



Title	Interleukin-32はウイルス感染時の自然免疫経路を活性化する [全文の要約]
Author(s)	郷, 俊寛
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第13441号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/74344">http://hdl.handle.net/2115/74344</a>
Type	theses (doctoral - abstract of entire text)
Note	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。; 配架番号 : 2455
Note(URL)	<a href="https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/">https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/</a>
File Information	Toshihiro_Goh_summary.pdf



[Instructions for use](#)

学 位 論 文 (要約)

Interleukin-32 はウイルス感染時の自然免疫経路を活性化する  
(IL-32 activates innate immune pathway in virus infection)

2019年3月

北海道大学

郷 俊寛

Toshihiro Goh



学 位 論 文 (要約)

Interleukin-32 はウイルス感染時の自然免疫経路を活性化する  
(IL-32 activates innate immune pathway in virus infection)

2019年3月

北海道大学

郷 俊寛

Toshihiro Goh

【背景と目的】Interlukin-32 (IL-32) は6種類のアリソフォーム (IL-32  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$ ,  $\epsilon$ ) を有し、炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  を誘導する因子として発見され、これまでにリウマチ性関節炎や潰瘍性大腸炎といった慢性炎症性疾患に関与していることが知られていた。しかし、IL-32 の自然免疫への関連性については未だ十分に解明されていない。自然免疫はウイルス感染時に宿主の生体防御において非常に重要な役割を担う。ウイルスが侵入した宿主細胞では初めに、RIG-I (retinoic acid-inducible gene-1) がウイルス RNA を、また、cGAS (cyclic GMP-AMP Synthase) がウイルス DNA を認識する。そして、下流のアダプターの分子を介してキナーゼ TBK1 (TANK-binding kinase 1) が活性化され、転写因子 IRF-3 (interferon regulatory transcription factor-3) 依存的にウイルスの排除に重要な I, III 型 interferons (IFNs) が産生される。本研究ではウイルス感染時における自然免疫応答に対する IL-32 の関与について検証した。

【方法と材料】 Human embryonic kidney 293T (HEK293T) cells, primary human hepatocytes (PHHs), Human embryonic lung fibroblasts (HELFL), または、CRISPR-Cas9 を利用して作製した IL-32 欠損 HEK293T を用いて実験を行なった。遺伝子ノックダウンするために small interfering RNA (siRNA) を各細胞に導入した。また、タンパク質の過剰発現には、各々の目的遺伝子の cDNA を組み込んだプラスミドベクターを使用した。siRNA, プラスミドベクター導入後 48 時間の細胞に感染実験刺激実験を行なった。感染実験では Vesicular stomatitis virus (VSV), herpes simplex virus-1 (HSV-1), encephalomyocarditis virus (EMCV), hepatitis B virus (HBV) を用い、核酸リガンドとして主に 5'-triphosphate RNA (3pRNA), herring testes-DNA (HT-DNA) を使用した。ウイルス量はプラークアッセイ、定量リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) を用いた。タンパク質の検出と会合にはウェスタンブロット法 (WB) と免疫沈降を行い、タンパク質量の測定に ELISA を用いた。タンパク質の細胞内局在には免疫染色で解析した。mRNA の定量には qRT-PCR を用いた。mRNA の転写活性にはルシフェラーゼアッセイを用いた。

【結果】初めに IL-32 が誘導されるメカニズムを検証した。HEK293T 細胞に 3pRNA 刺激をすると、IL-32 の発現が認められ、さらに、転写因子 nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) の複合体の一つである RelA をノックダウンした HEK293T 細胞では 3pRNA 刺激後に IL-32 の発現が低下した。次に IL-32 が抗ウイルス応答に関与しているかを検証した。IL-32 をノックダウンした細胞に VSV, EMCV, HSV-1, HBV 感染させると control と比較し I 型, III 型 IFNs の産生誘導が低下し、この結果と一致してウイルス量の増加が認められた。また、IL-32 欠損 HEK293T 細胞でも VSV 感染時に wild type (WT) の HEK293T 細胞と比較し I 型 IFNs の産生誘導の低下が認められた。さらに、IL-32 の各アリソタイプを IL-32 欠損 HEK293T 細胞に導入すると全ての細胞で control と比較し I 型 IFNs が増加

