレオシドである。これは、ウリジンの異性化によって生成される。ここで私たちは、他のウリジン修飾である m5U および s2U と併せて、シュードウリジンが、初代 DC を活性化する RNA の能力を、他に類を見ないほど抑制することを示した(図 3D)。この知見は、未修飾ウリジンが RNA の免疫刺激作用におそらく寄与していることを意味する。実際、証拠のいくつかのポイントがこの提案を支持している。初期の研究で、ポリ(U)が、プライミングした DC 内で IL-12 を誘導できる唯一のホモポリマーとして同定された(Koskira, 2004 年)。ディボールドらは、TLR7 ヌルのマウスの DC を用いて、TLR7 をポリ(U)処理に反応する受容体として同定した(ディボールドら, 2004 年)。他の研究では、ウリジンを混合したヌクレオシドでさえ、PBMC を刺激し、TNF- α を分泌させるのに充分であることが示された(Haila 等, 2004 年)。興味深いことに、以下の受容体を発現する転換 293 細胞をテストに用いた場合、ポリ(U)やその他の RNA ホモポリマーは、初代 DC やヒト TLR3、TLR7、TLR8 を活性化することが認められなかった。RNA 内に Ψ が存在することが、塩基の積み重ねを促進し、従って RNA 二重鎖を安定化させており(シャレットとグレイ, 2000 年)、このことが、 Ψ 修飾 RNA がなぜ TLR3 を強力に活性化できるのかを説明するかもしれない(図 2B)。

N6-メチルアデノシン(m6A)は、rRNA、tRNA、snRNA を含むすべての RNA タイプ、並びに、細胞起源とウイルス起源の mRNA に存在する唯一の塩基修飾ヌクレオシドである。m6A のメチル化は、ワトソン・クリック塩基対に干渉し、こうして、その存在が RNA 二重鎖を不安定化させる(ケージェクとケージェク, 2003 年)。m6A のこのような特徴は、m6A を含む RNA がなぜ TLR3 を刺激しなかったのかを説明するかもしれない(図 2B)。m6A は、哺乳類細胞の mRNA 内と、核内で複製するインフルエンザ、アデノウイルス、HSV、SV40、RSV といったウイルスの RNA 内に存在する(ボカーとロットマン, 1998 年)。一般的に、m6A 修飾は、内部、主にコード配列内に認められ、ウイルス mRNA は通常、細胞 mRNA よりも著しく多い m6A を含んでいた(ボカーとロットマン, 1998 年)。興味深いことに、ラウス肉腫ウイルスは、細胞培養でテストした際、m6A の有無に拘らず同じように複製し(ケインとビーモン, 1987 年)、従って、このウイルス mRNA 内の m6A に役割を割り当てることはできなかった。ウイルス RNA 内に m6A が存在することが、免疫活性化を回避させることでウイルスの役に立っているのかもしれないと、つい推測したくなる。この提案は、ウイルス mRNA 内に見られる m6A 修飾の頻度がインフルエンザ RNA の 1.8kb 長セグメントあたり 8 あれば(ナラヤンら, 1987 年)、DC を活性化する RNA の能力を抑制するのに充分

であることを考慮することで強化される(図5)。これらの初期のウイルス研究は、動物ではなく細胞培養で行われているため、m6Aの免疫抑制効果が見落とされたのかもしれない。m6Aまたはm5Cを含むRNAは、対応する未修飾RNAと同じくらい強力に初代DC1とDC2を刺激した(図3D)。DC2はTLR7のみを発現し(伊藤ら、2002年、松本ら、2003年)、従って修飾RNAにまったく応答しない293-hTLR7細胞と似ているので、これは予想外の発見だった(図2B)。テストされたすべてのRNAは、トランスフェクションによって細胞に送達され、多くの異なるRNA結合タンパク質と相互作用できるため、初代DCにはRNA受容体が他に類を見ないほど存在するが、293細胞やMDDCには存在しない可能性がある。このようなRNAセンサーは、m6Aとm5Cヌクレオシド残基が存在する場合ですらUリッチRNAパターンを認識できる可能性が高いが、U残基が修飾によって隠されている場合はそうではない。この仮説の支持は、同一鎖にm6A修飾とΨ修飾のいずれをも含むRNAは、DC1またはDC2を活性化しなかったのに、別の鎖にm6A修飾またはΨ修飾のいずれかを含むRNAの混合物は、これらの細胞を強力に活性化する、という観察結果によって提供された(図3D)。これに関連して、TLRとは独立して自然免疫系で機能する、FADD、RIG-1、PKRといった、一本鎖および二本鎖のRNA応答性細胞質受容体の例がすでに存在する(センとサルカール、2005年)。

