

1. 核酸アナログによる自然免疫応答の調節

柳井 秀元

東京大学大学院医学系研究科・免疫学講座

核酸によって活性化される免疫応答は病原体に対する生体防御に重要である一方、自己免疫疾患や炎症等の病態とも密接な関連がある。これまでに、Toll 様受容体 (TLR) をはじめとし、ウイルスや細菌由来の DNA, RNA を認識する、種々の核酸認識受容体とそのシグナル伝達機構が明らかにされてきている。これらに加え、私達は最近、核酸認識受容体シグナルの活性化に必須の役割を果たす分子として HMGB (High mobility group box) タンパク質を新たに同定した。HMGB タンパク質は様々な核酸と結合し、HMGB 欠損細胞においては核酸による免疫応答の活性化が顕著に減弱する。私達は HMGB タンパク質の機能を阻害するような非免疫原性のオリゴ核酸 (核酸アナログ) を作製し、核酸による免疫応答の活性化に与える影響について検討し、この核酸アナログが、DNA, RNA を問わず、核酸による免疫応答の活性化を阻害できることを明らかにした。本稿では、このような私達の最近の知見に基づき、核酸誘導性の自然免疫系活性化における核酸アナログの抑制作用について概説し、その応用について考察したい。

はじめに

ウイルスや細菌などの病原体感染に際し、生体はこれを排除すべく免疫系を活性化させる。自然免疫系は病原体の感染を真っ先に感知し、抗ウイルス応答等を惹起すると同時に、適応免疫系の活性化を促進する大切な役割を果たしている^{1,2)}。この機構の破綻は、易感染症や過度の炎症疾患、自己免疫疾患など様々な影響を及ぼすことが知られている³⁻⁵⁾。自然免疫系によるウイルスや細菌など病原体侵入の察知は、病原体に特有の分子構造パターン (pathogen-associated molecular pattern; PAMP) を、Toll 様受容体 (Toll-like receptor; TLR) に代表される種々のパターン認識受容体 (pattern recognition receptor; PRR) が認識することによって行われている^{2,3,5)}。PRR が PAMP を認識することにより、PRR 下流のシグナル伝達経路が活性化され、I 型

インターフェロン (IFN- α/β) や炎症性サイトカインの誘導など、病原体に対抗すべく免疫応答が活性化される。現在まで、様々な病原体由来の PAMP が報告されているが、それらの中でも、ウイルスや細菌由来の核酸は、免疫応答を強力に誘導することが分かっており、それら核酸を認識する核酸認識受容体やそのシグナル伝達経路の解明は、近年急速に進展しつつある。

核酸認識受容体とそのシグナル伝達機構について

核酸を認識する受容体としては、これまでのところ、TLR と細胞質内核酸認識受容体の 2 種類に大別した受容体群が知られている^{2,3,5,6)}。膜型受容体である TLR ファミリーメンバーでは、TLR3 が二本鎖 RNA (double-stranded RNA; dsRNA) である poly (I:C) を、TLR7 が G/U に富む一本鎖 RNA (single-stranded RNA; ssRNA) と短い dsRNA を、また TLR9 が非メチル化 CpG モチーフを含む DNA を認識することが示されている⁷⁻¹¹⁾。これら TLR はエンドソームに局在し、特に TLR7 及び TLR9 については形質細胞様樹状細胞において、ウイルス等に由来する核酸を認識し、大量の IFN- α/β を産生することで抗ウイルス応答に寄与していることが報告されている^{3,12,13)}。また、TLR 以外にも核酸を認識する受容体群が存在することが知られており、膜貫通ドメインを持たず、細胞質内で核酸を認識する性質から、細胞質内核酸認識受容体として知られてい

