



Title	Interleukin-32はウイルス感染時の自然免疫経路を活性化する
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13441
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77140
Type	doctoral thesis
File Information	Toshihiro_Goh.pdf



学 位 論 文

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)

2 0 1 9 年 3 月

北海道大学

郷 俊寛

Toshihiro Goh

学 位 論 文

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)

2 0 1 9 年 3 月

北海道大学

郷 俊寛

Toshihiro Goh

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	4 頁
緒言	6 頁
実験方法	8 頁
実験結果	12 頁
考察	27 頁
結論	29 頁
謝辞	30 頁
引用文献	31 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は下記基礎論文に投稿中である.

1. Toshihiro Goh, Taisho Yamada, Seiichi Sato, Hirotoshi Akita, Akinori Takaoka,
(論文名) Interleukin-32 accelerates IRF-3 transcription factor-mediated antiviral host
defense.

(学術雑誌名) Journal of Medical Virology

本研究の一部は下記の学会に発表した.

1, 郷 俊寛, 亀山 武志, 高岡 晃教

(演題名) 癌細胞における IL-32(Interleukin-32)の直接的な作用の検討

(学会名) 第 22 回 日本がん免疫学会総会

平成 30 年 8 月 1 日～3 日

(会場名) 岡山コンベンションセンター

要旨

【背景と目的】Interlukin-32 (IL-32) は6種類のアリソフォーム (IL-32 α , β , γ , δ , ζ , ϵ) を有し、炎症性サイトカイン IL-1 β , IL-8, TNF- α 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-I) 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- κ 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 の各アイソタイプを 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 γ 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 γ (IL-32 γ) 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 γ の C 末領域 (C-IL-32 γ) と N 末領域 (N-IL-32 γ) 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 γ と IRF-3 との会合が認められたが, N-IL-32 γ 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 γ , N-IL-32 γ 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 γ 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 γ を導入した IL-32 欠損細胞では会合が増加し, N-IL-32 γ 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.

【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.

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

3pRNA	5'-triphosphate RNA
cGAMP	Cyclic GMP-AMP
cGAS	Cyclic GAP-AMP synthase
CRISPR-Cas9	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated proteins-CRISPR associated protein 9
EMCV	Encephalomyocarditis virus
HBV	Hepatitis B virus
HEK293T	Human embryonic kidney cells 293 T
HELFI	Human embryonic lung fibroblasts
HIV-1	Human immunodeficiency type-1 virus
HSV-1	Herpes simplex virus-1
HT-DNA	Herring testes-DNA
IAV	Influenza A virus
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRF	Interferon regulatory factor
IRF-3	Interleukin regulatory factor-3
MDA5	Melanoma differentiation-associated gene 5
pgRNA	Pregenomic RNA
PHH	Primary human hepatocyte
PRRs	Pattern recognition receptors
RIG-1	Retinoic acid inducible gene-I
rIL-32 γ	Recombinant IL-32 γ
rIRF-3	Recombinant IRF-3
rTBK1	Recombinant TBK1
STING	Stimulator of interferon genes

TBK1	TANK-binding kinase 1
VSV	Vesicular stomatitis virus
WT	Wild type

緒言

Interleukin-32 (IL-32)は6種類のアリソフォーム (IL-32 α , β , γ , δ , ζ , ϵ) を有する炎症誘発性のメディエーターとして発見され, natural killer (NK) 細胞, 上皮細胞, 単球, 肝細胞など様々な細胞においてその誘導が確認されてきた (Kim et al., 2005, Ota et al., 2015, Netea et al., 2006, Watashi et al., 2013, Dinarello and Kim, 2006). IL-32 はリウマチ性関節炎 (RA), 炎症性腸疾患などの炎症性疾患で高発現しており, IL-1 β や TNF- α などの代表的な炎症性サイトカインの存在が高発現の一因であると考えられている (Heinhuis et al., 2011, Joosten et al., 2006, Shioya et al., 2007, Kay and Calabrese, 2004). 実際, IL-32 は, TNF- α などの刺激により nuclear factor-kappa B (NF- κ B)や c-Jun N-terminal kinase (JNK)または Akt を介して発現する報告がある (Zhu et al., 2014, Li et al., 2015). また, IL-32 が単球などで p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) または NF- κ B といった典型的なサイトカインシグナル経路を介して TNF- α や IL-8 などの様々なサイトカインの誘導をしている (Kim et al., 2005). 一方で, 筋線維芽細胞などでは上清よりも細胞内に IL-32 が優位に局在している報告や, 前単核細胞において protein kinase C (PKC)と会合して phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)を介した IL-6 の誘導を抑制しているなど, IL-32 の細胞内における機能についても報告されている (Nishida et al., 2008, Kang et al., 2012).

ウイルス感染における IL-32 の役割についても解明されつつある. Influenza A virus (IAV) 感染において cyclooxygenase-2 (COX-2) 経路, または, NF- κ B を介して IL-32 が誘導され, その結果 IL-32 の血中濃度が高くなるということが報告されている (Watashi et al., 2013, Li et al., 2008, Zhou and Zhu, 2015). また, これまでに, IL-32 γ で刺激した CD4 陽性 T 細胞で human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) の増殖が抑制される事や, IL-32 を刺激した末梢血単核細胞で interferon- λ 1 (IFN- λ 1) が誘導される事などの報告があり, IL-32 による刺激は, 炎症性サイトカインを誘導するだけでなく, 抗ウイルス応答も誘導することが知られている (Watashi et al., 2013, Nold et al., 2008). さらに, IFN- γ により誘導された IL-32 が肝細胞において hepatocyte nuclear factor 1 α (HNF1 α) や HNF4 α の発現を制御することにより, 肝細胞での B 型肝炎ウイルス (HBV) の増殖を抑えるなど, 細胞内における IL-32 の抗ウイルス反応についても報告されてきた (Kim et al., 2018). しかしながら, IL-32 のウイルス感染時の自然免疫センサーを介するシグナル経路への関連性について詳細には解明されていない.

細胞質内における自然免疫系の病原体認識およびその下流経路の活性化は微生物の侵入時に非常に重要な役割を担う. ウイルス認識に関わる代表的な自然免疫核酸センサーに, retinoic acid inducible gene-I (RIG-I), melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5)

そして cyclic GAP-AMP synthase (cGAS)と呼ばれる pattern recognition receptors (PRRs) が知られている (Chan and Gack, 2016). RIG-I と MDA5 は RNA センサーとして機能し、アダプター分子である mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) を活性化させる (Yoneyama et al., 2004, Yoneyama et al., 2005, Sun et al., 2013). 一方, cGAS は直接ウイルスの DNA と結合し、セカンドメッセンジャーである cyclic GMP-AMP (cGAMP) を産生され、次に環状ヌクレオチドを認識する stimulator of interferon genes (STING)によって cGAMP が認識され、下流シグナルが誘導される (Chen et al., 2016). これらの重要なアダプター分子である MAVS と STING は共通のシグナル経路である TNFR-associated NF- κ B kinase-binding kinase 1 (TBK1) と interferon regulatory factor 3 (IRF-3)を介してウイルスの排除に重要な I 型, III 型 IFN を誘導する.

本研究において、私は RNA および DNA ウイルス感染により誘導された IL-32 が I 型 IFNs 産生誘導を促進させる新しい制御因子として機能することを見出した. さらに、この場合、IL-32 は、分泌性のサイトカインとして機能するのではなく、細胞質において直接的に IRF-3 と会合することで、TBK1 キナーゼによる IRF-3 の活性化を促進させ、IFN 誘導による抗ウイルス活性を増強させるメカニズムを明らかにした.

実験方法

使用した細胞, 抗体, 試薬

Human embryonic kidney cells 293 T (HEK293T) 細胞は American Type Culture Collection より購入した. Human embryonic lung fibroblasts (HELFL)は吉山 裕規博士の御厚意により譲渡された. phoenix Bio 社の primary human hepatocytes (PHHs)を使用した. 抗体は下記を使用した: anti-Flag (F7425; SIGMA), anti-HA (M132-3; MBL), anti-IRF3 (CBX00167; Cosmo Bio), anti-IRF-3 (pS396) (4D4G; Cell Signaling), anti-IL-32 $\alpha\beta\gamma\delta$ (513501; BioLegend), anti-NAK (EP611Y; Abcam), anti-TBK1 (pS172) (D52C2; Cell Signaling), anti- β -actin (AC-15; SIGMA). ウェスタンブロットでは下記の通り希釈した: anti-Flag (F7425), 1:1000; anti-HA (M132-3), 1:1000; anti-IRF-3 (CBX00167), 1:1000; anti-IRF3 (pS396) (4D4G), 1:1000; anti-NAK (EP611Y), 1:1000; anti-TBK1(pS172) (D52C2), 1:1000, anti- β -actin (AC-15), 1:1000. Human IL-32 γ (4690-IL-025; R&D)は R&D 社より購入した. cGAMP は Biolog 社より購入した. Herring testis DNA (HT-DNA)は SIGMA 社より購入した. 3pRNA は MEGAscript kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて作製した.cGAMP, HT-DNA, 3pRNA は Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて細胞質へ導入した.

細胞培養

HEK293T 細胞, HELFL では, 10% fetal bovine serum (FBS) (CELLect) を加えた Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)を培養液として用いた. PHHs は dHCGM (phoenix bio) を培養液に用いた. 細胞は 5% CO₂ インキュベーターで 37 °C で培養した.

IL-32 遺伝子欠損細胞の作製

IL-32 のエクソン 5 を標的としたセンスオリゴ (5'-CACCGATGTCGAGCCTGGCAGAGC -3') とアンチセンスオリゴ (5'-AAACGCTCTGCCAGGCTCGACATC -3') を 95 °C で 5 分後 3 分毎に 5 °C ずつ 25 °C になるまで冷やしてアニーリングし, 制限酵素 BbsI を用いて切断した pX330-U6-chimeric_bb-CBh-hSpcas9 ベクターへライゲーションした. このベクターを wild type (WT) の HEK293T 細胞に導入して IL-32 遺伝子欠損細胞を作製した. IL-32 の発現の欠損を確認するために 1 μ g/ml の 3pRNA で細胞を刺激し 8 時間後に細胞を回収しウェスタンブロットで解析した. IL-32 遺伝子欠損部位の塩基配列は BigDye Terminator v3.1 sequencing kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンスで確認した.

プラスミドのクローニング

IL-32 β の cDNA は HEK293T 細胞から RT-PCR を用いて生成した. IL-32 γ ベクターは HEK293T 細胞から RT-PCR を用いて作製した IL-32 のエクソン 3 領域の cDNA と, pCIneo-IL-32 β -HA ベクターをインバース PCR し作製した線状化ベクターを In-Fusion HD Cloning Kit (TaKaRa) を用いてライゲーションして作製した. IL-32 δ と IL-32 ζ の cDNA は IL-32 β の cDNA より生成した. IL-32 α , IL-32 ϵ , N-IL-32 γ 及び C-IL-32 γ の cDNA は IL-32 γ の cDNA より生成した. HA-tagged IL-32 とその変異体の cDNA は pCIneoHA2 ベクターの NheI と XhoI 領域にライゲーションした. ヒト IRF-3 の cDNA は HEK293T 細胞から RT-PCR を用いて生成した. IRF-3 変異体 (IRF-3 (Δ SRR), IRF-3 (Δ DBD), IRF-3 (Δ IAD), IRF-3 (Δ PRR)) は IRF-3 の cDNA より生成した. Flag-tagged IRF-3 及びその変異体の cDNA は pCXN2-Flag ベクターの XhoI と NotI 領域にライゲーションした. mCherry-tagged IL-32 γ は IL-32 γ の cDNA より生成され pmCherry-C1 ベクター (Clontech) の BglII と SacII 領域にライゲーションした. それぞれの cDNA のシーケンスは BigDye Terminator v3.1 sequencing kit (Applied Biosystems) を用いて確認した. TBK1 及び活性化 IRF-3 (3/5D) の発現ベクターは参考文献で使用されていたものを用いた (Kubota et al., 2008); (Yamada et al., 2016).

