

[別紙 1]

論文の内容の要旨

氏名 柳井 秀元

I型インターフェロン (interferon- α/β ; IFN- α/β)は、ウイルスをはじめ、種々の微生物による感染の初期に産生誘導される代表的なサイトカインの1つであり、自然免疫系において様々な IFN 誘導遺伝子を発現することにより抗ウイルス活性を発揮することが知られている(Biron 2001)。さらに、ウイルス感染時の樹状細胞の成熟に重要な役割を担っていることも示されており、cytotoxic T-lymphocyte (CTL) 応答の誘導やB細胞による抗体産生に寄与していることも報告されている(Iwasaki and Medzhitov 2004)。そのため、IFN- α/β は自然免疫応答の活性化のみならず、その後の適応免疫系の活性化を誘導する役割を担っている点でもその重要性は特筆すべきものがある。IFN の産生誘導に関しては、近年の病原体認識機構に関する研究の発展により(Akira and Takeda 2004; Iwasaki and Medzhitov 2004)、Toll-like receptor (TLR) 下流での IFN 誘導機構の解析が必要とされている。しかしながら、そのシグナル伝達経路はまだ十分には解明されていない。今回、TLR9サブファミリーである TLR7およびTLR9を介するシグナルに着目し、その受容体下流での IFN- α/β 遺伝子発現誘導の分子メカニズムの解明を目的として研究を進めた。とくに、ウイルス感染による IFN- α/β 遺伝子の発現誘導に必須因子として知られている IFN regulatory factor (IRF) -3 及び IRF-7 転写因子に焦点を合わせ、遺伝子欠損マウスを用いた *in vivo* での解析を含めて研究を進めた。また、近年、樹状細胞の亜集団として知られている形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell; pDC)が、TLR9 や TLR7 を介して IFN- α/β を高産生することが報告されており(Hochrein, Schlatter *et al.* 2004; Krug, Luker *et al.* 2004; Lund, Alexopoulou *et al.* 2004)、免疫応答での重要性が明らかになりつつある。このような背景のもとで今回の研究はこの pDC における IFN- α/β 高産生性のメカニズムの一端を明らかにすることにもつながった。

まず、TLR9サブファミリーである TLR7およびTLR9受容体下流の主要なアダプター分子である myeloid differentiation factor 88 (MyD88)と IRF 転写因子との関連性を中心としたシグナル伝達の素過程について解析を進めた。これらの分子の細胞内での局在を調べた結果、MyD88 と IRF-7 は細胞内で粒状構造を形成し、その局在が一致することが観察され、一方で、MyD88 と IRF-3 との共局在は認められなかった。また、免疫沈降の実験からも MyD88 と IRF-7 が共沈し、両者が会合することが示された。さらに MyD88 変異体を用いて、MyD88 の IRF-7 との会合に必要な領域を検討し、IRF-7 は MyD88 の death domain (DD)を介して会合することを明らかにした。次に、

MyD88によるIRF-7の活性化を検討する為、HeLa細胞にMyD88及びIRF-7を発現させ、TLR9のリガンドとして知られる、CpGモチーフを含むDNAの一つであるCpG-Aで刺激したところ、IRF-7の核移行が観察され、TLR9-MyD88依存的にIRF-7が活性化されることが示唆された。以上の結果から、MyD88-IRF-7経路を介した新しいIFN- α/β の誘導機構の存在が示唆され、この機構によってpDCで大量にIFN- α/β が誘導されていると考えられた。また、従来知られていたIFN- α/β 誘導機構と異なり、この機構にはIRF-3は関与しないことが予想された。これらのことをさらに明確にする為、次にIRF-7及びIRF-3遺伝子欠損マウス由来のpDCを用いて検討した。

野生型、IRF-3遺伝子欠損マウス及びIRF-7遺伝子欠損マウスに、TLR9、TLR7を介して認識されることが知られている、herpes simplex virus type-1 (HSV-1)及びvesicular stomatitis virus (VSV)を感染させ、脾臓からpDCを調製し、IFN- α/β の転写誘導についてRT-PCRにて検討した。その結果、IRF-7遺伝子欠損マウス由来のpDCにおいてのみIFN- α/β の転写誘導が著明に減弱し、一方で、IRF-3遺伝子欠損マウス由来のpDCにおいては野生型と変化ない誘導を示した。同様のことは、これら遺伝子欠損マウス由来のpDCを*in vitro*でCpG-A刺激した際にも認められた。さらに、ELISAによってCpG-A刺激時の産生量について検討した結果、IRF-7遺伝子欠損マウス由来のpDCにおいてのみ、著明な減弱が認められ、IRF-7がpDCでのIFN- α/β の誘導を担っていることがmRNAレベル、蛋白レベルにおいて示された。この時、MyD88遺伝子欠損マウス由来のpDCにおいてもCpG-A刺激時のIFN- α の産生量が著明に減弱しており、TLR9のシグナルにおいて、MyD88-IRF-7経路によりIFN- α/β が誘導されることが確認された。さらにこのことは、TLR7のリガンドとして知られているpoly(U)刺激においても同様であった。

