



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	The roles of AHR and IFI16 in antiviral innate immune response [an abstract of entire text]
Author(s)	山田, 大翔
Description	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 : 2240 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12136号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61946
Type	doctoral thesis
File Information	Taisho_Yamada_summary.pdf



学 位 論 文 (要約)

The roles of AHR and IFI16 in antiviral innate immune response
(抗ウイルス自然免疫応答における AHR と IFI16 の役割)

2 0 1 6 年 3 月

北 海 道 大 学

山 田 大 翔

学 位 論 文 (要約)

The roles of AHR and IFI16 in antiviral innate immune response
(抗ウイルス自然免疫応答における AHR と IFI16 の役割)

2 0 1 6 年 3 月

北 海 道 大 学

山 田 大 翔

【背景と目的】近年の麻疹やインフルエンザの流行をはじめとしたウイルス感染症は、我々の生命を脅かす。こういった微生物が感染した際に、最前線において微生物を認識する機構は感染防御応答を惹起する上で最も初めの重要なプロセスである。その認識は、リポ多糖やペプチドグリカン、核酸などといった微生物特有の保存された構成分子の構造 (pattern-associated molecular patterns; PAMPs) を germ-line にコードされている受容体 (pattern recognition receptors; PRRs) を介して行われる。その後、下流にシグナルが伝達されることで、I 型/III 型インターフェロン (IFN) や各種サイトカインの遺伝子発現が誘導される。このような宿主の自然免疫応答は、生体の恒常性の維持に重要である。一方、この破綻は、多くの炎症性疾患や自己免疫疾患の病態の原因にもなっており、自然免疫のシグナル伝達経路の解明は、これらの病態を理解する上でも、重要な課題である。

近年、ウイルス感染においては、RNA や DNA といった核酸が主な PAMPs として特定の PRRs によって認識されることが知られている。本研究では、以下 2 つの観点で、この核酸シグナル制御機構を明らかにした。①AHR (Aryl hydrocarbon receptor) は、ダイオキシンとして知られる TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin) などの環境汚染物質の受容体として知られる。AHR の免疫系における機能については、その多くは TCDD などの外因的な AHR リガンドに曝露させた際の役割について研究がなされてきた。しかしながら、免疫応答の制御という点において、定常状態における、内在性リガンドによって恒常的に活性化している AHR シグナルの役割についてはほとんど検討されていない。そこで自然免疫応答における AHR の機能を解析する。②健康人に広く潜伏感染しながら、特に臓器移植患者などで重篤な感染症を引き起こす DNA ウイルスであるヒトサイトメガロウイルス (HCMV) は、日和見病原体として臨床では大きな問題となっているが、その自然免疫認識機構についてはまだ十分に明らかにされていない。そこで、HCMV 感染時の自然免疫応答に関わる宿主センサー分子の同定を試みた。

【材料と方法】今回の実験では、主に MEFs (mouse embryonic fibroblasts)、HELFL (human embryonic lung fibroblasts)、HFF (human foreskin fibroblasts)、PHHs (primary human hepatocytes)、HEK293T (human embryonic kidney 293T) 細胞を用いた。タンパク質の過剰発現には、それぞれ目的遺伝子の cDNA を組み込んだ発現ベクターを用いた。ノックダウンには合成オリゴ siRNA (small interfering RNA) を用いた。核酸リガンドとしては主に 3pRNA (5'末端に三リン酸構造をもつ一本鎖 RNA)、HCMV-DNA (HCMV 由来のゲノム DNA) などを用いた。AHR の活性化または阻害には Kyn (Kynurenine)、FICZ (6-formylindolo[3,2-b]carbazole)、TCDD、CH-223191 などを用いた。ウイルス感染実験には、VSV (Vesicular stomatitis virus)、FluV (Influenza A virus)、NDV (Newcastle disease virus)、SeV (Sendai virus)、EMCV (Encephalomyocarditis virus)、HSV-1 (Herpes simplex virus type 1)、HCMV (strain Towne) を用いた。遺伝子発現の変化を定量的 RT-PCR、ELISA などで測定した。タンパク質の会合を免疫沈降、発現量を Western blot 法で検討した。ウイルス量の測定には、plaque assay、viral replication assay、TCID₅₀ を行った。タンパク質の細胞内局在については、免疫染色や FRET 解析で検討した。In vitro の実験ではリコンビナントタンパク質を精製し、TIPARP による TBK1 の修飾やその活性に対する影響を in vitro ADP-ribosylation assay や in vitro kinase assay で解析した。マウス個体へのウイルス感染では VSV を腹腔内、FluV を経鼻的に感染させた。

①恒常的な AHR シグナルの活性化は I 型 IFN を介する抗ウイルス応答を制御する

【結果】Ahr^{-/-} MEFs や AHR 阻害剤である CH-223191 を処理した MEFs において、control と比較し、RNA ウイルスである VSV、FluV、NDV、SeV、EMCV や DNA ウイルスである HSV-1 感染時の I 型 IFNs の発現誘導がいずれも有意に増加した。また、MEFs に AHR リガンドである Kyn や FICZ 処理すると、ウイルス感染時の I 型 IFNs の発現誘導が有意に減少