共局在化分析

IL-32 γ は mCherry-tagged IL-32 γ ベクターを HELF に導入した. 内因性 IRF-3 は抗 IRF-3 抗体 (Cosmo Bio)(dilution, 1:20) と 2 次抗体である Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) (10 μ g/ml) を用いて染色した. 核染色に Hoechst 33342 (Invitrogen) を用いた. IL-32 と IRF-3 の共局在は共焦点顕微鏡 IX-81S (Olympus) を用いて観察した.

small interfering RNA (siRNA) によるノックダウン細胞の作製

siRNA は SIGMA より購入した. HEK293T 細胞では, 12-well プレートに細胞を播種し, 1 well あたり 50 nM の siRNA と 2.0 μ l の Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を混合した 100 μ l の Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) を培地に加えることで siRNA を導入した. HELF においては, 1×10^6 個の細胞と siRNA 100 μ g を 100 μ l の Opti-MEM に混合し, NEPA21 (NEPA GENE) を用いて電気穿孔法 (125 V poring pulse, 20 V driving pulse) で導入した. 電気穿孔後 100 μ l の DMEM を加え, 12-well プレートに各 well 50 μ l ずつ分注し DMEM で培養した. PHHs においては, 50 nM の siRNA と 2.0 μ l の Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を混合した Opti-MEM を, 細胞を播種するのと同時に 12-well プレート (356500; CORNING) に加えた. siRNA 導入後 48 時間経過した細胞を実験に用いた.

siRNA の標的配列詳細は表 1 に記載した.

表 1. 実験に用いた siRNA の標的配列

標的遺伝子	標的配列 (5'→3')
IL-32 #1	GGATTACGGTGCCGAGGC
IL-32 #2	GCTCACTCCTCTACTTGA
IL-32 #3	GGATGTTGAGGATCCCGC
IRF-3	CCTTCATTGTAGATCTGAT
RelA	GACTTGAGGTGTATTTCA

細胞へのウイルス感染とウイルス量の測定

HEK293T 細胞または HELF を 12-well プレートに播種し, VSV, EMCV, HSV-1 をそれぞれ 0.1 multiplicity of infection (m.o.i.), 1 m.o.i., 1 m.o.i. で感染させた. FBS フリーの DMEM 培地で, 37°C 1 時間インキュベーションした後, 培地を除去し, phosphate buffered saline (PBS) で細胞を 2 回洗浄し, 10% FBS の DMEM を加え 24 時間インキュベーションした. 各種ウイルス感染後 24 時間経過した培養上清を Vero 細胞を用いてプラークアッセイしウイルス量を測定した. HBV は 3000 genome equivalents per cell で PHHs に感染させた. 4%の Polyethylene Glycol 8000 (Promega)を加えた FBS フリーの DMEM を培地に使用し, 37°Cで 48 時間インキュベーションした. HBV 感染後 48 時間経過した PHHs を用い pregenomic RNA (pgRNA) を quantitative real-time PCR (qRT-PCR) で測定することによりウイルス量を評価した.

qRT-PCR による mRNA 量の解析

培養した細胞を Isogen (Nippon Gene) を用いて溶解させた後, クロロホルムを加え遠心分離し水相を回収した. 回収した水相にイソプロパノールを加えて遠心しペレットとして沈殿した RNA のみを残して上清を除去し, エタノールを加えて再度遠心した. 遠心後にペレットのみを残して上清を除去し, RNA を抽出した. 抽出した RNA を DNase I (Invitrogen)と ReverTra Ace (TOYOBO) で処理し, qPCR SYBR Premix Ex Taq (TAKARA) を用いて StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems)で解析した.

ELISA

VSV, EMCV, HSV-1 感染後または, 3pRNA, HT-DNA, cGAMP 刺激後 24 時間経過した細胞の培養上清を回収し, PBL Assay Science 社の ELISA キットを用いて解析した.

ルシフェラーゼアッセイ

HEK293T 細胞を 24-well プレートに播種し, 100 ng の p-125Luc ルシフェラーゼレポータープラスミド, 10ng の renilla ルシフェラーゼレポータープラスミド, 200 ng の TBK1 または IRF-3 (3/5D) ベクターを 2.0 μ l の Lipofectamin 2000 (Invitrogen) を用いて導入し 48 時間後に, 1 μ g/ml の 3pRNA で刺激し 24 時間インキュベートした. ルシフェラーゼ活性は Dual-Luciferase Reporter Assay system (Promega)で測定した. 測定値は renilla luciferase reporter plasmid の値で補正した.

ウェスタンブロット, 免疫沈降法

培養した細胞に 1% Triton-X (NaCl 150mM) のライシスバッファーを加えてタンパク質を回収した. 20 μ g のタンパク質を lower buffer12%のランニングゲルを用いて sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)し, Immobilon-P メンブレン (polyvinylidene difluoride (PVDF), 0.45 μ m) を用いてトランスファーした. タンパク質の検出は Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo scientific) を用いて ImageQuant LAS 2000 で解析した. 免疫沈降では 2000 μ g のタンパク質に 2 μ g の抗体を加えて 4°C over-night でインキュベーションし, 25 μ l の nProtein A Sepharose 4 Fast Flow (GE ヘルスケア・ジャパン) を加えて遠心した.

統計解析

統計学的有意差には Student's t-test を用いた.

実験結果

1. IL-32 はウイルス感染, 3pRNA 刺激時に NF- κ B を介して誘導される

1-1. 3pRNA刺激及びVSV感染後のIL-32の誘導を検証

私は初めにIL-32がウイルス感染時の自然免疫シグナル経路の活性化により誘導されるかを検証した. HEK293T細胞では定常時には IL-32の発現を認めなかったが, RIG-Iのリガンドである3pRNAで刺激したところ, 刺激初期8時間目よりIL-32 mRNAおよびタンパク質の発現が認められ, 少なくとも24時間後までmRNAの誘導が確認された. 同様の結果がVSV感染時にも認められた (図1).

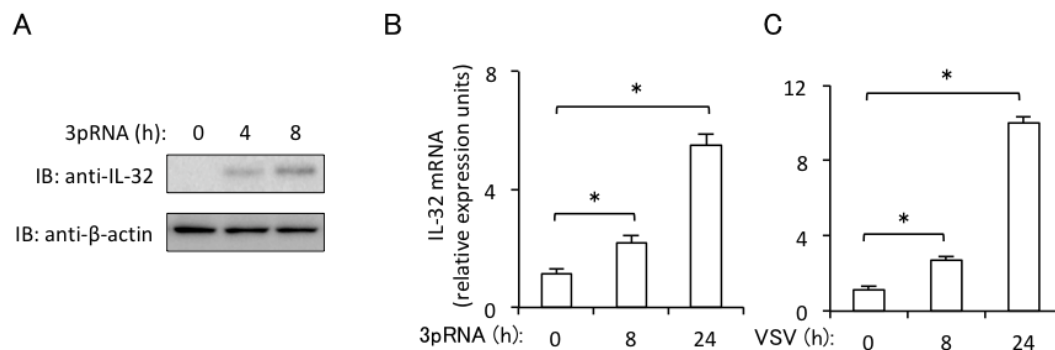


図 1. 3pRNA 刺激及び VSV 感染後に IL-32 が誘導される

A. HEK293T 細胞に 3pRNA (1 μ g/ml) 刺激し 8 時間後, 24 時間後の IL-32 のタンパク質発現をウェスタンブロットで解析した. B. HEK293T 細胞に 3pRNA 刺激後, 8 時間後, 24 時間後の IL-32 mRNA を定量リアルタイム PCR (qRT-PCR) で解析した. C. HEK293T 細胞に VSV 感染後 8 時間後, 24 時間後の IL-32 mRNA を定量リアルタイム PCR (qRT-PCR) 解析した.

1-2. 3pRNA刺激時にIL-32が誘導される経路を検証

このIL-32が誘導される細胞内経路を解明するためsiRNAを用いてRelA, IRF-3をそれぞれノックダウンして3pRNA刺激をしたところ, IRF-3をノックダウンした場合は, 影響がみられなかったが, RelAをノックダウンした細胞でIL-32の発現誘導がかなり低下した. このことからIL-32はRIG-I下流において少なくともRelA依存的なNF- κ B経路を介して誘導されることが示唆された (図2).

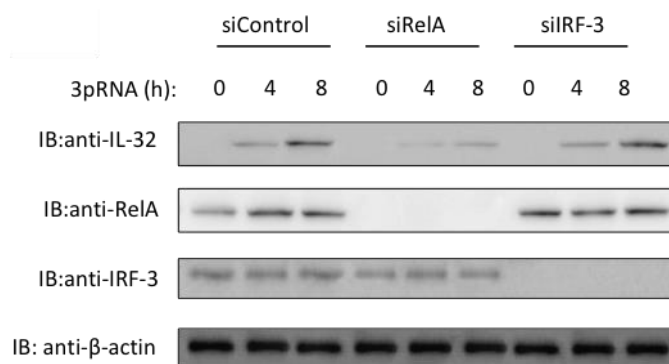


図 2. RelA ノックダウンによる 3pRNA 刺激後の IL-32 の発現誘導の低下が認められる

siControl または siRelA または siIRF-3 処理後, 3pRNA (1μg/ml) 刺激し 4 時間後, 8 時間後の HEK293T 細胞の IL-32 のタンパク質発現をウェスタンブロットで解析した.

2. IL-32 はウイルス感染時に IFN 産生を正に制御する

2-1. IL-32のVSV感染時における抗ウイルス応答の検証

次に IL-32 が, ウイルス感染時の IFN-β 誘導に関与しているかについて検証した. IL-32 遺伝子のそれぞれ異なる部位を標的とした 3 種類の siRNA (siIL-32#1, siIL-32#2, siIL-32#3) でノックダウンした HEK293T 細胞に VSV を 24 時間感染させたところ, コントロールの siRNA (siControl) を導入した HEK293T 細胞と比較し IFN-β の産生が著明に低下した. この結果に一致し, VSV 感染後 24 時間経過した培地を回収し, ウイルス量を測定したところ IL-32 をノックダウンした HEK293T 細胞で増加した (図 3).

