

CpG-ODN 2006 と B19 genome に共通する ssDNA 配列による 選択的赤芽球系増殖の抑制*

郭 永 梅

秋田大学大学院医学系研究科 血液・腎臓・膠原病内科学講座

(平成 23 年 4 月 4 日掲載決定)

CpG-ODN 2006 and human parvovirus B19 genome consensus sequences selectively inhibit growth and development of erythroid progenitor cells

Yongmei Guo

Department of Hematology, Nephrology and Rheumatology

Key words : CD34+ 細胞, CpG-ODN, B19, 赤芽球癆

はじめに

病原体やその産物が Toll-like receptor (TLR) 9 によって認識され、貧血を起こすことが報告されている¹⁻⁴⁾。TLR9 は細菌またはウイルスのゲノム DNA に存在する非メチル化 CpG ジヌクレオチドを認識する⁵⁾。自然界に存在するバクテリアやウイルスの CpG DNA は single-stranded (ss) oligodeoxynucleotide (ODN) 配列で、phosphodiester (PO) backbone を有する。しかし、免疫学的研究には、ヌクレアーゼ耐性とするために PO を phosphorothioate (PS) backbone に置き換えた CpG-ODN が主に用いられている (図 1)。重要なことは異なる backbone または異なる配列を持つ CpG ODN は免疫反応における作用が異なることが報告されていることである⁶⁻¹²⁾。

最近、TLR2, 4, 7, 8 が造血に直接的に関連しているのに対し、CpG-ODN がほかの細胞を介して、造血に影響することが報告された^{13,14)}。Sparwasser ら¹⁵⁾ は

CpG-ODN 2006 はサイトカインを介して、顆粒球・マクロファージ系前駆細胞 (granulocyte-macrophage colony forming units, CFU-GM) と赤芽球系前駆細胞の増殖を亢進させることを報告した。また、Thawani ら¹⁶⁾ はマウスを用いて、CpG-ODN は非赤芽球細胞から産生される炎症性サイトカインを介して、赤芽球造血を抑制し、貧血を起こすことを報告した。しかし、TLR9 とヒト CD34+ 細胞の関係についてはいまだ不明である。

一方、ヒト B19 パルボウイルス (B19) は ssDNA ウィルスで、ヒト赤芽球系を特異的に抑制する。その特異性は部分的に P 抗原という B19 のレセプターの分布に依存すると考えられてきたが^{17,18)}、P 抗原は赤芽球だけではなく、巨核球、内皮細胞などの細胞にも存在する^{17,19)}。このため、B19 による赤芽球系に選択的な抑制機序はいまだ不明である。非構造蛋白 NS1 によって、B19 は apoptosis 及び cell-cycle arrest を起こすことが報告されたが^{20,22)}、UV 照射後の B19 もまた G2 arrest を起こすと報告されている²⁰⁾。このことは、ウィルスゲノムまたは蛋白非存在下で、B19 DNA によって G2 arrest が誘導されることを示唆する。

我々はヒト造血において、TLR9 の代表的なリガンド CpG-ODN 2006 の影響を検討した。その結果、CpG-ODN 2006 と B19 の共通配列がヒト赤芽球系の増殖及び分化を抑制することを発見した。その機序に

Correspondence : Yongmei Guo, M.D., Ph.D.
Department of Hematology, Nephrology and Rheumatology, Akita-University Graduate School of Medicine, Hon-doh, Akita 010-8543, Japan
Tel : 81-18-884-6116
Fax : 81-18-836-6213
E-mail : kakueibai@yahoo.co.jp

*第 21 回秋田医学会学術奨励賞

(2)