連絡先

〒113-0033

東京都文京区本郷 7-3-1

東京大学大学院医学系研究科・免疫学講座

TEL: 03-5841-3378

FAX: 03-5841-3450

E-mail: yanai@m.u-tokyo.ac.jp

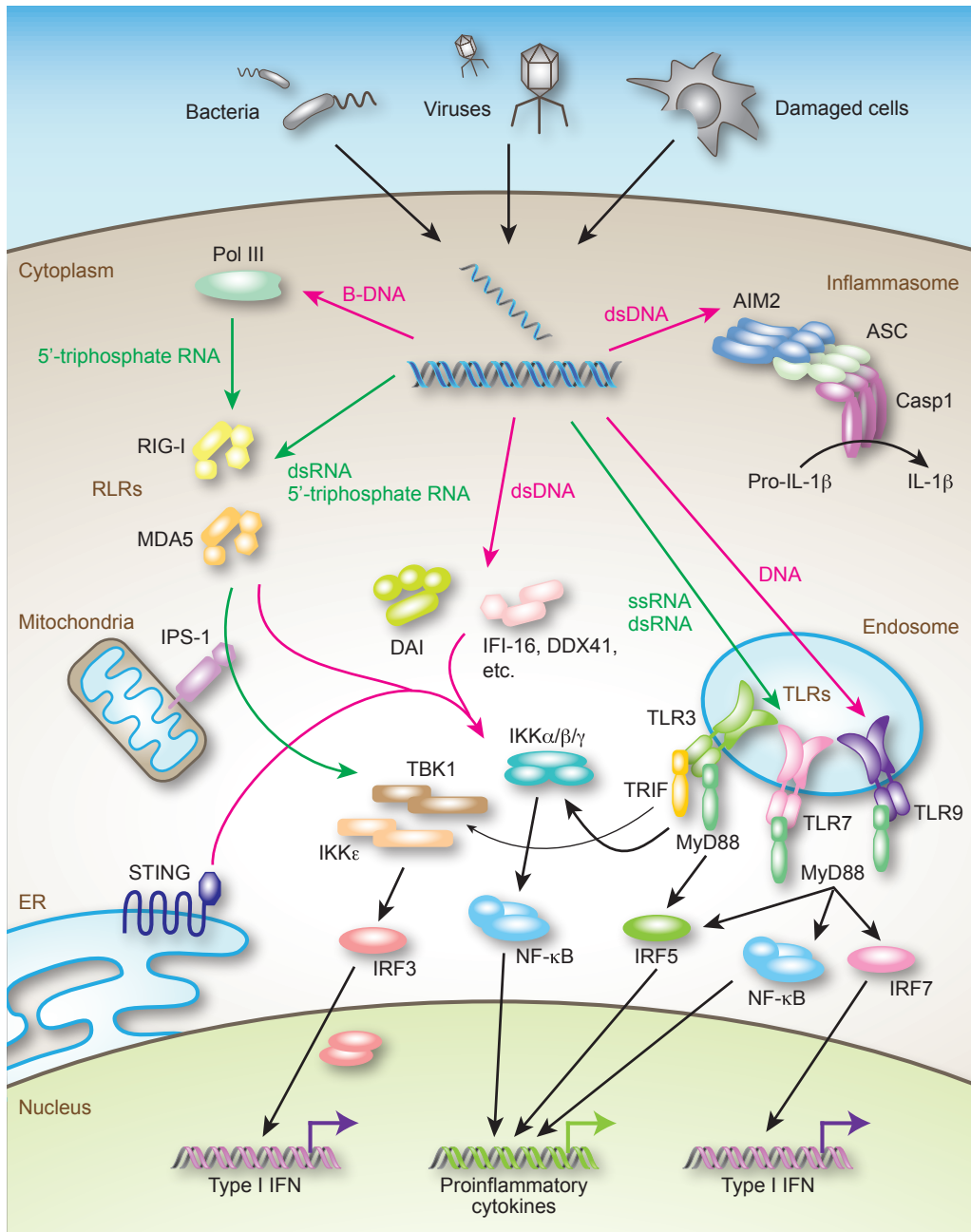


図1 自然免疫系における核酸認識経路

ウイルスや細菌，または損傷した細胞などに由来する DNA や RNA は，種々の核酸認識受容体を介して自然免疫応答を惹起する（核酸認識経路のうち，DNA は赤，RNA は緑，共通する経路は黒の矢印で示した）。エンドソームにおいては，TLR3 が dsRNA，TLR7 が ssRNA，そして TLR9 が非メチル化 DNA を認識する。TLR3 はアダプター分子である TRIF と MyD88 を介して転写因子 IRF3 と NF-κB を活性化する。また，TLR7 と TLR9 は MyD88 を介して IRF7 と NF-κB を活性化する。これによって I 型 IFN と炎症性サイトカイン遺伝子が誘導される。また，IRF5 は MyD88 依存的な経路によって活性化され，炎症性サイトカイン誘導に関与する⁹¹⁾。細胞質においては，DAI や IFI-16，DDX41 などが dsDNA を認識し，TBK1 と IKKε キナーゼによる IRF3 と NF-κB の活性化を促し，それによって I 型 IFN と炎症性サイトカイン遺伝子が誘導される。RIG-I はキャップ構造の無い 5' 末端が三リン酸化された (5'-triphosphate) RNA または短鎖の poly(I:C) と結合し，一方で MDA5 は長鎖の poly(I:C) と結合する。これによってアダプター分子である IPS-1 (VISA, MAVS, Cardif) と会合し，IRF3 及び NF-κB を活性化する。Pol-III が B-DNA を 5'-triphosphate RNA に転写し，これが RIG-I によって認識される経路も存在する。AIM2 インフラマソーム (inflammasome) は dsDNA を感知し，アダプター分子 ASC を介し，カスパーゼ 1 の活性化により IL-1β や IL-18 をプロセッシングし活性型のサイトカインに変換する。DNA 刺激により，アダプター分子である STING が ER から細胞質内の小胞構造体へと移行し，TBK1—IRF3 経路を活性化し I 型 IFN を誘導する。

る。細胞質内 RNA 認識受容体としては米山光俊博士らが発見した RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) や MDA5 (melanoma differentiation associated protein 5) が良く知られている¹⁴⁻¹⁶⁾。RIG-I や MDA5 は RNA ヘリカーゼドメインを有しており、poly (I:C) などの RNA を認識すると、ミトコンドリア膜に局在する IPS-1 (IFN- β promoter stimulator-1; 別名 MAVS, VISA, Cardif) と呼ばれるアダプター分子と会合し、I κ B- α のリン酸化やセリンスレオニンキナーゼである TBK1 (TANK binding kinase 1) 及び IKK ϵ /i (I κ B kinase ϵ / inducible) の活性化を介し、転写因子である NF- κ B や IRF (IFN regulatory factor) を活性化することで炎症性サイトカインや I 型 IFN を誘導する¹⁷⁻²⁰⁾ (図 1)。I 型 IFN の転写誘導は、IRF ファミリー転写因子によって主に担われており、IRF3, IRF5 および IRF7 がウイルス感染時の I 型 IFN の発現誘導に重要な役割を果たしていることが遺伝子欠損細胞及びマウスを用いた解析から示されている^{6,21)}。poly(I:C) や dsDNA など核酸刺激においては特に IRF3 が重要である²¹⁻²³⁾。これらの IRF 転写因子は、通常は細胞質内に存在しているが、核酸刺激やウイルス感染などにより活性化を受け、核内移行する。この IRF3 の核内移行にはリン酸化修飾が必要であり、TBK1 および IKK ϵ /i がこのリン酸化を担うキナーゼとして同定されている。リン酸化修飾を受けた IRF3 はホモ二量体を形成し、核内移行し、IFN 遺伝子の活性化に貢献する²⁴⁻²⁸⁾。

一方、細胞質内 DNA 認識機構についても複数の受容体について解析が為されている。石井健博士らによって二本鎖 DNA (double-stranded DNA; dsDNA) である poly(dAT)・poly(dTA) (一般の dsDNA が形成する B 型コンフォメーションを形成することから、B-DNA と呼ばれる) をリポフェクション法によって細胞質内に導入した際、TLR9 非依存的に I 型 IFN や炎症性サイトカインが誘導されることが報告されている²²⁾。また、ISD (IFN-stimulatory DNA) と呼ばれる人工合成 DNA や大腸菌由来 DNA、または牛胸腺由来 DNA などを細胞質内に導入すると、B-DNA と同様に免疫応答が活性化されることが報告されている^{23,29)}。これら DNA 刺激による I 型 IFN 産生には、RNA 刺激の際と同様、TBK1-IRF3 経路が重要であることが示されている^{22,29)}。さらに最近、I 型 IFN 誘導経路や NF- κ B 経路の活性化に小胞体膜上に局在する STING (stimulator of IFN genes) と呼ばれるアダプター分子が必須であることが示されている³⁰⁻³²⁾。これらのシグナル伝達経路の活性化を担う、細胞質内 DNA 認識受容体としては、私達の研究室で同定した DAI (DNA-dependent activator of IRFs) / ZBP1 (Z-DNA binding protein 1) や、DNA 依存的 RNA polymerase III (Pol-III), IFI-16 や DDX41 など、これまでに複数報告されている^{29,33-36)}。これらのうち DAI については、L929 細胞などの細胞株において DAI の発現をノックダウンによって低下させた際、I 型 IFN などのサイ

トカイン誘導が減弱することを報告したが、その後、*Dai* 遺伝子欠損細胞を用いた解析などから、DAI の発現が無い状態においても正常にサイトカインの誘導が認められることが示されており、DAI の機能には細胞種特異性があることが明らかとなっている³⁷⁾。また、細胞質内に導入された B-DNA が、Pol-III によって RNA に転写され、それが RNA 認識受容体である RIG-I に認識され、免疫応答が活性化される経路の存在が報告されている^{33,34,38)}。しかしながら A, T に富む DNA のみに pol-III の寄与が限定されることから、G, C に富む DNA やランダムな配列の DNA による免疫系の活性化には pol-III 以外の受容体である、IFI-16 や DDX41 などが関与していると思われる。さらには細胞質内 DNA 刺激の際には、HIN-200 (hematopoietic IFN-inducible nuclear proteins with a 200-amino acid repeat) ファミリーのメンバーである AIM2 (absent in melanoma 2) が、細胞質内 dsDNA 認識受容体として機能し、インフラマソームを活性化することが報告されている³⁹⁻⁴³⁾。AIM2 の活性化により、ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) を介してカスパーゼ 1 を活性化し、カスパーゼ 1 によるプロセッシングを介し、成熟型インターロイキン (interleukin; IL) -1 β や IL-18 の産生を促進することが報告されている³⁹⁻⁴³⁾。

上記のように、核酸認識受容体とそのシグナル伝達に関して、受容体とその下流のシグナル伝達経路に関与する多くの分子が同定されてきている。これらの認識機構が破綻するとウイルス感染等に対し、易感染性を示すことが遺伝子欠損マウス等を用いた解析により明らかになっている^{3,14,31)}。

核酸認識と自己免疫疾患

核酸による免疫系の活性化は病原体感染に対する感染応答に重要である一方、自己免疫疾患とも密接な繋がりがあることが知られている。DNase I (deoxyribonuclease 1) は細胞外に多く存在しており、細胞死などに伴い、細胞外に放出された DNA の分解に関与していると考えられている。*Dnase1* 遺伝子欠損マウスではこの機構が欠失しており、全身性ループスエリテマトーデス (systemic Lupus erythematosus; SLE) 様の病態を発症することが報告されており、また、*Dnase1* 遺伝子にナンセンス変異が入っている SLE 患者は変異の無い SLE 患者より、血清中の DNA 量、及び核内構成成分の複合体に対する抗核抗体 (anti-nuclear antibody; ANA) の力価が高く、*Dnase1* の変異が病態の増悪に関与していると考えられる⁴⁴⁻⁴⁶⁾。DNase II はリソソームに局在しており、貪食細胞が取り込んだ死細胞の DNA を消化する役割を果たしていると考えられる。*Dnase2a* 遺伝子欠損マウスは貧血症 (anemia) による胎性致死を示すことが報告されている^{47,48)}。未消化の DNA が細胞質内 DNA 認識受容体によって認識され、IRF3/7 の活性化による I 型 IFN の過剰産生によるものと