TLR7発現細胞株を用いることで、私たちは、試験管内で転写されたRNAと細菌RNAはヒトTLR7のリガンドであり、dsRNAはそうではないことを示す(図2)。この知見は、ヒトTLR7がホスホロチオエート結合を有するRNAオリゴマーに反応しないことを示したハイルら(2004年)の得た結果と矛盾する。長いRNAと、ホスホロチオエート結合を有する短いORNの間に見られるようなRNAの刺激の違いが、この結果の矛盾を説明する可能性がある。私たちは、細菌RNAだけでなく、試験管内で転写されたすべてのRNAが、一次配列にも拘らず、293細胞を発現するTLR7を活性化することを観察し、このことは、天然のRNAがこの受容体のリガンドであることを示している。

まとめると、私たちは、哺乳類細胞と細菌細胞から単離した選択された天然のRNAと、試験管内で転写されたRNAまたは化学合成されたRNAが、ヒトDCと、ヒトTLR3、TLR7、TLR8を発現する安定的に転換された293細胞とを活性化することを示す。このような活性化は、m5C、m6A、m5U、シュードウリジン、2'-O-メチルUといった天然に存在する修飾ヌクレオシドを含むRNAとともに減少または完全に除去された。本研究から得られた洞察は、核酸がその機序において突出した役割を果たす自己免疫疾患の理解を深め、ウイルスRNAにおけるヌクレオシド修飾の役割を究明し、治療用RNAの設計に向けた今後の方向性を示す可能性がある。