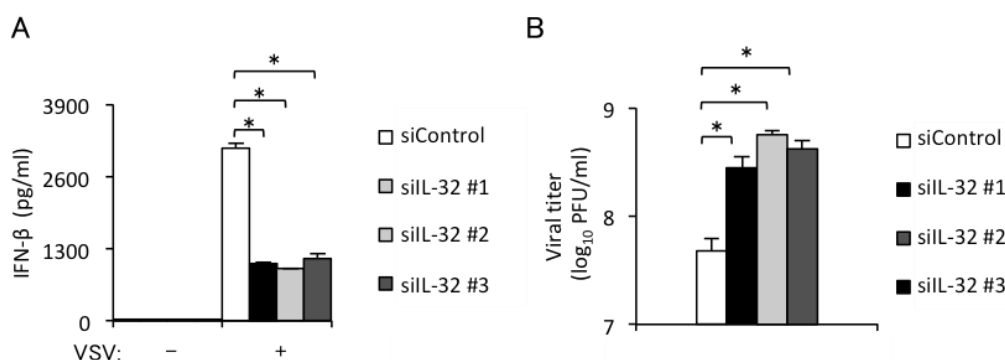


図 3. VSV 感染時に IL-32 ノックダウン細胞で IFN-β 低下しウイルス量が増加する

A. siControl または siIL-32 (siIL-32 #1, siIL-32 #2, siIL-32 #3) で処理し, VSV 感染後 24 時間の HEK293T 細胞の IFN-β のタンパク量を ELISA で解析した. B. VSV のウイルス量をプラークアッセイで解析した. (PFU, plaque-forming units)

2-2. IL-32ノックダウンしたHELFL, A549細胞におけるRNAウイルス感染時の抗ウイルス応答の検証

次に私はHEK293T細胞以外の細胞においても、IL-32がRNAウイルス感染時の抗ウイルス応答に関与するかを検証した。IL-32をノックダウンしたHEL F及びヒト肺胞基底上皮肺腺癌細胞であるA549において、VSVまたはEMCV感染後24時間目の培養上清でIFN- β 量が低下した (図4 A, B)。これに加え、ウイルス感染後24時間目の培養上清中のウイルス量はVSV, EMCVともに増加した (図4 C,D)。これらの結果からIL-32はRNAウイルス感染時に抗ウイルス応答を正に制御することが示唆された。さらに、VSVはIRG-Iにより認識され、EMCVはMDA5により認識されることが知られており、IL-32がRIG-I及びMDA5を介した自然免疫経路の両方に関与している可能性も考えられた (Kato et al., 2006)。

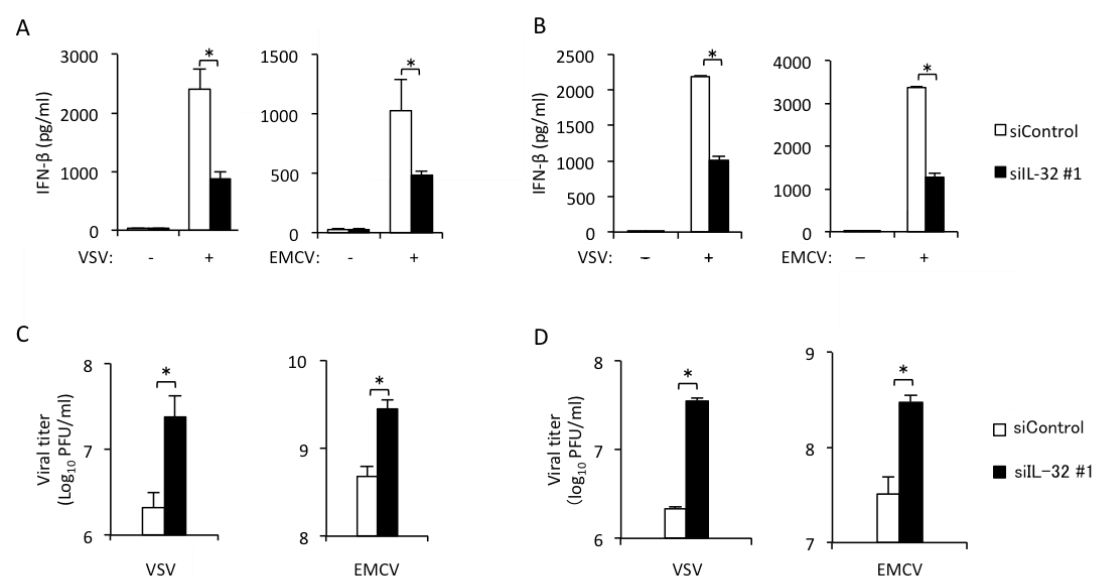


図 4. IL-32 をノックダウンした HELF, A549 細胞で RNA ウイルス応答が低下する

A. siControl または siIL-32 #1 で処理して 48 時間経過した HELF における、VSV または EMCV 感染後 24 時間の培養上清中の IFN- β のタンパク量を ELISA で解析した。B. siControl または siIL-32 #1 で処理して 48 時間経過した A549 細胞における、VSV または EMCV 感染後 24 時間の培養上清中の IFN- β のタンパク量を ELISA で解析した。C. 図 4 A で用いたウイルス感染後 24 時間目の培養上清中のウイルス量をイムノアッセイで測定した。D. 図 4 B で用いたウイルス感染後 24 時間目の培養上清中のウイルス量をイムノアッセイで測定した。

2-3. IL-32ノックダウンしたHEL F, PHHsにおけるDNAウイルス感染時の抗ウ

イルス応答の検証

さらに私はIL-32がRNAウイルスだけではなくDNAウイルス感染においても抗ウイル

ス応答に關与するかを検証した。IL-32をノックダウンしたHELFLにおいて、HSV-1感染後24時間目の培養上清でIFN- β 量が低下した(図5 A)。また、IL-32をノックダウンしたPHHsにおいては、HBV感染後48時間のIFN- $\lambda 1$ mRNA量が低下した(図5 B)。また、HSV-1感染後24時間目の培養上清中のウイルス量は増加した(図5 C)。また、pgRNAの増加はHBVの増殖の指標としてこれまでの研究で評価されており、本研究でもIL-32をノックダウンしたPHHsにおいて、HBV感染後48時間のpgRNAが増加したことから、HBVが増殖していると考えられた(図5 D)(Sato et al., 2015)。これらのことから、IL-32はDNAウイルスの感染においても抗ウイルス応答を正に制御することが示唆された。

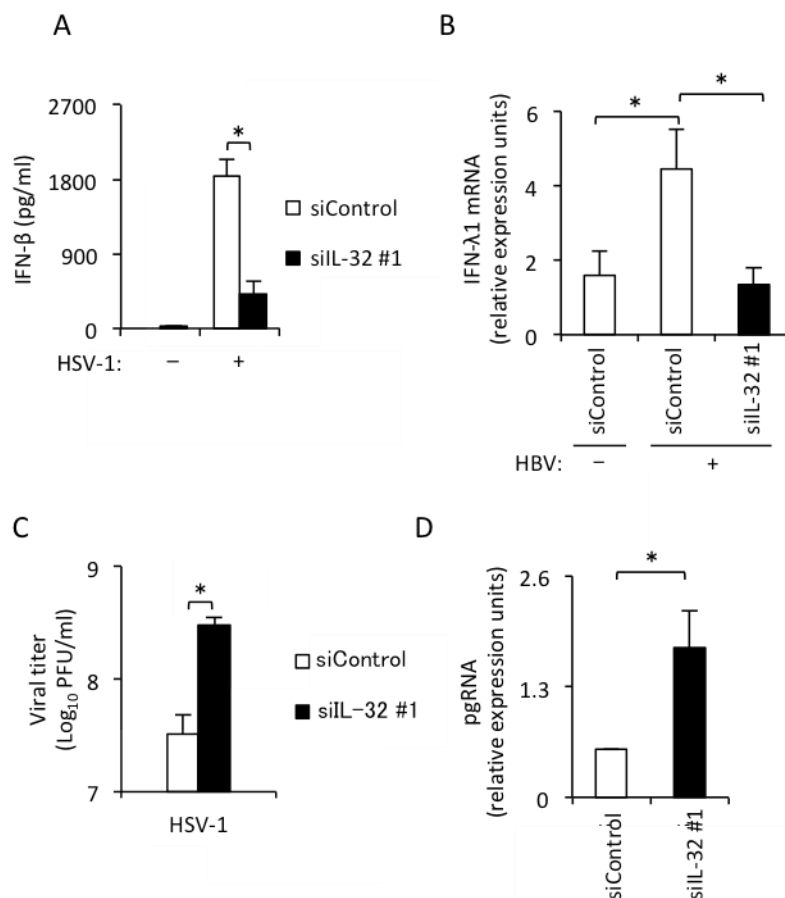


図 5. IL-32 をノックダウンした HELF, A549 細胞で RNA ウイルス応答が低下する

A. siControl または siIL-32 #1 で処理して 48 時間経過した HELF における、HSV-1 感染後 24 時間の培養上清中の IFN- β のタンパク量を ELISA で解析した。B. siControl または siIL-32 #1 で処理して 48 時間経過した PHHs における、HBV 感染後 48 時間の細胞の IFN- $\lambda 1$ mRNA 量を qRT-PCR で解析した。C. 図 5 A で用いたウイルス感染後 24 時間目の培養上清中のウイルス量をイムノアッセイで測定した。D. 図 4 B で用いたウイルス感染後 48 時間目の細胞の pgRNA 量を qRT-PCR で測定した。

2-4. IL-32遺伝子欠損細胞の作製

これらの結果により, IL-32 がウイルス感染時の I 型 IFN 産生誘導を正に制御することが示唆された. そこで, IL-32 遺伝子欠損細胞を作製することで, この新しい IL-32 の機能を確認することにした. IL-32 は, 現在, 6 つのアイソフォーム (IL-32 α , β , γ , δ , ζ , ϵ) が知られており CRISPR/Cas9 を使用し, IL-32 遺伝子の exon5 を標的とすることで全てアイソフォームを欠損させた. その結果, 2 種類 (clone3, clone6) の IL-32 遺伝子欠損 HEK293T (IL-32 KO HEK293T) 細胞を樹立することができ, これらについて, 3pRNA 刺激による IL-32 の誘導が消失していることを確認した (図 6).

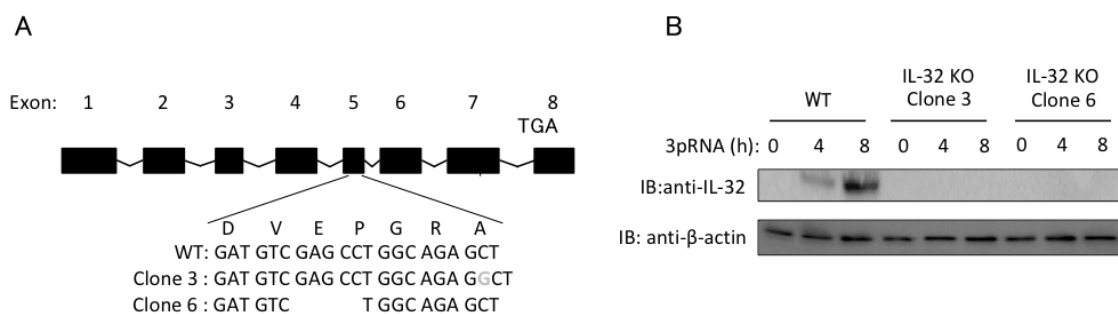


図 6. IL-32 遺伝子欠損細胞を作製した

A. IL-32 KO HEK293T (Clone3 or Clone6) 細胞の Genemap. B. WT HEK293T 細胞及び IL-32 KO HEK293T (Clone3 or Clone6) 細胞に 3pRNA 刺激し 4 時間後, 8 時間後の IL-32 をウェスタンブロットで解析した.

2-4. IL-32 遺伝子欠損細胞の 3pRNA 刺激時の IFN- β の発現誘導の検証

IL-32 KO HEK293 細胞において IL-32 の機能が欠如しているかについて確認した. 3pRNA 刺激にて IFN- β の産生が WT HEK293T 細胞と比較し著明に低下した. さらに, 6 種類あるアイソフォームをそれぞれについて解析をおこなった. IL-32 のアイソフォームを導入すると, 全てのアイソフォームで IFN- β の産生が増加し, IL-32 γ が最も IFN- β の産生が高かった (図 7 A, B). このことから, IL-32 KO HEK293T 細胞では IL-32 の自然免疫活性時における IFN- β を正に誘導する機能が欠如していることが示唆された. また, IL-32 の全てのアイソフォームが 3pRNA 刺激時に IFN- β 産生誘導を正に制御することが示唆された. さらに RIG-I シグナルの活性化による IFN- β の産生誘導にどれだけ影響するかについてその IFN- β に必須である転写因子 IRF-3 遺伝子欠損 (IRF-3 KO) した細胞と比較する事で検証した.

