



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
Author(s)	橋爪, 芽衣
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第14009号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14009
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94459
Type	doctoral thesis
File Information	Mei_HASHIZUME.pdf



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

北海道大学大学院総合化学院 総合化学専攻 生物化学コース

分子医化学講座 分子生体防御研究室

橋爪 芽衣

2020

要旨

冬季に流行するインフルエンザなど、我々ヒトの体は日々様々な感染症の危険に曝されている。ウイルス感染症は現在まで数多くのパンデミックを引き起こし、多くの死者を出しているにもかかわらず、その治療法の多くは対処療法のみで根本的な治療法の見つかっていない感染症がほとんどである。一方、生体内で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感染初期に微生物の侵入を感知し、インターフェロン(IFN, 以下 IFN と記す) やサイトカインの誘導等を介し活性化されることで、体内からの病原微生物の排除に重要な役割を果たす。これまでに数多くの細胞質内で微生物由来核酸を認識する自然免疫核酸センサーが同定され、その細胞内局在や下流のシグナル経路、調節因子、翻訳後修飾等が報告されており、これらの分子を標的とした抗ウイルス薬の開発などが期待される。

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、著者は宿主のウイルス防御メカニズムを明らかにすることによるウイルス感染の制御を目指し、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、日本においてしばしば重症な眼感染症を引き起こし、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) に対する自然免疫応答の解析を行った。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 (stimulator of interferon genes) を介して IFN が誘導されていることがわかった。これまで多くの不活化細胞において 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ヒト結膜上皮細胞において誘導された 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ウイルス量の抑制が見られた。更に、ウイルスタンパク質のひとつである CR1 β が IFN の誘導を増強することでウイルス複製を抑制していることも確認された。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。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。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 に局在している cGAMP のセンサー STING が、細胞膜を突き抜けて細胞外へとリガンド結合領域を表出させ、細胞外の cGAMP を認識していることが明らかとなった。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。

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 HAdV やその他のウイルスに対して、新たな治療戦略を提案するだけでなく、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も明らかとした。さらに、細胞質内タンパク質の細胞外への表出という、これまでにない分子の発現パターンを示した。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。

目次

図目次.....	4
表目次.....	6
略語	7
第 1 章 序章.....	9
1 ウイルス感染に対する自然免疫応答	9
2 STING の構造と機能.....	10
3 アデノウイルス	11
3.1 アデノウイルスの構造	11
3.2 ヒトアデノウイルス (HAdV) のゲノム構造	13
3.3 アデノウイルスの分類	13
4 本研究の目的.....	14
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	15
1 背景.....	15
2 材料と方法	18
2.1 細胞.....	18
2.2 消毒薬	18
2.3 ウイルス	18
2.4 ウイルス精製	18
2.5 ウイルス感染	19
2.6 HAdV 増殖試験	19
2.7 定量 Real-time PCR 法	19
2.8 ELISA	19
2.9 siRNA による遺伝子ノックダウン	19
2.10 HAdV の DNA コピー数の定量	19
2.11 IFN の抗ウイルス作用評価	20
2.12 A549 細胞増殖試験.....	20
2.13 ウイルス不活化効果判定試験.....	20
2.14 ウイルス不活化効果判定法	20
2.15 データ解析.....	20
3 結果.....	21
3.1 ヒト結膜上皮細胞では HAdV-D37 感染でⅢ型 IFN が優位に誘導される	21

3.2	HAdV-D37 感染では cGAS-STING 経路を介して IFN を産生する	23
3.3	ヒト結膜上皮細胞において IFN は抗ウイルス作用を示す	24
3.4	CR1 β タンパク質は IFN の誘導を増強し、HAdV の複製を抑制する	25
3.5	ペルオキソー硫酸水素カリウム配合剤は HAdV-D 不活化効果を持つ	28
4	考察	31
4.1	EKC 起因 HAdV における自然免疫応答シグナル機構	31
4.2	EKC 起因 HAdV へのペルオキソー硫酸水素カリウム配合剤の不活化効果	34
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		36
1	背景	36
2	材料と方法	37
2.1	マウスとウイルス	37
2.2	細胞	37
2.3	定量 Real-time PCR 法	37
2.4	CRISPR-Cas9 システムを用いたノックアウト細胞作製	38
2.5	プラスミド作製と遺伝子導入	38
2.6	間接蛍光抗体法	38
2.7	細胞膜タンパク質のビオチン化と細胞分画	39
2.8	トリプシン処理	39
2.9	FACS 解析	39
2.10	cGAMP pull-down アッセイ	39
2.11	免疫ブロット法	40
2.12	ELISA	40
2.13	siRNA による遺伝子ノックダウン	40
2.14	ヘマトキシリン・エオジン染色	40
2.15	ルシフェラーゼアッセイ法	40
2.16	GST pull-down アッセイ	41
2.17	データ解析	41
3	結果	42
3.1	ウイルス感染で cGAS 依存的に cGAMP が細胞外に産生される	42
3.2	血球系の細胞では細胞外 cGAMP 刺激で STING 依存的に IFN が産生される	44
3.3	cGAMP のトランスポーターである SCL19A1 は高濃度の時のみ働く	47
3.4	細胞外 cGAMP 応答性の細胞では STING が細胞表面に局在し、細胞表面で cGAMP と結合している	50
3.5	STING は細胞膜上ではなく ER に局在し、TM5 を介して細胞外へと C 末端領	

域を表出させている	52
3.6 ER-PM 接着タンパク質 E-Syts は STING の細胞外表出に重要である	54
3.7 細胞外 cGAMP 刺激では細胞表面直下で TBK1、IRF-3 が活性化される	56
3.8 STING は N 末端領域でも TBK1 と結合し、その下流経路を活性化する	57
3.9 STING の中和抗体によって細胞外 cGAMP 刺激による IFN の誘導が阻害され る	60
3.10 細胞外に表出している STING は <i>in vivo</i> のウイルス感染の制御に重要である	62
4 考察	65
第 4 章 結論	68
参考文献	69
補足資料	84
謝辞	90

図目次

- 図1. ウイルス感染によって IFN を誘導する自然免疫核酸センサーとその下流経路
- 図2. STING の構造
- 図3. アデノウイルスの構造
- 図4. HAdV-D37 の転写領域と ORF の位置関係
- 図5. HAdV-D37 の増殖曲線
- 図6. ヒト結膜上皮細胞では HAdV-D37 感染で IFN- λ 1 が優位に誘導され、他のサイトカインは誘導されない
- 図7. ヒト結膜上皮細胞は HAdV-D37 感染により cGAS-STING 経路を介して IFN を産生する
- 図8. ヒト結膜上皮細胞において IFN は HAdV-D37 の複製を抑制する
- 図9. 高病原性の HAdV 型 (HAdV-D37) は低病原性の型 (HAdV-D53) と比較して、IFN- λ 1 の誘導が低く、CR1 β タンパク質の発現も低い
- 図10. CR1 β タンパク質は HAdV-D37 感染時の IFN の誘導を増強し、ウイルス複製を抑制する
- 図11. ペルオキソー硫酸水素カリウム配合剤は HAdV-D を不活化する
- 図12. ペルオキソー硫酸水素カリウム配合剤は次亜塩素酸ナトリウムと異なり、低濃度でも HAdV-D に対する不活化効果を保持する
- 図13. HAdV-D 感染ヒト結膜上皮細胞での自然免疫応答 (仮説)
- 図14. ウイルス感染による cGAS 依存的な細胞外 cGAMP 量の上昇
- 図15. 細胞外 cGAMP 刺激による血球系細胞での IFN 応答
- 図16. 細胞外 cGAMP 刺激による IFN 誘導は STING を介する
- 図17. 低濃度の細胞外 cGAMP 刺激では SLC19A1 非依存的に IFN を誘導する
- 図18. 低濃度 cGAMP は細胞質内に侵入せず、細胞表面に集積する
- 図19. ヒトの単球では STING が細胞表面に局在し、cGAMP と細胞膜上で相互作用する
- 図20. ER の STING は細胞膜を貫通して、C 末端の一部を細胞外に表出させている
- 図21. ER-PM 接着タンパク質 E-Syts は STING の細胞外表出を制御している
- 図22. 細胞外 cGAMP 刺激ではリン酸化 TBK1 とリン酸化 IRF-3 の局在が細胞内刺激と異なる
- 図23. STING の CTT 領域は細胞外 cGAMP 刺激による IFN 応答に必須ではない
- 図24. STING の N 末端は TBK1 と結合し、下流シグナルを活性化する
- 図25. STING 抗体による細胞表面 STING の阻害は細胞外 cGAMP 刺激によって誘導される抗ウイルス自然免疫シグナルを抑制する
- 図26. α -C-STING 抗体はウイルス感染したマウスの抗ウイルス自然免疫応答を阻害する
- 図27. マウスの血中 cGAMP 量を増強させることで、ウイルス感染を制御できる

- 図28. 細胞質核酸センサーのリガンド刺激では I 型と III 型 IFN が同程度誘導される
- 図29. HAdV の増殖曲線
- 図30. IFN- γ 処理によって細胞表面 STING の表出が増加する

表目次

表1.	アデノウイルスが持つタンパク質のウイルス粒子内の存在場所と機能
表2.	HAdV の分類と関連する疾患
表3.	HAdV 感染を感知する自然免疫核酸センサー
表4.	定量 Real-time PCR に使用したプライマー配列
表5.	本研究で使用した siRNA の配列
表6.	KO 細胞作製に使用した gRNA の配列
表7.	本研究で使用した抗体一覧

略語

3pRNA: 5'-triphosphorylated RNA
AIM2: absent in melanoma 2
CDNs: cyclic dinucleotides
CD-NTases: cGAS/DncV-like nucleotidyltransferases
CTT: C terminal tail
cGAMP: cyclic GMP-AMP
cGAS: cyclic GMP-AMP synthase
c-di-AMP: cyclic dimeric adenosine monophosphate
c-di-GMP: cyclic dimeric guanosine monophosphate
CPE: cytopathic effect
DAI: DNA-dependent activator of interferon regulatory factor
DAMPs: damage-associated molecular patterns
DCs: dendritic cells
dsRNA/DNA: double-stranded RNA/DNA
EKC: epidemic keratoconjunctivitis
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
EMCV: encephalomyocarditis virus
ENPP1: ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 1
ER: endoplasmic reticulum
E-Syts: extended synaptotagmins
FACS: fluorescence activated cell sorter
gRNA: guide RNA
HAdV: human adenovirus
HCjE: human conjunctival epithelial cells
HIV: human immunodeficiency virus
HSV: herpes simplex virus
IAV: influenza A virus
IFI16: interferon gamma-inducible protein 16
IFN: interferon
IgG: immunoglobulin G
IKK: inhibitor- κ B kinase
IL: interleukin
IRF: interferon-regulatory factor
ISGs: IFN stimulated genes

