



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ウイルス感染における新規自然免疫核酸センサーシグナル機構の解明と感染制御への応用 [全文の要約]
Author(s)	橋爪, 芽衣
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。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第14009号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78071
Type	doctoral thesis
File Information	Mei_HASHIZUME_summary.pdf



学 位 論 文 の 要 約

博士の専攻分野の名称 博士（理学） 氏名 橋爪 芽衣

学 位 論 文 題 名

ウイルス感染における新規自然免疫核酸センサーシグナル機構の解明と感染制御への応用

我々の体は常に感染症の危険にさらされており、特に、インフルエンザや SARS などのウイルス感染症はこれまで数多くの世界的流行を引き起こしている。しかしながら、多くのウイルス感染症は根本的な治療法は確立されておらず、現在の治療法は対処療法がほとんどである。一方、生体内でウイルスや細菌などの病原微生物の増殖や病気の発症を防いでいるのが免疫システムである。なかでも自然免疫系は微生物の感染初期にその侵入を感知し、インターフェロン（IFN）やサイトカインの誘導を介して生体防御機構を活性化することで、体内からの病原微生物の排除に働く。現在までに数多くのパターン認識受容体とその下流シグナル経路が同定されており、このような自然免疫シグナルの宿主細胞における調節因子や翻訳後修飾等も多数報告されている。さらに、ウイルス側にも抗ウイルス自然免疫応答を回避する分子機構が存在していることも明らかとなっている。

まず、第1章では学位論文研究の総括的な序章と研究目的について述べ、著者は自然免疫応答に関与する分子を標的とした抗ウイルス生体防御機構の活性化によるウイルス感染の制御を目的とし、実際に細胞および個体レベルでのウイルス感染に対する宿主の自然免疫応答の新規分子機構を調べた。

次に、第2章（流行性角結膜炎起因ヒトアデノウイルス感染症の自然免疫応答による感染制御ならびに不活化剤の評価）では、日本だけでなく世界中で流行性角結膜炎（EKC）を引き起こし、その強い接触感染力による院内感染や集団感染が社会問題となっているにも関わらず、治療法や予防法が確立されていないDNAウイルス、ヒトアデノウイルスD種（HAdV-D）に着目した。本章では、HAdV-Dの感染制御を目指し、EKC起因HAdV感染における自然免疫活性化の標的分子を探索するために、自然免疫応答シグナル機構を明らかとした。さらに、感染を予防することによる感染制御のために、ペルオキシ-硫酸水素カリウム配合剤のHAdV-Dに対する不活化効果を検討した。まず、HAdV-Dの初感染組織である、ヒト結膜上皮細胞におけるHAdV感染に対する自然免疫応答のプロファイルを解析したところ、III型IFNであるIFN- λ 1が、I型IFNやその他のサイトカインと比較して、優位に誘導されていることが明らかとなった。更にその誘導シグナル経路をsmall interfering RNA（siRNA）によるノックダウン（KD）系を用いて調べたところ、細胞質DNAセンサーcGAS（cyclic GMP-AMP synthase）とその下流に位置するアダプター分子であるSTING（stimula

tor of interferon genes) を介してIFNが誘導されていることがわかった。これまで多くの不死化細胞においてIFNはHAdVに対して抗ウイルス作用を発揮しないことが報告されていた。しかしながら実際に初代ヒト結膜上皮細胞を用いてIFNがHAdV感染を制御できないのか検討したところ、IFN処理したヒト結膜上皮細胞ではHAdVのDNAコピー数が抑制され、ヒト結膜上皮細胞においてはIFNが抗ウイルス免疫を活性化させることがわかった。一方で、同じ細胞においても、cGASやRIG-Iのリガンドである、HT-DNAまたは3pRNA刺激に対しては、I型IFNとIII型IFNを同程度誘導していた。このことから、ヒト結膜上皮細胞におけるHAdV-D感染では、何らかのウイルス因子がI型IFNの発現誘導を抑制している可能性が示唆された。初代ヒト結膜上皮細胞を用いることによって、I型とIII型両方のIFNがHAdV-Dに対して抗ウイルス作用を示すことが確認されたため、I型IFNを抑制している機構を明らかとし、それを阻害することで更なる生体防御の活性化が期待できる。また、ウイルスタンパク質の一つであるCR1 β がIFN誘導を増強していることも明らかとなり、このタンパク質を標的とした抗ウイルス治療への応用も期待できる。最後に、HAdV-Dの予防に有効とされる次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) の問題点を解決した、ペルオキソ一硫酸水素カリウム (KHSO₅) 配合剤のHAdV-Dに対する不活化効果を検討した結果、4 Log以上のウイルスDNAコピー数を減少させ、十分な不活化効果を示した。ペルオキソ一硫酸水素カリウム配合剤の利便性を考慮すると、この結果は特に眼科領域における院内感染の予防に非常に有用であることを示唆している。以上の結果より本研究では、HAdV-D感染の制御、予防面で新たな知見をもたらした。