考えられており、I型IFNの影響を抑えるために、I型IFN受容体 α 鎖をコードする*Ifnar1*遺伝子と*Dnase2a*遺伝子を二重に欠損させたマウスでは、マウスは出生するようになるが、慢性的な多発性関節炎(polyarthritis)を発症することが報告されている⁴⁹⁾。TREX1(3' repair exonuclease 1)はDNaseIIIの一種であり、*Trex1*遺伝子欠損マウスにおいては炎症性の心筋炎(myocarditis)を発症することが報告されている⁵⁰⁾。また、ヒトにおいては、*Trex1*遺伝子の変異が凍瘡状狼瘡(chilblain lupus)の患者などに見られている^{51,52)}。

このように、核酸と自己免疫疾患の病態との関連について、報告が為されていることに加え、核酸認識受容体の自己免疫疾患における役割についても解析がなされている。抗核抗体中のDNAやRNAが、形質細胞様樹状細胞に発現しているTLR7及びTLR9によってそれぞれ認識され、I型IFNを誘導すること、また、自己反応性B細胞(autoreactive B cell)の活性化を促進することが報告されており⁵³⁻⁶⁵⁾、SLEの病態の増悪に関与していると考えられている。また、TLR7トランスジェニックマウスはSLEの病態を発症することも報告されている^{54,62)}。関節リウマチ(rheumatoid arthritis; RA)においては、RA患者は変形性関節症(osteoarthritis; OA)患者よりも滑膜組織(synovial tissue)におけるTLR3の発現が上昇しており、ネクローシスを起こした滑液(synovial fluid)細胞由来のRNAがTLR3によって認識され、滑膜線維芽細胞(synovial fibroblast)を活性化し、I型IFNや炎症性サイトカイン、RANKL(receptor activator of NF- κ B ligand)の過剰な産生を誘導し、RAの進行に関与していることが示唆されており⁶⁶⁻⁶⁸⁾、また、中枢性脱髄疾患の一つである多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)のマウスモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE)では、TLR9の関与も示唆されている⁶⁹⁻⁷¹⁾。

以上のように、核酸認識受容体シグナルと自己免疫疾患の病態との関連については多数の報告が為されており、核酸認識受容体とそのシグナル伝達機構を明らかにしていくこと、さらには核酸認識受容体シグナルを抑制するような制御法を見出すことは、これらの病態に対処する治療法の開発に向け、有用であると考えられる。

核酸認識受容体 HMGB タンパク質の同定

最近、私達は様々な核酸と結合し、DNA、RNAを問わず、核酸による免疫系の活性化に関与するHMGB(High mobility group box)タンパク質を同定した^{72,73)}。HMGBタンパク質はそれぞれ相同性が高いHMGB1、HMGB2、HMGB3から構成され、N末端側にA-box、B-boxの2つのDNA結合ドメインを有する分子量約30kDaの核内に局在する核タンパクとして知られている⁷⁴⁾。核タンパクと

して知られているものの、一部は細胞質にも存在し、TLR9のシグナルに関与することが報告されていた^{75,76)}。また、様々な刺激によって細胞外にまで放出され、TLR4やRAGE(receptor for advanced glycosylation end products)などの受容体によって認識され、炎症性サイトカインとしても機能するという非常にユニークな分子である⁷⁷⁻⁷⁹⁾。In vitroにおけるプルダウンアッセイの検討から、HMGBタンパク質はB-DNAを含む様々なDNAと直接結合することが分かった⁷³⁾。一方、興味深いことに、HMGB1およびHMGB3はpoly(I:C)やpoly(U)などのRNAとも結合し、HMGB2はRNAとは結合しないことが分かった。この結合の性質と一致して、*Hmgb1*遺伝子欠損マウス胎児線維芽細胞(mouse embryonic fibroblast; MEF)においては、DNA刺激、RNA刺激の両方において、野生型細胞と比較し、I型IFNやその他サイトカインの誘導が低下していた。一方で、*Hmgb2*^{-/-} MEFにおいてはDNA刺激においてのみ、サイトカインの誘導に低下が見られ、RNA刺激では変化は認められなかった。さらに、HMGB1、HMGB2、HMGB3のすべてのHMGBタンパク質の発現をノックダウン法により減弱させたところ、細胞質内核酸認識受容体またはTLRのリガンドに関わらず、DNA、RNAどちらの刺激においても、IRF3やNF- κ Bの活性化が顕著に減弱し、I型IFNやTNF- α (tumor necrosis factor- α)などの炎症性サイトカインの誘導が低下することが明らかとなった。一連の検討から、HMGBタンパク質が様々な核酸リガンドと結合し、様々な核酸認識受容体シグナルの活性化に関与することが明らかとなり、これらを総合し、HMGBタンパク質が様々な核酸を認識する汎核酸認識受容体として機能しているのではないかと考えた(図2)。すなわち、核酸刺激の際、まず始めにHMGBタンパク質が核酸と結合し、その後それぞれの核酸受容体によって核酸が認識され、免疫応答が活性化される、という二層性の仕組みがあるのではないかと考えられた。HMGBタンパク質による核酸認識機構が、TLRやRIG-Iなどの個々の核酸認識受容体の活性化にどのように関与しているか、その具体的なメカニズムは現在のところ不明であり、またこのような核酸認識機構にどのようなメリットがあるのか、その意義について、今後検討していきたい興味ある課題であると考えている。

HMGB タンパク質と結合する非免疫原性核酸による免疫応答抑制作用

上記の解析から、HMGBタンパク質が核酸による免疫応答活性化に重要な役割を担っていることが分かった。そこで、HMGBタンパク質の機能を阻害できれば、核酸による免疫応答の活性化を抑制できるのではないかと考えた。HMGBタンパク質はTLR9のリガンドであるCpG-B DNAと強く結合することが過去の報告において、また私

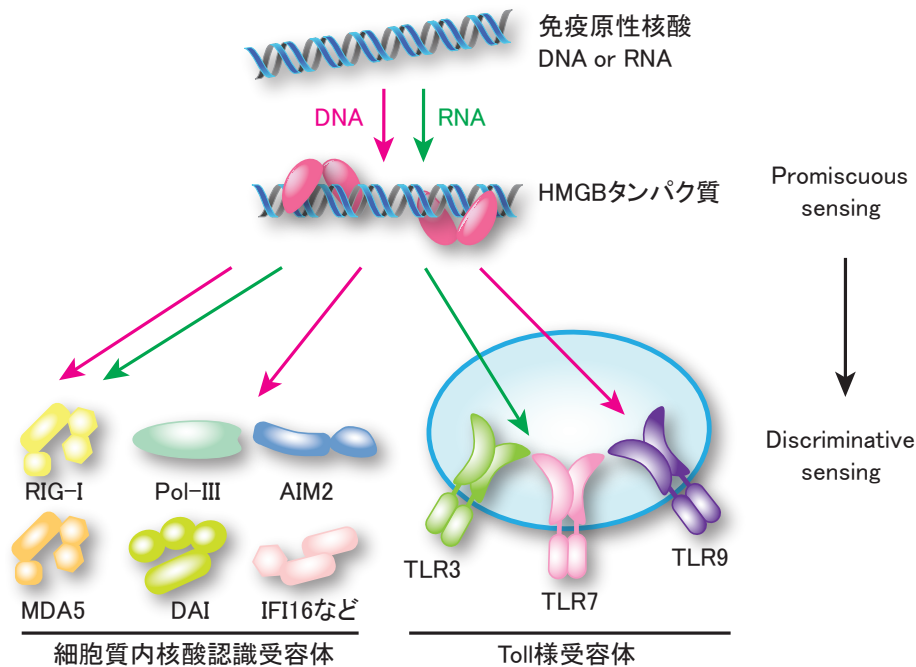


図2 HMGB タンパク質による核酸認識機構

HMGBタンパク質を介した核酸認識機構のモデル図。HMGBタンパク質はDNA, RNAを問わず、免疫原性核酸と結合する(様々な核酸を認識する性質から汎核酸認識 (promiscuous sensing) と呼んでいる)。続いて細胞質内核酸認識受容体やToll様受容体によって核酸が認識され(核酸の構造, 修飾など, 核酸の特徴を特異的に認識 (discriminative sensing と呼んでいる)), 下流のシグナルが活性化される。このような二層性の核酸認識機構が存在しているのではないかと考えられる。