JAK: janus tyrosine kinase
KO: knockout
LILRB: leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily b
MACS: magnetic-activated cell sorting
MAVS: mitochondrial antiviral signaling protein
MDA5: melanoma differentiation associated protein-5
MOI: multiplicity of infection
mRNA: messenger RNA
MVA: modified vaccinia ankara
MyD88: myeloid differentiation primary-response protein 88
NDV: newcastle disease virus
NF- κ B: nuclear factor-kappa B
ORF: open reading frame
PAMPs: pathogen-associated molecular patterns
PBMCs: peripheral blood mononuclear cells
PIP₂: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PM: plasma membrane
Pol III: RNA polymerase III
RIG-I: retinoic acid inducible gene 1
siRNA: small interfering RNA
ssRNA/DNA: single-stranded RNA/DNA
SLAM: signaling lymphocytic activation molecule
STAT: signal transducers and activators of transcription
STIM1: stromal interaction molecule 1
STING: stimulator of interferon genes protein
TBK1: TANK-binding kinase 1
TIRAP: Toll/IL-1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein
TLRs: Toll-like receptors
TM: transmembrane domain
TNF: tumor necrosis factor
TRAM: TRIF-related adaptor molecule
TRIF: TIR domain-containing adapter protein inducing IFN- β
WT: wild type

第 1 章 序章

1 ウイルス感染に対する自然免疫応答

ウイルス感染では多くの場合、ウイルス由来の核酸が病原体関連分子パターン (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) として Toll 様受容体 (TLRs) や細胞質核酸センサーなどのパターン認識受容体によって認識されることで、自然免疫応答が引き起こされる (図 1) (Pandey et al., 2015; Wu and Chen, 2014; Rathinam and Fitzgerald, 2011; Desmet and Ishii, 2012; Yoneyama and Fujita, 2010; Rehwinkel and Reis e Sousa, 2013; Schlee and Hartmann, 2016; Barbalat et al., 2011)。哺乳類細胞において、RIG-I (retinoic acid-inducible gene-I) や cGAS (cyclic GMP-AMP synthase) といった特定の核酸センサーによって開始される下流のシグナル経路の活性化は、それぞれユビキチンや cGAMP (cyclic GMP-AMP) のようなセカンドメッセンジャーによって制御されている (Sun et al., 2013; Cohen, 2018; Wu et al., 2013; Gao et al., 2013)。特に、*TMEM173* 遺伝子にコードされている、小胞体 (ER) タンパク質である STING (stimulator of interferon genes、別名 ERIS、MITA、MPYS) (Ishikawa and Barber, 2008; Jin et al., 2008; Zhong et al., 2008; Sun et al., 2009) は cGAS によって内因的に産生された cGAMP の細胞質受容体である (Zhang et al., 2013; Diner et al., 2013; Ablasser et al., 2013a; Chen et al., 2016)。STING は活性化されると、I κ B キナーゼ複合体 (IKKs) や TBK1 (TANK-binding kinase 1) をリクルートし、活性化する。次に、転写因子である NF- κ B (Nuclear factor-kappa B) や IRF-3 (Interferon Regulatory Factor-3) が活性化され、最終的に抗ウイルス生体防御のために I 型インターフェロン (IFN) や炎症性サイトカインを産生する (McWhirter et al., 2009; Chen et al., 2011; Barber, 2015)。従って、cGAS 及び STING は、単純ヘルペスウイルスやアデノウイルスのような DNA ウイルスの認識と下流の抗ウイルスシグナルの活性化において、重要な認識機構と考えられている (Lam et al., 2014)。一方で、cGAS-STING 経路は RNA ウイルス感染の自然免疫による制御にも関与していることも報告されている (Schoggins et al., 2014; Ishikawa et al., 2009)。

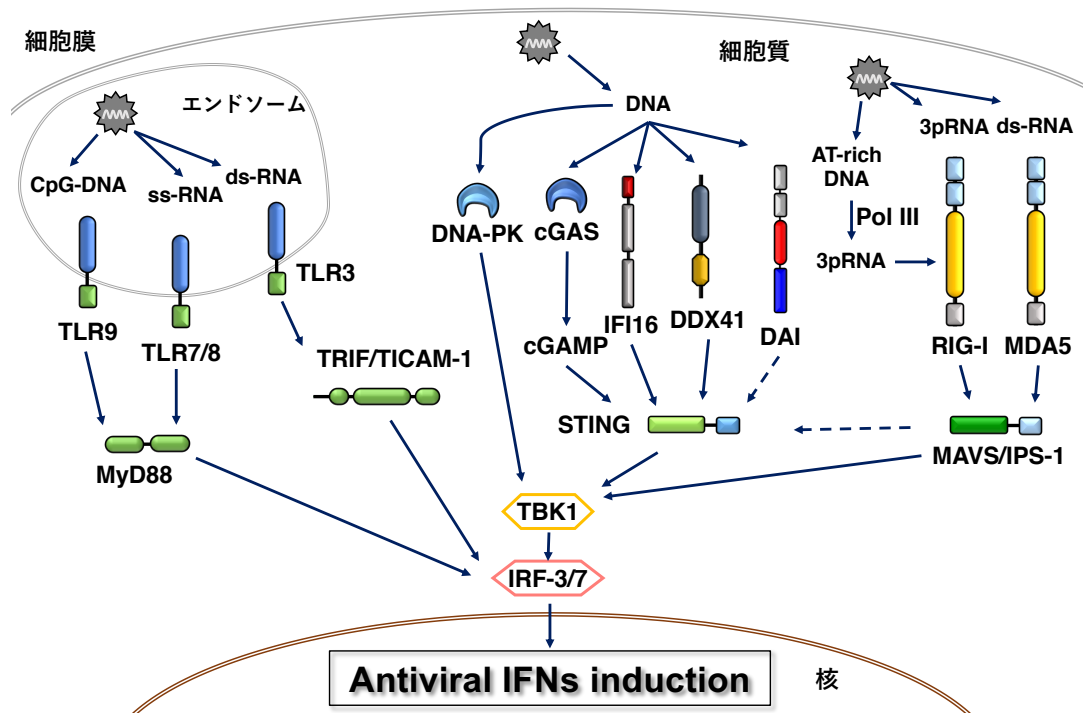


図1. ウイルス感染によってIFNを誘導する自然免疫核酸センサーとその下流経路

ウイルス由来の核酸がそれぞれのセンサーに認識されることで、シグナル伝達経路が活性化し、それぞれ下流のアダプター分子を介してIFNが誘導される。

2 STING の構造と機能

STING はERに局在する4回膜貫通タンパク質で、細胞質環状ジヌクレオチド (CDNs) を認識することで活性化され、IFN や炎症性サイトカインなどの自然免疫サイトカインを誘導し、生体防御に働く。STING タンパク質は4つの膜貫通ドメイン、二量体化ドメイン、CDNs 結合ドメイン、TBK1/IRF-3 結合ドメイン (CTT; C terminal tail) を有することが知られているが (図2) (Burdette and Vance, 2013)、5つ目の膜貫通ドメインを持つことも示唆されている (Ishikawa and Barber, 2008)。二量体化したSTINGにCDNsが結合すると、STINGは構造変化を起こし、CTTと呼ばれるC末端領域がTBK1と結合できるようになることで、その下流シグナルを活性化させる (Tsuchiya et al., 2016; Shang et al., 2019; Zhang et al., 2019)。病原体に対する宿主の生体防御機能に加えて、ヒトにおける恒常的なSTINGシグナリングの活性化が、サイトカイン調節不全や炎症を引き起こすことも知られている。*TMEM173*の機能獲得型変異は乳児発症性STING関連血管炎 (SAVI) と呼ばれる自己炎症性疾患を引き起こすことが報告されている (Liu et al., 2014; Jeremiah et al., 2014; Gao et al., 2015; Gray et al., 2015; Crawl et al., 2017)。さらに、cGAS-STING経路は抗ガン免疫を

誘導する腫瘍由来の DNA の認識に関与しているという報告もある (Deng et al., 2014; Ahn et al., 2014; Woo et al., 2014; Barber, 2015)。従って、STING は自然免疫応答を活性化する細胞質 DNA の cGAS を介した認識とつながる重要なシグナルアダプター分子としての機能だけでなく、自己免疫疾患やガン免疫のセンサーとしても機能している。

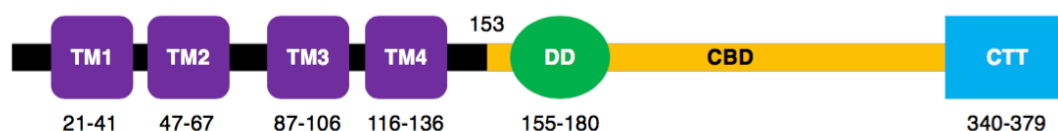


図 2. STING の構造

TM : Transmembrane domain、DD : Dimerization domain、CBD : CDNs binding domain、CTT : C terminal tail。数字はアミノ酸残基を示す。

3 アデノウイルス

3.1 アデノウイルスの構造

アデノウイルスは、エンベロープを持たない二重鎖直鎖状 DNA ウイルスである。その DNA ゲノムサイズは一般的に 26-45 kb に及び、DNA は直径 90 nm に及ぶ、正 20 面体構造をとる capsid で包まれている (図 3) (Davison, 2003; Hall et al., 2010)。

アデノウイルスは、capsid protein と capsid 内に存在する core protein から構成される。capsid protein は、capsid protein と minor protein から構成されており、major capsid protein には型決定にも利用される領域である penton base、hexon、fiber の 3 種類のタンパク質が、minor capsid protein には IIIa、VI、VIII、IX の 4 種類のタンパク質がそれぞれ含まれている。また、core protein としては V、VII、Mu、TP、IVa2、protease が知られている (Russell, 2009)。各タンパク質のウイルス粒子における配置を図 3 に、役割を表 1 に示す。