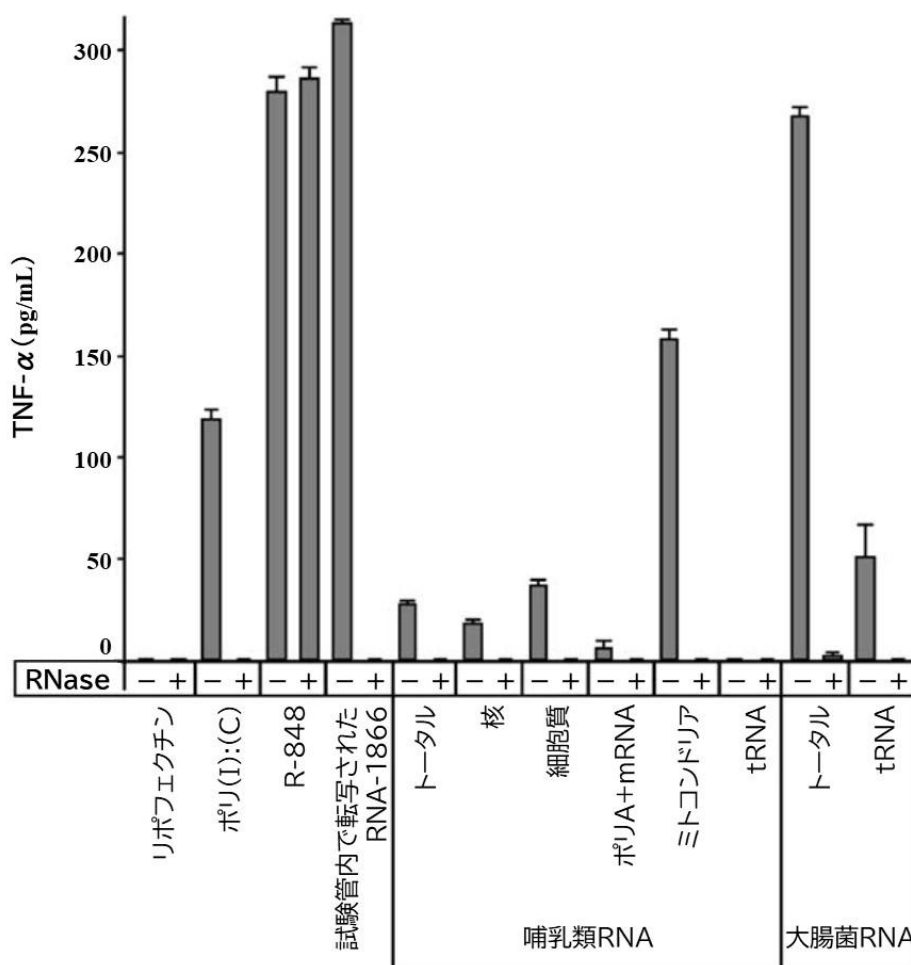


図1. 天然のRNAをトランスフェクションしたMDDCによるTNF- α の産生

ヒトMDDCを、リボヌクレアーゼ(RNase)の分解がある場合とない場合で、リポフェクチン単独で培養、もしくは、R-848(1 μ g/mL)と、或いは293細胞由来RNA(トータルRNA、核RNA、細胞質RNA)、マウス心臓由来RNA(ポリA+mRNA)、ヒト血小板ミトコンドリアRNA、ウシtRNA、細菌tRNA、トータルRNA(大腸菌)、と複合化した。8時間後、ELISAで浮遊物内のTNF- α を測定した。平均値 \pm SEMを示す。結果は、3回の独立した実験の代表値である。