第3章（自然免疫センサー分子の細胞外シグナルを認識する新たな抗ウイルス免疫機構の解明）では、生体内でのウイルス感染に対する自然免疫活性化機構について検討した。細胞質DNAセンサーであるcGASは、DNAウイルスや細菌由来のDNAを認識することによって活性化され、環状ジヌクレオチド (CDNs) であるcGAMPを産生し、そのcGAMPを細胞内小胞体 (ER) においてSTINGが感知し、下流の分子を活性化することでIFNが誘導され、生体防御機構が働くことが考えられている。cGAMPは、特にDNAウイルス感染において重要な自然免疫活性化低分子である。これまでの報告で、細胞外のcGAMPがSTINGを介した自然免疫応答を活性化していることが示唆されているが、その詳細なメカニズムはほとんど明らかにされていない。本章では、細胞外のcGAMPによる自然免疫活性化機構に着目して、実際のウイルス感染時の細胞外cGAMPの誘導性と、それを認識することで活性化される抗ウイルス免疫の詳細な機構を解明した。まず、マウスにおいて各種ウイルス感染時のcGAMPの産生を調べたところ、DNAウイルスだけでなくRNAウイルス感染においてもcGAS依存的にcGAMPが産生され、さらには、cGAMPが血中へと放出されていることが見出された。次に細胞外のcGAMPがどのようなメカニズムで下流のシグナルを活性化させているのかを明らかにするため、様々な細胞で細胞外cGAMPへの応答性ならびにその機序の解析を進めた。その結果、樹状細胞やマクロファージといったモノサイト系の細胞で、ER膜上のSTINGがリガンド結合領域であるC末端の一部を細胞外に表出させ、細胞外のセカンド

メッセンジャーであるcGAMP及びその他のCDNsを直接細胞表面上で検出していることが明らかとなった。さらに、Extendedシナプトタグミン (E-Syts) によるERと細胞膜のコンタクトサイトがERに存在するSTINGの細胞外への表出を可能としていることを見出した。実際に、マウスにおいて、細胞外に表出しているリガンド結合部位に対する中和抗体を処理すると、ウイルス感染の抑制が阻害された。加えて、cGAMP分解酵素の阻害剤(ARL67156)を用いることにより、細胞外のcGAMP濃度を上昇させると、マウスにおけるウイルス感染がより抑制された。このことから、生体内でのDNA及びRNAウイルス感染の両方で、細胞外へのcGAMPの放出と、それを感知し、自然免疫応答を活性化させる新規の機構が明らかとなった。STINGはガン免疫や自己免疫疾患にも関与していることが知られており、この新規機構を利用したSTINGシグナルの調節は自然免疫を基軸とした感染、ガン制御、さらにはその活性化により引き起こされる自己免疫疾患等に対する新規の治療への応用へとつながることも期待される。

第4章では本研究の結論について述べた。

本研究では、これまで治療法や予防法のなかった EKC 起因の HAdV-D、その他の DNA 及び RNA ウイルス感染時の宿主における自然免疫活性化の新規機構を明らかとし、新たな治療戦略を提案した。さらに、細胞質内タンパク質の細胞外への表出という、これまでになかった分子の発現パターンを示した。このようなユニークなタンパク質動態を取ることで、細胞外とのコミュニケーションが可能となり、これが細胞小器官膜上タンパク質の機能や動態の多様性をもたらし、細胞生物学的な側面から新しい局面を開拓することにつながると考えている。