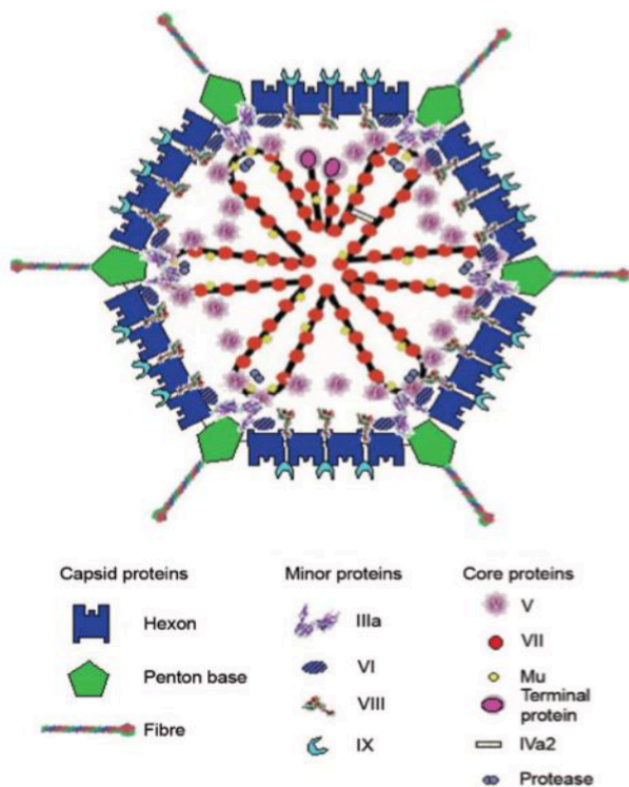


図 3. アデノウイルスの構造 (Russell, 2009)より引用

表 1. アデノウイルスが持つタンパク質のウイルス粒子内の存在場所と機能 (Hall et al., 2010)より引用

Polypeptide/name	Location	Function
II (hexon)	Facets of icosahedron	Major structural component, forms facets of the capsid
III (penton base)	Capsid vertices	Contains an RGD motif which facilitates interaction with cellular integrins*
<i>IIIa</i>	<i>Underside of penton base</i>	<i>Stabilizes the vertices</i>
IV (Fibre)	Projecting from the penton base	Mediates the initial attachment to host cells
V	Core	Links core to capsid, possibly aids nuclear localization
VI	Inner hexon cavity	Protease cofactor, assembly, endosome disruption and nuclear import of hexon
VII	Core	Targets viral genome to the nucleus and condenses DNA
VIII	Between hexons	Stabilization of peripentonal hexon-hexon interactions
IX	External faces of the capsid	Stabilization of virion. Transcriptional activator
TP	5'-End of the genome	Primes DNA replication
Mu	Core	DNA condensation
IVa2	Core	DNA packaging
Ad protease	Core	Cleaves precursor proteins

*Exceptions include the species F Ads

*太字は major capsid proteins

3.2 ヒトアデノウイルス (HAdV) のゲノム構成

ヒトアデノウイルス(HAdV)のゲノムは、主に初期遺伝子(E)、遅延初期遺伝子、後期遺伝子(L)の3つに分けることが出来る。初期遺伝子には、E1A、E1B、E2A、E2B、E3、E4の6遺伝子があり、遅延初期遺伝子にはIXとIVaの2つ、後期遺伝子にはL1-L5の5つがある(Hall et al., 2010)。例として図4にHAdV-D37の遺伝子とタンパク質をコードするORFの位置関係を示す。

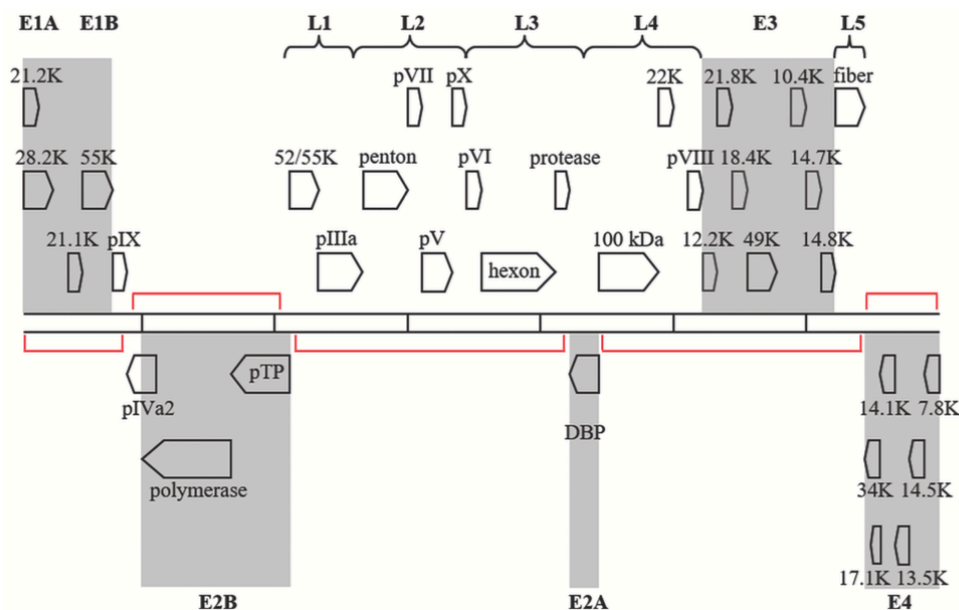


図4. HAdV-D37の転写領域とORFの位置関係 (Ismail et al., 2018) より引用

E1A/B : early region 1A/B、E2A/B : early region 2A/B、E3/4 : early region 3/4、L1-5 : late region 1-5

3.3 アデノウイルスの分類

アデノウイルスは *Mastadenovirus* に属しており、*Human mastadenovirus* A-G の7つの種に分類され、それぞれの種特異的な病気を引き起こす(表2)(Hall et al., 2010)。それぞれの種のなかでさらに様々な型に分けられており、現在までで85以上の型が見つかった。型の分類は伝統的な中和反応試験に基づいて行われており、また近年ではゲノム解析技術の発展により、3つのタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列(penton base, hexon, fiber; PHF)の比較による分類も行われている。1-51型までは中和反応によって分類された血清型、52型以降はPHF配列によって分類された遺伝子型と呼ばれている(Biere and Schweiger, 2010; Madisch et al., 2005)。また、ヒトアデノウイルスは頻繁に組換えを起こしており、遺伝型の多くは組換え体である。

本論文では、ヒトアデノウイルスをHAdV-種名型番号と表記する(例:ヒトアデノウイルスC種1型はHAdV-C1と表す)。

表 2. HAdV の分類と関連する疾患

種 型	臨床疾患
A 12, 18, 31	胃腸炎
B 3, 7, 11, 14...	結膜炎、咽頭炎、肺炎
C 1, 2, 5, 6, 57	咽頭炎、肺炎
D 8, 9, 10, 19, 37, 53, 54...	流行性角結膜炎
E 4	結膜炎、肺炎
F 40, 41	胃腸炎
G 52	胃腸炎

4 本研究の目的

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、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。前述したように、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。

このような背景の中、これらの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。

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

1 背景

HAdV は様々な組織に感染し、肺炎、角結膜炎、胃腸炎、肝炎、心筋炎などの疾患を引き起こす。その中で、流行性角結膜炎（以下 EKC と記す）は、主に HAdV の D 種（HAdV-D）によって引き起こされる眼感染症であり、手から眼へと接触感染し、世界中の眼科や病院において院内感染などのアウトブレイクをしている（Warren et al., 1989; Takeuchi et al., 1990; Alai, 2016）。EKC の主な症状は異物感や流涙であり、他にも眼瞼腫脹、充血、結膜浮腫、結膜濾胞、結膜下点状出血等がある（Ghebremedhin, 2014）。より重症の場合は偽膜等による眼痛、角膜合併症による視力低下が見られる（Ghebremedhin, 2014）。中でも HAdV-D8、-D19a (64)、-D37、-D53、-D54、-D56 による EKC は視力障害・失明を引き起こすほど重症となる場合がある（Gonzalez et al., 2019; Tabbara et al., 2010）。EKC では他の HAdV 眼感染症と比較して、炎症反応が長期化することが知られているが、その分子メカニズムは解明されておらず、利用可能な特効薬も存在しない。先行研究から、タンパク質コード領域毎の分子系統解析により、E3 遺伝子領域の CR1 β タンパク質（49 K）と L5 遺伝子領域の fiber タンパク質の 2 タンパク質のアミノ酸配列と EKC との関連が示唆されている。しかし、これらの配列の違いが本当に EKC の症状と関連しているのかどうかは明らかになっていない。

HAdV はその組換えウイルスが遺伝子医療などでベクターとして広く使用され、今までに HAdV に対する自然免疫応答に関する研究は多く行われており、HAdV を感知するセンサーもいくつか同定されている（表 3）。また、その下流のシグナル伝達経路や、この応答を阻害するようなウイルスタンパク質もいくつか同定されている（Ferrari et al., 2014; Fonseca et al., 2012; Spurrell et al., 2014）。一方で、これらの研究の多くは組換えウイルスや不死化細胞を使用した実験である。組換えウイルスはウイルスの増殖や免疫回避に必要な遺伝子領域が取り除かれており、実際の感染ウイルスの細胞内での動態を理解できるかは疑問である。さらに、多くの不死化細胞において HAdV 感染では、IFN が HAdV に対して抗ウイルス作用を示さないことが報告されており（Wu et al., 2015; Anderson and Fennie, 1987; Kitajewski et al., 1986）、自然免疫応答が HAdV 感染の制御に関与しているのかは不明な点が多い。加えて、HAdV の型や、HAdV 感染によって引き起こされる症状の重症度の違いによって自然免疫反応が異なるという報告もあり（Lam et al., 2014; Teigler et al., 2014; Yawata et al., 2016）、型または重症度の異なる検体から分離されたウイルス株間での症状の違いに自然免疫応答が関与している可能性が示唆されている。

表 3. HAdV 感染を感知する自然免疫核酸センサー

Localization	Sensor	Cell types		Virus	Reference
		Murine	Human		
Endosome	TLR9	pDCs	pDCs	Ad5	Zhu et al., 2007, Martinez et al., 2007
	cGAS	RAW264.7 MS1	A549, HeLa, ARPE19, THP-1	Ad5CiG, Ad2, Ad7, Ad35	Lam et al., 2014
	DDX41	RAW264.7 mDCs	–	Ad3, Ad5, Ad2Ts1	Zhang et al., 2011, Stein et al., 2012
Cytoplasm	AIM2	RAW264.7	HKC, HaCaT	Ad5CiG, Ad2Ts1	Stein et al., 2012, Schulte et al., 2013
	NLRP3	BMMs	HKC, HaCaT, THP-1, PBMCs	Ad5-GFP, Ad2Ts1	Barlan et al., 2011, Schulte et al., 2013
	RIG-I (RNA pol III)	–	NU-GC-3 cells	Adenovirus virus-associated RNA	Minamitani et al., 2011
	MDA5	–	HKC, HaCaT	ΔE1-Ad5-CMV-GFP	Schulte et al., 2013

HKC: Primary human keratinocytes、HaCaT: keratinocyte cell line、ARPE19: retinal pigmented epithelium cell line、NU-GC-3 cell: human gastric cancer cell lines