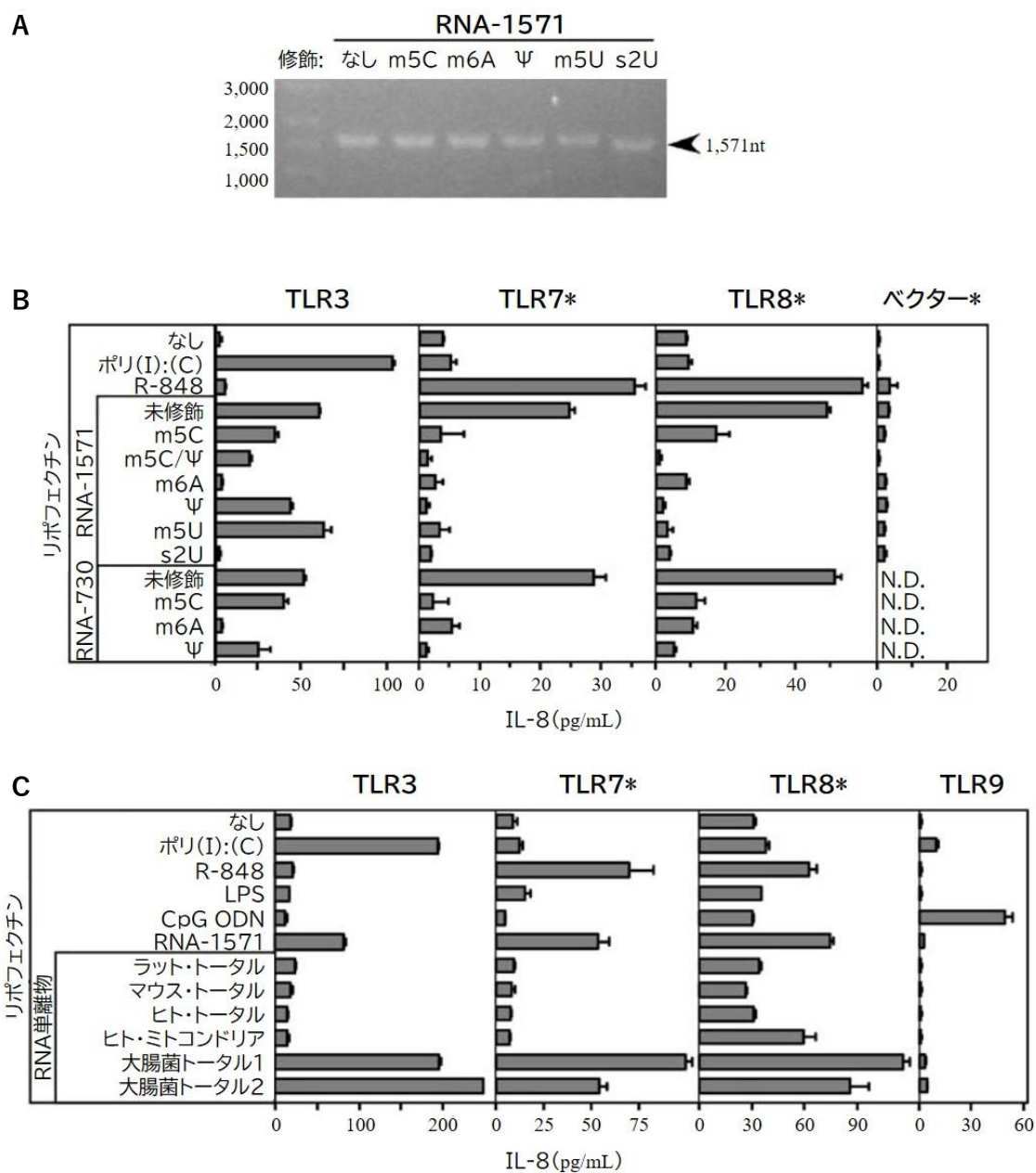


図 2. RNA による TLR に依存した活性化

(A)何もなし、或いは m5C、m6A、Ψ、m5U、または s2U のスクレオシド修飾を施した、試験管内で転写された RNA-1571 の一定分量(1μg)を、アガロース・ゲルを変性させた後で、臭化エチジウム染色と UV 照射を行い、分析した。

(B)ヒト TLR3、TLR7、TLR8 および対照ベクターを安定的に発現する 293 細胞を、リポフェクチン単独で処理、もしくは R-848(1μg/mL)、或いは指定された RNA(5μg/mL)と複合化した。RNA-730 と RNA-1571 に存在する修飾スクレオシドが示されている。293-ELAM-luc 細胞を対照細胞として使用したが、他の対照でも同様の結果が得られた。

(C)CpG ODN-2006(5μg/mL)、LPS(1.0μg/mL)、RNA 単離物は、ラットの肝臓由来、マウス細胞株(TUBO)由来、ヒトの脾臓(トータル)由来、ヒト血小板ミトコンドリア RNA 由来、2つの異なる大腸菌由来のもの

である。293-hTLR9 細胞を対照として扱った。8 時間後、ELISA で浮遊物内の IL-8 を測定した。
平均値±SEMを示す。hTLR3 標的 siRNA を発現するように転換された細胞株にはアスタリスクを付した。
結果は、4 回の独立した実験の代表値である。N.D.は未決定のこと。