IL-32 KO (clone3) HEK293T と IRF-3 KO HEK293T における 3pRNA 刺激後 24 時間経過した培養上清の IFN- β の産生量を測定したところ, IRF-3 KO HEK293T ではその IFN- β

産生がほぼ完全に認められず、それと比較して IL-32 KO (clone3) KO HEK293T では 3 分の 1 程度の産生量であった。この結果より IL-32 は必須な役割を持つのではなく、それを補助する制御因子として作用する分子であることが示唆された。

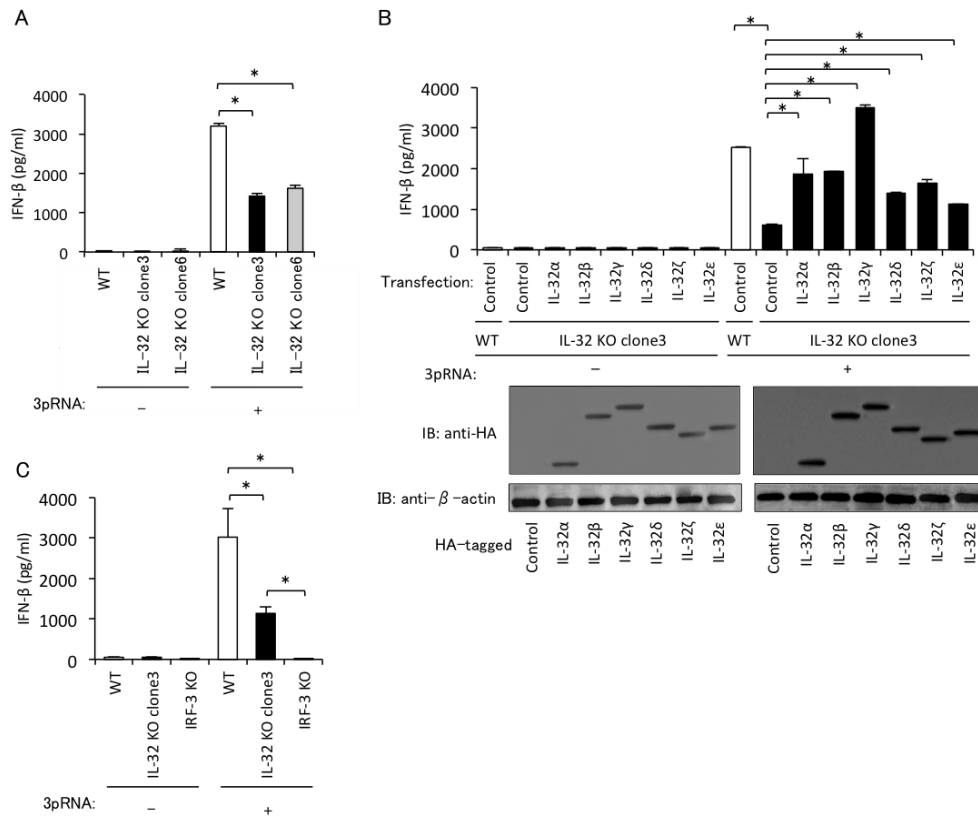


図 7. IL-32 KO HEK293T 細胞における 3pRNA 刺激時の IFN-β 誘導の低下が認められた

A. WT HEK293T 細胞及び IL-32 KO HEK293T (Clone3 or Clone6) 細胞を 3pRNA 刺激し 24 時間後の培養上清で IFN-β のタンパク量を ELISA で解析した. B. IL-32 KO HEK293T (Clone3) 細胞に control ベクターまたは HA タグ IL-32 (HA-IL-32) の各アイソフォーム (IL-32α, β, γ, δ, ζ, ε) のベクターを導入し, 3pRNA 刺激し 24 時間経過した細胞と培地を回収した. はじめに, 抗 HA 抗体を用いてウェスタンブロットで, HA-IL32 のアイソフォームの発現が全て均一であることを確認した (下図). その上で IFN-β のタンパク量を ELISA で解析した (上図). C. WT HEK293T 細胞, IL-32 KO clone3 HEK293T 細胞, IRF-3 KO HEK293T 細胞に 3pRNA 刺激し 24 時間後の培養上清を回収し, ELISA で IFN-β 量を比較した.

2-5. IL-32KO HEK293T 細胞の VSV 感染時の抗ウイルス応答の検証

次に, IL-32 が欠損することでウイルス感染時の抗ウイルス応答が低下するかを検証し

た. VSV 感染後 24 時間目の IL-32 KO HEK293T 細胞の培養上清で IFN- β 量を測定したところ, WT HEK293T 細胞と比べて IFN- β の産生誘導が著明に低下した. これまでの結果から IL-32 はウイルス感染時に IFN- β の産生誘導を正に制御することが示唆されてきたことから, IL-32 のアイソフォームを IL-32 KO HEK293T 細胞に発現させることで VSV 感染時における IFN- β の産生が回復するかを検証した. 6 種類の IL-32 のアイソフォームを導入し 48 時間経過した IL-32 KO HEK293T 細胞において, VSV 感染を行い 24 時間目の培養上清で IFN- β 量およびウイルス量を測定した. その結果, IL-32 の全てのアイソフォーム IFN- β 産生の回復が認められ, 特に IL-32 γ で産生量が高かった. さらにウイルス量を測定したところ, すべての IL-32 アイソフォームにおいてウイルス量の低下が認められた (図 8).

これらの結果から IL-32 の全てのアイソフォームは IFN- β を正に制御し, さらに RNA 及び DNA ウイルスに対し抗ウイルス効果を有することが示唆された.

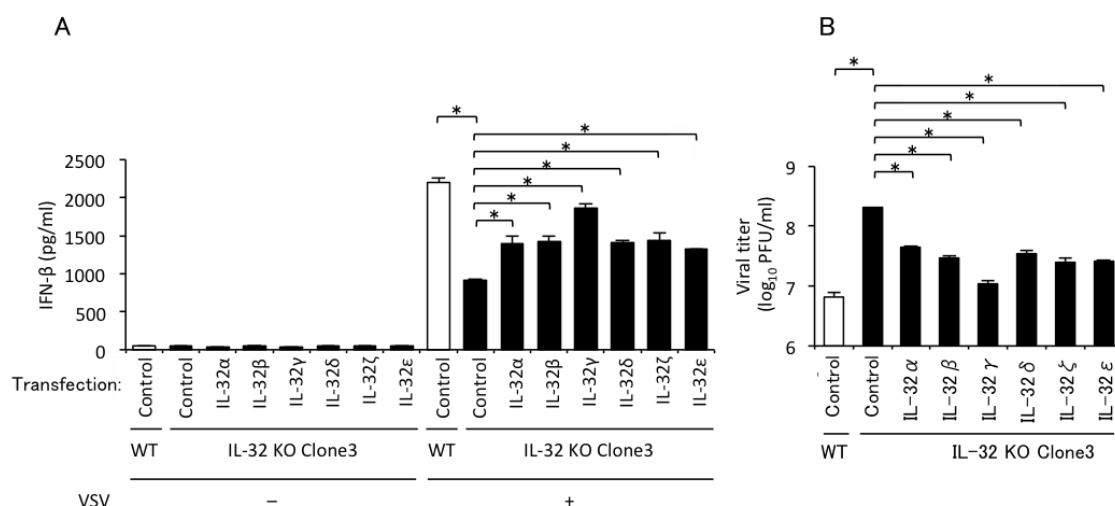


図 8. IL-32 KO HEK293T 細胞で VSV 感染時の抗ウイルス応答が低下する

A. WT HEK293T 細胞及び, control ベクターまたは HA tagged IL-32 の各アイソフォームのベクターを導入し 16 時間後の IL-32 KO HEK293T (Clone3) 細胞に VSV を感染させて 24 時間後の培養上清を用いて IFN- β のタンパク量を ELISA で解析した. B. 図 7 A で IFN- β の測定に使用した VSV のウイルス量をプラークアッセイで解析した.

3. IL-32 は IRF-3 の活性化に關与する

3-1. IL-32 ノックダウン HELF における 3pRNA, HT-DNA, cGAMP 刺激時の IFN- β 産生の検証

次に私は, 細胞内 RNA 刺激以外に, DNA や cGAMP 刺激時により活性化される自然

免疫経路に対して IL-32 がどのように関与しているかについて検証した。HEL F に RIG-I のリガンドである 3pRNA, cGAS のリガンドである HT-DNA, STING のリガンドである cGAMP を刺激したところ, どの刺激においても, IL-32 をノックダウンした HEL F の IFN- β の産生が低下した (図 9)。このことから IL-32 が RNA リガンドと DNA リガンドのどちらの刺激にも IFN 産生に関与したと考えられ, 自然免疫の RNA 認識と DNA 認識による IFN 産生に共通する経路である TBK1 または IRF-3 に関与していることが示唆された。

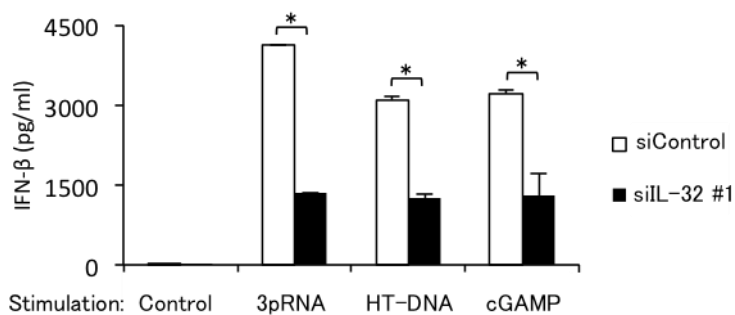


図 9. IL-32 ノックダウン細胞において核酸刺激すると IFN- β 産生誘導が低下する

siControl または siIL-32 #1 で処理し 48 時間経過後に, 3pRNA または HT-DNA または cGAMP による刺激をし 24 時間経過した HELF の細胞上清で IFN- β のタンパク量を ELISA で解析した。

3-2. TBK1 または IRF3 の活性化に対する IL-32 の関与について検証

そこで, TBK1 及び IRF-3 の活性化に IL-32 が関与しているかについて検証した。TBK1 を過剰発現させると *IFNBI* のプロモーターが活性化されるが, これが IL-32 KO HEK293T 細胞においては, WT HEK293T 細胞と比較し, 部分的に低下したが, 活性化 IRF-3 変異体 (IRF-3/5D) を過剰発現させてもプロモーターの活性は変わらなかった (図 10 A)。また, IL-32 をノックダウンした HELF においても類似した結果が得られた (図 10 B)。さらに, IL-32 の欠損では, 3pRNA 刺激により誘導される IRF-3 の活性化の指標である IRF-3 の S396 のリン酸化が低下したのに対し, TBK1 のキナーゼ活性の指標である TBK1 の S172 のリン酸化は変化しなかった (図 10 C, D)。

