HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ウイルス感染・腫瘍に対する自然免疫応答の制御機構［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	髙島, 謙
Description	配架番号：2300
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12559号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/66063
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Ken_Takashima_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　高島　謙

学 位 論 文 題 名

ウイルス感染・腫瘍に対する自然免疫応答の制御機構

（Regulatory mechanisms of the innate immune response to virus infection and tumor）

【背景と目的】病原体の感染に対し、パターン認識受容体（Pattern-recognition receptor: PRR）は病原微生物に共通する構造（Pathogen-associated molecular patterns: PAMPs）を認識し、迅速な自然免疫応答を引き起こす。細胞質に存在するRIG-I様受容体（RIG-I-like receptor: RLR）は、ウイルス二重鎖RNA（dsRNA）を認識するPRRであり、自然免疫において重要な働きをする。Melanoma differentiation associated gene 5 （MDA5）はRLRの一つであり、麻疹ウイルスや脳心筋炎ウイルスなどに由来する比較的長いdsRNA(>1kb)を認識する。MDA5はC末端領域においてdsRNAを挟み込む形で結合すると、dsRNAに沿って繊維状の多量体を形成することでミトコンドリア上に存在するアダプター分子Mitochondrial antiviral signaling protein（MAVS）の活性化を促し、I型インターフェロン（IFN）や炎症性サイトカインの産生を誘導する。MDA5の活性化はウイルス感染に対する生体防御に働くが、一方でMDA5の過剰な活性化が自己免疫疾患（1型糖尿病、SLE等）を誘発するため、MDA5の活性制御機構の解明が求められていた。本論文の第一章ではMDA5の新規制御因子の同定およびその制御機構の解明を目的とし、解析を行った。

RNAのみならずDNAも自然免疫機構を賦活化する。細胞質内DNA認識経路では主にStimulator of interferon genes （STING）依存的にI型IFNの産生が生じる。最近、抗腫瘍免疫におけるSTING経路の重要性が注目を浴びている。腫瘍微小環境において樹状細胞等の抗原提示細胞が腫瘍由来のDNAを取り込み、STING経路を活性化させる。その際に産生されるI型IFNが抗原特異的T細胞(CTL)の活性化を促し、腫瘍の成長を抑制することが報告された。腫瘍免疫には抗原特異的CTLのみならずNatural killer（NK）細胞等がエフェクター細胞として働くが、それらを介した腫瘍抑制機構に関するSTING経路の役割は不明である。また腫瘍内でどの細胞のSTING経路が抗腫瘍に関与するかについても解明されていない。本論文の第二章ではNK細胞を介した抗腫瘍免疫応答における生体及び腫瘍細胞自体のSTING経路の役割を解明することを目的とし、解析を行った。

⑴ MDA5 の新規制御因子の同定とその制御機構

【材料と方法】Yeast AH109 株を用いた Yeast two-hybrid 法によって Human Lung library より MDA5 結合因子のスクリーニングを行った。得られた分子の機能解析には HEK293（human embryonic kidney 293）や HeLa 細胞等の細胞株を用いた。ウイルス感染実験には麻疹及びセンダイウイルスを用い、核酸リガンドとして dsRNA 合成アナログである polyI:C を用いた。タンパク質の過剰発現は各遺伝子の cDNA をコードした発現ベクターを、ノックダウンには siRNA を、そしてノックアウト細胞の構築には CRISPR-Cas9 システムを用いた。タンパク質の相互作用は免疫沈降及び免疫染色によって確認した。mRNA 発現は定量 PCR 法により確認し、タンパク質発現はウエスタンブロットにより検出した。リン酸化の検出には Phos-tag を、多量体の検出には Native PAGE を用いた。シグナル伝達の解析に

はルシフェラーゼアッセイ等を行った。
【結果】MDA5 の新規結合因子としてリン酸化酵素 RIOK3（Rio kinase 3）及び熱ショックタンパク質（Heat shock protein: HSP）である DnaJ Hsp40 homolog, subfamily B, member 1（DNAJB1）を同定した。RIOK3 は細胞質内で MDA5 と結合し、MDA5 Ser-828 をリン酸化することが判明した。RIOK3 による MDA5 Ser-828 のリン酸化は MDA5 の活性化に必須である多量体形成を阻害し、MDA5 由来のシグナル伝達を抑制していることが明らかとなった。また dsRNA による刺激により DNAJB1 及び HSP70 の発現が亢進し、共に stress granule へと移行することが確認された。DNAJB1 は MDA5 と細胞質内で結合し、MDA5 の多量体形成を阻害することが判明した。また DNAJB1 は HSP70 と共同して MDA5 及び MAVS 由来のシグナル伝達を抑制することが確認された。
【考察】定常状態において RIOK3 は MDA5 Ser-828 をリン酸化することで MDA5 を不活性状態に維持していると考えられる。また DNAJB1 は HSP70 と共同して MDA5-MAVS 経路を制御していると予想される。これらの制御機構の破綻が MDA5 由来の自己免疫疾患と関与する可能性が考えられ、今後の検討課題である。
【結論】MDA5 は RIOK3 による Ser-828 のリン酸化及び DNAJB1/HSP70 複合体との相互作用によって多量体形成が阻害されることにより、活性を制御されていることが示された。

⑵ **腫瘍微小環境における STING 経路の役割**

【材料と方法】CRISPR -Cas9 システムにより STING 欠損 B16D8 細胞及びマウスを樹立し、STING 欠損 B16D8 担癌マウスモデルを構築した。腫瘍内の免疫細胞の割合はフローサイトメトリーにより確認し、遺伝子発現は定量 PCR 法により評価した。
【結果】野生株の B16D8 細胞を移植したところ、STING 欠損マウスでは WT マウスに比べ著明な腫瘍増大を認めた。この際、腫瘍内の NK 細胞の割合は著減しており、腫瘍組織全体での IL-33 や IP-10 の発現も有意に減少していた。また STING 欠損株及び野生株の B16D8 細胞を STING 欠損マウスに移植したところ、STING 欠損株由来の腫瘍は野生株の場合に比べ有意な腫瘍増大を認めた。この際、腫瘍内の NK 細胞の割合はさらに減少しており、腫瘍組織全体における CCL5 や IP-10 の発現も有意に減少していた。
【考察】腫瘍内において宿主細胞の STING 経路は IL-33 及び IP-10 の発現誘導に寄与し、また腫瘍細胞自体の STING 経路は CCL5 及び IP-10 の発現誘導に寄与することで、NK 細胞依存的な腫瘍増殖制御に寄与していることが示唆された。今後、腫瘍内の宿主細胞のみならず腫瘍細胞の STING 経路も治療標的となり得るかもしれない。
【結論】B16D8 細胞を用いた担癌モデルにおいて、腫瘍内では宿主及び腫瘍細胞の STING 経路が共同して NK 細胞依存的な抗腫瘍免疫応答に寄与するが、関わる遊走性因子には違いがあることが示された。