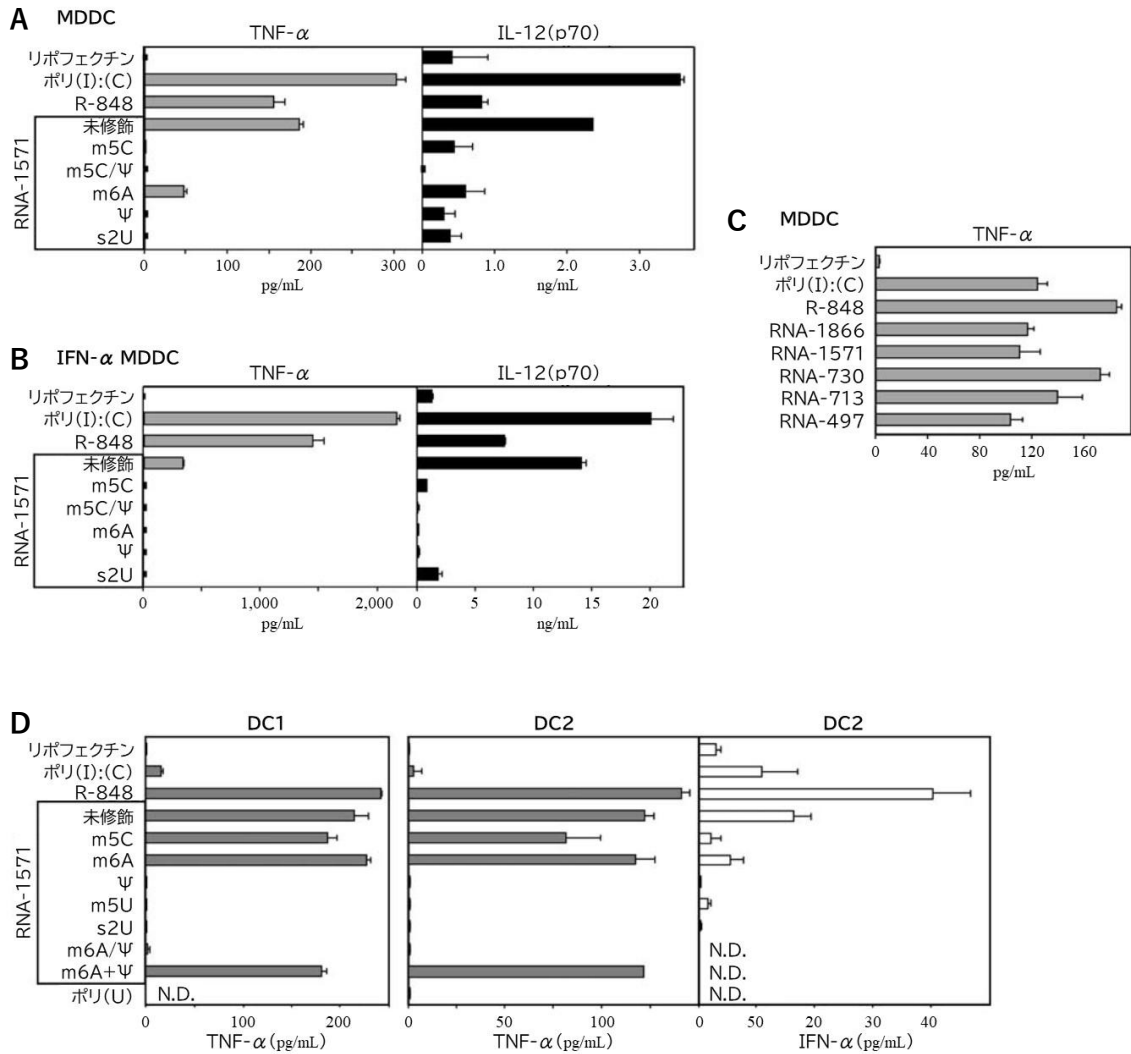
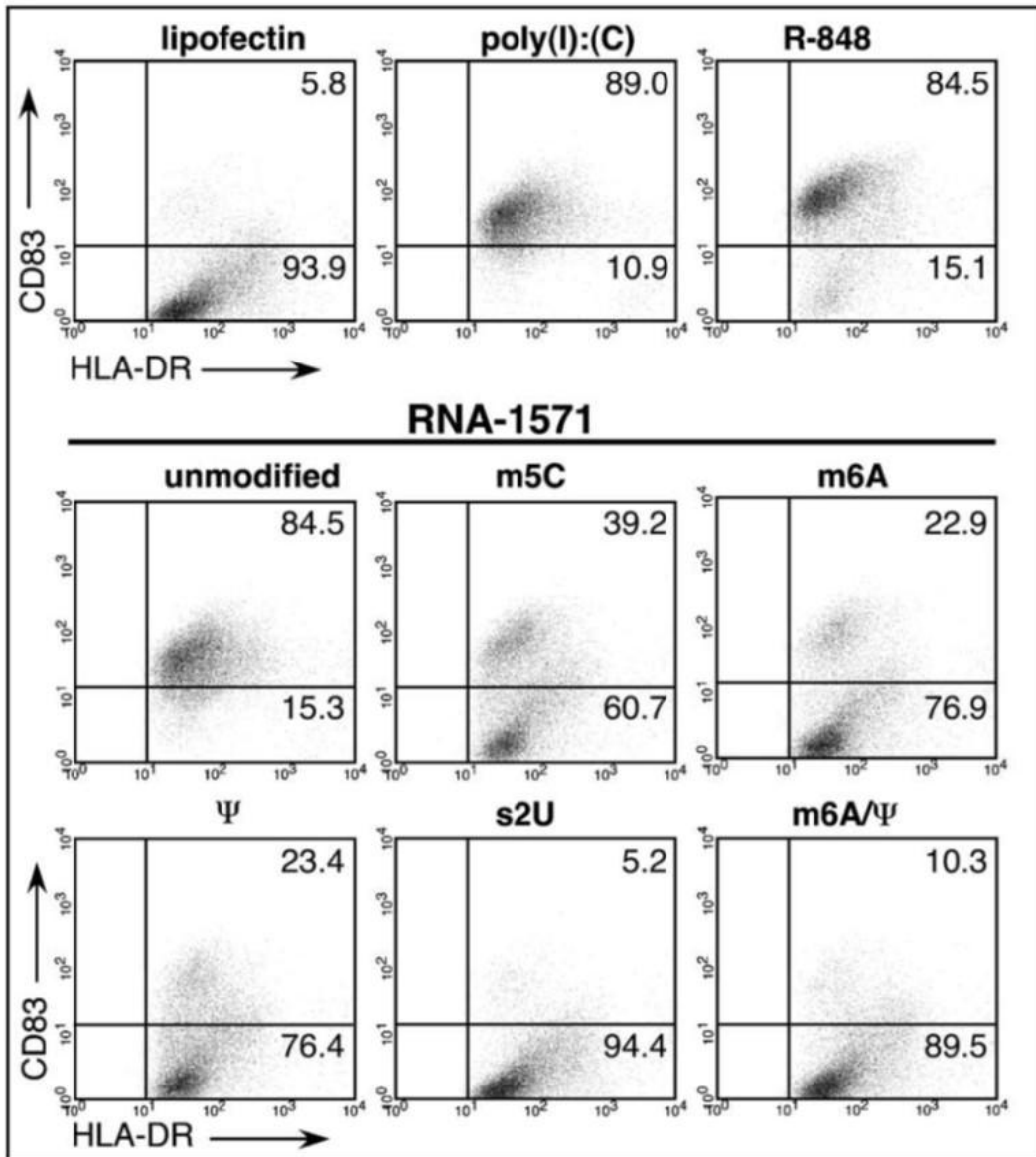