これらの結果より IL-32 は, TBK1 の活性化ではなく, TBK1 による IRF-3 のリン酸化過程に関与していることが示唆された。

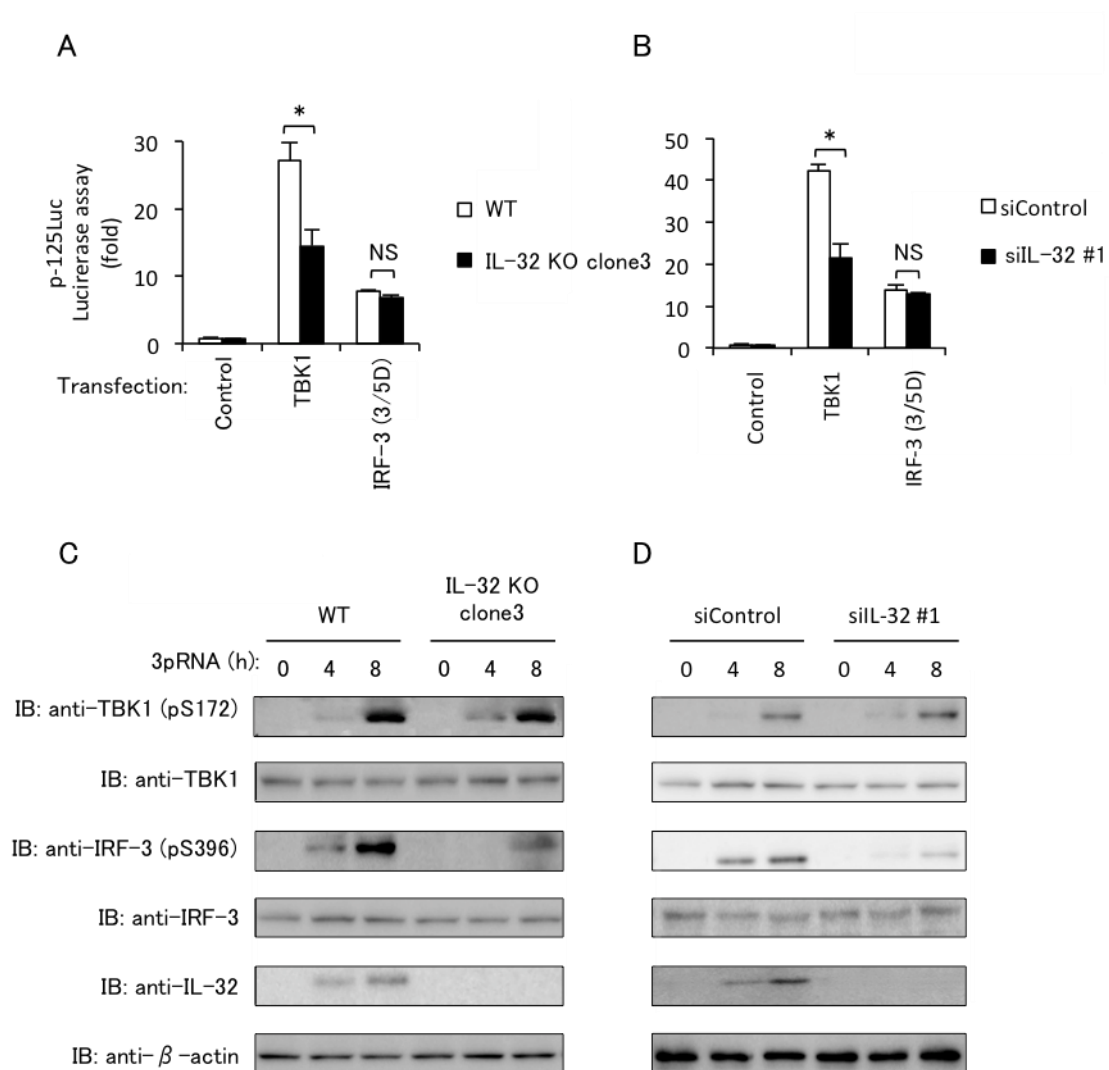


図 10. IL-32 欠損細胞に TBK1 を過剰発現させると IFN-β 転写活性が低下する

A. p-125Luc firefly ルシフェラーゼレポータープラスミドと TBK1 ベクターまたは IRF-3 (3/5D) ベクター導入し 24 時間後に WT HEK293T 細胞及び IL-32 KO HEK293T 細胞をルシフェラーゼアッセイで解析した. B. siControl または siIL-32 #1 処理し 48 時間経過した HELF を B. と同様にルシフェラーゼアッセイで解析した. C. 3pRNA 刺激後 4 時間, 8 時間の WT HEK293T 細胞及び IL-32 KO HEK293T 細胞のリン酸化 TBK1 (pS172) またはリン酸化 IRF-3 (pS396) をウェスタンブロットで解析した. D. siControl または siIL-32 #1 処理し 48 時間経過した HELF を C.と同様にウェスタンブロットで解析した.

4. IL-32 が IRF-3 と結合する

4-1. IL-32 の IRF-3 への結合を検証

IL-32 の TBK1 または IRF-3 への関連性をより詳細に調べるために, IL-32 と TBK1 及び IRF-3 の結合性について検証した. HA-tagged IL-32 γ を導入した HEK293T 細胞に, Flag-tagged MAVS, Flag-tagged TBK1, Flag-tagged IRF-3 を導入したところ, IL-32 γ と IRF-3 との会合を認めた (図 11 A). このような過剰発現系の結果に加え, 内因性のタンパク質に対しても検討をおこなった. その結果, 内因性 IRF-3 が 3pRNA 刺激初期より誘導される内因性 IL-32 と会合していることが示された (図 11 B). 私はさらに, IL-32 と IRF-3 が直接結合するかについて検証した. リコンビナント IL-32 γ とリコンビナント IRF-3 を混合し抗 IRF-3 抗体で免疫沈降すると IL-32 がウェスタンブロットで検出された (図 11 C 左). 一方, 抗 TBK1 抗体で免疫沈降しても IL-32 は検出されなかった (図 11C 右). この場合, 3pRNA は含まれていないことから, IL-32 は, リガンドとは無関係に, 直接 IRF-3 と会合するものと推察される.

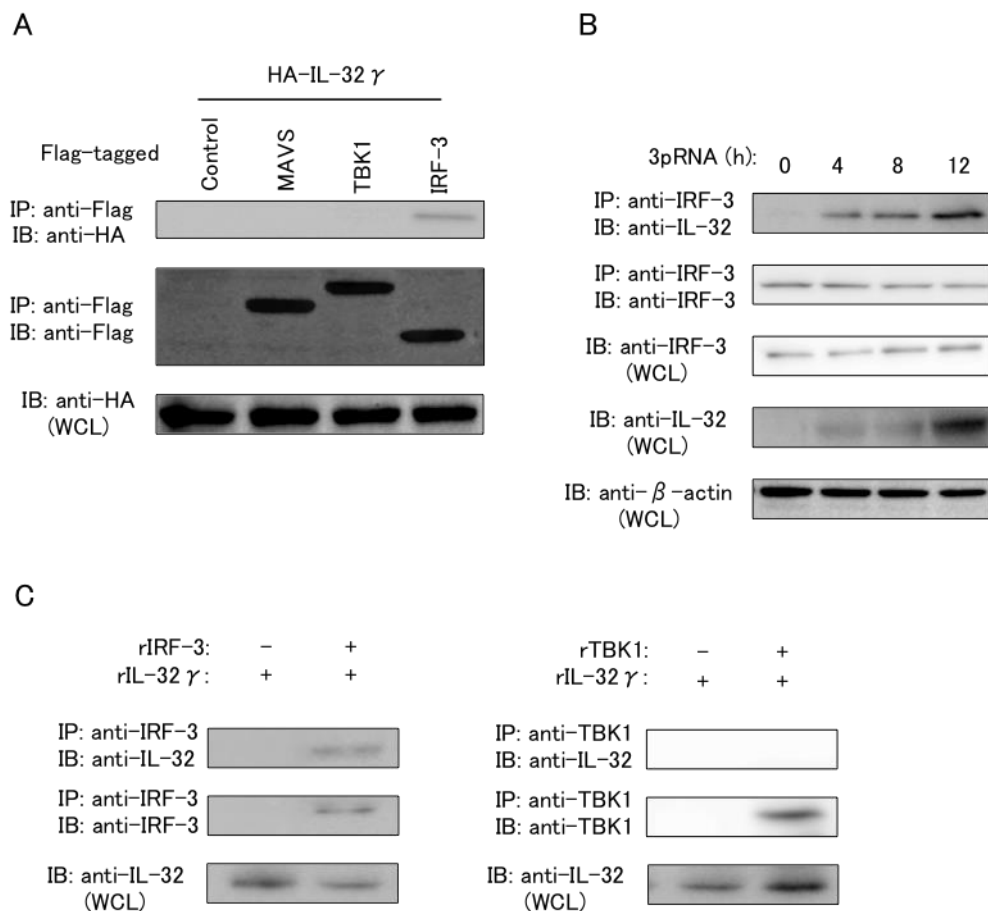


図 11. IL-32 γ が IRF-3 と会合した

A. IL-32 KO (clone3) HEK293T 細胞に HA-IL-32 γ ベクターと同時に Flag-MAVS ベクターまたは

Flag-TBK1 ベクター または Flag-IRF-3 を導入し 24 時間経過した細胞を回収し、抗 Flag 抗体で免疫沈降し、抗 HA 抗体でウェスタンブロットした。(WCL, whole cell lysate) B. 3pRNA 刺激し 4, 8, 12 時間後の WT HEK293T 細胞を回収し、抗 IRF-3 抗体で免疫沈降し、抗 IL-32 抗体でウェスタンブロットした。C. 3pRNA 刺激し 4, 8, 12 時間後の WT HEK293T 細胞を抗 IRF-3 抗体で免疫沈降し、抗 IL-32 抗体でウェスタンブロットした。

4-2. 細胞内における IL-32 と IRF-3 の局在を検証

これまでのウェスタンブロットや免疫沈降法を用いて行なった実験の結果から IL-32 が IRF-3 と直接結合することが示唆された。しかし、これらの実験で使用される試薬は生体内では存在しないものも多く、実際の細胞内の環境を再現することは非常に困難なである。そこで私は共局在分析を用いることにより細胞内において IRF-3 と IL-32 が結合しているかについて確認することを試みた。共焦点顕微鏡にて 3pRNA 刺激前後の HELF で mCherry-tagged IL-32 γ と内因性 IRF-3 が細胞質内で共局在していることが認められた (図 12)。この結果より IL-32 は細胞質内で IRF-3 と結合していることが示唆された。一方、興味深いことに、IRF-3 は核移行するのに対し、IL-32 は、IRF-3 のように核移行しないという動態の乖離もみとめられた。

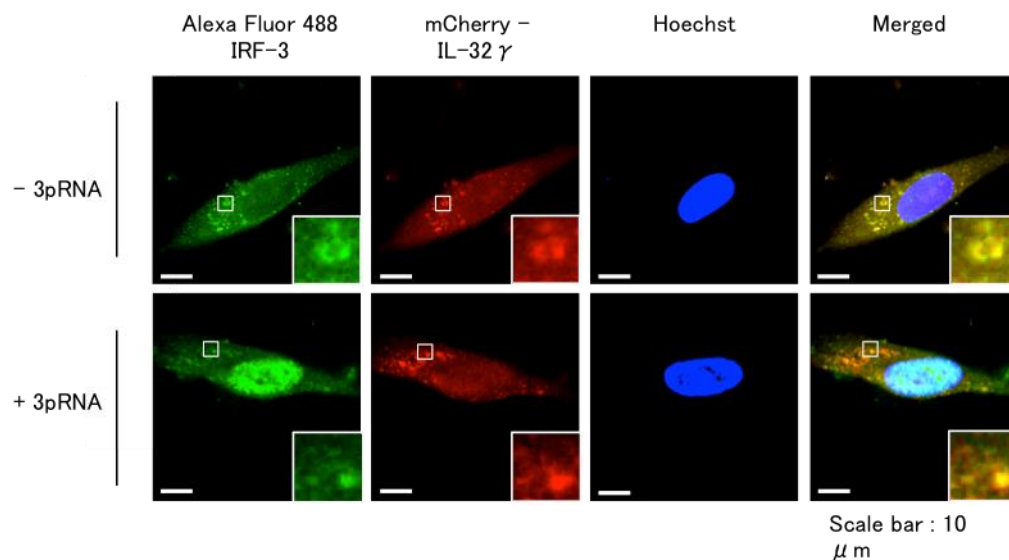


図 12. 細胞内での IL-32 γ と IRF-3 の共局在が認められた

3pRNA 刺激前 (-) と刺激後 4 時間 (+) の HELF における mCherry-tagged IL-32 γ と内因性 IRF-3 (Alexa Fluor 488) との共局在を共焦点顕微鏡で観察した。核は Hoechst33342 にて染色。Scale bar: 10 μ m.