し、ウイルス量が低下した。そこで IL-32 が自然免疫経路に関与するかを次に検証した。IL-32 をノックダウンした細胞に RIG-I, HT-DNA を刺激すると control と比較し I 型 IFNs の産生が低下した。また、IL-32 欠損細胞に TBK1 を過剰発現させると I 型 IFNs の転写活性が低下したが、活性化 IRF-3 を過剰発現させても I 型 IFN の転写活性は低下しなかった。さらに、3pRNA 刺激した IL-32 欠損細胞では WT と比較し、TBK1 のリン酸化は変化しなかったが、IRF-3 のリン酸化が低下した。IL-32 が TBK1 を介した IRF-3 のリン酸化に関与していることが示唆されたため、IL-32 の TBK1 または IRF-3 への結合性について検証した。TBK1, IRF-3 を発現させた IL-32 欠損細胞に IL-32 $\gamma$  を過剰発現させ免疫沈降を行うと IRF-3 と IL-32 の会合が認められたが、TBK1 と IL-32 との会合は認められなかった。また、recombinant IL-32 $\gamma$  (IL-32 $\gamma$ ) を rIRF-3 または rTBK1 とともに混和し免疫沈降すると rIL-32 の rIRF-3 との会合が認められたが、rIL-32 の rTBK1 との会合は認められなかった。さらに、免疫染色で細胞内局在を確認したところ IL-32 と IRF-3 の共局在が細胞質で認められた。IL-32 $\gamma$  の C 末領域 (C-IL-32 $\gamma$ ) と N 末領域 (N-IL-32 $\gamma$ ) の変異体を作成し IRF-3 との会合性を免疫沈降にて検証したところ、C-IL-32 $\gamma$  と IRF-3 との会合が認められたが、N-IL-32 $\gamma$  と IRF-3 との会合は認められなかった。そこで、実際の抗ウイルス応答における IL-32 と IRF-3 の会合の重要性を検証した。IL-32 欠損細胞に C-IL-32 $\gamma$ , N-IL-32 $\gamma$  を発現させウイルス感染をしたところ、control と比較し、C-IL-32 $\gamma$  を発現した細胞で I 型 IFNs の産生誘導の増加が認められ、この結果に一致しウイルス量が低下した。さらに、IL-32 欠損細胞は 3pRNA 刺激後に、免疫沈降すると WT と比較し TBK1 への IRF-3 の会合が低下するが、C-IL-32 $\gamma$  を導入した IL-32 欠損細胞では会合が増加し、N-IL-32 $\gamma$  を導入した細胞では会合の増加は認められなかった。

【考察】本研究では IL-32 が自然免疫活性時に IRF-3 と結合し、IRF-3 と TBK1 の会合を促進させることで IFN 産生を正に制御することが明らかになったが、TBK1 と IRF-3 の会合を IL-32 がどのように促進させているかについての詳細な分子機構については十分に解明できていない。核酸刺激時に TBK1 が微小管を介して IRF-3 の複合体を形成するという報告があるため、IL-32 と微小管の関連性を検証することが TBK1 と IRF-3 の会合を促進するメカニズム解明につながる可能性がある。IFN の過剰な産生は、RA やシェーグレン症候群などの自己免疫性疾患に関与していることが知られている。興味深いことに、これまでの研究で IL-32 のプロモーター領域 (rs4786370) に single nucleotide polymorphism (SNP) を有する RA 患者で IL-32 が高発現している報告がある。本研究の結果より考えると、過剰な IL-32 の発現は TBK1-IRF-3 の会合を促し通常よりも多く IFN 産生することが予想される。過剰な IFN の分泌が原因となる自己免疫性疾患に IL-32 が寄与している可能性があり、これまで十分に解明されていない病態の理解に貢献でき

るかもしれない。一方, IRF-3 が原因となる癌の発現や増殖, または炎症性疾患がこれまでに多く報告されており, IRF-3 関連疾患に対する IL-32 の関与について今後検証する必要がある。

**【結論】**IL-32 がウイルス感染時に活性化される自然免疫経路において IFNs を正に制御することが明らかになった。本研究は今後, ウイルス感染の治療の一助になることが期待できる。