図3. RNA をトランスフェクションした DC によるサイトカイン産生

MDDC(A と C)、IFN- α MDDC(B)、初代 DC1 と DC2(D)を、リポフェクチン単独で 8~16 時間かけて処理、もしくは R-848(1 μ g/mL)、或いは指定された RNA(5 μ g/mL)と複合化した。RNA-1571 に存在する修飾ヌクレオシドが示されている。ELISA で浮遊物内の TNF- α 、IL-12(p70)、IFN- α を測定した。平均値 \pm SEM を示す。結果は、10 回(A と C)、6 回(B)、6 回(D)の独立した実験の代表値である。N.D.は未決定のこと。

A



B

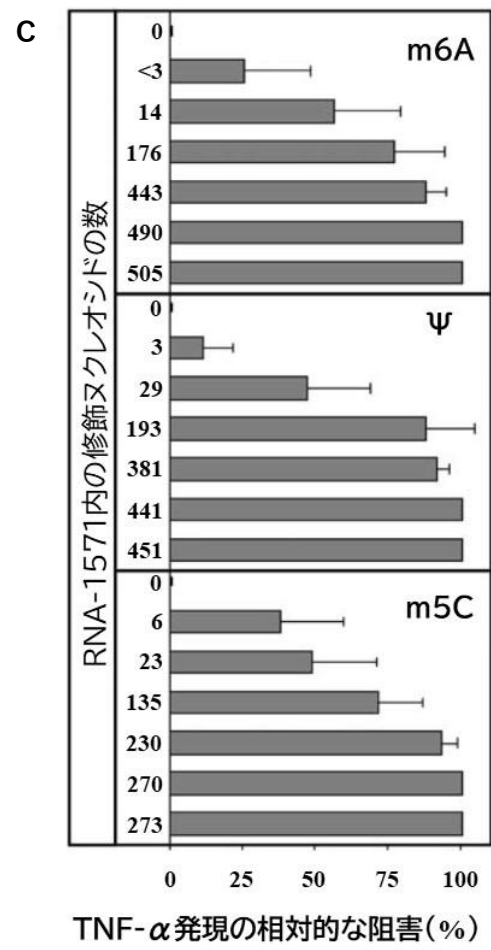
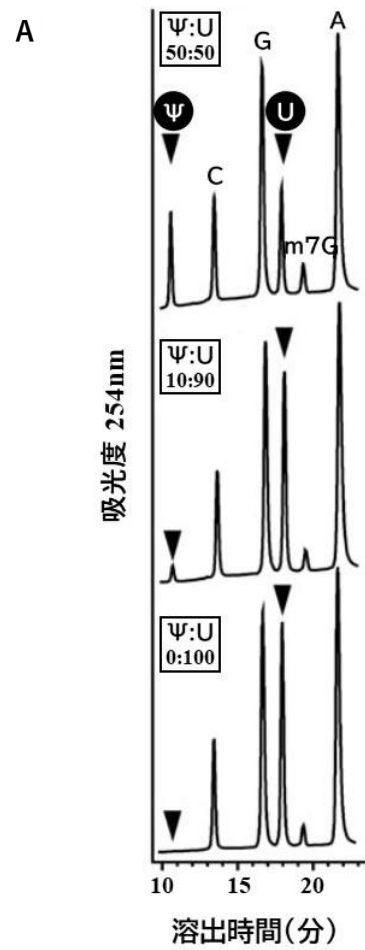
	TNF- α *	CD80	CD86
	pg/mL	蛍光の平均	
リポフェクチン	0	7.6	55.3
ポリ(I):(C)	45.6	59.4	257.4
R848	48.3	55.2	235.4
RNA-1866			
未修飾	26.7	52.7	246.4
m5C	0	16.4	108.6
m6A	0	12.4	78.4
Ψ	0	12.0	87.5
s2U	0	8.0	62.7
m6A/ Ψ	0	8.6	68.4