HAdV はノロウイルス等と同様にエンベロープをもたないウイルスであり、アルコールや市販の石鹼のような非塩素系消毒に対する抵抗性が高く (Wutzler and Sauerbrei, 2000; Uzuner et al., 2018)、また一本鎖 RNA ウイルスや他の二本鎖 DNA ウイルスと比べ紫外線への抵抗性も高い。そして、プラスチックや金属表面、点眼瓶などに長期間存在することも報告されている (Nauheim et al., 1990; Gordon et al., 1993; Uchio et al., 2002)。以上のような特徴により HAdV による感染症は接触感染力が高く、院内感染、水泳プール、軍隊基地、学校等での集団感染が大きな社会問題となっている (Hall et al., 2010; Ghebremedhin, 2014; Hamada et al., 2008)。HAdV に対する消毒薬としてよく用いられているものとして、80% 消毒用エタノール、ポピドンヨード、0.1%次亜塩素酸ナトリウムなどが挙げられる。この中で最も効果があるとされているのは次亜塩素酸ナトリウムであるが、金属腐食性や塩素臭などの理由で使用が限られている (Akanuma, 2007; Fukuzaki, 2006)。近年発売された、ペルオキソ一硫酸水素カリウム配合剤は塩素系の環境除菌・洗浄剤であり、その特有の活性機序により、塩素臭がほとんどなく、また、金属への影響も少ないことが特徴である。ペルオキソ一硫酸水素カリウム配合剤は、消毒薬耐性の強いノロウイルスを始め、幅広い抗微生物作用を示し、米国では環境保護庁に登録され、医療施設等の清掃や消毒に使用されている (Eleraky et al., 2002; McCormick and Maheshwari, 2004)。HAdV-C5、-C6 に対してペルオキソ一硫酸水素カリウム配合剤が不活化効果を持つことは報告されているが (McCormick and Maheshwari, 2004)、他の HAdV、特に EKC を引き起こす HAdV-D に効果があるのかは調べられていない。

日本だけでなく世界中で EKC を引き起こす HAdV-D 感染症は、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。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にした。さらに、感染を予防することによる感染制御のために、ペルオキシ一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。

2 材料と方法

2.1 細胞

A549 細胞は ATCC より購入し、ヒト結膜上皮細胞株 (HCjE) は Ilene K. Gipson 教授より (Gipson et al., 2003)、初代ヒト結膜上皮細胞は八幡信代先生よりそれぞれ分与していた。A549 細胞の培養培地には DMEM (Dulbecco's modified eagle medium、Nissui) に、0.1%炭酸水素ナトリウム水溶液、4 mM L-glutamine (Gibco)、10% FBS (Fetal bovine serum; ウシ胎児血清、Gibco)を加えたものを使用し、維持培地には 5% FBS 含有 DMEM を使用した。ヒト結膜上皮細胞株は、Gipson らの報告の方法をもとに基礎培地として Keratinocyte-SFM (Gibco) に 0.09 mM CaCl_2 を加えたものを用いてコンフルエントの 1/2 程度まで培養したのち、Keratinocyte-SFM と Low calcium DMEM/F12 (Gibco) を 1 : 1 で混合した培地でコンフルエントの 2/3 程度まで培養した。その後、DMEM/F12 (Gibco) に 10% FBS、10 ng/ml の EGF を加えた分化培地で 1 週間培養した。初代ヒト結膜上皮細胞の培地には、Corneal Epithelial Cell Medium (ScienCell) を使用し、添付の製品プロトコルに従い培養した。

2.2 消毒薬

消毒薬として、次亜塩素酸ナトリウム (Wako) とペルオキソ-硫酸水素カリウム配合剤 (キョーリンメディカルサプライ株式会社、ルビスタ)、alcoholic chlorbenzarconium (丸石製薬、ウエルパス) を用いた。

2.3 ウイルス

HAdV-B3、-D8、-D37、-D53、-D54、-D56 の眼感染症を引き起こす 6 つの異なる型を使用した。HAdV-B3、-D8 を福岡歯科大学の八幡信代先生から、HAdV-D37、-D53、-D56 を熊本保健環境研究所の橋下慎太郎先生から、HAdV-D54 を北海道医療大学の北市伸義先生にそれぞれ分与して頂いた。

フラスコに単層培養された A549 細胞にウイルス液を接種し、37°C、 CO_2 濃度 5.0%に設定されたインキュベーターで培養した。細胞変性効果 (CPE) が観察された時点で細胞を回収し、凍結融解を 3 回行った後、3,000 rpm で 10 分遠心し、その上清をウイルス液とした。

2.4 ウイルス精製

回収したウイルス液は AV Purification Mini Kit (BIOMIGA) を用いて、添付の製品プロトコルに従い精製した。精製したウイルスは TCID_{50} 法で力価測定を行った。96 well プレートに単層培養された A549 細胞に段階希釈したウイルスを接種し、12 日後に CPE を観察し、ウイルス原液の力価を定量した。

2.5 ウイルス感染

培養細胞の培養液を FBS 不含の培地に替え、HAdV を感染させた。2 時間後にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗い、新しい培養液を加えた。

2.6 HAdV 増殖試験

24 well プレートに単層培養された A549 細胞と HCjE 細胞に HAdV を 0.1、1、10 MOI でそれぞれ感染させ、1 日、3 日、6 日、9 日後に培養上清と感染細胞から DNA を回収し、Real-time PCR で HAdV の DNA コピー数を測定した。

2.7 定量 Real-time PCR 法

ISOGEN (ニッポンジーン) を用いてチオシアン酸グアニジンフェノールクロロホルム法にて培養細胞から RNA の回収を行い、DNase および RNase free の水に溶解した。抽出した RNA に DNase I (Invitrogen) を加え 25°C で 15 分間反応させることで DNase 処理を行い、DNA を分解させた。反応後 25 mM EDTA 1 μ l を加え 65°C で 10 分間反応させることで、DNase I を失活させた。その後、ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit (TOYOBO) を用いて RNA を逆転写し、cDNA を合成した。

定量的 Real-time PCR は SYBR[®] Premix Ex TaqTM (Takara) を用いてインターカレーター法にて行い、StepOnePlusTM Real-Time PCR System (Applied Biosystems) で定量し、 $\Delta\Delta C_t$ 法にて解析した。なお、反応条件は、95°C 10 秒間の初期変性後、95°C 5 秒間の変性反応、60°C 30 秒間のアニーリング及び伸長反応の 2 ステップを 45 サイクル行った。内部標準としては *GAPDH* を使用した。使用したプライマーの配列は表 4 (補足資料) に記した。

2.8 ELISA

VeriKine[™] Human IFN- β ELISA kit (PBL) と、Human IL-29 ELISA kit (Invitrogen) を添付の製品プロトコルに従い、HAdV 感染後の培養上清中の IFN- β と IFN- $\lambda 1$ タンパク質をそれぞれ測定した。

2.9 siRNA による遺伝子ノックダウン

単層培養された HCjE 細胞に、siRNA の終濃度が 60 nM となるように、OPTI-MEM (Gibco) と Lipofectamine RNAi MAX Reagent (Invitrogen) を用いてリポフェクション法にてトランスフェクションした。本研究に用いた siRNA の配列は表 5 (補足資料) に記した。

2.10 HAdV の DNA コピー数の定量

PCR 増幅反応は KOD SYBR[®] qPCR Mix (TOYOBO) を用いて行い、StepOnePlus[™] Real-

Time PCR System で定量した。反応条件は、98°C 2 分間の鋳型 DNA の変性後、98°C 10 秒間の熱変性、50°C 10 秒間のアニーリング、68°C 45 秒間の伸長反応の 3 ステップを 45 サイクル行った。プライマーは、forward primer: 5'-TTCCCCATGGC(A/T/C/G)CACAA(C/T)AC-3'、reverse primer: 5'-TGCC(T/G)(A/G)CTCAT(A/G)GGCTG(A/G)AAGTT-3' (product length: 554 bp, product T_m: 88.0°C)を使用した。スタンダード DNA には HAdV-D37 の Hexon 遺伝子の PCR 産物を pBluescript SK (+) (ストラタジーン) に組み込んだものを用い、HAdV DNA のコピー数を測定した。

2.11 IFN の抗ウイルス作用評価

24 well プレートに単層培養された初代ヒト結膜上皮細胞に、リコンビナント IFN- α (peprotech) と IFN- λ 1 (R&D) をそれぞれ 10,000 unit/mL、100 ng/mL の濃度で処理し、24 時間後に HAdV を感染させた。感染後 12 時間、24 時間に細胞と培養液からウイルス DNA を回収し、DNA コピー数を Real-time qPCR で測定した。

2.12 A549 細胞増殖試験

96 well プレートに単層培養された A549 細胞に、チオ硫酸ナトリウムで中和した 1%、0.1%、0.01% のペルオキソー硫酸水素カリウム溶液を処理して、24 時間後に Cell Counting Kit-8 (DOJINDO)を用い、添付の製品プロトコルに従って吸光度 (A₄₅₀) を測定した。

2.13 ウイルス不活化効果判定試験

ウイルス液 50 μ l に 0.002%、0.02%、0.2% 次亜塩素酸ナトリウム 50 μ l、および 0.02%、0.2%、2% ペルオキソー硫酸水素カリウム配合剤 50 μ l をそれぞれ混合し、室温で 1 分、30 秒インキュベートした。反応後、終濃度が 0.1% となるようにチオ硫酸ナトリウムを加え、反応を停止させた。その後、次亜塩素酸ナトリウムは塩酸、ペルオキソー硫酸水素カリウムは炭酸水素ナトリウム水溶液を用いて pH 調整を行った。alcoholic chlorbenzarconium も同様にウイルス液と 1 分間反応させた後、DMEM で 260 倍希釈をして反応を停止させた。次に、それぞれの消毒薬で処理した HAdV 溶液を A549 細胞に接種した。6 日後、細胞と培養液からウイルス DNA を回収し、DNA コピー数を Real-time qPCR で測定した。

2.14 ウイルス不活化効果判定法

消毒薬の代わりに PBS を用いたコントロールと比較し、DNA コピー数が 4 Log 以上の差が見られたものを不活化効果の有るものとした。

2.15 データ解析

統計解析の P 値を決定するために両側のスチューデントの t 検定を行った。

3 結果

3.1 ヒト結膜上皮細胞では HAdV-D37 感染でⅢ型 IFN が優位に誘導される

まず、流行性角結膜炎（EKC）を引き起こす HAdV-D の初感染組織と考えられているヒト結膜上皮細胞におけるウイルスの増殖率を確認した。HAdV 感染において IFN を誘導しないとされている A549 細胞では（Lam et al., 2014）、ウイルス濃度依存的に 6 日後にはウイルス量が飽和状態になっていた（図 5A）。一方で、ヒト結膜上皮細胞においては、HAdV-D37 は 1 日目からウイルス量が多く、その後時間が経ってもウイルス量はほとんど変化しなかった（図 5B）。ヒト結膜上皮細胞は A549 細胞と比較して、感染効率が良いことが示された。