達の解析からも明らかになっていた^{73,75)}。CpG-B DNA中の非メチル化CGモチーフはTLR9の活性化に重要であることが報告されており^{10,80)}、このまま用いた場合にはTLR9によって認識され、免疫系を活性化してしまうため、CpG-B DNAのCGモチーフをGGに替え、免疫原性のないオリゴ核酸 (ISM ODN) を合成した⁸¹⁾。このISM ODNはHMGB1, HMGB2, HMGB3のどのHMGBタンパク質とも強く結合し、また、競合的プルダウンアッセイによる検討から、ISM ODNはB-DNAやCpG-B DNAとHMGBタンパク質との結合も阻害できることも分かった⁸¹⁾。ISM ODNが核酸刺激による免疫応答の活性化を抑制できるかどうか、MEFや樹状細胞などの細胞にISM ODNを予め処理をしておき、DNAやRNA刺激を行った際のI型IFNやその他のサイトカインの誘導を検討したところ、DNA, RNAを問わず、核酸刺激によるサイトカインの誘導が顕著に抑制されることが明らかとなった(図3)。また、IRF3やNF- κ B, MAPキナーゼなど、転写因子やシグナル伝達分子の活性化もISM ODNの処理によって抑制されることが明らかとなった。では、どのようにISM ODNは核酸による免疫応答の活性化を抑制しているのか。CGモチーフをGGに変換したオリゴ核酸であるので、弱いながらもTLR9を活性化し、TLR9のシグナル伝達系が抑制的

に機能している可能性も考えられたが、ISM ODNによる抑制効果は*Tlr9* 遺伝子欠損細胞においても認められたため、TLR9によるシグナルは関与していないことが分かった。また、ISM ODNの処理によって、B-DNAなどの核酸の細胞内への取り込みが影響を受けるのではないかと考えられたが、ISM ODNはB-DNAなどの核酸の取り込みを阻害はしないことが分かった (ODN 1019 と呼ばれているオリゴ核酸^{75,82)}も試したところ、ODN 1019も核酸による免疫応答を抑制するが、このオリゴでは顕著にB-DNAの取り込みが抑制されることがわかり、オリゴ核酸の配列によっては核酸リガンドの取り込みに影響を及ぼすものもあることが判明した (未発表)。ISM ODNはこのような機構で応答を抑制している訳ではないと考えられる)。ISM ODN以外にもオリゴ核酸を合成し、HMGB1とのアフィニティー、及び免疫応答の抑制効果について検討したところ、HMGB1との結合が強いオリゴ核酸は抑制効果も強く、結合が弱いものは抑制効果も弱いことが分かり、オリゴ核酸とHMGB1との結合と、免疫応答の抑制効果には相関があることが明らかとなった⁸¹⁾。このことから、ISM ODNはHMGBタンパク質と結合し、B-DNAなどの核酸とHMGBタンパク質との結合を阻害することで、免疫応答の活性化を抑制しているのではないかと考えられ

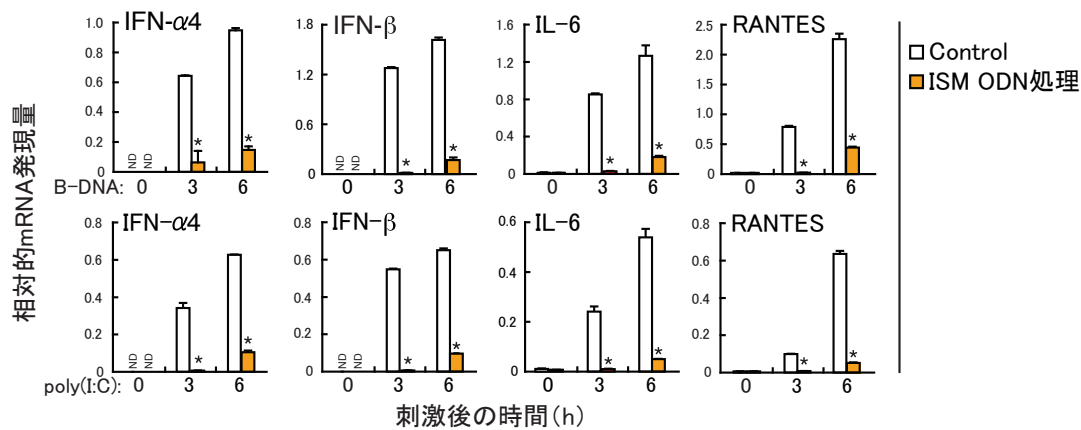


図3 核酸刺激時のサイトカイン誘導における ISM ODN の効果

マウス胎児線維芽細胞に ISM ODN (1 μM) を予め処理しておき、B-DNA (5 μg/ml), poly(I:C)(5 μg/ml) または LPS (200 ng/ml) で刺激し、I 型 IFN やその他のサイトカインの誘導を qRT-PCR で検討した。

た、一連の結果は、HMGB タンパク質が汎核酸認識受容体として機能しているという考えを支持するものであり、ISM ODN が HMGB タンパク質と強固に結合することで、HMGB タンパク質と免疫原性核酸との結合を阻害しているのではないかと考えられる (図 4)。

オリゴ核酸による免疫応答抑制作用の応用性

オリゴ核酸のどのような性質が HMGB タンパク質との結合に必要なのか、次の 3 点について検討した。①まず、オリゴ核酸の骨格について、CpG-B DNA や ISM ODN は、通常のリン酸ジエステル (phosphodiester; PD) 結合とは異なり、エステル結合部の酸素原子 (O) が硫黄原子 (S) に置換された、ホスホロチオエート (phosphorothioate; PS) 結合に変換された骨格を有する核酸アナログとなっている。ISM ODN と同じ塩基配列で骨格を PD にしたのでは PS の骨格の場合と比較し、HMGB タンパク質との結合が弱く、且つ抑制効果も見られないことから、PS 骨格を有していることは HMGB タンパク質との結合、免疫応答の抑制に重要であることが分かった⁸¹⁾。②また、塩基部位について、塩基のない PS 骨格のみのアナログを用いた場合にも、塩基有りの CpG-B DNA や ISM ODN と比較し、弱いながらも HMGB タンパク質との結合が認められ、抑制効果も確認されたが、塩基部位があるほうが HMGB タンパク質との結合、抑制効果は共に強いことが分かった。塩基配列の重要性について、PS 骨格を持つ、poly(dA) や poly(dC) など、ホモポリマーを用いて検討したところ、これらホモポリマーを用いた場合においてさえも HMGB タンパク質との結合、応答の抑制効果が見られた。これらの結果から、HMGB タンパク質との結合を強固にする何らかの特異的塩基配列がある可能性はあるが、調べた限りにおいては核酸の塩基配列自身にはそれほど重要な