図 4. RNA による DC の活性化

MDDC を、リポフェクチン単独で 8~16 時間かけて処理、もしくは R-848(1 μ g/mL)、或いは指定された RNA(5 μ g/mL)と複合化した。RNA-1571 に存在する修飾ヌクレオシドが示されている。

(A)CD83 と HLA-DR の染色を示す。

(B)ELISA で浮遊物内の TNF- α を測定した(アスタリスクは、フロー・サイトメトリー用に、通常の培養量より 30 倍多く培養した細胞を示す)。CD80 および CD86 の蛍光の平均をフロー・サイトメトリーにより決定した。データは、4 回の独立した実験の代表値である。



B

装飾ヌクレオシド 反応中 ^a (%)	m6A							Ψ							m5C						
	0	1	10	50	90	99	100	1	10	50	90	99	100	1	10	50	90	99	100		
RNA ^b 中																					
予想(%)	0	0.3	3.2	16	29	32	32	0.3	2.9	14	26	28	29	0.2	1.7	9	16	17	17		
測定(%)	0	<0.2	0.9	11	28	31	32	0.2	1.9	12	24	28	29	0.4	1.4	9	15	17	17		
測定(個数)	0	<3	14	176	443	490	505	3	29	193	381	441	451	6	23	135	230	370	273		

図 5. 修飾ヌクレオシドの含有量が異なる RNA の分析

m6A、Ψ、m5C を含むキャップ RNA-1571 を、m6ATP、ΨTP、m5CTP と、それに対応する未修飾 NTP との相対比率が 0%、1%、10%、50%、90%、99%、100% となる条件下で転写した。

(A)すべての転写産物を一リン酸まで分解し、修飾ヌクレオシドの相対組込量を決定するために、逆相 HPLC により分析した。簡略化のため、ヌクレオシドの記号のみを示す。シュードウリジン三リン酸とウリジン三リン酸が指示された比率(Ψ:U)で存在する中で転写された RNA により得られた代表的な吸光度プロファイルを示す。溶出時間は、シュードウリジン(Ψ)、シチジン(C)、グアノシン(G)、ウリジン(U)、7-メチルグアノシン(m7G)、アデノシン(A)、の 3'-リン酸塩について示されている。

(B)RNA-1571 の修飾ヌクレオシド含有量。RNA-1571 内の m6A、Ψ、m5C の予想比率は、転写反応における修飾 NTP の相対量と、RNA-1571 のヌクレオシド組成に基づいて算出した(予想比率)。測定された修飾ヌクレオシド含有量(%)の値は、HPLC クロマトグラムの軽量後に得られた相対値に基づいて決定した。これらの測定値と、RNA-1571 のヌクレオシド含有量(A:505、U:451、C:273、G:342)に基づき、RNA-1571 一分子あたりの m6A、Ψ、m5C の数を算出した。「a」は、それぞれ ATP、UTP、CTP に対する m6ATP、ΨTP、m5CTP の値(%)を表す。「b」は、すべての NMP に対する m6A、Ψ、m5C 一リン酸の値を表す。

(C)MDDC に、指定量の m6A、Ψ、m5C を含む、リポフェクチンと複合化したキャップ RNA-1571(5μg/mL)をトランスフェクションした。8 時間後、ELISA により浮遊物内の TNF-α を測定した。データは、TNF-α の相対的な阻害として示されている。3 回の独立した実験で得られた平均値±SEM を示す。RNA-1571 一分子あたりの m6A、Ψ、m5C の数は、(B)に示したように算出した。