ODNによる赤芽球系増殖の選択的抑制

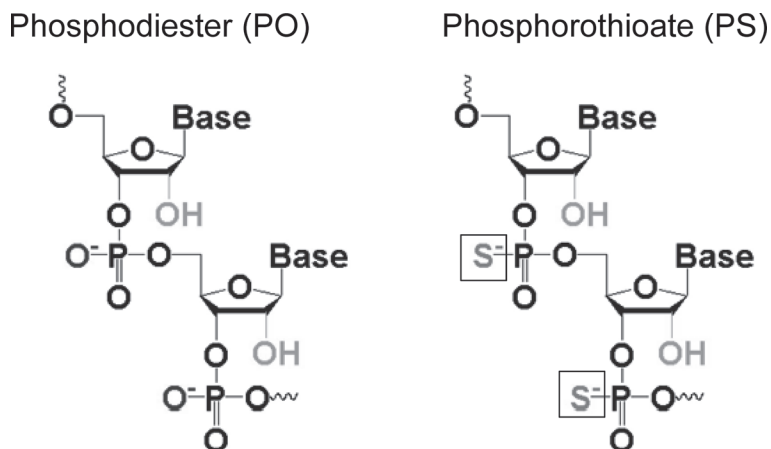


図1. Phosphodiester (PO) backbone 中の酸素を硫黄で置換した phosphorothioate (PS) backbone.

ついて検討した結果、微生物由来の核酸がヒトの造血幹細胞の分化増殖制御に関わっていることを初めて見出した。

CpG-ODN 2006-PO による赤芽球増殖の特異的な抑制

赤芽球系 (GPA+), 顆粒球系 (CD15+), 巨核球系 (CD61+) 前駆細胞を同時に誘導する系を用いて CpG-ODN 2006-PO (2006-PO) の影響を検討した。2006-PO は濃度依存性に赤芽球系増殖を選択的に抑制した。顆粒球系及び巨核球系は抑制しなかった (図 2A)。赤芽球系, 顆粒球系, 巨核球系それぞれの培養系においても, 2006-PO は選択的に赤芽球系を抑制した。以上より, 2006-PO は赤芽球系を特異的に抑制することを確認した。

次に, 我々は異なる ODNs の作用を検討するため, CpG motif, ODN backbone, 配列の違いに着目した。図 2B に示す如く, CpG motif の CG を GC と置き換えた non-CpG-ODN (2137-PO) は 2006-PO と同様に赤芽球抑制効果を示した。しかし, 2006-PO と同じ PO backbone で, 完全に異なる配列を持つ 2243-PO や PS backbone を持つ CpG-ODN (2006-PS) は赤芽球増殖に影響しなかった。以上より, 2006-PO による赤芽球系抑制は CpG motif ではなく, ODN 配列, 及び backbone 依存性であった。

CpG-ODN 2006 は TLR9 によって認識されることが知られている。2006-PO による赤芽球系抑制における

TLR9 の関与を検討した。我々は rhodamine で標識した 2006-PO が細胞内に入っていることを共焦点顕微鏡で観察したが, CD34+ 細胞や赤芽球系細胞には TLR9 がほとんど発現していないことを確認した (図 2C)。すなわち, 2006-PO による赤芽球系抑制には TLR9 以外の経路が関与していると推定された。

2006-PO は直接的に赤芽球増殖を抑制, 巨赤芽球を作らせると同時に, 細胞分裂を遅らせ, G2/M arrest と apoptosis を誘導する

2006-PO は TLR9 を有する単球やマクロファージなどの支持細胞にも強い活性を持ち, サイトカイン産生を惹起する²³⁾。それらの細胞を介して, 2006-PO が BFU-E を抑制している可能性を除外するため限界希釈法を用いた²⁴⁾。2006-PO による BFU-E colony の抑制は原点を通る直線であったことから 2006-PO は支持細胞を介してではなく, 直接 BFU-E colony の形成を抑制することを確認した (図 3A)。

次に, 2006-PO による赤芽球系の抑制機序を検討した。その結果, 7日間培養後, 2006-PO は赤芽球サイズの増大 (図 3B), 分化の遅延 (図 3C), 細胞周期停止 (図 3D) 及び apoptosis (図 3E) をもたらすことを見出した。

以上は B19 感染による赤芽球癆 (pure red cell aplasia, PRCA) で認められる巨大赤芽球に極めて類似する所見である²⁰⁻²²⁾。そこで, 2006-PO と B19 に共通する配列があるか否かについて検索した。