4-3. 細胞外の IL-32 の刺激がウイルス感染時の IFN 誘導に関係しない事を検証

ウイルス感染時の IFN 産生が, IL-32 の細胞外からの刺激ではなく, 細胞内に局在する IL-32 によって誘導していることを確認するため, VSV 感染後 1 時間経過した HEK293T 細胞に rIL-32 γ を 1, 5, 25 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で刺激し, 24 時間後に回収した培地を用いて IFN- β の産生誘導を測定したが, rIL-32 に影響しなかった (図 13). これらの結果よりウイルス感染時の IFN 産生誘導は細胞内に局在する IL-32 が制御していることが示唆された.

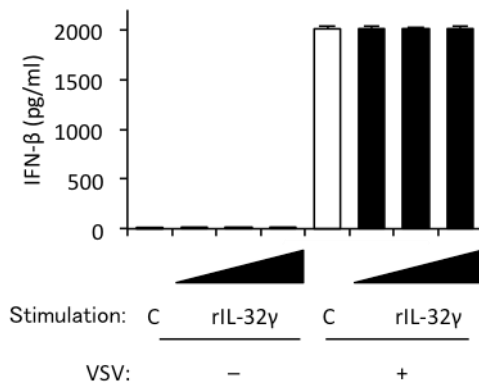


図 13. VSV 感染させた WT HEK293T へ rIL-32 γ 刺激しても IFN- β 産生誘導に変化はない

VSV 感染後 1 時間経過した WT HEK293T 細胞に 1, 5, 25 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で rIL-32 γ を刺激し, 刺激後 24 時間経過した後の培養上清を回収し IFN- β のタンパク量を ELISA で解析した.

5. IL-32 は IRF-3 と TBK1 の会合を促進させる

5-1. IRF-3 と IL-32 の結合領域を決定

これまでの結果より, IL-32 がウイルス感染時に IFN- β を正に制御していることと, IL-32 が IRF-3 に結合することが判明した. そこで, IL-32 と IRF-3 の結合が IFN 誘導に関与するかについて検証した. 最初に, IRF-3 側の IL-32 に対する結合領域を明らかにするため, 私は IRF-3 の欠損変異体を 4 種類作製し IL-32 γ との結合性を調べた. IRF-3 の serine-rich region (SRR), IRF association domain (IAD), pattern-recognition receptors (PRR) の領域が欠損した変異体は IL-32 γ との結合が認められたが, DNA binding domain (DBD) 領域が欠損した変異体は結合しなかった (図 14 A). このことから IRF-3 の DBD 領域が IL-32 との結合に必要であることが示唆された. 次に IL-32 側の IRF-3 に対する結合領域を明らかにすることを試みた. IL-32 の全てのアイソフォームは IRF-3 への結合を認めたため (図 14 B), 全てのアイソフォームの共通する領域 (IL-32 γ のアミノ酸 86-234 領域) が IRF-3 との結合に必要であることが示唆された. そこで, IL-32 γ の欠損変異体, N-IL-32 γ (アミノ酸 1-85) 及び C-IL-32 γ (アミノ酸 86-234) の 2 種類作製し IRF-3 との結合を検証した (図 14 C). 内因性 IRF-3 が HA tagged C-IL-32 γ と共沈したが, N-IL-32 γ では認め

られなかったことから、IL-32 γ の C 末領域が IRF-3 との結合に必要であることが示唆された。

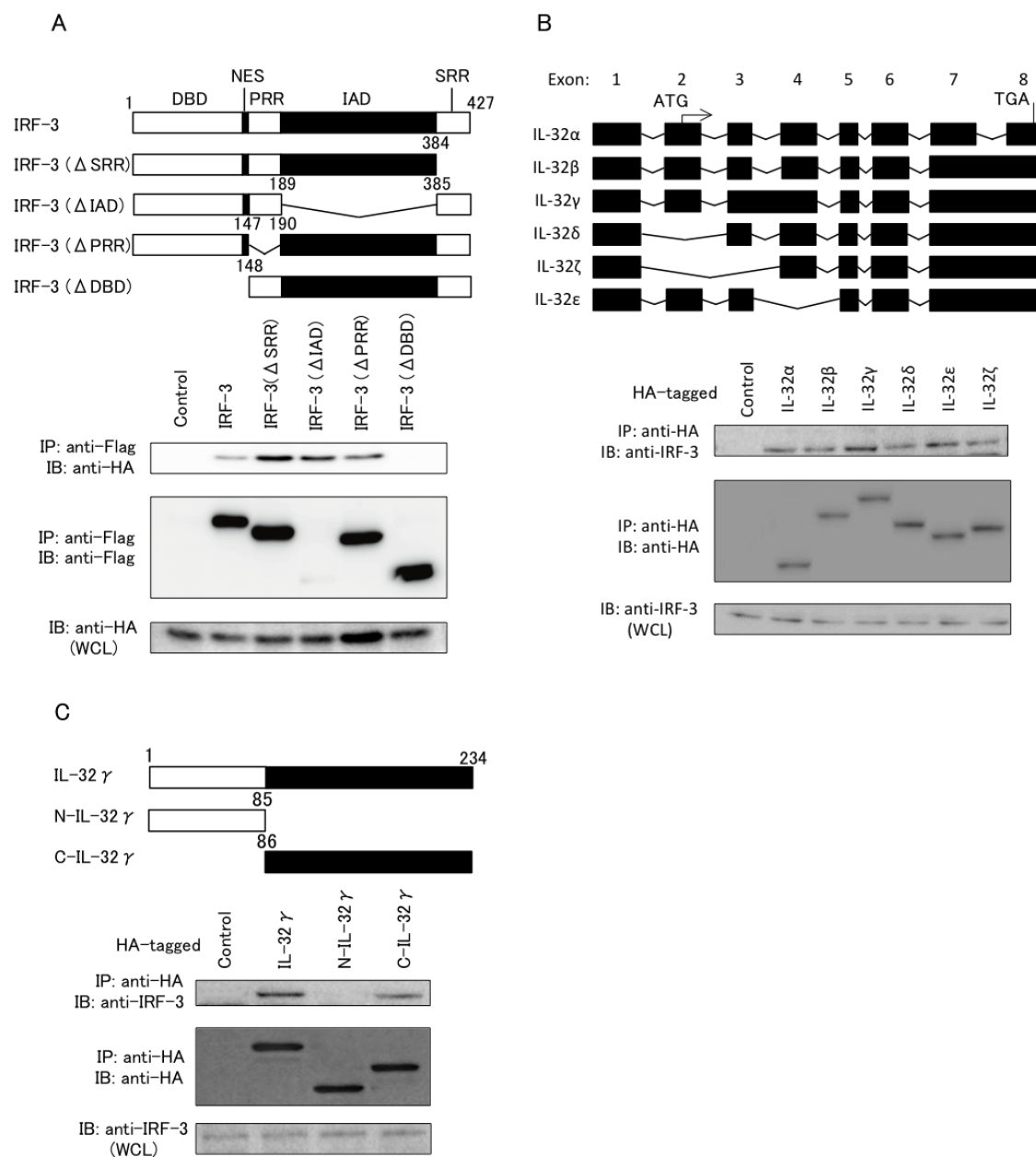


図 14. IRF-3 と IL-32 との結合領域の同定

A. HEK293T 細胞に HA-IL-32 γ ベクター と Flag-IRF-3 ベクター またはその変異体 (上図) を導入し抗 Flag 抗体で免疫沈降し, 抗 HA 抗体でウェスタンブロットした (下図). SRR, serine rich region; IAD, interferon regulatory factor (IRF) association domain; PRR, pattern recognition receptor; DBD, DNA binding domain. B. IL-32 KO (clone3) HEK293T 細胞に HA-IL-32 ベクター のアイソタ

イプ (上図) を導入し抗 HA 抗体で免疫沈降し, 抗 IRF-3 抗体でウェスタンブロットした (下図).
C. IL-32 KO (clone3) HEK293T 細胞に HA-IL-32 γ ベクター 及びその変異体 (上図) を導入し抗 HA 抗体で免疫沈降し, 抗 IRF-3 抗体でウェスタンブロットした (下図).

5-2. IRF-3 と IL-32 の結合による自然免疫応答の活性化を検証

IRF-3 と IL-32 の結合領域が判明したため, この IRF-3 と IL-32 との結合が IFN の誘導を促すのに必要であるかをさらに検証した. IL-32 KO HEK293T 細胞に N-IL-32 γ または C-IL-32 γ を導入すると, VSV 感染または 3pRNA 刺激時に IL-32 欠損により低下した IFN 産生が N-IL-32 を導入することにより回復したが, C-IL-32 γ では回復しなかった(図 15 A, B). この結果に一致して, ウイルス量は C-IL-32 γ を導入することで低下したが, N-IL-32 γ では変わらなかった(図 15 C). このことから, IL-32 の機能発現には, IRF-3 の結合が重要であることが示唆された.

