

論文の内容の要旨

論文題目 Toll 様受容体 3 のシグナル経路と抗ウイルス応答の役割

大澤 朋子

Toll 様受容体 (Toll-like Receptors : TLRs) は病原微生物特有のパターン構造 (Pathogen-associated molecular patterns : PAMPs) を認識し、炎症性サイトカインや I 型インターフェロン (IFN) の産生および樹状細胞 (Dendritic Cells:DC) の成熟を誘導し、自然免疫のみならず、その後の獲得免疫の誘導においても極めて重要な役割を果たすパターン認識受容体 (Pattern Recognition Receptor : PRRs) である。これまでにヒトでは 10 種類の TLR ファミリーが同定され、それぞれが特異的な病原体の PAMPs を認識することが知られており、下流のシグナル経路を介して、NF- κ B (Nuclear factor of κ B) や IRF (Interferon regulatory factor) などの転写因子が活性化し、炎症性サイトカインや I 型 IFN 遺伝子の転写を誘導することが分かっている。

TLR ファミリーのなかでも、TLR3 はウイルス特有の二本鎖 RNA (double -stranded RNA : ds RNA) を認識し I 型 IFN を誘導するという報告もあることから、抗ウイルス応答への関与が示唆されていたものの、そのシグナル経路や免疫応答における生理的な役割については不明な部分が多い。一方、dsRNA を認識して活性化される PRR として細胞質内受容体である RIG-I (retinoic acid-inducible protein I) /MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5) が同定され、これらの分子がもつ RNA ヘリカーゼドメインが細胞質内で dsRNA を認識し、I 型 IFN 等を誘導することが報告された。特に dsRNA 認識による I 型 IFN 遺伝子の誘導に関しては多くの細胞で TLR3 よりもむしろ RIG-I/MDA5 経路の関与が大きいという認識が広がっている。そのため、従来の dsRNA をリガンドとして行われてきた TLR3 経路の解析は、実はこれら dsRNA 認識受容体による反応の総和をみていたものであり、TLR3 特有の現象ではなかった可能性が考えられる。さらに、これまでに *TLR3* 遺伝子欠損 (TLR3 KO) マウス

を用いて個体レベルでの TLR3 の重要性を明確に示した報告は少なく、同経路特異的な機能や生体防御における役割には未知の部分が多く残されている。

一方で、TLR3 の発現は DC やマクロファージなど特定の細胞に限局しており、また、その他の細胞における構成的な発現は I 型 IFN やウイルス感染により誘導されない限り低いことが知られており、このことも TLR3 特異的なシグナル経路の探索を困難にしている要因の一つである。

本研究では、TLR3 の特異的な機能を解明するため、TLR3 遺伝子トランスジェニック (TLR3 Tg) マウスを作製した。TLR3 の発現を人為的に高めることで、増強された同経路に特異的なシグナル経路の解析を行うと共に、TLR3 欠損マウスと比較検討することによって、TLR3 が抗ウイルス応答に果たす役割の解明を行うことを試みた。

まず、TLR3 のウイルス感染防御に果たす役割を検証するため、脳心筋炎ウイルス (EMCV) とコクサッキーウイルス B (CVB) の感染実験を行った。その結果、両ウイルスに対し、野生型マウスに比べ TLR3 Tg マウスは抵抗性を、TLR3 欠損マウスは感受性を示した。そこで、TLR3 の抗ウイルス応答機序を解析するため、TLR3 Tg マウス、野生型マウスおよび TLR3 欠損マウスの CVB 感染後の心臓と各系統マウスの腹腔内マクロファージを、dsRNA の合成核酸である poly I : C (Polyinosinic : polycytidylic acid) により刺激し、誘導遺伝子群を解析した。その結果、炎症性サイトカインおよびケモカイン産生が野生型と比較し顕著に増強していたのに対し、I 型 IFN の産生は野生型と同等であり、IFN 誘導遺伝子群の発現増強もみられなかった。

また、TLR3 Tg マウスにおけるシグナル経路を解明するため、TLR シグナルのアダプター分子である MyD88 (Myeloid differentiation primary response protein 88) および TRIF (Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- β) を TLR3 Tg マウスにから欠損させたマウスを解析した。その結果、MyD88 欠損/TLR3 Tg マウス由来マクロファージにおいて、炎症性サイトカインの顕著な減弱が確認された。

これらの結果から、TLR3 は EMCV および CVB 感染に対して重要な役割を担うことが示唆されただけでなく、TLR3 は I 型 IFN 以外の遺伝子誘導により抗ウイルス応答を引き起こしていることも示唆された。

そこで、I 型 IFN による抗ウイルス応答を排除した TLR3 の役割を解析するため、I 型 IFN 受容体遺伝子欠損 (IFN AR1 KO) /TLR3 Tg (IFNAR1 KO /TLR3 Tg) マウスを作製し、CVB の感染実験を行った。その結果、IFNAR1 KO /TLR3 Tg マウスでは CVB に対して抵抗性を示すことを見出した。このことから、TLR3 シグナルが I 型 IFN に依存しない機構で強力な抗ウイルス応答を誘導できることが示された。さらに、同マウスの CVB 感染時の肝臓を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、炎症性サイトカインに加え、ケモカインおよび IFN- γ とその誘導遺伝子群の誘導が顕著に増強していた。

そこで、ウイルス感染防御において TLR3 の下流で産生される IFN- γ の重要性を検討するため、IFNAR1 KO /TLR3 Tg マウスに IFN- γ 中和抗体を接種し、CVB 感染への感受性を検討し

た。その結果、コントロール抗体接種群に比べて、IFN- γ 中和抗体接種群で CVB 感染への著しい感受性の増加がみられ、CVB 感染における IFN- γ の重要性が強く示唆された。

最後に、IFNAR1 KO /TLR3 Tg マウス肝臓において IFN- γ 産生細胞の探索を行ったところ、CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞および NK 細胞では、IFNAR1 KO マウス由来細胞と比較して IFN- γ 産生に著変がなく、CD11b 陽性 (CD11b⁺) 細胞で顕著に IFN- γ の産生が増強していることが分かった。

以上の研究結果から、TLR3 の発現を人為的に増強させた TLR3 Tg マウスを用いることで、今まで明らかにされていなかった TLR3 の抗ウイルス免疫応答における役割の一部を解明することが出来た。すなわち、TLR3 は I 型 IFN の産生より、むしろ炎症性サイトカインおよびケモカインの産生に重要であり、ケモカインにより局所に集簇した CD11b⁺細胞が IFN- γ を誘導することが CVB 感染防御に重要であることが証明された。今回得られた一連の結果は、TLR3-IFN- γ 経路の存在を明らかにし、その経路が感染防御に果たす重要な機能を示したことで、自然免疫系の理解に新たな展開をもたらしたものと考えられる。