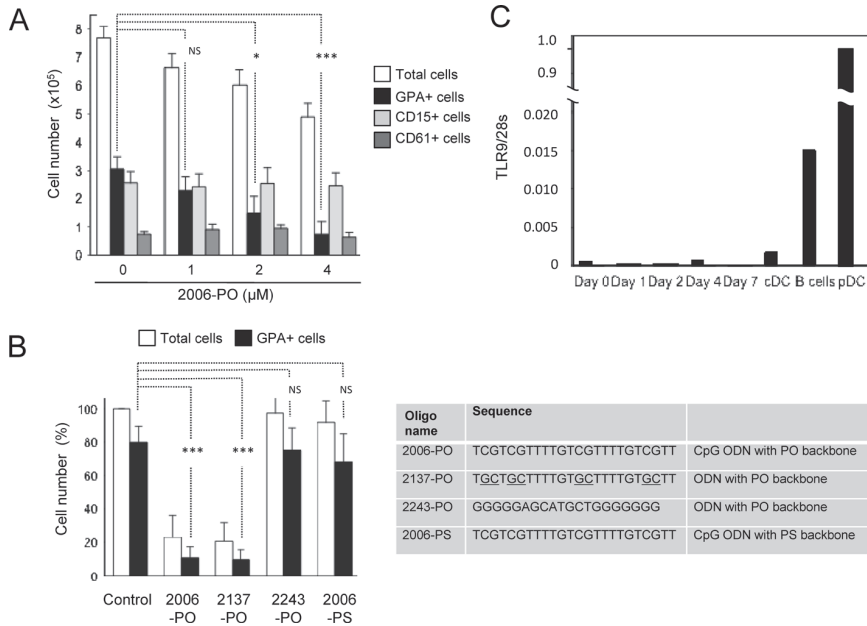


図2. A: CpG-ODN 2006-POによる赤芽球系前駆細胞 (GPA+ cells) の選択的抑制. 顆粒球系 (CD15+ cells) と巨核球系 (CD16+ cells) の抑制は認められなかった. B: CpG-ODN 2006-POによる配列特異的及び backbone 依存的な赤芽球系前駆細胞の抑制. C: CD34⁺ 細胞 (Day0) と赤芽球系前駆細胞 (Day1-7 cells) の TLR9 発現. pDCs, B cell を positive control とし, cDCs を negative control として検討した. 赤芽球系前駆細胞においては TLR9 の発現を認めなかった.

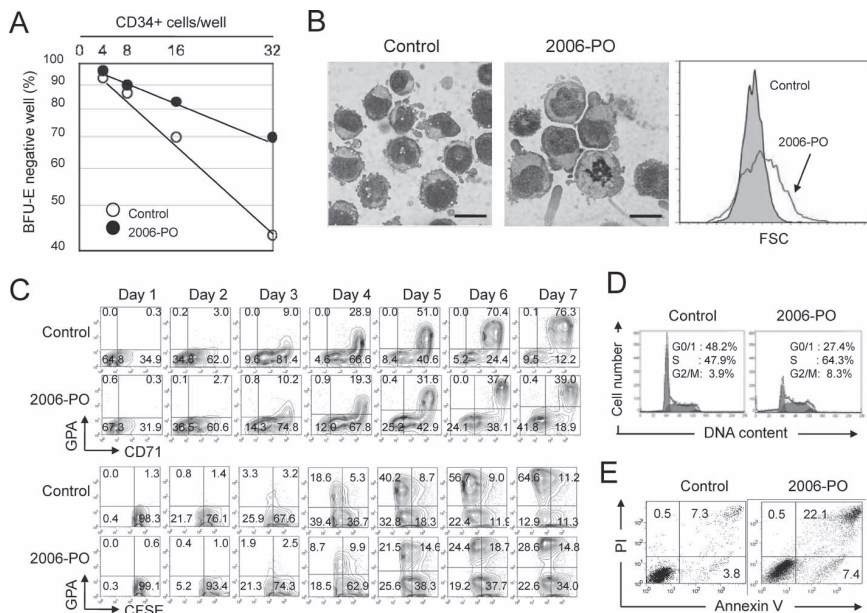


図3. A: 2006-POは直接的にBFU-E colonyの形成を抑制した. B: 2006-POは赤芽球サイズを増大させた. C: 2006-POは赤芽球の分化を遅延させた. D: 2006-POは赤芽球の細胞周期停止を起こした. E: 2006-POは赤芽球のapoptosisをもたらした.

