

論文の内容の要旨

論文題目 細胞質内 DNA 認識受容体としての RIG-I ファミリー分子の同定及び多機能分子 HMGB1 の免疫応答における役割

氏名 小柴 隆二

パターン認識受容体 (pattern recognition receptors; PRRs) は病原体を感知するセンサーであり、自然応答を惹起し、適応免疫への橋渡しをする重要な役割を担っている。PRRs は病原体特有の構造物である病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) を認識し、I 型インターフェロン (Interferon; IFN) や炎症性サイトカインの産生などを介し免疫応答を誘導する。PRRs はその局在様式から大きく分けて膜貫通型と細胞質型の二つのグループに分類される。前者としてはグラム陰性菌の細胞壁構成成分であるリポ多糖 (lipopolysaccharide; LPS) を認識する Toll 様受容体 (Toll-like receptor; TLR) 4をはじめとする TLRs があり、ウイルス、細菌、寄生虫など多様な病原体に由来する広範な PAMPs の認識に重要な役割を果たしている。後者としては細胞質内受容体である RIG-I (Retinoic acid-inducible gene-I)、MDA5 (melanoma differentiation associated protein-5)、DAI (DNA-dependent activator of IRFs) などが知られており、ウイルス感染など病原体感染により細胞質に放出された核酸を認識するのに重要であると考えられている。これまでに複数の核

酸認識受容体が明らかにされているが、細胞質内 DNA 認識受容体については不明な点が多かった。また、私たちの研究により HMGB タンパク質が様々な免疫原性核酸と結合し、核酸刺激時の免疫応答に必須な分子であることが明らかとなったが、HMGB タンパク質がどのように核酸を認識し、RIG-I や MDA5 などの核酸認識受容体の活性化に関わっているか、その詳細は不明である。そこで本研究では、DNA 認識受容体同定を目的として、これまで細胞質内 RNA 認識受容体として知られていた RIG-I 及び MDA5 の解析を、さらに、汎核酸認識受容体である HMGB1 (high mobility group box 1) タンパク質について、HMGB1 コンディショナルノックアウトマウス (*Hmgb1* cKO) を作製し、その生体内における役割を検討した。

まず、RIG-I および MDA5 が細胞質内に暴露された DNA の応答への関与を検討したところ、RIG-I または MDA5 を発現させた細胞では DNA 刺激によって I 型 IFN が顕著に誘導されることが分かった。この結果と一致して、*Rig-i* 遺伝子欠損マウス胎児線維芽細胞を用いて DNA 刺激したところ、I 型 IFN の誘導が減弱することが判明した。しかし、そのときのインターロイキン (Interleukin; IL) -6 などのサイトカインの誘導に際を認められず、RIG-I/MDA5 が DNA 刺激における I 型 IFN の誘導に特異的に関与している一方で、IFN 以外のサイトカイン誘導にはほとんど関与しないことが明らかとなった。次に、DNA 刺激による転写因子である IRF3 および NF- κ B の活性における RIG-I の役割について検討を行った。その結果、I 型 IFN 誘導に重要とされる IRF3 の DNA 刺激による活性化は *Rig-i* 遺伝子欠損細胞で顕著に減弱していた。またこのとき、様々なサイトカインの誘導に重要とされる NF- κ B の活性化はほぼ正常に誘導されており、DNA 刺激による I 型 IFN と他のサイトカインの選択的な誘導の違いと一致する結果であった。さらに、リコンビナント RIG-I タンパク質を精製し、DNA の結合をプルダウンアッセイにより検討したところ、RNA のみならず、免疫原をもつ DNA とも直接結合することが明らかとなった。

HMGB1 は核酸認識以外にも、細胞の分化、炎症との関わりが示唆されていた。そこで、本研究で

はまず、Cre-エストロゲン受容体 (Cre-ER^{T2}) マウスと交配し、全身性 *Hmgb1* cKO マウスを作製した。これまでのコンベンショナルな *Hmgb1*^{-/-}マウスは生後早期の致死性を示していたが、全身性 *Hmgb1* cKO には致死性、外見における異常を示さず、体重および免疫担当細胞の細胞集団においてもコントロールのマウスと差異は確認されなかった。また、HMGB1 は B 細胞の分化に重要であることが示された。また、HMGB1 は TCR や抗体などの遺伝子再編成への関与が報告されていることから、T 細胞特異的または B 細胞特異的な *Hmgb1* cKO マウス作製した。T 細胞特異的な *Hmgb1* 欠損マウスでは胸腺細胞、脾細胞における T 細胞群の割合は正常であった。一方で、B 細胞特異的な *Hmgb1* 欠損マウスでは脾臓が明らかに小さく、また、脾細胞における B 細胞群の細胞数について顕著な減弱が見られた。さらに、ミエロイド系細胞において *Hmgb1* を欠失したマウスにおいては、LPS 誘導性ショックに対し脆弱性を示すことが明らかとなった。

本研究における解析から、細胞質内 DNA 認識受容体について、その一端を明らかにした。また、*Hmgb1* cKO マウスを用いることで、多機能分子である HMGB1 の生理的な役割について解析することが可能となり、HMGB1 の機能について、新知見を得ることができた。HMGB1 多彩な機能を有する分子であり、核酸認識受容体、自己免疫疾患や虚血・再還流などの炎症の病態、さらにはがん細胞の増殖などにも密接な関連があることが示唆されている。*Hmgb1* cKO マウスを用いて、今後、これらの機能・病態についての検討により、自己免疫疾患や敗血症などの治療応用に役立つことが期待される。