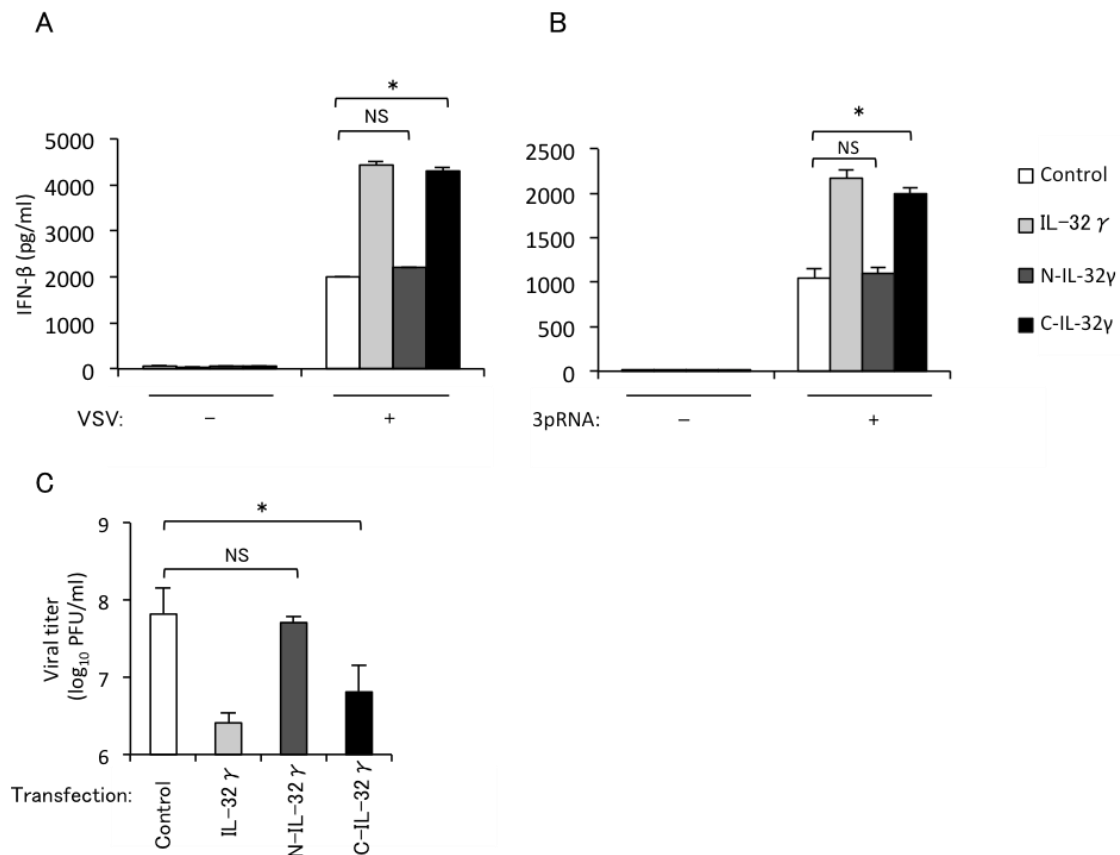


図 15. IL-32 の機能発現には, IRF-3 の結合が重要

A. HA-IL-32 γ ベクター 及びその変異体を導入した IL-32 KO (clone3) HEK293T 細胞に VSV 感染し, 24 時間後の IFN- β のタンパク量を ELISA で解析した. B. HA-IL-32 γ ベクター 及びその変異体を導入した IL-32 KO (clone3) HEK293T 細胞に 3pRNA 刺激し, 24 時間後の IFN- β のタンパク量を ELISA で解析した. C. HA-IL-32 γ ベクター 及びその変異体を導入した IL-32 KO (clone3)

HEK293T 細胞に VSV 感染し 24 時間後のウイルス量をプラークアッセイで解析した.

5-3. IRF-3 と IL-32 の結合により TBK1-IRF-3 の会合が促進されるかを検証

これらの結果より IL-32 の IRF-3 への結合がウイルス感染時の効率良い IFN 応答に必要であることが示唆された. さらにこの結合による IFN 応答増強のメカニズムの詳細について検討した. 図 10 より IL-32 は TBK1 よりも下流であるが IRF-3 の TBK1 によるリン酸化よりも前の段階で関与していることが予想されたため, TBK1 と IRF-3 の会合に関与していると考えた. 実際, 3pRNA 刺激により誘導される IRF-3 と TBK1 の会合は IL-32 を欠損することで顕著に低下したが WT-IL-32 γ または C-IL-32 γ の発現することで会合が回復した. 一方で N-IL-32 γ を導入しても TBK1 と IRF-3 の会合は回復しなかった (図 16). これらの結果より IL-32 は IRF-3 と結合し TBK1-IRF-3 の会合を促し, ウイルス感染時における自然免疫経路を正に制御することが示唆された.

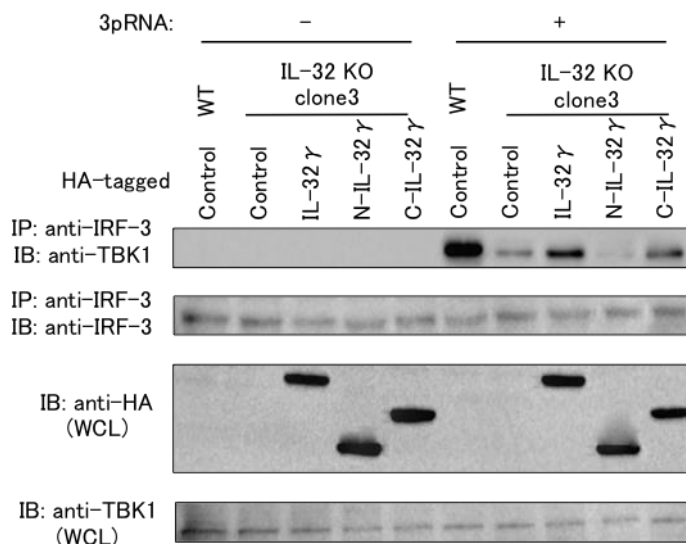


図 16. IL-32 と IRF-3 の結合により TBK1-IRF-3 の会合が促進された

3pRNA 刺激前 (-) 及び刺激後 8 時間 (+) の WT HEK293T 細胞及び HA-IL-32 γ ベクター 及び その変異体を導入した IL-32 KO (clone3) HEK293T 細胞を抗 IRF-3 抗体で免疫沈降し, 抗 TBK1 抗体でウェスタンブロットした.

考察

IL-32 は炎症誘発性のメディエーターで炎症性疾患、癌そしてウイルス感染に関連していることが知られている。本研究では IL-32 が RNA 及び DNA ウイルス感染時における I 型, III 型 IFN の産生を正に制御すること、また、ウイルス感染により誘導された IL-32 は IRF-3 と結合し TBK1-IRF-3 の会合を促すことで IRF-3 のリン酸化を正に制御することを示した。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なかった。IRF-3 は I 型, III 型 IFN の転写に重要で、RIG-I, MDA5, cGAS, IFI16, DAI や TLR3, TLR4 などの PRR により活性化される (Yoneyama et al., 2004, Yoneyama et al., 2005, Sun et al., 2013, Chen et al., 2016, Kubota et al., 2008, Unterholzner et al., 2010, Takaoka et al., 2007, Alexopoulou et al., 2001). これらのセンサーが活性化されると、下流のアダプター分子である MAVS 及び STING が IRF-3 のリン酸化キナーゼである TBK1 と複合体を形成し、IRF-3 を活性化することにより IFN の転写を促す (Chan and Gack, 2016). 興味深いことに、核酸刺激時に、TBK1 が微小管に沿って移動することで、能動的に IRF-3 と会合しやすくなり、TBK1 と IRF-3 の複合体の形成が促進されるという報告がある (Seo et al., 2016, Chiang et al., 2014). IL-32 は微小管依存的な TBK1 の IRF-3 への移動に関与することで TBK1 と IRF-3 の会合を促している可能性がある。もう一つの可能性として、IL-32 が IRF-3 との複合体を形成することや、IRF-3 の形態を変化させることにより TBK1 への会合を促すことが予想される。実際、IRF-3 と結合し IRF-3 の活性化を促すレギュレーターはこれまでに多く知られている。これらのレギュレーターと IL-32 の関連性を検証することで、TBK1-IRF-3 の会合促進の詳細なメカニズムを知ることができるかもしれない (Lin et al., 2014, Yang et al., 2006, Zhang et al., 2014, Zhang et al., 2009, Prinarakis et al., 2008, Yang et al., 2009, Shi et al., 2010).

本研究では全ての IL-32 のアイソフォームが IRF-3 と結合し、ウイルス感染時の IFN- β 産生を促進させた。このアイソフォームの中で、IL-32 γ が他のアイソフォームと比較すると僅かではあるが IRF-3 との結合が高かった (図 13 B). 興味深いことに、データベースで分析した結果、IL-32 γ には 4 つ casein kinase 2 によりリン酸化修飾を受ける候補部位を見出した (IL-32 γ のアミノ酸配列 34-37, 88-91, 149-152, 200-203). それ以外のアイソフォームにはこの部位が 3 つ以下であり、このようなタンパク質モチーフの数の差異が IRF-3 との結合における親和性に依存している可能性がある。今後は、IRF-3 と結合するタンパク質モチーフの同定や、IL-32 の IRF-3 への結合の強さが IL-32 を介した IFN

誘導に関連しているかについて検証することでアイソフォームのそれぞれの細胞内での詳細な役割が解明できるかもしれない。

マウスにおいて IL-32 に類似したタンパク質は未だ報告がないが、ヒト IL-32 を恒常的に発現させたトランスジェニックマウスによる *in vivo* の実験はこれまでに報告されてきた (Kim et al., 2014, Choi et al., 2010, Bai et al., 2015, Kobayashi et al., 2010). しかしながら、本研究では IL-32 は定常状態では発現されず、ウイルス感染後において発現が誘導された。このことから、今後、自然免疫経路における IL-32 の生理的な現象を *in vivo* で検証するためには、ウイルス感染時に IL-32 が一過性に発現できるトランスジェニックマウスの作製が必要となることが予想される。

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 (Damen et al., 2018, Niewold, 2014). 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 (Damen et al., 2018). 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。

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、ウイルス感染や癌、そして原因不明な IFN の産生障害の治療の一助になれることが期待できる。

結論

本研究全体から得られた新しい知見は下記の通りである。

- ・ IL-32 は自然免疫経路において IRF-3 と結合し、IRF-3 と TBK1 の会合を促すことにより IFN- β の産生誘導を正に制御する。

上記新知見の意義は2つある。

第1の意義は、自然免疫経路に関与する新たな因子を発見した事である。これまでに RIG-I、STING、TBK1、IRF-3 といった自然免疫における IFN 誘導に必要な分子が発見された。しかし、過剰な IFN の産生は人体に有害であり、IFN 産生の増減を管理し恒常性の維持に貢献する因子が必要とされる。これまでに、ユビキチン化やリン酸化といった翻訳後修飾により自然免疫経路を調節する因子は多数発見されている。しかし、この翻訳後修飾因子に比べ、分子同士を物理的に近接あるいは乖離させることで IFN の産生調節する因子の発見は少なく、そのメカニズムの解析が不十分であることが多い。本研究では IL-32 が、IRF-3 の TBK1 への会合を促す因子であることが示唆されている。これまでわからなかった、細胞質内での分子同士の会合のメカニズムが明らかにできる可能性がある。TBK1 が微小管に沿って移動することで、能動的に IRF-3 と会合しやすくなるという報告があることから今後は IL-32 と微小管の関連性について研究していきたい。

第2の意義は、IL-32 が様々なウイルスに対して抗ウイルス応答を有することである。IAVをはじめ、HIV-1、HBV などはこれまで各ウイルス特異的な治療薬が用いられてきた。しかし、臨床においては複数のウイルスに感染していることや、発見に時間がかかるウイルスに感染している患者も多数存在し、汎用性のある抗ウイルス薬の開発が期待される。IL-32 はウイルス感染時に IFN を誘導することで抗ウイルス応答に貢献するが、ウイルス感染していない細胞では IFN が誘導されない。細胞内の IL-32 の量を調節することができれば、ウイルスに感染した細胞でのみ IFN が発現されることが予想される。IFN 治療ではウイルスに感染していない細胞にまで IFN の影響が及ぶが、局所的に IFN が産生されれば副作用が少ない抗ウイルス薬が開発できる可能性がある。また、予防薬にも応用できることが期待される。本研究では4種類のウイルスを使用した。今後は麻疹ウイルス、水痘ウイルスといった他のウイルスでも IL-32 が抗ウイルス応答に関与

するかを研究していきたい.

謝辞

本論文は、著者が北海道大学大学院医学研究科 医学専攻 第一内科分野博士課程在学中の研究をまとめたものです. 本研究に関してご指導を頂きました第一内科今野哲准教授に心より感謝いたします. 本研究を行うにあたり, 指導委託をご快諾いただき, 全実験に関する知識と技術のご指導を頂きました北海道大学遺伝子病制御研究所分子生体防御分野の高岡晃教教授, 佐藤精一講師, 山田大翔助教, 現神戸大学大学院医学研究科生化学・分子生物学講座 シグナル統合学分野 病態シグナル学部門亀山武志特任助教に深い感謝の意を表します. これまでの研究課程において, 多くのご指導を賜りました北海道大学医学部第一内科分野, 遺伝子病制御研究所の諸先生とスタッフ, 研究にご助言・ご助力頂きました多くの皆様に心よりの感謝を申し上げます.

