HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	核酸認識自然免疫レセプターToll-like receptor 3 により認識されるRNA構造の同定［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	立松, 恵
Description	配架番号：2060
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11067号
Issue Date	2013-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53798
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Megumi_Tatematsu_abstract.pdf, 「論文内容の要旨」

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　立松　恵

学 位 論 文 題 名

核酸認識自然免疫レセプターToll-like receptor 3 により認識される RNA 構造の同定

【背景と目的】

自然免疫系の核酸認識レセプターである Toll-like receptor (TLR) 3 は、(+)鎖 RNA ウイルスや DNA ウイルスの複製中間体として生じる二本鎖 RNA (dsRNA) を認識すると考えられている。TLR3 が活性化すると、アダプター分子 TICAM-1/TRIF を介したシグナル伝達により、I 型インターフェロン (IFN) や炎症性サイトカインの産生が誘導される。

TLR3-TICAM-1 経路によるウイルス感染制御について、TLR3 ノックアウト(KO) マウスを利用した研究から、ピコルナウイルス科に属するウイルスやウエストナイルウイルスの他、(-)鎖 RNA ウイルスであるインフルエンザウイルスやフレボウイルスに対する応答に関わることがわかっている。(-)鎖 RNA ウイルスはほとんど dsRNA を作らないため、TLR3 が検知するウイルス成分は dsRNA のみではない可能性が考えられる。また、ネクローシス細胞由来の RNA や mRNA が TLR3 を活性化するという報告もあり、TLR3 が認識する RNA 構造については不明な点が残されている。一本鎖 RNA (ssRNA) は、塩基対形成により二本鎖構造を含む二次構造をとることが知られており、ssRNA の部分構造が TLR3 により認識される可能性が考えられる。

TLR3-TICAM-1 経路は、自然免疫応答としてのサイトカイン産生の他、クロスプライミングによる細胞傷害性 T 細胞の活性化や NK 細胞の活性化を引き起こすことで獲得免疫系への橋渡しとしての機能も有する。さらに、クロマチンのリモデリングを促進するという報告もあり、TLR3 を介したシグナル伝達は、生体内において多様な応答を担う経路である。したがって、この経路の活性制御は、感染症、癌免疫、再生医療といった幅広い分野への応用の可能性をもっている。

本研究では、ウイルス由来の RNA や in vitro 転写により作製した様々な RNA による TLR3 依存的な応答について調べ、TLR3 を活性化することのできる RNA 構造の同定を目指した。

【材料と方法】

ポリオウイルス感染細胞から抽出した RNA による TLR3 依存的なサイトカイン産生について、野生型および TLR3 KO マウスの脾臓より MACS にて分取した CD11c 陽性樹状細胞において観察した。また、RNase III や RNase A を用いた分解により RNA 構造について検討した。

ポリオウイルスゲノム cDNA を鋳型として in vitro 転写により作製した RNA (PV-RNA) による TLR3 活性化について、TLR3 を強制発現させた HEK293 細胞における IFN-βプロモータの活性化を指標としてレポーターアッセイにより検討した。その他、ヒト線維芽細胞株 MRC-5 や子宮頸癌細胞 HeLa ではサイトカイン mRNA 発現誘導を調べ、マウスの脾臓由来の CD11c 陽性樹状細胞および CD11c 陽性 CD8α陽性樹状細胞や、骨髄より誘導したマクロファージにおいて、サイトカイン産生量を測定した。

in vitro 転写 RNA の細胞内への取り込みについては、HeLa 細胞およびマウス脾臓より分取した CD11c 陽性 CD8α陽性樹状細胞において顕微鏡観察した。dsRNA の取り込みは

CpG-ODN と共通のレセプターを介して、Raftlin 依存的に起こることから、PV-RNA の細胞内への取り込みが、dsRNA と同様の機構を利用するかについて調べるため、ODN2006 の前処理による阻害や Raftlin ノックダウンの影響を、HEK293 細胞におけるプロモーターアッセイで評価した。

RNA の二次構造について、mfold、RNAfold、centroidfold の三種類のソフトウエアを利用して予測した。

【結果】

ポリオウイルス感染細胞由来の RNA は、マウス脾臓より分取した樹状細胞において、TLR3 依存的にサイトカインを産生した。この RNA は、dsRNA を分解する RNase III や、ssRNA を分解する RNase A によりそれぞれ分解を受けたことから、dsRNA と ssRNA を含み、特に、部分的な dsRNA 構造をもつ ssRNA に富んでいることがわかった。

ポリオウイルスゲノム配列を基に in vitro 転写で作製した PV-RNA の中には、ssRNA であっても HEK293 細胞において TLR3 依存的に IFN-βプロモータの活性化を引き起こすものがあった。活性のある ssRNA は、血清を含む培地中でも安定に構造を維持していた。ヒト細胞株やマウス免疫細胞における TLR3 経路の活性化も調べたところ、プロモーターアッセイで活性がみられた PV-RNA による TLR3 依存的な応答がみられた。ただし、マウス細胞においてはプロモーターアッセイで活性の見られなかった RNA でもやや弱いながらも応答が観測された。

PV-RNA の中で TLR3 活性化能が最も強い PV5 について、ソフトウエア解析により二次構造を予測したところ、二本鎖構造であるステムが連なる部分があった。二次構造に基づいて PV5 の中でいくつかの分枝となる領域を削った PV5 欠損体を作製して、それらの欠損による TLR3 活性化への影響を調べた。IFN-βプロモーターアッセイやマウス細胞におけるサイトカイン産生の測定の結果、ステムの連なる中心構造を残していても、いくつかの PV5 欠損体では TLR3 の活性化能を失った。この活性のない欠損体は、血清を含む培地中では分解されていた。

PV5 は、HeLa 細胞において、エンドソームへ取り込まれて TLR3 と共局在した。また、マウス脾臓由来の CD11c 陽性 CD8α陽性樹状細胞においても細胞内へ入って TLR3 と共局在する様子が観察された。

PV5 による IFN-βプロモータの活性化は、Raftlin ノックダウンにより減弱し、ODN2006 の前処理により阻害された。

【考察】

ポリオウイルス感染細胞内には TLR3 を活性化する RNA が存在し、その RNA は必ずしも dsRNA ではないことが分かった。また、in vitro 転写により作製した PV-RNA の中には ssRNA であっても TLR3 を活性化するものがあった。ssRNA による TLR3 活性化能は ssRNA の安定性と関連していたことから、部分的な塩基対形成により安定性を維持している ssRNA が、その二本鎖構造により TLR3 に認識される可能性が示唆された。また、TLR3 を活性化する ssRNA は、dsRNA と同じレセプターを介して同様の分子機構により TLR3 が局在するエンドソーム内へ取り込まれることもわかった。

これらのことから、dsRNA を生じない(-)鎖ウイルスの感染に対して TLR3 依存的な応答が関与することも説明がつく。TLR3 が、これまで考えられていた以上に広範囲の RNA を認識することがわかり、ウイルス由来の RNA の他、自己 RNA に対する炎症応答などにおいても、より多様な役割を持つと考えられる。

【結論】

TLR3 は、完全な dsRNA のみでなく、不完全な dsRNA 領域をもつ ssRNA を認識することで、多様なウイルス感染や慢性炎症に対して免疫応答を誘導する。