(4)

ODNによる赤芽球系増殖の選択的抑制

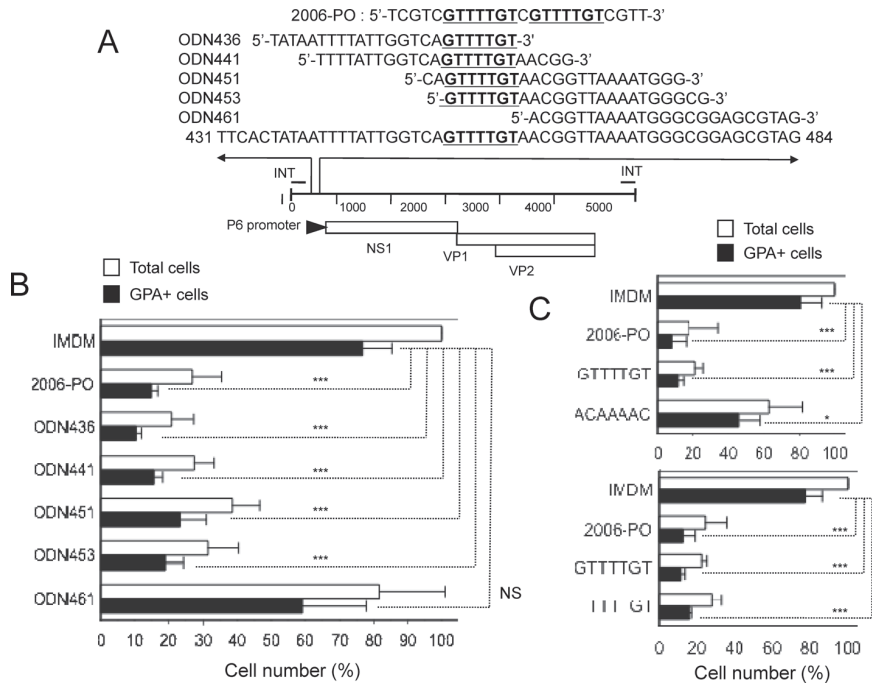


図4. A: B19のP6-promotor領域に、2006-POとの共通配列5'-GTTTTGT-3'を認めた。B: 5'-GTTTTGT-3'を含む配列のみが赤芽球系を抑制した。C: 5'-GTTTTGT-3'配列自体が赤芽球系を抑制した。

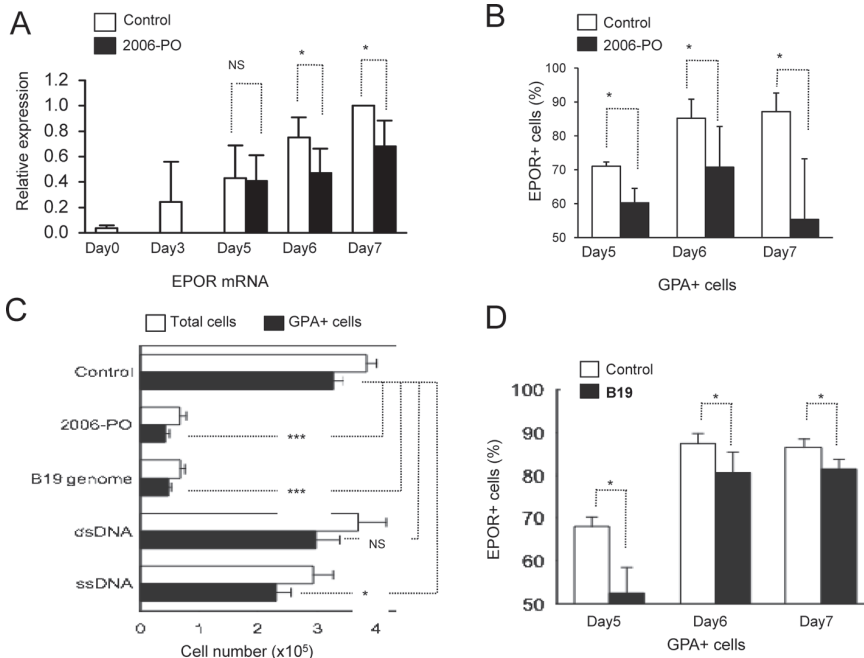


図5. A-B: 2006-POはEPORの転写、またEPOR蛋白発現を抑制した。C: B19ゲノムは赤芽球系増殖を抑制した。D: B19ゲノムはEPOR蛋白発現を抑制した。