IRF-7はIFN- α/β によって誘導され、誘導されたIRF-7によってさらにIFN- α/β が誘導されるpositive feedback機構の存在が、mouse embryonic fibroblast (MEF)の解析から示されていた。IFNAR1遺伝子欠損マウス及びIFN stimulated gene factor3 (ISGF3)の構成因子の一つであるIRF-9遺伝子欠損マウス由来のpDCをCpG-A刺激したところ、IFN- α の誘導が著明に減弱し、pDCにおいてもIRF-7を介するpositive feedback機構が機能していることが明らかとなった。

IRF-7はMyD88のDDを介して会合することが示され、このドメインにはIL-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4)も会合することが報告されている。そこでIRAK4のMyD88-IRF-7経路への関与を調べる為、IRAK4遺伝子欠損マウス由来のpDCを用いてIFN- α/β 誘導を検討したところ、IFN- α の誘導が著明に減弱し、MyD88-IRF-7経路へのIRAK4の関与が示された。また、MyD88下流で機能することが知られているtumor necrosis factor receptor-associated kinase 6 (TRAF6)もIRF-7と会合し、この経路に関与することが示唆された。

IRAK4及びTRAF6はNF- κ Bの活性化や炎症性サイトカインの誘導に関与すること

が報告されているが、*IRF-7* 遺伝子欠損樹状細胞における、TLR9 刺激時の NF- κ B、p38 及び JNK の活性化は正常で、IL-6、IL-12 などの炎症性サイトカインの産生にも異常は認められず、*IRF-7* は IFN- α/β の誘導のみに影響していることが示された。

MyD88-*IRF-7* 経路を介して産生される IFN- α/β の *in vivo* での重要性を明らかにすべく、まず HSV-1 感染に対する生存率及び血中への IFN- α の誘導について検討した。その結果、*IRF-3* 遺伝子欠損マウスは野生型と変化ない生存率、IFN- α の産生量を示す一方、*IRF-7* 遺伝子欠損マウスは HSV-1 感染に脆弱で、血中 IFN- α の産生量も著明に減弱していた。また、*MyD88* 遺伝子欠損マウスにおいては生存率、IFN- α の産生量は正常であった。これらのことから、HSV-1 感染時の血中 IFN- α の誘導は MyD88 非依存的であることが判明し、一方で、この MyD88 非依存経路による血中 IFN- α の誘導においても *IRF-7* は重要な役割を果たしていた。

次に、CpG-A をアジュバントとして用いた時の ovalbumin (OVA) に対する CD8⁺T 細胞の応答性について解析した。その結果、*IRF-7* 遺伝子欠損マウス及び *MyD88* 遺伝子欠損マウスにおいて、OVA 特異的な CD8⁺T 細胞の応答性が減弱し、野生型マウスから pDC を除いておくことによっても減弱した。*IRF-7* 遺伝子欠損マウス由来の pDC においては、他の炎症性サイトカインの産生等には異常がなかったことと併せて、これらの結果により、CpG-A をアジュバントとして用いた時の CD8⁺T 細胞の応答性には、pDC において MyD88 及び *IRF-7* が重要であり、恐らくこの経路により産生される IFN- α/β が重要である可能性が考えられた。

この研究の結果、TLR7 および TLR9 下流で MyD88-*IRF-7* 依存性の IFN 遺伝子誘導経路が見出された。TLR4 の下流での IFN 産生誘導が MyD88 非依存性であり、かつ *IRF-3* にも依存している一方で、今回見出した経路は、これらとは異なる新しい IFN 遺伝子誘導経路であると考えられる。*IRF-7* が MyD88 や TRAF6 と会合し、これらの分子依存的に活性化を受けたり、さらに、従来 MyD88 下流の NF- κ B の活性化に関わることが知られていた IRAK4 が *IRF-7* の活性化にも関与し、IFN 産生に必須であることが明らかとなった。おそらく TLR9、TLR7 直下において MyD88 をはじめとする IRAKs や TRAF6 を含む複合体に、*IRF-7* が MyD88 の DD ドメインを介して recruit されることによって、活性化を受け、IFN 産生誘導経路を分岐しているものと考えられる。本研究により見出された MyD88-*IRF-7* 経路によって誘導される IFN- α/β は、HSV-1 感染時の血中 IFN- α の誘導にはほとんど影響せず、血中 IFN- α は MyD88 非依存経路によって担われていることが示された。MyD88 依存、非依存どちらの経路による IFN- α/β の誘導にも *IRF-7* は重要な役割を果たしていることが明らかとなった。一方で、pDC において MyD88-*IRF-7* 経路により誘導される IFN- α/β は、OVA のような抗原特異的な CD8⁺T 細胞の活性化に重要であった。pDC が脾臓やリンパ節において T 細胞領域に存在していることを併せて考えると、局所において pDC によって IFN- α/β が誘導されることが重要で、MyD88-*IRF-7* 経路による IFN- α/β は、CD8⁺T 細胞の活性化など適応免

疫系において重要な役割を果たしているかもしれないということが考えられた。