

審査の結果の要旨

氏名 小柴隆二

本研究は自然免疫応答における細胞質内DNA認識受容体の同定を目的とし、細胞質内に曝露されたDNAによる免疫応答において、これまで細胞質内RNA認識受容体と報告されていたRIG-I/MDA5の関与について解析を試みたものである。さらに、様々な免疫応答に重要とされているHMGB1について、HMGB1コンディショナル欠損マウスを用い、生体内におけるHMGB1の役割の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. I型IFN受容体欠損由来のマウス胎児繊維芽細胞 (MEFs) にRIG-IもしくはMDA5を過剰発現することで、DNA刺激におけるI型IFN遺伝子の誘導がコントロールの細胞と比較して増強した。また、RIG-I遺伝子欠損MEFsを用いた同様の解析の結果では、RIG-Iを欠損することでI型IFN遺伝子の誘導が減弱し、さらにRIG-I遺伝子欠損MEFsに対してsiRNA法によりMDA5の発現を低下することでI型IFN遺伝子の誘導がより減弱した。一方で、RANTESやIL-6などのサイトカインmRNAの発現誘導は、過剰発現細胞や欠損細胞の両方において野生型とほぼ同じ挙動を示した。RIG-IやMDA5は、細胞質内DNA刺激においてI型IFNを選択的に誘導する細胞質内DNA認識受容体として機能しうることが示された。
2. siRNA法によりRIG-IまたはMDA5の発現を低下したヒト由来の細胞株であるHela細胞にDNA刺激を行った結果、コントロールの細胞と比較してI型IFN遺伝子の誘導が減弱される一方で、他のサイトカイン遺伝子の誘導に差が認められず、ヒト由来の細胞においてもマウス由来の細胞における検討と同様の結果を示した。
3. I型IFNの誘導に重要である転写因子IRF3のDNA刺激時における活性化をIRF3のリン酸化を指標にして検討した結果、その活性化はコントロール細胞と比較してRIG-I欠損MEFsにおいて減弱した。一方で様々なサイトカインの誘導に重要なNF- $\kappa$ Bは、 $\kappa$ B配列を有するDNAに対するgel shift assayを行ったところ、RIG-I欠損細胞におけるDNA刺激によるNF- $\kappa$ Bの活性化は、コントロール細胞と同様の挙動を示した。
4. 精製したGSTtag融合RIG-Iタンパク質を用いてB-DNAによるプルダウンアッセイを行ったところ、RIG-IがB-DNAに結合することが示された。また、この結合は様々な核酸を用いることで阻害され、RIG-IがRNAに限らず様々な種類のDNAに結合することが示された。

5. *Hmgbl*遺伝子の近傍に2つの*loxP*配列を有する (*Hmgbl* flox) マウスを2ライン作製した。さらにエストロゲンCre (CreER<sup>T2</sup>) マウスと交配して得られたマウスにタモキシフェンを投与することで、誘導的に様々な臓器や細胞でHMGB1が欠失されることが示された。またこのマウスにおいて外見、体重や各細胞群の細胞数に異常は確認されなかった。
6. *Hmgbl* floxマウスとLck-Creマウスとの交配によりT細胞特異的にHMGB1を欠失したマウスを得た。そのマウス由来の胸腺および脾臓細胞群を解析したところ、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T細胞の割合に異常は確認されなかった。また、mb. 1-Creマウスとの交配によりB細胞特異的にHMGB1を欠失したマウスでは、野生型と比べて脾臓の大きさが顕著に小さくなっていた。さらに、その脾臓における細胞群の解析を行ったところ、B細胞の数が顕著に減少することが示された。
7. *Hmgbl* floxマウスとLys-Creマウスとの交配によりミエロイド系細胞においてHMGB1を欠失したマウスを得た。そのマウスはマウス敗血症モデルであるLPS誘導性ショックに対して脆弱性を示し、LPS投与による血中のTNF- $\alpha$ の産生は、コントロール群に比べて亢進していた。また、HMGB1を欠失した腹腔マクロファージではLPS刺激により誘導されるTNF- $\alpha$  mRNAは、HMGB1を発現しているマクロファージに比べて増強した。
8. *Hmgbl* floxマウスとLys-Creマウスとの交配により得られたマウスより、腹腔およびM-CSF分化誘導マクロファージを調整し、CpG-B DNAによる刺激を行った。その結果、HMGB1を欠損したマクロファージにおいて、TNF- $\alpha$ およびIL-6 mRNAの誘導がコントロール細胞と比較して増強することが示された。

以上、本論文は、細胞質内DNAによる自然免疫応答の解析から、これまでに細胞質内RNA認識受容体と考えられていたRIG-IやMDA5が、細胞質内DNA認識受容体としても機能することを明らかとなった。またDNA刺激におけるI型IFN以外のサイトカインの誘導に関与する他の受容体の存在が示唆され、さらなる解析が期待される。さらに、*Hmgbl* 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、新知見が得られた。今後、HMGB1の多様な機能・病態についての検討より、自己免疫疾患や敗血症などの病態の理解が進むことが期待される。上記一連の結果より、本研究は学位の授与に値するものと考えられる。