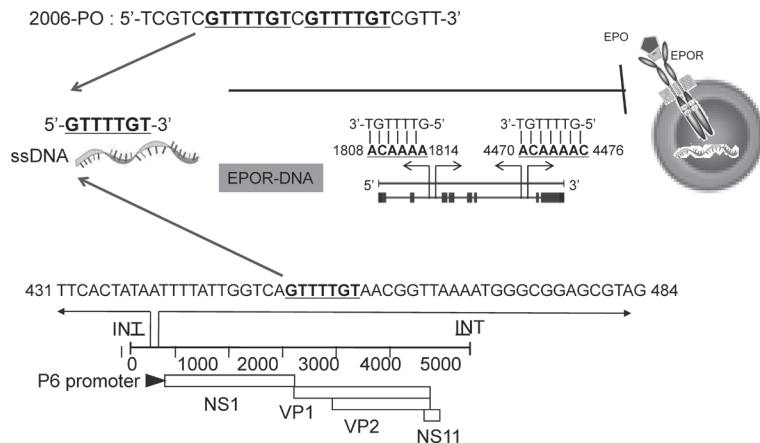


図 6. 5'-GTTTTGT-3' 配列による EPOR 遺伝子の発現抑制機序の予想図.

B19 と 2006-PO の共通配列 5'-GTTTTGT-3' は赤芽球増殖を抑制する

B19 の P6-promotor 領域に、2006-PO との共通配列 5'-GTTTTGT-3' を認めた (図 4A). そこで、B19 配列を合成して赤芽球に対する影響を検討した結果、5'-GTTTTGT-3' を含む配列のみが赤芽球系を抑制することを見出した (図 4B). 更に、5'-GTTTTGT-3' 配列自体が赤芽球系を抑制することを確認した (図 4C).

2006-PO 及び B19 は EPO 受容体 (EPOR) の発現を抑制する

赤芽球系転写因子のうち、比較的赤芽球系に特異性の高い転写因子の発現を real-time PCR を用いて検討した. その結果、2006-PO による EPOR の転写抑制を認め、ウェスタンブロットで EPOR 蛋白発現抑制を認めた (図 5A-B). また、B19 感染患者から抽出した B19 ゲノムもまた赤芽球系を抑制するとともに、EPOR の発現低下を誘導した (図 5C-D).

ま と め

以上、我々は ODN 2006-PO と B19 の共通配列が赤芽球系を選択的に抑制することを発見した. この 2006-PO は EPOR mRNA 及び EPOR 蛋白発現を抑制することによって、赤芽球系を選択的に抑制すると考えられた. 5'-GTTTTGT-3' 配列による EPOR 遺伝子

の発現抑制機序は不明である. 5'-GTTTTGT-3' 配列が EPOR 遺伝子へ相補的に結合することによって、EPOR mRNA の発現を抑制しているのかも知れない (図 6). 本研究は赤芽球系を特異的に抑制する DNA 配列の発見とともに、微生物の核酸による造血制御機構の存在を世界で初めて示唆するものである.

謝 辞

本稿で述べた研究成果は、秋田大学大学院医学系研究科血液・腎臓・膠原病内科学講座、澤田賢一教授のご指導、研究室の皆様のご協力のもとで行われた. 研究室の皆様ならびに多くの共同研究者に深甚の謝意を表する.

参考文献

- 1) Bafica, A., Scanga, C.A., Feng, C.G., Leifer, C., Cheever, A. and Sher, A. (2005) TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Exp. Med.*, **202** (12), 1715-1724.
- 2) Kalis, C., Gumenscheimer, M., Freudenberg, N., et al. (2005) Requirement for TLR9 in the immunomodulatory activity of *Propionibacterium acnes*. *J. Immunol.*, **174** (7), 4295-4300.
- 3) Coban, C., Ishii, K.J., Kawai, T., et al. (2005) Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by