次にヒト結膜上皮細胞における HAdV-D37 に対する自然免疫応答をプロファイルした。ヒト結膜上皮細胞株（HCjE）と初代ヒト結膜上皮細胞の両方で、HAdV-D37 感染後の IFN の誘導を Real-time PCR 法を用いてタイムコースで測定した結果、I 型 IFN である *IFNB1* の mRNA の発現誘導に比べて、Ⅲ型 IFN である *IFNL1* が優位に誘導されていた（図 6A）。これと同様に、タンパク質レベルでも IFN- λ 1 が IFN- β より高いレベルで産生されていた（図 6B）。加えて、IFN 以外のサイトカインが誘導されているのかを検討したが、IL-1 β 、TNF α 、IL-6、IL-8 などの炎症性サイトカインはほとんど誘導されていなかった（図 6C）。これらの結果より、ヒト結膜上皮細胞においては HAdV-D37 感染時にⅢ型 IFN である IFN- λ 1 がメインに産生されることが明らかとなった。

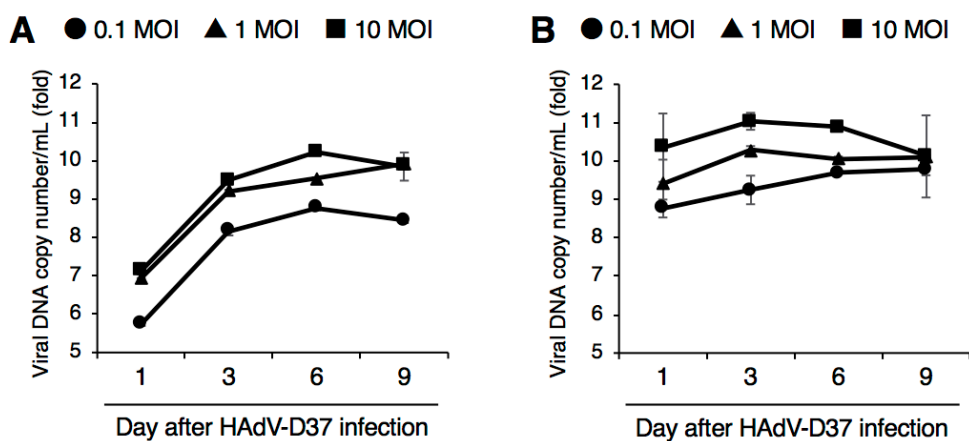


図 5. HAdV-D37 の増殖曲線

A549 細胞（A）及びヒト結膜上皮細胞（B）に HAdV-D37 を 0.1（●）または、1（▲）、10 MOI（■）で感染させ、1、3、6、9 日後のウイルス DNA コピー数を Real-time PCR にて測定した。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 $\pm$ SD で表した。

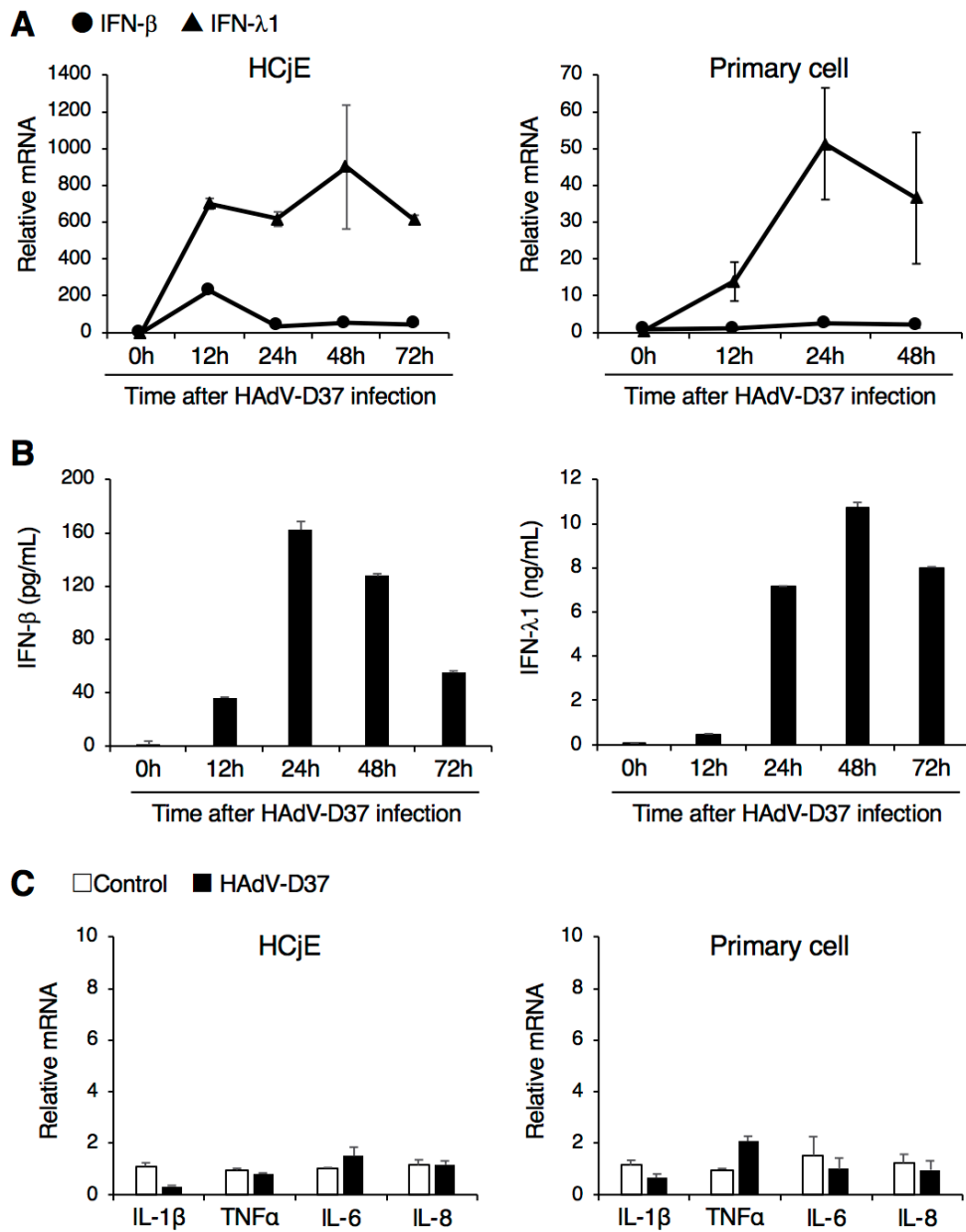


図 6. ヒト結膜上皮細胞では HAdV-D37 感染で IFN- λ 1 が優位に誘導され、他のサイトカインは誘導されない

(A) ヒト結膜上皮細胞株 (HCjE)、及び初代ヒト結膜上皮細胞 (Primary cell) に HAdV-D37 感染させた後、示した時間での *IFNB1* (●) と *IFNL1* (▲) の mRNA を Real-time PCR で測定した。

(B) HAdV-D37 感染後の HCjE 培養上清中の IFN- β と IFN- λ 1 のタンパク質を ELISA で定量した。

(C) HAdV-D37 感染後 12 時間の HCjE、及び初代ヒト結膜上皮細胞 (Primary cell) における各種サイトカインの mRNA 量を Real-time PCR にて測定した。

データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 $\pm$ SD で表した。

3.2 HAdV-D37 感染では cGAS-STING 経路を介して IFN を産生する

ヒト結膜上皮細胞における IFN- λ 1 の産生メカニズムを明らかにするために、siRNA による遺伝子のノックダウン系を用いて、どの自然免疫核酸センサー分子、及そのアダプター分子が HAdV-D37 感染時に働くのかを調べた。その結果、細胞質 DNA センサーである cGAS とそのアダプター分子である STING をノックダウンした時のみ、IFN- λ 1 の誘導が有意に低下した (図 7A)。さらにその下流のシグナル経路も同様に検討したところ、IRF-3、IRF-7、及び NF- κ B の構成タンパクである RelA といった全ての転写因子が IFN- λ 1 の誘導に関与していることが示唆された (図 7B)。以上の結果より、HAdV-D37 感染時には細胞質 DNA センサーの cGAS がウイルス DNA と結合し、その下流の STING、さらには転写因子である IRF-3/7、NF- κ B を活性化させ IFN- λ 1 を誘導していることが示唆された。

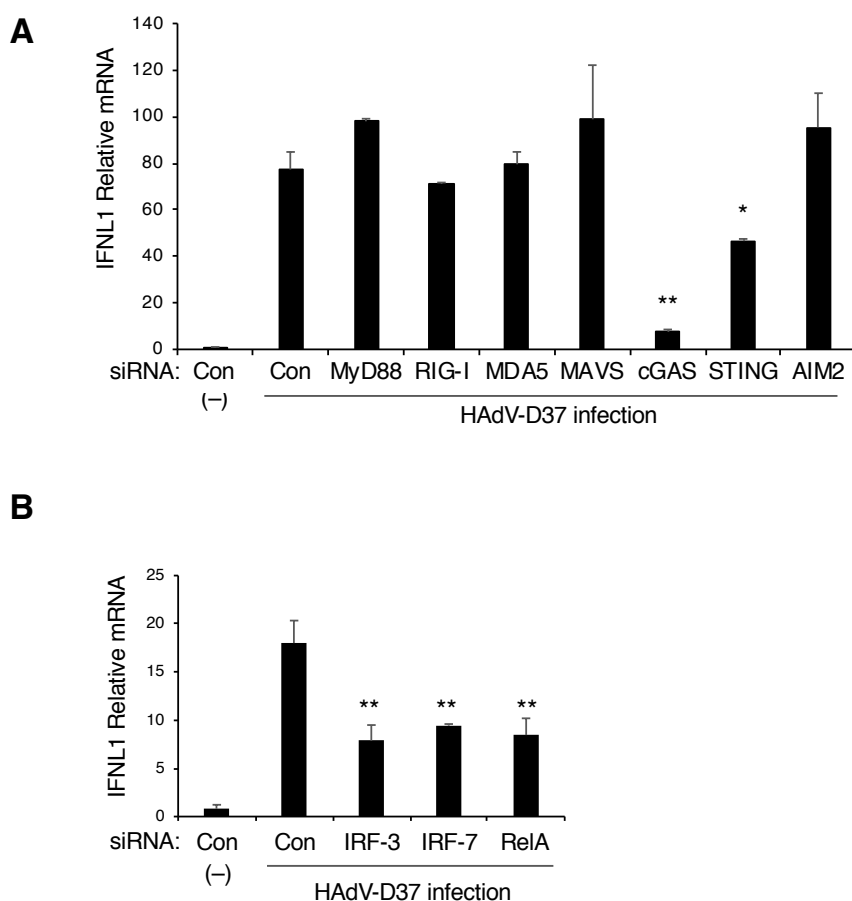


図 7. ヒト結膜上皮細胞は HAdV-D37 感染により cGAS-STING 経路を介して IFN を産生する

(A、B) HCjE に図示した siRNA をトランスフェクションした 48 時間後に HAdV-D37 を感染させ、12 時間後の *IFNL1* の mRNA を Real-time PCR で定量した。

データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 $\pm$ SD で表した。** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$ vs コントロール。

3.3 ヒト結膜上皮細胞において IFN は抗ウイルス作用を示す

これまで多くの不死化細胞を用いた研究において、IFN は HAdV に対して抗ウイルス作用を持たないことが知られていた。一方で、一部の初代細胞においては IFN が HAdV 感染を抑制することができるという報告もされていた (Zheng et al., 2016)。そこで、ヒト結膜上皮細胞において誘導される IFN が HAdV-D に対して抗ウイルス作用を示すのかどうかを検討した。まず初代ヒト結膜上皮細胞を用いて、IFN 処理で抗ウイルス作用のあるとされる IFN 誘導遺伝子である Viperin と OAS1 が誘導されていることを確認した (図 8A)。次に IFN 処理をしたヒト結膜上皮細胞において、HAdV-D37 の増殖を抑制できるのかを調べたところ、感染後 24 時間でウイルスの DNA 量が 1 Log 以上低下していた (図 8B)。以上より、IFN がヒト結膜上皮細胞に感染した HAdV-D37 に対して抗ウイルス作用を発揮することが明らかとなった。

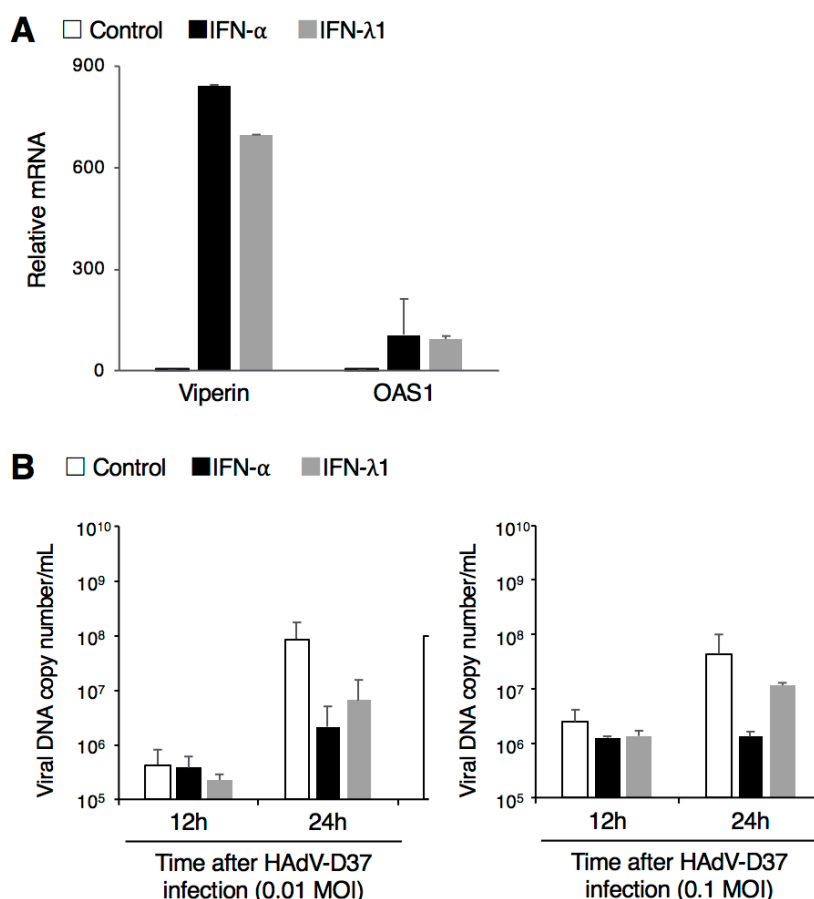


図 8. ヒト結膜上皮細胞において IFN は HAdV-D37 の複製を抑制する

(A) 初代ヒト結膜上皮細胞に IFN- α (10⁴ unit/mL) と IFN- λ 1 (100 ng/mL) を処理した 24 時間後に Viperin、OAS1 の mRNA を Real-time PCR で測定した。

(B) (A) と同様に IFN 処理したヒト結膜上皮細胞に 0.01、0.1 MOI の HAdV-D37 をそれぞれ感染させ、12、24 時間後のウイルス DNA のコピー数を Real-time PCR で測定した。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 $\pm$ SD で表した。

3.4 CR1 β タンパク質は IFN の誘導を増強し、HAdV の複製を抑制する

EKC を引き起こす HAdV-D の中でも多発性角膜上皮浸潤などの角膜への症状を頻繁にきたす高病原性の型、HAdV-D37 と、ほとんど角膜症状を引き起こさない低病原性の型 HAdV-D53 が知られている。このような型間の症状の違いが IFN 誘導と関与しているのかどうかを検討した。まず、それぞれの型の IFN の誘導をタイムコースで測定したところ、HAdV-D53 は HAdV-D37 と比較して、IFN の遺伝子発現誘導が高いことがわかった (図 9A)。次に、免疫回避タンパク質として知られている E3 領域の CR1 β の発現量を測定したところ、E1A には違いがなかったにも関わらず (図 9B)、HAdV-D53 感染では発現量が高く、対して、HAdV-D37 では発現量が低かった (図 9C)。このことから、高病原性の型である HAdV-D37 では低病原性の型である HAdV-D53 と比べて IFN の誘導が低く、免疫抑制タンパク質である CR1 β の発現も低いことが見出された。

高病原性の型 HAdV-D37 では IFN の遺伝子誘導、及び CR1 β の発現量が低かったことから、CR1 β タンパク質が IFN の誘導と関与しているのではないかと考え、CR1 β タンパク質と IFN 誘導との関連を調査した。まず HAdV-D37 の CR1 β に対する siRNA を設計し、感染細胞において CR1 β をノックダウンして IFN の誘導性が変化するのかを調べた。その結果、CR1 β をノックダウンした HAdV-D37 感染細胞では、*IFNB1* と *IFNL1* 両方の誘導が低下していることが明らかとなった (図 10A)。これと一致して、CR1 β をノックダウンすると、HAdV-D37 感染時のウイルス DNA 量が増加した (図 10B)。以上より、HAdV-D37 感染ヒト結膜上皮細胞では、CR1 β が IFN の誘導を増強し、さらなる抗ウイルス作用を発揮することが示唆された。

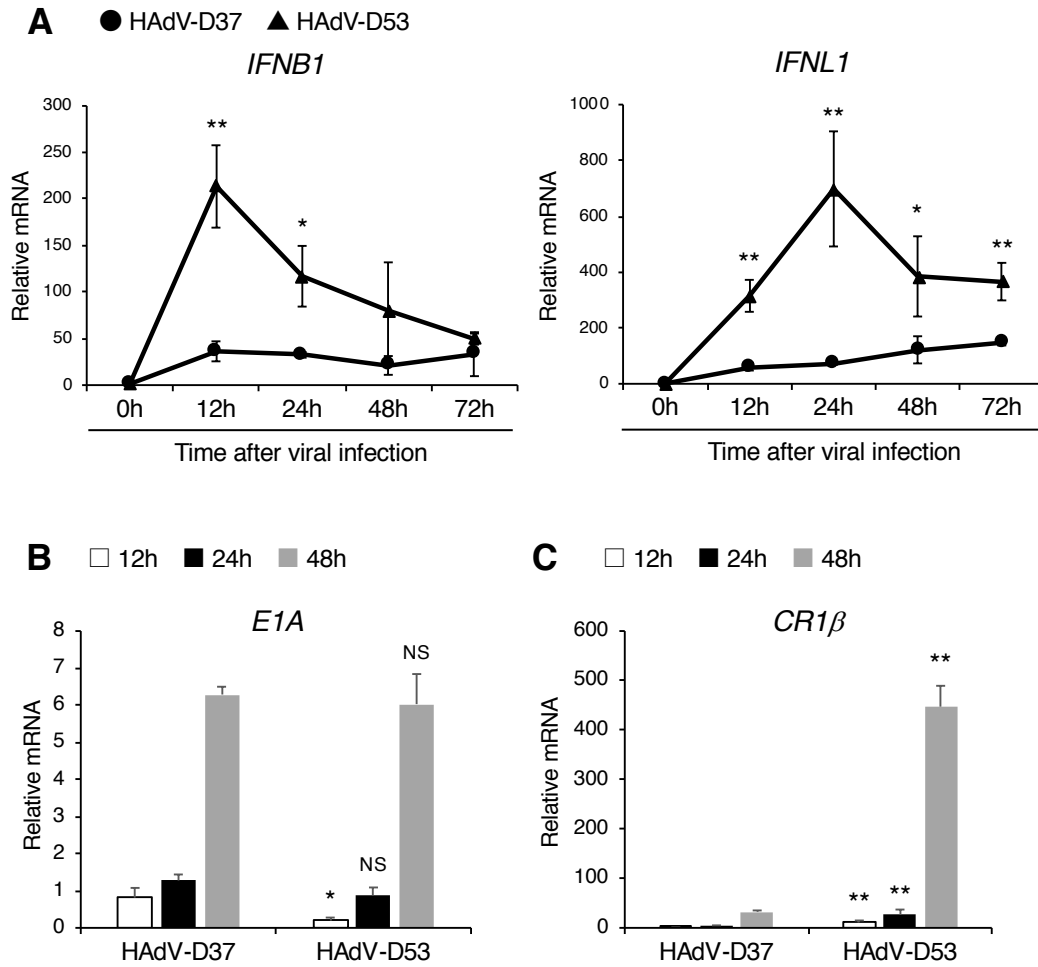


図 9. 高病原性の HAdV 型 (HAdV-D37) は低病原性の型 (HAdV-D53) と比較して、IFN- λ 1 の誘導が低く、CR1 β タンパク質の発現も低い

(A) HCjE に HAdV-D37 (●)、-D53 (▲) を感染させ、図示した時間での *IFNB1* と *IFNL1* の mRNA 量を Real-time PCR で測定した。

(B) HAdV-D37、-D53 を感染させた HCjE の *E1A* の mRNA 量を Real-time PCR で測定した。

(C) HAdV-D37、-D53 を感染させた HCjE の *CR1β* の mRNA 量を図示した時間で Real-time PCR で測定した。

データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 $\pm$ SD で表した。** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$ vs HAdV-D37。NS, not significant.