性はないと考えられた。③オリゴ核酸の鎖長について、前述のホモポリマーについて、5mer, 10mer, 15mer, 20mer のオリゴを合成し、結合、応答の抑制について検討したところ、20mer のものでは、HMGB タンパク質との結合、応答の抑制効果が見られたが、それ以下の鎖長のオリゴにおいては、結合も抑制効果も認められなかった。HMGB1 は 15-18bp の DNA と結合するという報告があることから^{83,84)}、この性質を反映しているものと考えられる。以上のことから、PS 骨格は HMGB1 との結合および抑制効果に重要であること、さらに塩基部分が加わることで HMGB1 との結合能が増強され、且つ免疫応答の抑制効果が高まることが分かった。これまでにも、TLR7 や TLR9 を標的とし、免疫応答を抑制する比較的短い (多くの場合 15-25 mer ほど)、一部分あるいは全体が PS 骨格の核酸アナログが報告されており、これらの核酸アナログは TLR7 や TLR9 と結合し、阻害活性を発揮すると考えられている^{85,86)}。しかしながら、最近、これらの核酸アナログによる抑制効果と、核酸アナログと受容体とのアフィニティーには必ずしも相関しないという報告がなされ⁸⁷⁾、核酸アナログと受容体との結合のみでは必ずしもその効果を説明出来ないことが明らかとなった。これらの核酸アナログがどのように応答を抑制しているのか、その詳細は必ずしも明らかになっていない。TLR を特異的に抑制すると言われている核酸アナログのうち、上記の条件を充たすものを用いて、B-DNA 刺激などによる免疫応答の活性化に及ぼす影響を検討したところ、TLR 特異的に抑制されているこれらの核酸アナログによっても、B-DNA などによる免疫応答の活性化が顕著に抑制されるという結果を得ている (未発表)。核酸アナログが HMGB タンパク質と結合し、核酸刺激による免疫応答の活性化を抑制するというアイデアは、これらの核酸アナログによ

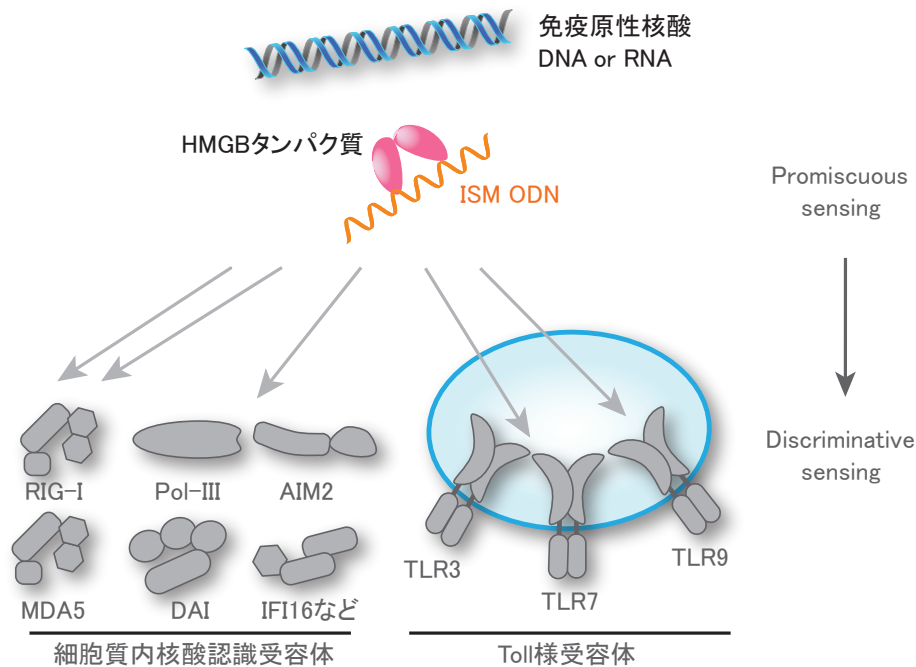


図4 ISM ODNによる核酸誘導性免疫応答の抑制

ISM ODNによる免疫応答抑制機構のモデル図。ISM ODNはHMGBタンパク質と強固に結合するため、B-DNAやpoly(I:C)など、免疫原性核酸がHMGBタンパク質と結合できなくなるのではないかと考えられる。ISM ODNがHMGBタンパク質と結合することで、promiscuous sensingが阻害され、結果として細胞質内核酸認識受容体やToll様受容体を介したシグナルが不活性化される。

るTLRシグナルの抑制メカニズムを理解する上で手助けとなる可能性があると考えられる。

上述のように、核酸認識受容体シグナルは自己免疫疾患の病態の増悪と深い関わりがある。核酸による自然免疫応答の活性化をISM ODNで抑制することにより、自己免疫疾患の病態を改善できる可能性はあるのか。前出のTLRをターゲットとした核酸アナログでは、ANA中のDNAやRNAなどによる免疫系の活性化を抑制できるという報告もある^{86,88}。そこでまず、マウスにISM ODNを投与し、核酸をアジュバントとして用いた時のOVA(ovalbumin; 卵白アルブミン)特異的CD8+T細胞の活性化、及びIgG1の産生を検討したところ、ISM ODNの投与によって、これらの活性化、産生は顕著に抑制されることが分かった⁸¹。すなわち、ISM ODNは核酸刺激による自然免疫系の活性化を介した適応免疫応答の“誘導”も抑制できることが示された。さらに、ISM ODNの投与によってEAEのような自己免疫疾患の病態発症を抑制できることも明らかとなった(図5)。これらの結果から、核酸アナログ投与により、自己抗体中の核酸などが関連する自己免疫疾患の病態の治療法に応用できる可能性があると考えられる。しかしながら、実際、ISM ODNがどの過程を抑制しているのかは不明であり、核酸アナログによる病態抑制への応用を可能にするためには、今後詳細を解明していく必要がある。

最後に、ISM ODNがHMGB1と結合することから、HMGB1が関与する病態をISM ODNが抑制できる可能性について紹介したい。HMGB1はLPSなどの刺激によって細胞外に放出され、炎症性サイトカインと機能することが知られており^{74,77,78}、LPS誘導性の敗血症モデルにおいては抗HMGB1抗体を投与することにより、致死性ショックを改善できることも報告されている⁷⁹。このモデルにおいて、ISM ODNを適用したところ、HMGB1抗体投与の実験と同様、LPS誘導性ショックを抑制できることが分かった(図5)。ISM ODNは細胞レベルにおいてはLPS刺激によるサイトカイン誘導は抑制せず、またマウス個体レベルにおいても、LPS投与による初期のサイトカイン産生は抑制しないことから、LPS刺激そのものを抑制している訳ではないようである。一つの可能性として、LPS刺激によって細胞外に放出されたHMGB1にISM ODNが結合し、HMGB1の炎症性サイトカインとしての機能を阻害することが予想される。HMGB1は虚血・再還流などの刺激によっても細胞外に放出され、炎症の増悪にも寄与することが示唆されている^{89,90}。ISM ODNなどHMGB1と結合できる核酸アナログは、自己免疫疾患のみならず、これらに対する免疫抑制剤としても応用できる可能性があるのではないかと期待している。

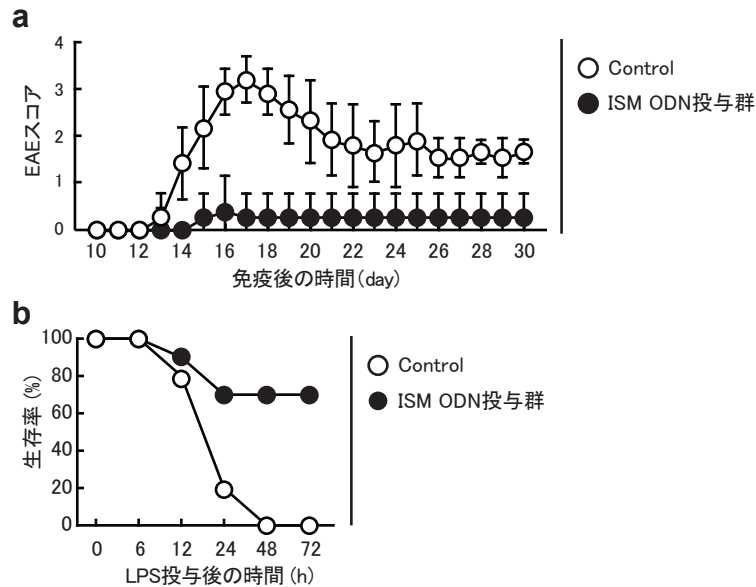


図5 ISM ODN 投与のEAE及びLPS誘導性ショックにおける効果

a.C57BL6/Jマウスにミエリン乏突起神経膠細胞糖タンパク (myelin-oligodendrocyte glycoprotein; MOG) ペプチド, 完全フロイントアジュバントを用いて免疫した. 免疫後8, 10および12日目に0.1 mgのISM ODNを静脈注射により投与し, 投与無し (Control) と比較検討した. 免疫後10日から30日後までのEAE病態スコアを記録した. b.C57BL/6Jマウスに0.1 mgのISM ODNを静脈注射により投与し, 1時間後に1.25 mgのLPSを腹腔内注射した. ISM ODN投与無し (Control) と比較検討し, 生存率を記録した.