- the malaria pigment hemozoin. *J. Exp. Med.*, **201**(1), 19-25.
- 4) Chang, K.H. and Stevenson, M.M. (2004) Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. *Int. J. Parasitol.*, **34**(13-14), 1501-1516.
 - 5) Krieg, A.M. (2002) CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.*, **20**, 709-760.
 - 6) Yamamoto, S., Yamamoto, T., Kataoka, T., Kuramoto, E., Yano, O. and Tokunaga, T. (1992) Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN and augment IFN-mediated natural killer activity. *J. Immunol.*, **148**(12), 4072-4076.
 - 7) Sun, S., Zhang, X., Tough, D.F. and Sprent, J. (1998) Type I interferon-mediated stimulation of T cells by CpG DNA. *J. Exp. Med.*, **188**(12), 2335-2342.
 - 8) Lipford, G.B., Bendigs, S., Heeg, K. and Wagner, H. (2000) Poly-guanosine motifs costimulate antigen-reactive CD8 T cells while bacterial CpG-DNA affect T-cell activation via antigen-presenting cell-derived cytokines. *Immunology*, **101**(1), 46-52.
 - 9) Verthelyi, D., Ishii, K.J., Gursel, M., Takeshita, F. and Klinman, D.M. (2001) Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. *J. Immunol.*, **166**(4), 2372-2377.
 - 10) Kadowaki, N., Antonenko, S. and Liu, Y.J. (2001) Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c- type 2 dendritic cell precursors and CD11c+ dendritic cells to produce type I IFN. *J. Immunol.*, **166**(4), 2291-2295.
 - 11) Sester, D.P., Naik, S., Beasley, S.J., Hume, D.A. and Stacey, K.J. (2000) Phosphorothioate backbone modification modulates macrophage activation by CpG DNA. *J. Immunol.*, **165**(8), 4165-4173.
 - 12) Haas, T., Metzger, J., Schmitz, F., *et al.* (2008) The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity*, **28**(3), 315-323.
 - 13) Nagai, Y., Garrett, K.P., Ohtani S., *et al.* (2006) Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity*, **24**(6), 801-812.
 - 14) Sioud, M., Floisand, Y., Forfang, L. and Lund-Johansen, F. (2006) Signaling through toll-like receptor 7/8 induces the differentiation of human bone marrow CD34+ progenitor cells along the myeloid lineage. *J. Mol. Biol.*, **364**(5), 945-954.
 - 15) Sparwasser, T., Hultner, L., Koch, E.S., Luz, A., Lipford, G.B. and Wagner, H. (1999) Immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides cause extramedullary murine hemopoiesis. *J. Immunol.*, **162**(4), 2368-2374.
 - 16) Thawani, N., Tam, M., Chang, K.H. and Stevenson, M.M. (2006) Interferon-gamma mediates suppression of erythropoiesis but not reduced red cell survival following CpG-ODN administration in vivo. *Exp. Hematol.*, **34**(11), 1451-1461.
 - 17) Brown, K.E., Anderson, S.M. and Young, N.S. (1993) Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science*, **262**, 114-117.
 - 18) Brown, K.E., Hibb, J.R., Gallinella, G., *et al.* (1994) Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). *N. Engl. J. Med.*, **330**(17), 1192-1196.
 - 19) Cooling, L.L., Zhang, D.S., Walker, K.E. and Koerner, T.A. (1995) Detection in human blood platelets of sialyl Lewis X gangliosides, potential ligands for CD62 and other selectins. *Glycobiology*, **5**(6), 571-581.
 - 20) Morita, E., Tada, K., Chisaka, H., *et al.* (2001) Human parvovirus B19 induces cell cycle arrest at G(2) phase with accumulation of mitotic cyclins. *J. Virol.*, **75**(16), 7555-7563.
 - 21) Ozawa, K., Ayub, J., Kajigaya, S., Shimada, T. and Young, N. (1988) The gene encoding the nonstructural protein of B19 (human) parvovirus may be lethal in transfected cells. *Virology*, **62**(8), 2884-2889.
 - 22) Moffatt, S., Yaegashi, N., Tada, K., Tanaka, N. and Sugamura, K. (1998) Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells. *J. Virol.*, **72**(4), 3018-3028.
 - 23) Sparwasser, T., Miethke, T., Lipford, G., *et al.* (1997) Bacterial DNA causes septic shock. *Nature*, **386**(6623), 336-337.
 - 24) Dozmorov, I., Eisenbraun, M.D. and Lefkovits, I. (2000) Limiting dilution analysis: from frequencies to cellular interactions. *Immunol. Today*, **21**(1), 15-18.