

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 鈴木 孝 幸

学位論文題名

細胞質内ウイルス DNA への細胞特異的な自然免疫応答とウイルスによるその抑制 (Cell type-specific innate immune response to cytoplasmic viral DNA and its suppression by viral proteins)

【背景と目的】

自然免疫応答は獲得免疫系の活性化に必須であり、ウイルス感染初期には I 型インターフェロンや炎症性サイトカインの産生を誘導し、ウイルスを抑制する重要な働きがある。インフルエンザウイルスや C 型肝炎ウイルス等の RNA をゲノムにもつウイルスに対する自然免疫応答機構は、その詳細な分子機構が明らかとなっているが、B 型肝炎ウイルス (Hepatitis B virus: HBV) やヘルペスウイルス等の DNA をゲノムにもつウイルスに対するメカニズムについては不明なところが多い。

細胞質内のウイルス DNA を認識するセンサー分子として、これまで DAI、IFI16、Mre11、DNA-PK、cGAS 等の複数の分子が報告されている。これらは、細胞内の小胞体上に存在する STING 分子を介して I 型インターフェロンの産生を誘導する。一方で、ウイルス RNA を認識するセンサー分子である RIG-I 分子がウイルス DNA をも認識し、ミトコンドリア外膜上の IPS-1 分子を介して I 型インターフェロン産生を誘導するという報告もある。この STING や IPS-1 分子は共に TBK1 と呼ばれるリン酸化酵素を活性化する。TBK1 は活性化すると自己リン酸化し、さらに転写因子の IRF-3 をリン酸化することで I 型インターフェロン産生を誘導する。本研究では、まず、リン酸化した TBK1 に対する抗体をプローブとして、ウイルス DNA 刺激によるリン酸化 TBK1 の細胞内局在を追跡した。共焦点顕微鏡などでリン酸化 TBK1 とミトコンドリア上の IPS-1 分子、小胞体上の STING 分子との共局在を細胞ごとに調べた。リン酸化 TBK1 の局在はヒト、マウスの各種臓器由来の細胞株を用いて解析し、更にツパイの細胞株を加えて比較解析した。これにより、ヒトの細胞株ではリン酸化 TBK1 は主にミトコンドリア上に存在し、ヒト以外の哺乳類ではミトコンドリアには存在せず、STING と共局在した。これは、ヒトとヒト以外の哺乳類では DNA に対する自然免疫応答のメカニズムが異なることを示唆している。

多くのウイルスは、ヒトの自然免疫応答を制御して増殖する。DNA ウイルスである HBV は数十年に亘りヒトの肝細胞に感染し、宿主の自然免疫応答を抑制する。このメカニズムの解明に取り組み今回、HBV の Pol タンパク質が宿主の RIG-I 分子の活性化を抑制するという新たなメカニズムを発見した。

【材料と方法】

ヒト細胞株として、HepG2 細胞、THP-1 細胞、HeLa 細胞を用い、マウス細胞として RAW264.7 細胞、マウス肝細胞、L929 細胞を用いた。またツパイの肺由来線維芽細胞である T-23 細胞を用いた。DNA による刺激として、サケのゲノム DNA (Invitrogen) と PCR により増幅させた HBV ゲノム DNA 断片を用いた。DNA ウイルスとして単純ヘルペス I

型ウイルス (Herpes simplex virus type 1: HSV-1)の K 株、HBV の C 株を用いた。リン酸化した TBK1 に対する抗体として市販の抗 p-TBK1 抗体を用い、共焦点レーザー顕微鏡を用い細胞内局在を観察した。遺伝子の発現は Real Time PCR Step-One System (ABI)を用い定量した。

【結果】

DNA に対する自然免疫応答を調べるために、ヒト細胞株である HeLa 細胞、HepG2 細胞、THP-1 細胞にウイルス由来の DNA やサケゲノム DNA を Lipofectamine2000 試薬を用いてトランスフェクションし刺激したところ、リン酸化した TBK1 (p-TBK1)は、主にミトコンドリア上に局在し、ミトコンドリア上の IPS-1 分子と共局在した。一方で、同様の実験をマウス細胞株である RAW264.7 細胞、L929 細胞、マウス肝細胞やツパイの細胞株である T-23 細胞で実験を行ったところ、p-TBK1 はミトコンドリア上には存在せず、主に STING 分子と共局在した。このように、ヒトとヒト以外の哺乳類の細胞では p-TBK1 の細胞内局在が明確に異なることから、異なるメカニズムが存在することが示唆された。

このようなヒトとヒト以外の細胞での p-TBK1 の細胞内局在の違いは、DNA ウイルスである HSV-1 感染時にも観察されたことから、ウイルス感染に対する自然免疫応答もヒトとヒト以外の哺乳類とでは、異なる機構が働くことが示唆された。

HSV-1 と異なり、DNA ウイルスである HBV の全長ゲノムをコードしたベクターを細胞内に発現させ、HBV 粒子を作ると、I 型インターフェロンは殆ど産生されなかった。これは、HBV のタンパク質が宿主の自然免疫応答を抑制しているのではないかと考え調べたところ、HBV の Pol タンパク質を過剰発現させると、DNA による I 型インターフェロン産生が抑制されることを発見した。さらに、その詳細なメカニズムを調べたところ、細胞質内の RNA ヘリケースである RIG-I 分子が Pol タンパク質により抑制されていることを発見した。

【考察】

これまで、DNA に対する自然免疫応答については、複数の相反するモデルが提唱されていた。今回、DNA に対する自然免疫応答に必須な TBK1 のリン酸化を指標として、その細胞内局在により、ヒトとヒト以外の哺乳類では p-TBK1 の細胞内局在が明確に異なることを明らかにした。特にヒトの細胞では p-TBK1 は IPS-1 と共局在したことから、RIG-I 経路が主に働いていると考えられる。一方で、マウス細胞等では p-TBK1 は STING と共局在したことから、cGAS を始めとする DNA センサー分子が主に働いていると考えられる。このように、これまで相反する報告が複数存在したことは、生物種ごとに、DNA に対する自然免疫応答のメカニズムが異なる為である可能性が考えられ、今後、種ごとの自然免疫応答を詳細に解明する必要があると考えられる。

本研究から、ヒトの細胞では DNA に対する自然免疫応答では主に RIG-I 経路が働くことが示唆されたが、HBV の Pol タンパク質はこの RIG-I を特異的に阻害したことから、ヒトに於ける DNA に対する自然免疫応答に於いては RIG-I 異存的な経路が重要であることが示唆された。

【結論】

p-TBK1 の細胞内局在の違いから、ヒトとヒト以外の哺乳類では DNA に対する自然免疫応答の分子メカニズムが異なることが示唆され、特にヒトでは RIG-I 異存的経路が重要であることが示唆された。一方で、DNA ウイルスである HBV は、この RIG-I を抑制する能力を有することが示唆された。