した。この AHR 活性化による IFN 応答の抑制に関わる因子として、AHR 誘導遺伝子の 1 つである TIPARP (TCDD-inducible poly(ADP-ribose)polymerase)を同定した。*Tiparp*^{-/-} MEFs においても control と比較して、ウイルス感染時の I 型 IFNs の発現誘導が有意に増加した。これと一致して、ウイルス量の減少が認められた。TIPARP は、IFN 誘導に重要である TBK1 との直接的な会合や細胞内における共局在が認められ、TBK1 を ADP リボシル化してそのキナーゼ活性を阻害した。さらに、TIPARP の酵素活性変異体を用いた解析により、実際の細胞において、TIPARP の酵素活性が自然免疫応答の抑制に関与することが明らかとなった。*Tiparp*^{-/-} MEFs や *Tiparp*^{-/-}マウスに CH-223191 を処理してもウイルス感染時の IFN-β 応答やウイルス量への影響が認められなかった。さらに CH-223191 処理をしたマウスでは、FluV 感染に対する抵抗性を示した。さらに、外因性の AHR リガンドである TCDD などを用いても、内因性 AHR リガンドの場合と同様に、AHR、TIPARP 依存的にウイルス感染時の IFN 応答の抑制が認められた。

【考察】本研究では恒常的な AHR シグナル活性化の新たな側面を示した。ウイルス感染時の IFN 応答を調節するために AHR を介して TIPARP の発現が制御されることは、ウイルス感染において IFN 誘導を最適に調節するという自然免疫における生理的な重要性を示すものである。とりわけ、炎症やサイトカインストーム等といった、微生物感染に対する過剰で有害な免疫応答を制御していることが考えられる。つまり、I 型 IFN 応答の過剰な活性化によって引き起こされる有害な影響から宿主を守るために、ウイルス由来の核酸による TBK1 を介したシグナルを抑制するという、重要な役割を恒常的な AHR シグナルが担っていることを示唆している。別の観点からみると、宿主のストレスや栄養状態などの要因による AHR の活性化がウイルス感染に対する自然免疫抗ウイルス作用を抑制しているかもしれないという面白い可能性が示唆される。本研究では、AHR アンタゴニストや TDO 阻害剤を用いた解析から、この恒常的な AHR シグナルの活性化はトリプトファン代謝産物を介することが示唆された。例えば、飢餓状態におけるトリプトファンが欠乏することによって AHR シグナルによる TIPARP 発現誘導が減少し、ウイルス感染に対する過剰な免疫応答を引き起こされるかもしれない。それ故に、本研究結果は病態制御のための治療的な重要性をもつかもしい。また、TBK1 の活性化制御はリン酸化やユビキチン化などといった翻訳後修飾によって制御されることが知られているが、本研究で示した TBK1 の ADP リボシル化は、これまでに報告されておらず、TBK1 の活性の制御機構の新たな知見といえる。TBK1 は抗ウイルス作用のみならず、がんの細胞増殖や抗アポトーシス作用などといった様々な作用があることも知られている。AHR や TIPARP の活性を薬理的に調節することは、様々なウイルスによる感染症のみならず、炎症、がん化ならびにその他の疾患を制御するうえで、理にかなった治療的アプローチとなり得るかもしれない。

【結論】Kyn などの内因性の AHR リガンドによって活性化している AHR シグナルは、恒常的に TIPARP の発現を誘導する。誘導された TIPARP は TBK1 と直接的に会合して ADP リボシル化することでそのキナーゼ活性を阻害し、ウイルス感染時の核酸センサーを介する I 型 IFNs 応答を抑制することが示された。

②IFI16 は HCMV テグメントタンパク質 pp65 の自然免疫センサー分子である

【結果】HELFL において HCMV 感染によって自然免疫応答が認められた。この応答に関与する宿主センサー分子として、DNA センサー分子である IFI16、cGAS、DDX41 を候補として見出した。しかしながら、HCMV-DNA で刺激による IFN-β mRNA 誘導には IFI16、cGAS の関与が見られなかった。一方、IFI16 に会合する HCMV の構造タンパク質である pp65 に着目した。pp65 を HELFL に過剰発現すると自然免疫応答の活性化が認められ、その応答は IFI16 依存的であった。さらに IFI16 は、N 末領域の PYRIN ドメインを含む領域で pp65 と会合した。また、pp65 を欠損させた HCMV を作製し、HELFL や PHHs に感染させると、WT HCMV と比較し、誘導される I/III 型 IFNs や炎症性サイトカインの発現誘導が有意に減少し

た。さらに pp65 はキナーゼ活性をもつため、pp65 のキナーゼ活性変異体を HELF に過剰発現させ解析したところ、pp65 のキナーゼ活性依存的に自然免疫応答の活性化が認められた。

【考察】 HELF における HCMV 感染において、IFI16 は HCMV 構造タンパク質 pp65 を認識することが示されたが、一方で DDX41 は HCMV のゲノム DNA を認識することも示唆された。また、cGAS は HCMV 由来の DNA や pp65 以外の未知なる因子を認識する可能性もある。また、IFI16 は、これまで報告されてきた DNA 認識とは異なる部位で pp65 と会合することが示されたことから、DNA 認識と pp65 認識ではそのメカニズムが異なることが示唆された。さらに、HCMV 側からの視点に立ててみれば、むしろ積極的に自然免疫応答を誘導していることも考えられる。HCMV は LCMV (lymphocytic choriomeningitis virus) というレトロウイルスと同様に、IFN シグナルを活性化させることで、感染の持続感染化を誘導するという側面があるのかもしれない。

【結論】 HELF において HCMV 感染時に宿主 PRR である IFI16 は、tegument タンパク質 pp65 と会合して下流にシグナルを伝達することで、I/III 型 IFNs、および各種炎症性サイトカインが発現誘導され、抗ウイルス応答として作用する。