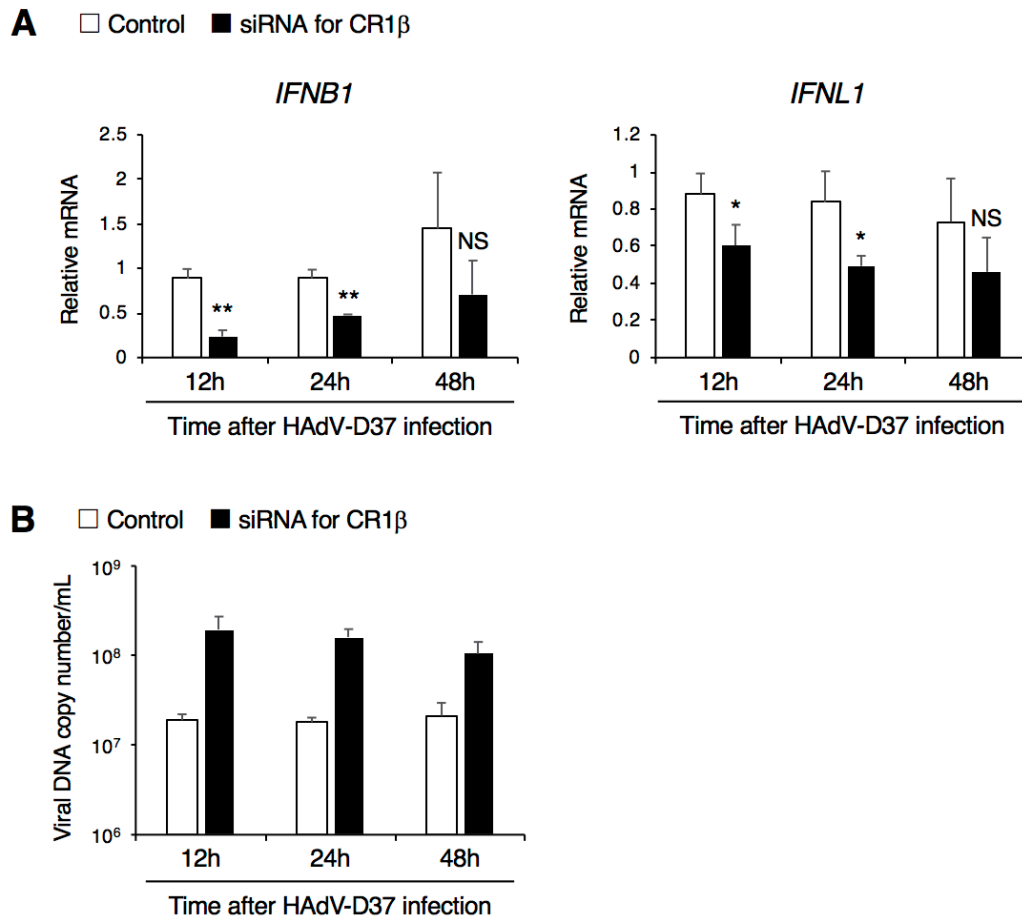


図 10. CR1 β タンパク質は HAdV-D37 感染時の IFN の誘導を増強し、ウイルス複製を抑制する

(A) HCjE にコントロール siRNA (blank) と HAdV-D37 CR1 β に対する siRNA (filled) をトランスフェクションした 24 時間後に HAdV-D37 を感染させ、図示した時間で *IFNB1* と *IFNL1* の mRNA を Real-time PCR を用いて定量した。

(B) CR1 β をノックダウンした HCjE に HAdV-D37 を感染させた後、図示した時間で、ウイルス DNA のコピー数を Real-time PCR で測定した。

データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 $\pm$ SD で表した。 $** P < 0.01$ 、 $* P < 0.05$ vs コントロール。NS, not significant.

3.5 ペルオキソー硫酸水素カリウム配合剤は HAdV-D 不活化効果を持つ

金属腐食性や刺激臭などの次亜塩素酸ナトリウムの問題点を解決した新しい消毒薬としての、ペルオキソー硫酸水素カリウム配合剤の EKC を引き起こす HAdV に対する不活化効果を調べるために、EKC を引き起こす HAdV-D の 5 つの型 (HAdV-D8、-D37、-D53、-D54、-D56)、コントロールとして HAdV-B3 を用いて不活化効果試験を行った。まず、ペルオキソー硫酸水素カリウム配合剤が A549 細胞の増殖に影響をするかどうかを調べたところ、ペルオキソー硫酸水素カリウム配合剤で処理をしても A549 細胞の増殖は変化しなかった (図 11A)。この条件下で、ペルオキソー硫酸水素カリウム配合剤及び次亜塩素酸ナトリウムと HAdV をそれぞれ 30 秒、1 分と反応させ、その不活化効果を比較した。その結果、30 秒、1 分の両方で、今回用いた全ての型でペルオキソー硫酸水素カリウム配合剤は次亜塩素酸ナトリウムと同等、または HAdV-D8、-D37、-D54 においてはそれ以上の不活化効果を示した (図 11B、C)。さらに様々な濃度でのペルオキソー硫酸水素カリウム配合剤及び次亜塩素酸ナトリウムの HAdV-D に対する不活化効果を検討した。驚くべきことに、ペルオキソー硫酸水素カリウム配合剤では推奨使用濃度の 10 分の 1 倍である 100 ppm (0.1%) でも、HAdV-D に対して十分な不活化効果を示した (図 12)。それと比較して、次亜塩素酸ナトリウムは低濃度ではほとんど不活化効果が認められなかった。これらの結果は、ペルオキソー硫酸水素カリウム配合剤が EKC 関連 HAdV-D の感染性を十分に低下させることができることを示唆している。

加えて、現在病院で手指消毒薬として広く使用されているアルコール系消毒薬 (alcoholic chlorbenzarconium) の HAdV-D に対する不活化効果を検討したところ、1 分間の反応時間では今回用いたどの HAdV も感染性は変わらなかった (図 11C)。

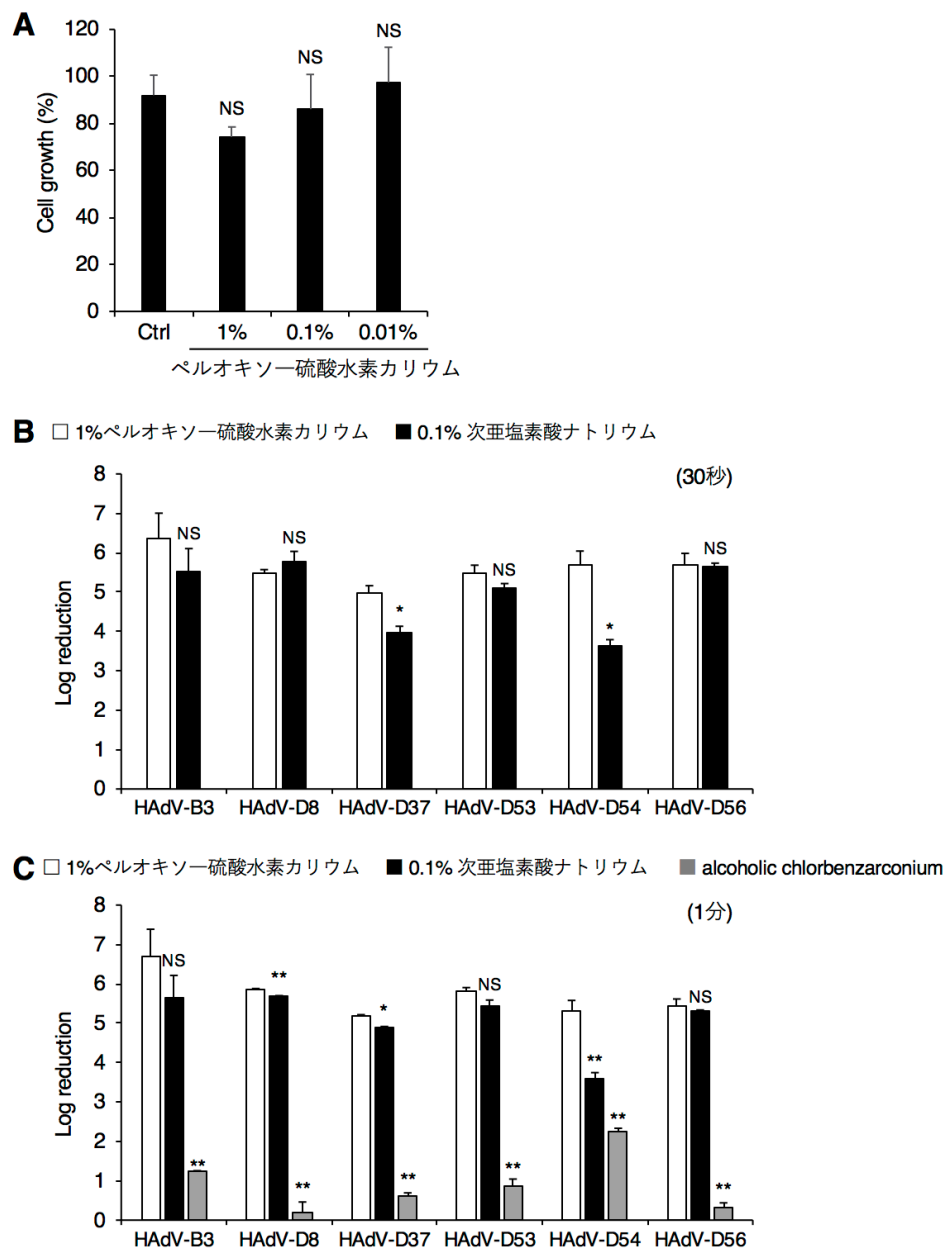


図 11. ペルオキシソー硫酸水素カリウム配合剤は HAdV-D を不活化する

(A) 1、0.1、0.01%のペルオキシソー硫酸水素カリウムを中和した後（方法参照）A549 細胞に処理し、24 時間後に細胞の増殖率を測定した。

(B) 1%ペルオキシソー硫酸水素カリウム (white) 及び 0.1%次亜塩素酸ナトリウム (black) と HAdV を 30 秒間反応させ、A549 細胞に接種し、6 日後にウイルス DNA を測定した。

(C) 1%ペルオキシソー硫酸水素カリウム (white) 及び、0.1%次亜塩素酸ナトリウム (black)、alcoholic chlorbenzarconium (gray) と HAdV を 1 分間反応させ、A549 細胞に接種し、6 日後にウイルス DNA を測定した。

データは 3 回の独立した実験から得られた平均値±SD で表した。** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$ vs ペルオキシソー硫酸水素カリウム。NS, not significant。