おわりに

本稿では, HMGBタンパク質をターゲットとした非免疫原性核酸アナログによる核酸誘導性の免疫応答の抑制作用について紹介させていただいた. HMGBタンパク質がどのように核酸による免疫応答の活性化に関与しているのか, その詳細の解明は, 核酸アナログを自己免疫疾患や炎症の治療に適用させていくために解明していかなければならない課題であると考えられる. また, 現時点ではISM ODNの効果はエンドポイントにおいてしか検討できていない. 具体的に疾患のどの過程を抑制しているのか, その詳細を明らかにしていきたい. その他の自己免疫疾患や炎症のモデルにおいてもISM ODNを適用できるのか, また, 感染症との関連についても今後検討していきたい課題であると考えている. これらのことを明らかにし, また, HMGBタンパク質を標的とした, 核酸アナログやさらにより良いデリバティブを開発することで, 自己免疫疾患などの治療応用へ向けた分子基盤の提供につながっていくことを期待している.

謝辞

本稿で紹介させていただいた研究は東京大学医学系研究科免疫学講座の谷口維紹先生のご指導のもと, 藩龍馬君, 千葉志穂さん, 王志超博士, Choi Myoung Kwon 博士をはじめ, 研究室の皆様のご助力を得てなされたものであります. また, 質量分析は児玉龍彦先生 (東京大学), 川村猛先生 (東京大学) との共同研究により, *Tlr9* 遺伝子欠損マウスの解析は審良静男先生 (大阪大学) との共同研究によって為されたものであります. この場をお借りし, 深く感謝申し上げます.

参考文献

- 1) Janeway, C. A., Jr. & Medzhitov, R.: Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 197-216, 2002.
- 2) Medzhitov, R.: Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449: 819-826, 2007.
- 3) Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O.: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783-801, 2006.
- 4) Hornung, V. & Latz, E.: Intracellular DNA recognition. *Nat. Rev. Immunol.* 10: 123-130, 2010.
- 5) Takeuchi, O. & Akira, S.: Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140: 805-820, 2010.
- 6) Tamura, T., Yanai, H., Savitsky, D. & Taniguchi, T.: The IRF family transcription factors in immunity and

- oncogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 26: 535-584, 2008.
- 7) Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A.: Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413: 732-738, 2001.
 - 8) Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & Reis e Sousa, C.: Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303: 1529-1531, 2004.
 - 9) Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. & Bauer, S.: Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303: 1526-1529, 2004.
 - 10) Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. & Akira, S.: A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740-745, 2000.
 - 11) Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., de Fougerolles, A., Endres, S. & Hartmann, G.: Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat. Med.* 11: 263-270, 2005.
 - 12) Honda, K., Takaoka, A. & Taniguchi, T.: Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* 25: 349-360, 2006.
 - 13) Lund, J. M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N. C., Gale, N. W., Iwasaki, A. & Flavell, R. A.: Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 5598-5603, 2004.
 - 14) Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C., Reis e Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T. & Akira, S.: Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441: 101-105, 2006.
 - 15) Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y. M., Gale, M., Jr., Akira, S., Yonehara, S., Kato, A. & Fujita, T.: Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J. Immunol.* 175: 2851-2858, 2005.
 - 16) Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S. & Fujita, T.: The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* 5: 730-737, 2004.
 - 17) Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K. J., Takeuchi, O. & Akira, S.: IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat. Immunol.* 6: 981-988, 2005.
 - 18) Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R. & Tschoopp, J.: Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437: 1167-1172, 2005.
 - 19) Seth, R. B., Sun, L., Ea, C. K. & Chen, Z. J.: Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- κ B and IRF3. *Cell* 122: 669-682, 2005.
 - 20) Xu, L. G., Wang, Y. Y., Han, K. J., Li, L. Y., Zhai, Z. & Shu, H. B.: VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN- β signaling. *Mol. Cell* 19: 727-740, 2005.
 - 21) Honda, K. & Taniguchi, T.: IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 644-658, 2006.
 - 22) Ishii, K. J., Coban, C., Kato, H., Takahashi, K., Torii, Y., Takeshita, F., Ludwig, H., Sutter, G., Suzuki, K., Hemmi, H., Sato, S., Yamamoto, M., Uematsu, S., Kawai, T., Takeuchi, O. & Akira, S.: A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat. Immunol.* 7: 40-48, 2006.
 - 23) Stetson, D. B. & Medzhitov, R.: Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* 24: 93-103, 2006.
 - 24) Fitzgerald, K. A., McWhirter, S. M., Faia, K. L., Rowe, D. C., Latz, E., Golenbock, D. T., Coyle, A. J., Liao, S. M. & Maniatis, T.: IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* 4: 491-496, 2003.
 - 25) McWhirter, S. M., Fitzgerald, K. A., Rosains, J., Rowe, D. C., Golenbock, D. T. & Maniatis, T.: IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in *Tbk1*-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 233-238, 2004.
 - 26) Mori, M., Yoneyama, M., Ito, T., Takahashi, K., Inagaki, F. & Fujita, T.: Identification of Ser-386 of interferon regulatory factor 3 as critical target for inducible phosphorylation that determines activation. *J. Biol. Chem.* 279: 9698-9702, 2004.
 - 27) Sharma, S., tenOever, B. R., Grandvaux, N., Zhou, G. P., Lin, R. & Hiscott, J.: Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 300: 1148-1151, 2003.
 - 28) Takahashi, K., Horiuchi, M., Fujii, K., Nakamura, S., Noda, N. N., Yoneyama, M., Fujita, T. & Inagaki, F.: Ser386 phosphorylation of transcription factor IRF-3 induces dimerization and association with CBP/p300 without overall conformational change. *Genes Cells* 15: 901-910, 2010.
 - 29) Takaoka, A., Wang, Z., Choi, M. K., Yanai, H., Negishi, H., Ban, T., Lu, Y., Miyagishi, M., Kodama, T., Honda, K., Ohba, Y. & Taniguchi, T.: DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448: 501-505, 2007.
 - 30) Ishikawa, H. & Barber, G. N.: STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 455: 674-678, 2008.
 - 31) Ishikawa, H., Ma, Z. & Barber, G. N.: STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependen-

