



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Interleukin-32はウイルス感染時の自然免疫経路を活性化する〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	郷, 俊寛
Description	配架番号 : 2455
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13441号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74343
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Toshihiro_Goh_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 郷 俊 寛

学 位 論 文 題 名

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)

【背景】Interleukin-32(IL-32)は、natural killer cells (NKT)、上皮細胞より分泌され、IL-1 β 、IL-8、TNF- α などの炎症性サイトカインを誘導する因子として発見された。近年、抗ウイルス応答における IL-32 の機能についての報告が増えつつあるが、IL-32 と自然免疫との関連性については未だ十分に解明されていない。細胞質内の自然免疫経路は病原体の侵入において非常に重要な役割を担う。ウイルス感染において、RNA 及び DNA ウイルスは初めに RIG-I (retinoic acid-inducible gene-I)、cGAS(cyclic GMP-AMP Synthase) により認識される。さらに、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 型、III 型 interferon (IFN) 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経路への IL-32 の関与について検証した。

【方法と材料】Human embryonic kidney cells 293T (HEK293T) 細胞、human embryonic lung fibroblasts (HELFL)、primary human hepatocytes (PHHs)を用いた。siRNA を用いて特定の遺伝子をノックダウンした。また、CRISPR-Cas9 を使用し IL-32 遺伝子欠損細胞を作製した。Vesicular stomatitis virus (VSV)、herpes simplex virus-1 (HSV-1)、encephalomyocarditis virus (EMCV)、hepatitis B virus (HBV)を用いて感染実験を行った。核酸センサーに対する特異的なリガンドとして 5'-triphosphate RNA (3pRNA)、herring testes-DNA (HT-DNA)を使用した。タンパク質の検出及びタンパク質量の測定に、それぞれウェスタンブロット法 (WB)、ELISA を用いた。mRNA の定量には定量リアルタイム PCR (qRT-PCR)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。3pRNA 刺激した HEK293T 細胞で IL-32 の発現が認められ、さらに、3pRNA 刺激後に RelA をノックダウンした HEK293T 細胞で IL-32 の発現が低下したことから IL-32 は自然免疫の活性化時に NF- κ B を介して誘導されることが示唆された。次に IL-32 がウイルス感染時に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 siRNA を導入した細胞と比較し IFN 産生誘導が低下し、さらに、これら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 遺伝子欠損 HEK293T 細胞でもウイルス感染時にワイルドタイプ (WT) の HEK293T 細胞と比較し IFN 産生誘導の低下が認められたことから、IL-32 はウイルス感染時に抗ウイルス応答を活性化することが示唆された。次に IL-32 が自然免疫経路に関与するかを検証した。IL-32 をノックダウンした HELFL に RIG-I、HT-DNA を刺激すると I 型 IFN 産生が低下した。また、TBK1 を過剰発現させた IL-32 遺伝子欠損 HEK293T 細胞では I 型 IFN の転写活性が低下したのに対し、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 遺伝子

欠損 HEK293T 細胞では WT の HEK293T 細胞と比較し、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。これらの結果から、IL-32 は細胞内の自然免疫における RNA 認識経路と DNA 認識経路の下流で活性化される共通の分子である TBK1 または IRF-3 に関与することが示唆された。次に IL-32 と TBK1 または IRF-3 との結合性について検証した。IL-32 遺伝子欠損 HEK293T 細胞に HA タグ IL-32 γ と Flag タグ TBK1 または Flag タグ IRF-3 を共発現させ、抗 Flag 抗体で免疫沈降すると Flag タグ IRF-3 を発現させた細胞で HA が検出された。また、3pRNA 刺激した HEK293T 細胞を用いて、抗 IRF-3 抗体で免疫沈降すると IL-32 が検出された。さらにリコンビナント IL-32 γ (rIL-32 γ) 及び rIRF-3 を混合し抗 IRF-3 抗体で免疫沈降したところ IL-32 が検出された。一方 rIL-32 γ と rTBK1 を混合して抗 TBK1 抗体で免疫沈降しても IL-32 は検出されなかった。これらの結果から IL-32 は IRF-3 と結合することが示唆された。次に IL-32 と IRF-3 が結合する事が、自然免疫活性時の IFN 産生誘導に関与しているかについて検証した。IRF-3 に結合する IL-32 γ 変異体 (C-IL-32 γ) と IRF-3 に結合しない N-IL-32 γ をそれぞれ IL-32 遺伝子欠損 HEK293T 細胞に発現させ 3pRNA 刺激をしたところ、コントロールの遺伝子欠損 HEK293T 細胞と比較し、C-IL-32 γ が発現した細胞で IFN 産生の増加が認められたが、N-IL-32 γ が発現した細胞では IFN 産生の増加は認められなかった。このことから IL-32 は IRF-3 と結合することで自然免疫活性時の IFN 産生を正に制御することが示唆された。最後に IL-32 と IRF-3 の結合が、TBK1 と IRF-3 との会合に関与するかを検証した。C-IL-32 γ を発現させた IL-32 遺伝子欠損 HEK293T 細胞において 3pRNA 刺激後、抗 IRF-3 抗体で免疫沈降したところ、コントロールの IL-32 遺伝子欠損 HEK293T 細胞と比較し TBK1 の検出が増加したが、N-IL-32 γ を発現させた IL-32 遺伝子欠損 HEK293T 細胞では TBK1 の検出は変わらなかった。この結果より自然免疫活性時に IL-32 は IRF-3 と結合し TBK1-IRF-3 の会合を促すことが示唆された。

【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。しかしながら、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。

今回の結果より IL-32 の核酸センサーを介した IFN 反応における役割を明らかにした。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。