利益相反

開示すべき利益相反状態はない.^[1]

引用文献

Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* *413*, 732-738.

Bai, X., Shang, S., Henao-Tamayo, M., Basaraba, R.J., Ovrutsky, A.R., Matsuda, J.L., Takeda, K., Chan, M.M., Dakhama, A., Kinney, W.H., *et al.* (2015). Human IL-32 expression protects mice against a hypervirulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *112*, 5111-5116.

Chan, Y.K., and Gack, M.U. (2016). Viral evasion of intracellular DNA and RNA sensing. *Nature reviews Microbiology* *14*, 360-373.

Chen, Q., Sun, L., and Chen, Z.J. (2016). Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nature immunology* *17*, 1142-1149.

Chiang, H.S., Zhao, Y., Song, J.H., Liu, S., Wang, N., Terhorst, C., Sharpe, A.H., Basavappa, M., Jeffrey, K.L., and Reinecker, H.C. (2014). GEF-H1 controls microtubule-dependent sensing of nucleic acids for antiviral host defenses. *Nat Immunol* *15*, 63-71.

Choi, J., Bae, S., Hong, J., Ryoo, S., Jhun, H., Hong, K., Yoon, D., Lee, S., Her, E., Choi, W., *et al.* (2010). Paradoxical effects of constitutive human IL-32{gamma} in transgenic mice during experimental colitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 21082-21086.

Damen, M.S.M.A., Schraa, K., Tweehuysen, L., den Broeder, A.A., Netea, M.G., Popa, C.D., and Joosten, L.A.B. (2018). Genetic variant in IL-32 is associated with the ex vivo cytokine production of anti-TNF treated PBMCs from rheumatoid arthritis patients. *Scientific reports* *8*, 14050.

Dinarello, C.A., and Kim, S.-H. (2006). IL-32, a novel cytokine with a possible role in disease. *Annals of the rheumatic diseases* *65 Suppl 3*, iii61-64.

Heinhuis, B., Koenders, M.I., van Riel, P.L., van de Loo, F.A., Dinarello, C.A., Netea, M.G., van den Berg, W.B., and Joosten, L.A.B. (2011). Tumour necrosis factor alpha-driven IL-32 expression in rheumatoid arthritis synovial tissue amplifies an inflammatory cascade. *Annals of the Rheumatic Diseases* *70*, 660-667.

Joosten, L.A.B., Netea, M.G., Kim, S.-H., Yoon, D.-Y., Oppers-Walgreen, B., Radstake,

T.R.D., Barrera, P., van de Loo, F.A.J., Dinarello, C.A., and van den Berg, W.B. (2006). IL-32, a proinflammatory cytokine in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 3298-3303.

Kang, J.-W., Park, Y.S., Lee, D.H., Kim, J.-H., Kim, M.S., Bak, Y., Hong, J., and Yoon, D.-Y. (2012). Intracellular interaction of interleukin (IL)-32 α with protein kinase C ϵ (PKC ϵ) and STAT3 protein augments IL-6 production in THP-1 promonocytic cells. *The Journal of biological chemistry* *287*, 35556-35564.

Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K.J., *et al.* (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* *441*, 101-105.

Kay, J., and Calabrese, L. (2004). The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)* *43 Suppl 3*, iii2-iii9.

Kim, D.H., Park, E.-S., Lee, A.R., Park, S., Park, Y.K., Ahn, S.H., Kang, H.S., Won, J.H., Ha, Y.N., Jae, B., *et al.* (2018). Intracellular interleukin-32 γ mediates antiviral activity of cytokines against hepatitis B virus. *Nature communications* *9*, 3284.

Kim, S.-H., Han, S.-Y., Azam, T., Yoon, D.-Y., and Dinarello, C.A. (2005). Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNF α . *Immunity* *22*, 131-142.

Kim, S.J., Lee, S., Kwak, A., Kim, E., Jo, S., Bae, S., Lee, Y., Ryoo, S., Choi, J., and Kim, S. (2014). Interleukin-32 γ transgenic mice resist LPS-mediated septic shock. *J Microbiol Biotechnol* *24*, 1133-1142.

Kobayashi, H., Huang, J., Ye, F., Shyr, Y., Blackwell, T.S., and Lin, P.C. (2010). Interleukin-32 β propagates vascular inflammation and exacerbates sepsis in a mouse model. *PloS one* *5*, e9458.

Kubota, T., Matsuoka, M., Chang, T.-H., Tailor, P., Sasaki, T., Tashiro, M., Kato, A., and Ozato, K. (2008). Virus infection triggers SUMOylation of IRF3 and IRF7, leading to the negative regulation of type I interferon gene expression. *The Journal of biological chemistry* *283*, 25660-25670.

Li, D., Chen, D., Zhang, X., Wang, H., Song, Z., Xu, W., He, Y., Yin, Y., and Cao, J. (2015). c-Jun N-terminal kinase and Akt signalling pathways regulating tumour necrosis factor- α -induced interleukin-32 expression in human lung fibroblasts: implications in airway inflammation. *Immunology* *144*, 282-290.

Li, W., Liu, Y., Mukhtar, M.M., Gong, R., Pan, Y., Rasool, S.T., Gao, Y., Kang, L., Hao, Q., Peng, G., *et al.* (2008). Activation of interleukin-32 pro-inflammatory pathway in

response to influenza A virus infection. *PloS one* *3*, e1985.

Lin, L., Pan, S., Zhao, J., Liu, C., Wang, P., Fu, L., Xu, X., Jin, M., and Zhang, A. (2014). HSPD1 interacts with IRF3 to facilitate interferon-beta induction. *PloS one* *9*, e114874.

Netea, M.G., Azam, T., Lewis, E.C., Joosten, L.A.B., Wang, M., Langenberg, D., Meng, X., Chan, E.D., Yoon, D.-Y., Ottenhoff, T., *et al.* (2006). Mycobacterium tuberculosis induces interleukin-32 production through a caspase-1/IL-18/interferon-gamma-dependent mechanism. *PLoS medicine* *3*, e277.

Niewold, T.B. (2014). Type I interferon in human autoimmunity. *Frontiers in immunology* *5*, 306.

Nishida, A., Andoh, A., Shioya, M., Kim-Mitsuyama, S., Takayanagi, A., and Fujiyama, Y. (2008). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling mediates interleukin-32alpha induction in human pancreatic periacinar myofibroblasts. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* *294*, G831-838.

Nold, M.F., Nold-Petry, C.A., Pott, G.B., Zepp, J.A., Saavedra, M.T., Kim, S.-H., and Dinarello, C.A. (2008). Endogenous IL-32 controls cytokine and HIV-1 production. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* *181*, 557-565.

Ota, K., Kawaguchi, M., Fujita, J., Kokubu, F., Huang, S.K., Morishima, Y., Matsukura, S., Kurokawa, M., Ishii, Y., Satoh, H., *et al.* (2015). Synthetic double-stranded RNA induces interleukin-32 in bronchial epithelial cells. *Exp Lung Res* *41*, 335-343.

Prinarakis, E., Chantzoura, E., Thanos, D., and Spyrou, G. (2008). S-glutathionylation of IRF3 regulates IRF3-CBP interaction and activation of the IFN beta pathway. *The EMBO journal* *27*, 865-875.

Sato, S., Li, K., Kameyama, T., Hayashi, T., Ishida, Y., Murakami, S., Watanabe, T., Iijima, S., Sakurai, Y., Watashi, K., *et al.* (2015). The RNA sensor RIG-I dually functions as an innate sensor and direct antiviral factor for hepatitis B virus. *Immunity* *42*, 123-132.

Seo, M., Lee, S.O., Kim, J.H., Hong, Y., Kim, S., Kim, Y., Min, D.H., Kong, Y.Y., Shin, J., and Ahn, K. (2016). MAP4-regulated dynein-dependent trafficking of BTN3A1 controls the TBK1-IRF3 signaling axis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *113*, 14390-14395.

Shi, H.-X., Yang, K., Liu, X., Liu, X.-Y., Wei, B., Shan, Y.-F., Zhu, L.-H., and Wang, C. (2010). Positive regulation of interferon regulatory factor 3 activation by Herc5 via

ISG15 modification. *Molecular and cellular biology* *30*, 2424-2436.

Shioya, M., Nishida, A., Yagi, Y., Ogawa, A., Tsujikawa, T., Kim-Mitsuyama, S., Takayanagi, A., Shimizu, N., Fujiyama, Y., and Andoh, A. (2007). Epithelial overexpression of interleukin-32alpha in inflammatory bowel disease. *Clinical and experimental immunology* *149*, 480-486.

Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X., and Chen, Z.J. (2013). Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science (New York, NY)* *339*, 786-791.

Takaoka, A., Wang, Z., Choi, M.K., Yanai, H., Negishi, H., Ban, T., Lu, Y., Miyagishi, M., Kodama, T., Honda, K., *et al.* (2007). DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* *448*, 501-505.

Unterholzner, L., Keating, S.E., Baran, M., Horan, K.A., Jensen, S.B., Sharma, S., Sirois, C.M., Jin, T., Latz, E., Xiao, T.S., *et al.* (2010). IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nature immunology* *11*, 997-1004.

Watashi, K., Liang, G., Iwamoto, M., Marusawa, H., Uchida, N., Daito, T., Kitamura, K., Muramatsu, M., Ohashi, H., Kiyohara, T., *et al.* (2013). Interleukin-1 and tumor necrosis factor- α trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase activation-induced cytidine deaminase (AID). *The Journal of biological chemistry* *288*, 31715-31727.

Yamada, T., Horimoto, H., Kameyama, T., Hayakawa, S., Yamato, H., Dazai, M., Takada, A., Kida, H., Bott, D., Zhou, A.C., *et al.* (2016). Constitutive aryl hydrocarbon receptor signaling constrains type I interferon-mediated antiviral innate defense. *Nature immunology* *17*, 687-694.

Yang, K., Shi, H., Qi, R., Sun, S., Tang, Y., Zhang, B., and Wang, C. (2006). Hsp90 regulates activation of interferon regulatory factor 3 and TBK-1 stabilization in Sendai virus-infected cells. *Molecular biology of the cell* *17*, 1461-1471.

Yang, K., Shi, H.-X., Liu, X.-Y., Shan, Y.-F., Wei, B., Chen, S., and Wang, C. (2009). TRIM21 is essential to sustain IFN regulatory factor 3 activation during antiviral response. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* *182*, 3782-3792.

Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y.-M., Gale, M., Akira, S., *et al.* (2005). Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* *175*, 2851-2858.

- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., and Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature immunology* *5*, 730-737.
- Zhang, B., Li, M., Chen, L., Yang, K., Shan, Y., Zhu, L., Sun, S., Li, L., and Wang, C. (2009). The TAK1-JNK cascade is required for IRF3 function in the innate immune response. *Cell research* *19*, 412-428.
- Zhang, J., Hu, M.-M., Shu, H.-B., and Li, S. (2014). Death-associated protein kinase 1 is an IRF3/7-interacting protein that is involved in the cellular antiviral immune response. *Cellular & molecular immunology* *11*, 245-252.
- Zhou, Y., and Zhu, Y. (2015). Important Role of the IL-32 Inflammatory Network in the Host Response against Viral Infection. *Viruses* *7*, 3116-3129.
- Zhu, T., Zhang, L., Ling, S., Duan, J., Qian, F., Li, Y., and Xu, J.-W. (2014). Scropolioside B inhibits IL-1 β and cytokines expression through NF- κ B and inflammasome NLRP3 pathways. *Mediators of inflammation* *2014*, 819053.