- dent innate immunity. *Nature* 461: 788-792, 2009.
- 32) Zhong, B., Yang, Y., Li, S., Wang, Y. Y., Li, Y., Diao, F., Lei, C., He, X., Zhang, L., Tien, P. & Shu, H. B.: The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity* 29: 538-550, 2008.
 - 33) Ablasser, A., Bauernfeind, F., Hartmann, G., Latz, E., Fitzgerald, K. A. & Hornung, V.: RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat. Immunol.* 10: 1065-1072, 2009.
 - 34) Chiu, Y. H., Macmillan, J. B. & Chen, Z. J.: RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* 138: 576-591, 2009.
 - 35) Unterholzner, L., Keating, S. E., Baran, M., Horan, K. A., Jensen, S. B., Sharma, S., Sirois, C. M., Jin, T., Latz, E., Xiao, T. S., Fitzgerald, K. A., Paludan, S. R. & Bowie, A. G.: IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat. Immunol.* 11: 997-1004, 2010.
 - 36) Zhang, Z., Yuan, B., Bao, M., Lu, N., Kim, T. & Liu, Y. J.: The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nat. Immunol.* 12: 959-965, 2011.
 - 37) Ishii, K. J., Kawagoe, T., Koyama, S., Matsui, K., Kumar, H., Kawai, T., Uematsu, S., Takeuchi, O., Take-shita, F., Coban, C. & Akira, S.: TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature* 451: 725-729, 2008.
 - 38) Choi, M. K., Wang, Z., Ban, T., Yanai, H., Lu, Y., Koshi-ba, R., Nakaima, Y., Hangai, S., Savitsky, D., Nakasato, M., Negishi, H., Takeuchi, O., Honda, K., Akira, S., Tamura, T. & Taniguchi, T.: A selective contribution of the RIG-I-like receptor pathway to type I interferon responses activated by cytosolic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 17870-17875, 2009.
 - 39) Burckstummer, T., Baumann, C., Bluml, S., Dixit, E., Durnberger, G., Jahn, H., Planyavsky, M., Bilban, M., Colinge, J., Bennett, K. L. & Superti-Furga, G.: An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat. Immunol.* 10: 266-272, 2009.
 - 40) Fernandes-Alnemri, T., Yu, J. W., Datta, P., Wu, J. & Alnemri, E. S.: AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 458: 509-513, 2009.
 - 41) Hornung, V., Ablasser, A., Charrel-Dennis, M., Bauernfeind, F., Horvath, G., Caffrey, D. R., Latz, E. & Fitzgerald, K. A.: AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 458: 514-518, 2009.
 - 42) Muruve, D. A., Petrilli, V., Zaiss, A. K., White, L. R., Clark, S. A., Ross, P. J., Parks, R. J. & Tschoop, J.: The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature* 452: 103-107, 2008.
 - 43) Roberts, T. L., Idris, A., Dunn, J. A., Kelly, G. M., Burn-ton, C. M., Hodgson, S., Hardy, L. L., Garceau, V., Sweet, M. J., Ross, I. L., Hume, D. A. & Stacey, K. J.: HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science* 323: 1057-1060, 2009.
 - 44) Chitrabamrung, S., Rubin, R. L. & Tan, E. M.: Serum deoxyribonuclease I and clinical activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol. Int.* 1: 55-60, 1981.
 - 45) Napirei, M., Karsunky, H., Zevnik, B., Stephan, H., Mannherz, H. G. & Moroy, T.: Features of systemic lupus erythematosus in *DnaseI*-deficient mice. *Nat. Genet.* 25: 177-181, 2000.
 - 46) Yasutomo, K., Horiuchi, T., Kagami, S., Tsukamoto, H., Hashimura, C., Urushihara, M. & Kuroda, Y.: Mutation of *DNASE1* in people with systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* 28: 313-314, 2001.
 - 47) Okabe, Y., Kawane, K., Akira, S., Taniguchi, T. & Nagata, S.: Toll-like receptor-independent gene induction program activated by mammalian DNA escaped from apoptotic DNA degradation. *J. Exp. Med.* 202: 1333-1339, 2005.
 - 48) Yoshida, H., Okabe, Y., Kawane, K., Fukuyama, H. & Nagata, S.: Lethal anemia caused by interferon- β produced in mouse embryos carrying undigested DNA. *Nat. Immunol.* 6: 49-56, 2005.
 - 49) Okabe, Y., Kawane, K. & Nagata, S.: IFN regulatory factor (IRF) 3/7-dependent and -independent gene induction by mammalian DNA that escapes degradation. *Eur. J. Immunol.* 38: 3150-3158, 2008.
 - 50) Stetson, D. B., Ko, J. S., Heidmann, T. & Medzhitov, R.: Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell* 134: 587-598, 2008.
 - 51) Crow, Y. J., Hayward, B. E., Parmar, R., Robins, P., Leitch, A., Ali, M., Black, D. N., van Bokhoven, H., Brunner, H. G., Hamel, B. C., Corry, P. C., Cowan, F. M., Frints, S. G., Klepper, J., Livingston, J. H., Lynch, S. A., Massey, R. F., Meritet, J. F., Michaud, J. L., Ponsot, G., Voit, T., Lebon, P., Bonthron, D. T., Jackson, A. P., Barnes, D. E. & Lindahl, T.: Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause Aicardi-Goutieres syndrome at the AGS1 locus. *Nat. Genet.* 38: 917-920, 2006.
 - 52) Morita, M., Stamp, G., Robins, P., Dulic, A., Rosewell, I., Hrivnak, G., Daly, G., Lindahl, T. & Barnes, D. E.: Gene-targeted mice lacking the Trex1 (DNase III) 3'->5' DNA exonuclease develop inflammatory myocarditis. *Mol. Cell. Biol.* 24: 6719-6727, 2004.
 - 53) Boule, M. W., Broughton, C., Mackay, F., Akira, S., Marshak-Rothstein, A. & Rifkin, I. R.: Toll-like receptor 9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes. *J. Exp. Med.* 199: 1631-1640, 2004.
 - 54) Deane, J. A., Pisitkun, P., Barrett, R. S., Feigenbaum, L., Town, T., Ward, J. M., Flavell, R. A. & Bolland, S.: Control of toll-like receptor 7 expression is essential to restrict autoimmunity and dendritic cell proliferation. *Immunity* 27: 801-810, 2007.
 - 55) Fournie, G. J.: Detection of nucleosome-IgG immune complexes in ascites from mice transplanted with anti-DNA antibody-secreting hybridomas and in plasma from MRL-lpr/lpr mice. *Clin. Exp. Immunol.* 104:

