

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏 名 柳井 秀元

本研究は形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid dendritic cell ; pDC)における、Toll 様受容体 (Toll-like receptor ; TLR)を介した I 型インターフェロン(interferon- α/β ; IFN- α/β)の誘導経路を明らかにするため、主に IFN regulatory factor (IRF)遺伝子欠損マウスを含む、種々の遺伝子欠損マウス由来の pDC を用いて TLR 刺激時の IFN 誘導について検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. 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を 293T 細胞を用いて解析し、免疫沈降の実験から MyD88 と IRF-7 が共沈し、両者が会合することを示した。さらに MyD88 変異体を用いた解析から、IRF-7 は MyD88 の death domain (DD)を介して会合していることを明らかにした。次に、HeLa 細胞に MyD88 及び IRF-7 を発現させ、TLR9 のリガンドである CpG モチーフを含む DNA である CpG-A 刺激による IRF-7 の核移行を観測し、TLR9-MyD88 依存的に IRF-7 が活性化されることが示された。
2. 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、herpes simplex virus type-1 (HSV-1)及び vesicular stomatitis virus (VSV)を感染させ、脾臓由来の 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ていることが示された。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ている。ELISA によって CpG-A 刺激時の IFN- α の産生量についても検討し、*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。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。また、*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 を用いた解析から、IFN- α の誘導が著明に減弱していることが示され、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を明らかにした。さらに、*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、IFN- α の誘導が著明に減弱し、MyD88-IRF-7 経路への IRAK4 の関与していることを示した。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。

3. MyD88-IRF-7 経路を介して産生される IFN- α/β の *in vivo* での役割について検討しており、HSV-1 感染に対する生存率及び血中への IFN- α の誘導について解析した結果、*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ることが明らかとなった。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することが明らかとなり、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 における MyD88 及び IRF-7 が重要であることが示された。

以上、本論文は TLR7 および TLR9 下流での MyD88-IRF-7 依存性 IFN 遺伝子誘導経路を明らかにした。本研究はこれまで未知であった、MyD88 依存性の IFN 誘導経路を明らかにしたものであり、TLR を介したシグナル伝達経路の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。