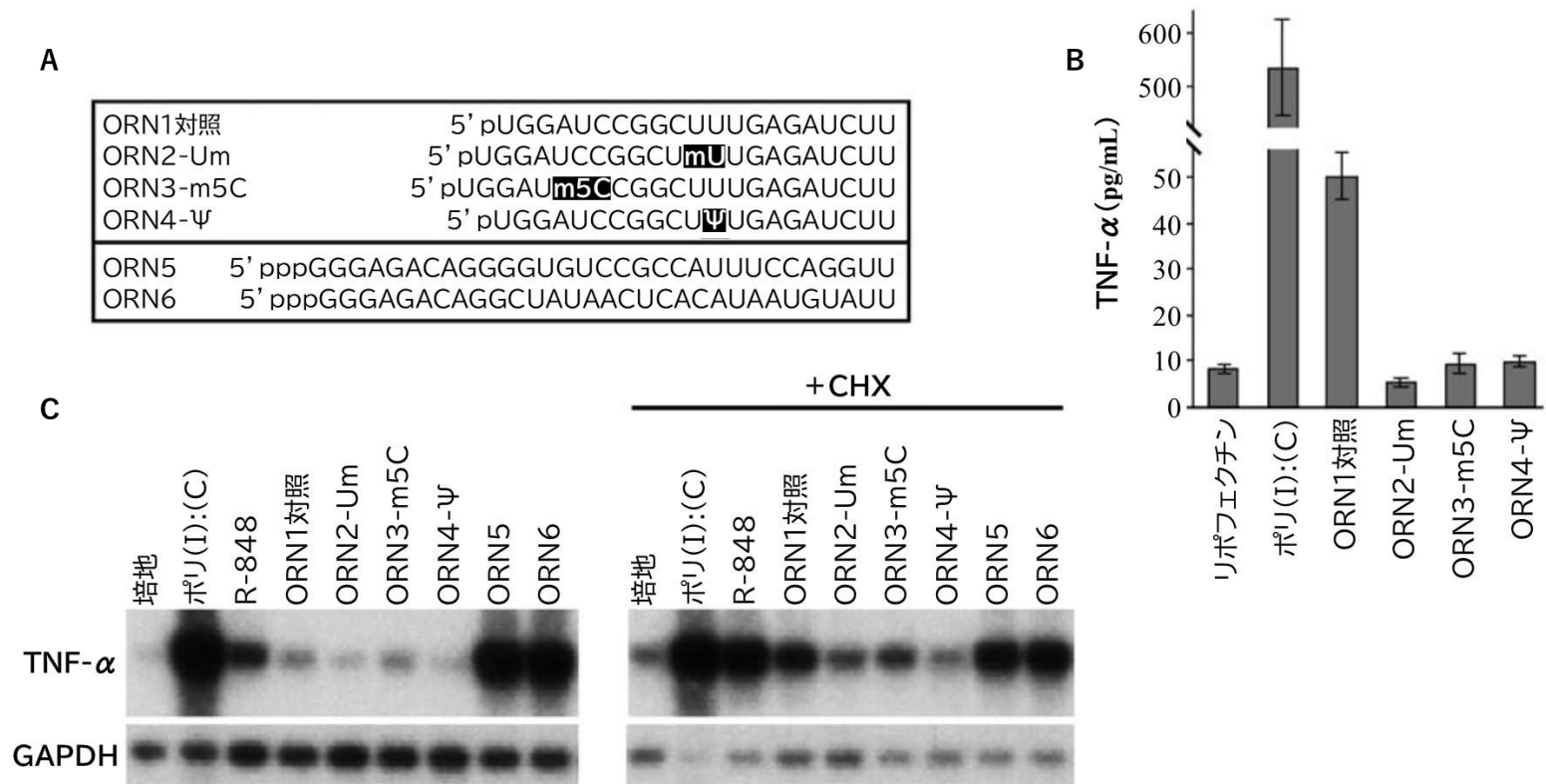


図 6. RNA をトランスフェクションした DC による TNF- α の発現

(A)化学合成された(ORN1~4)、もしくは試験管内で転写された(ORN5~6)オリゴリボヌクレオチド(ORN)の配列を示す。修飾ヌクレオチドである Um(2'-O-メチルウリジン)、m5C、 Ψ の位置を強調表示した。

(B)平均値 \pm SEM を示す。結果は、3 回の独立した実験の代表値である。細胞から単離した RNA をノーザン・ブロッティングにより分析した。

(C)ヒト MDDC を、リポフェクチン単独(対照)、R-848(1 μ g/mL)、リポフェクチンと複合化した指定の RNA(5 μ g/mL)でトランスフェクションした。記載は、細胞を 2.5 μ g/mL のシクロヘキシミド(CHX)で処理したことを意味する。8 時間の培養後、ELISA で浮遊物内の TNF- α を測定した。