- 236-240, 1996.
- 56) Krieg, A. M. & Vollmer, J.: Toll-like receptors 7, 8, and 9: linking innate immunity to autoimmunity. *Immunol. Rev.* 220: 251-269, 2007.
 - 57) Lau, C. M., Broughton, C., Tabor, A. S., Akira, S., Flavell, R. A., Mamula, M. J., Christensen, S. R., Shlomchik, M. J., Viglianti, G. A., Rifkin, I. R. & Marshak-Rothstein, A.: RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *J. Exp. Med.* 202: 1171-1177, 2005.
 - 58) Leadbetter, E. A., Rifkin, I. R., Hohlbaum, A. M., Beaudette, B. C., Shlomchik, M. J. & Marshak-Rothstein, A.: Chromatin-IgM complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 416: 603-607, 2002.
 - 59) Marshak-Rothstein, A.: Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 823-835, 2006.
 - 60) Marta, M., Meier, U. C. & Lobell, A.: Regulation of autoimmune encephalomyelitis by toll-like receptors. *Autoimmun. Rev.* 8: 506-509, 2009.
 - 61) Means, T. K., Latz, E., Hayashi, F., Murali, M. R., Golenbock, D. T. & Luster, A. D.: Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J. Clin. Invest.* 115: 407-417, 2005.
 - 62) Pisitkun, P., Deane, J. A., Difilippantonio, M. J., Tarasenko, T., Satterthwaite, A. B. & Bolland, S.: Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to *TLR7* gene duplication. *Science* 312: 1669-1672, 2006.
 - 63) Savarese, E., Chae, O. W., Trowitzsch, S., Weber, G., Kastner, B., Akira, S., Wagner, H., Schmid, R. M., Bauer, S. & Krug, A.: U1 small nuclear ribonucleoprotein immune complexes induce type I interferon in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Blood* 107: 3229-3234, 2006.
 - 64) Tan, E. M., Schur, P. H., Carr, R. I. & Kunkel, H. G.: Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 45: 1732-1740, 1966.
 - 65) Vollmer, J., Tluk, S., Schmitz, C., Hamm, S., Jurk, M., Forsbach, A., Akira, S., Kelly, K. M., Reeves, W. H., Bauer, S. & Krieg, A. M.: Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J. Exp. Med.* 202: 1575-1585, 2005.
 - 66) Brentano, F., Schorr, O., Gay, R. E., Gay, S. & Kyburz, D.: RNA released from necrotic synovial fluid cells activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via Toll-like receptor 3. *Arthritis Rheum.* 52: 2656-2665, 2005.
 - 67) Kim, K. W., Cho, M. L., Oh, H. J., Kim, H. R., Kang, C. M., Heo, Y. M., Lee, S. H. & Kim, H. Y.: TLR-3 enhances osteoclastogenesis through upregulation of RANKL expression from fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Immunol. Lett.* 124: 9-17, 2009.
 - 68) Ospelt, C., Brentano, F., Rengel, Y., Stanczyk, J., Kolling, C., Tak, P. P., Gay, R. E., Gay, S. & Kyburz, D.: Overexpression of toll-like receptors 3 and 4 in synovial tissue from patients with early rheumatoid arthritis: toll-like receptor expression in early and longstanding arthritis. *Arthritis Rheum.* 58: 3684-3692, 2008.
 - 69) Asagiri, M., Hirai, T., Kunigami, T., Kamano, S., Gober, H. J., Okamoto, K., Nishikawa, K., Latz, E., Golenbock, D. T., Aoki, K., Ohya, K., Imai, Y., Morishita, Y., Miyazono, K., Kato, S., Saftig, P. & Takayanagi, H.: Cathepsin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis. *Science* 319: 624-627, 2008.
 - 70) Marta, M., Andersson, A., Isaksson, M., Kampe, O. & Lobell, A.: Unexpected regulatory roles of TLR4 and TLR9 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 38: 565-575, 2008.
 - 71) Prinz, M., Garbe, F., Schmidt, H., Mildner, A., Gutcher, I., Wolter, K., Piesche, M., Schroers, R., Weiss, E., Kirschning, C. J., Rochford, C. D., Bruck, W. & Becher, B.: Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 116: 456-464, 2006.
 - 72) Yanai, H., Ban, T. & Taniguchi, T.: Essential role of high-mobility group box proteins in nucleic acid-mediated innate immune responses. *J. Intern. Med.* 270: 301-308, 2011.
 - 73) Yanai, H., Ban, T., Wang, Z., Choi, M. K., Kawamura, T., Negishi, H., Nakasato, M., Lu, Y., Hangai, S., Koshiba, R., Savitsky, D., Ronfani, L., Akira, S., Bianchi, M. E., Honda, K., Tamura, T., Kodama, T. & Taniguchi, T.: HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature* 462: 99-103, 2009.
 - 74) Bianchi, M. E. & Manfredi, A. A.: High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol. Rev.* 220: 35-46, 2007.
 - 75) Ivanov, S., Dragoi, A. M., Wang, X., Dallacosta, C., Louten, J., Musco, G., Sitia, G., Yap, G. S., Wan, Y., Biron, C. A., Bianchi, M. E., Wang, H. & Chu, W. M.: A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA. *Blood* 110: 1970-1981, 2007.
 - 76) Tian, J., Avalos, A. M., Mao, S. Y., Chen, B., Senthil, K., Wu, H., Parroche, P., Drabic, S., Golenbock, D., Sirois, C., Hua, J., An, L. L., Audoly, L., La Rosa, G., Bierhaus, A., Naworth, P., Marshak-Rothstein, A., Crow, M. K., Fitzgerald, K. A., Latz, E., Kiener, P. A. & Coyle, A. J.: Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat. Immunol.* 8: 487-496, 2007.
 - 77) Bianchi, M. E.: HMGB1 loves company. *J. Leukoc. Biol.* 86: 573-576, 2009.
 - 78) Scaffidi, P., Misteli, T. & Bianchi, M. E.: Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418: 191-195, 2002.
 - 79) Wang, H., Bloom, O., Zhang, M., Vishnubhakat, J. M., Ombrellino, M., Che, J., Frazier, A., Yang, H., Ivanova, S., Borovikova, L., Manogue, K. R., Faist, E., Abraham, E., Andersson, J., Andersson, U., Molina, P. E., Abum-

- rad, N. N., Sama, A. & Tracey, K. J.: HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 285: 248-251, 1999.
- 80) Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A. & Klinman, D. M.: CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374: 546-549, 1995.
- 81) Yanai, H., Chiba, S., Ban, T., Nakaima, Y., Onoe, T., Honda, K., Ohdan, H. & Taniguchi, T.: Suppression of immune responses by nonimmunogenic oligodeoxynucleotides with high affinity for high-mobility group box proteins (HMGBs). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 11542-11547, 2011.
- 82) Roman, M., Martin-Orozco, E., Goodman, J. S., Nguyen, M. D., Sato, Y., Ronaghy, A., Kornbluth, R. S., Richman, D. D., Carson, D. A. & Raz, E.: Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat. Med.* 3: 849-854, 1997.
- 83) Saito, K., Kikuchi, T., Shirakawa, H. & Yoshida, M.: The stabilized structural array of two HMG1/2-boxes endowed by a linker sequence between them is requisite for the effective binding of HMG1 with DNA. *J. Biochem.* 125: 399-405, 1999.
- 84) Stott, K., Tang, G. S., Lee, K. B. & Thomas, J. O.: Structure of a complex of tandem HMG boxes and DNA. *J. Mol. Biol.* 360: 90-104, 2006.
- 85) Halpern, M. D. & Pisetsky, D. S.: In vitro inhibition of murine IFN gamma production by phosphorothioate deoxyguanosine oligomers. *Immunopharmacology* 29: 47-52, 1995.
- 86) Lenert, P. S.: Classification, mechanisms of action, and therapeutic applications of inhibitory oligonucleotides for Toll-like receptors (TLR) 7 and 9. *Mediators Inflamm.* 2010: 986596, 2010.
- 87) Ashman, R. F., Goeken, J. A., Latz, E. & Lenert, P.: Optimal oligonucleotide sequences for TLR9 inhibitory activity in human cells: lack of correlation with TLR9 binding. *Int. Immunol.* 23: 203-214, 2011.
- 88) Graham, K. L., Lee, L. Y., Higgins, J. P., Steinman, L., Utz, P. J. & Ho, P. P.: Treatment with a toll-like receptor inhibitory GpG oligonucleotide delays and attenuates lupus nephritis in NZB/W mice. *Autoimmunity* 43: 140-155, 2010.
- 89) Andersson, U. & Tracey, K. J.: HMGB1 Is a Therapeutic Target for Sterile Inflammation and Infection. *Annu. Rev. Immunol.* 29: 139-162, 2011.
- 90) Kaczorowski, D. J., Tsung, A. & Billiar, T. R.: Innate immune mechanisms in ischemia/reperfusion. *Front. Biosci. (Elite Ed)* 1: 91-98, 2009.
- 91) Takaoka, A., Yanai, H., Kondo, S., Duncan, G., Negishi, H., Mizutani, T., Kano, S., Honda, K., Ohba, Y., Mak, T. W. & Taniguchi, T.: Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434: 243-249, 2005.

Regulation of Innate Immune Responses by Nucleic Acid Analogues

Hideyuki YANAI

Department of Immunology, Graduate School of Medicine and Faculty of Medicine, University of Tokyo

The activation of innate immune responses by nucleic acids is critical to host responses against pathogens, such as viruses; however, nucleic acids can also trigger the development and/or exacerbation of pathogenic responses such as autoimmunity. We previously demonstrated that the selective activation of nucleic acid-sensing cytosolic and Toll-like receptors is contingent on the promiscuous sensing of nucleic acids by high-mobility group box proteins (HMGBs). Besides these findings, we also found that nonimmunogenic nucleotide with high-affinity HMGB binding, termed ISM ODN, functions as suppressing agent for nucleic acid-activated innate immune responses. In this review, we aim to summarize this novel feature of HMGB proteins in nucleic acid-mediated innate immune responses. In addition, we will discuss the inhibitory effect of nonimmunogenic oligodeoxynucleotides (ni-ODNs) targeting HMGB proteins.