● ペルオキソー硫酸水素カリウム ▲ 次亜塩素酸ナトリウム

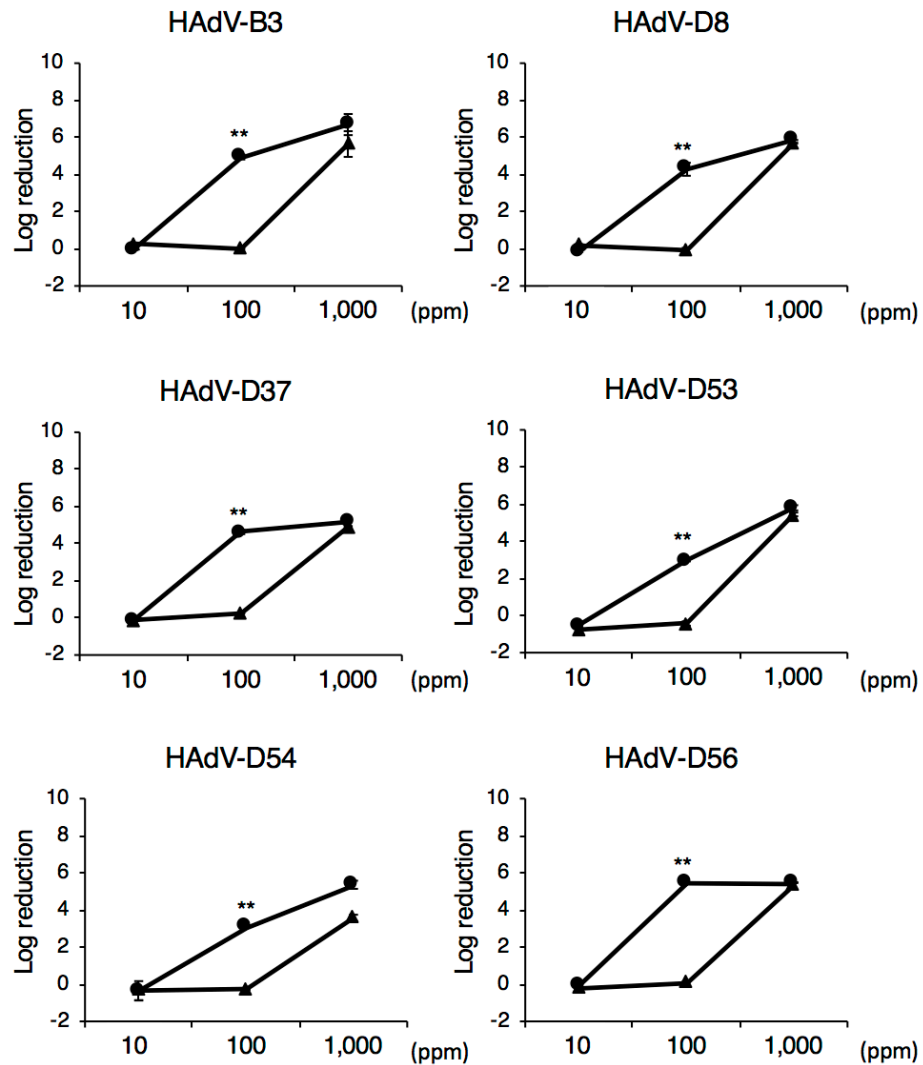


図 12. ペルオキソー硫酸水素カリウム配合剤は次亜塩素酸ナトリウムと異なり、低濃度でも HAdV-D に対する不活化効果を保持する

10、100、1,000 ppm のペルオキソー硫酸水素カリウム (●)、及び次亜塩素酸ナトリウム (▲) と図示した型の HAdV を 1 分間反応させ、A549 細胞に接種し、6 日後にウイルス DNA を測定した。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値±SD で表した。** $P < 0.01$ vs 次亜塩素酸ナトリウム。

4 考察

4.1 EKC 起因 HAdV における自然免疫応答シグナル機構

本研究では、HAdV-D の初感染組織である、ヒト結膜上皮細胞において、HAdV-D 感染時に細胞質 DNA センサー cGAS とそのアダプター分子である STING を介して、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、優先的に誘導されていることを明らかにした。更に、ヒト結膜上皮細胞において IFN が HAdV-D37 の感染を抑制し、ウイルスタンパク質のひとつである CR1 β が IFN の誘導を増強することでウイルス複製を抑制していることも確認された。加えて、高病原性の型では IFN の誘導性が低病原性の型と比較して低く、IFN と病原性との関係についての新しい知見も見出した。

HAdV-D 感染の認識機構について

これまでの研究により、HAdV に対する自然免疫核酸センサーとして、エンドソーム内でウイルス由来の DNA を認識する TLR9、細胞質内で DNA を認識する cGAS や DDX41、AIM2、NLRP3 などの DNA センサー分子や、細胞質内でウイルス由来の RNA を認識する RIG-I や MDA5 など多数のセンサーが報告されている (表 3)。これらは HAdV のライフサイクルの異なるステップで、HAdV 由来の PAMPs を認識しており、どこでウイルスを認識しているかはウイルスの細胞内動態に依存する。HAdV は、通常エンドサイトーシスによって細胞内に侵入した後、エンドソームから脱殻し、微小管を介して細胞質内を移動し、DNA が核内へと輸送され、核内で DNA 複製が行われると考えられている。一方で、侵入後にエンドソーム内に長期に留まる型の報告 (Teigler et al., 2014) や、感染細胞内でのライフサイクルが型の違いによって異なることも知られている。ヒト結膜上皮細胞においては HAdV-D37 感染が cGAS によって認識されており、このことは細胞質内にウイルス DNA が存在していることを示唆している。したがって、HAdV-D37 感染ではウイルスの侵入から核への移行までの間に DNA が細胞質内へと漏出していることが考えられる。実際に HAdV の DNA が細胞質に存在することが報告されている (Wang et al., 2013)。また、EKC 起因型はウイルスの複製が他の型と比較して遅いことも知られており、他の型とは複製方法が異なると考えられ、HAdV-D は細胞質で DNA 複製を行っている可能性もある。しかしながら、cGAS が核内に存在しているという報告もあり (Gentili et al., 2019)、HAdV-D37 のウイルス DNA がどこで認識されているのかについては、さらなる検討が必要である。

IFN の HAdV-D に対する感染制御とその応用の可能性

IFN はウイルス感染初期の自然免疫応答の一端で、抗ウイルス応答による生体防御に働く代表的なサイトカインであり、中でもⅠ型とⅢ型 IFN はウイルス感染時にその遺伝子発現が誘導される。近年、上皮系の細胞ではウイルス感染時にはⅠ型 IFN よりもⅢ型 IFN の方が優位に誘導されることや (Baldrige et al., 2017; Galani et al., 2017; Jewell et al., 2010; Nice et al., 2015)、Ⅲ型 IFN の受容体の発現分布が上皮細胞に多いことなどが知られている (Ank et al., 2008)。ウイルス感染時に誘導された IFN は、通常細胞表面に存在する IFN 受容体に結合し、その下流の JAK/STAT 経路を活性化する。IFN によって活性化された細

胞は、OAS や Viperin などの抗ウイルス作用を持つ様々な IFN 誘導遺伝子 (ISGs) の遺伝子発現を誘導し、ウイルス感染を抑制する (Schoggins, 2019)。さらに I 型 IFN と III 型 IFN では ISGs の誘導性も異なることが知られており、腸の上皮細胞では III 型 IFN が主に抗ウイルス免疫を活性化させる (Nice et al., 2015; Baldridge et al., 2017; Good et al., 2019)。それに対して、気道上皮細胞では、I 型 IFN と III 型 IFN の両方で抗ウイルス応答を活性化させることができる (Hamming et al., 2013)。ヒト結膜上皮細胞においては I 型 IFN と III 型 IFN の両方が HAdV-D の制御に関与していることが示され (図 8B)、両方の 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、HAdV-D37 感染においては III 型 IFN が優位に誘導されており、I 型 IFN はほとんど認められなかった。ヒト結膜上皮細胞においても 3pRNA 刺激や HT-DNA 刺激では I 型 IFN が III 型 IFN と同程度に誘導されていたことから (図 28、補足資料)、HAdV 感染時にウイルスタンパク質などが I 型 IFN の誘導を抑制していることが予想される。これまでに I 型 IFN の誘導のみを抑制する機構については知られておらず、この制御メカニズムを明らかにし、それを解除することによって、HAdV-D 感染における I 型と III 型両方の IFN の相乗効果による抗ウイルス免疫活性化が期待される。

病原性の違いと自然免疫応答の関係性

EKC では異物感や流涙、眼瞼腫脹、充血、結膜浮腫、結膜濾胞、結膜下点状出血等の症状が現れる (Ghebremedhin, 2014)。さらに重症化した場合には偽膜等による眼痛、多発性角膜上皮浸潤などの角膜合併症による視力低下が見られる (Ghebremedhin, 2014)。EKC を引き起こす HAdV-D の中でも、HAdV-D8、-D37、-D54 は症状の重症化に関与していることが示唆されている (Aoki et al., 2019)。これに対して、HAdV-D53、-D56 は比較的軽症で済むことが多い。これに関連するように、本論文の結果では高病原性とされる HAdV-D37 は、低病原性とされる HAdV-D53 より IFN の誘導が低いことが示唆された。ヒト結膜上皮細胞において、IFN は HAdV-D に対して抗ウイルス作用を持つことから、低病原性の HAdV-D53 感染では、感染細胞から IFN が大量に誘導されているために、ウイルスの増殖が抑制されている可能性が考えられる。それとは対象に、高病原性である HAdV-D37 は IFN の誘導を抑制することにより、症状を長期化または重症化させている可能性が示唆された。さらに、ウイルス感染によって誘導される IFN- λ 1 は単球細胞からの TNF、IL-1 β 、IL-6、CCL2 といった炎症性サイトカインの誘導を抑制すること (Broggi et al., 2017; Zanoni et al., 2017; Lazear et al., 2019)、これに関連して、重症な患者からの涙液中では CCL2 や IL-1 β が優位に増加していることも報告されている (Yawata et al., 2016)。これらのことより、低病原性の型では、大量に誘導された IFN- λ 1 がウイルス感染による炎症反応を制御するため、重症化しにくいことも考えられる。

免疫回避タンパク質 CR1 β の自然免疫活性化という新たな機能の発見

HAdV の E3 領域の幾つかのタンパク質は免疫回避に働くことが知られている。その中でも、CR1 β タンパク質は高病原性の HAdV-D37 では発現量が低病原性の HAdV-D53 と比

較して、非常に低いことが示された (図 9C)。このタンパク質は EKC 関連 HAdV-D の感染細胞から細胞外に分泌され、NK 細胞などの自然免疫細胞に発現している CD45 に結合し、免疫抑制に働くことが報告されている (Arnberg, 2013)。しかし今回、CR1 β が感染細胞において IFN の誘導を正に制御し、ウイルスの複製を抑制するという新たな機能を持つことを明らかとした (図 13)。CR1 β タンパク質は膜貫通ドメインを持つ膜タンパクであり、ウイルス感染細胞で細胞膜上に発現し、細胞外領域が切断されることによって、細胞外へと分泌される (Windheim et al., 2013)。さらに、CR1 β タンパク質は CD45 の他に、LILRB や SLAM などといった細胞膜タンパク質と相互作用することも報告されており (Martinez-Martin et al., 2016)、細胞外へと分泌された CR1 β タンパク質が感染細胞において細胞表面上に存在する受容体に結合することによって、IFN 産生を増強していることも考えられる。一方、本論文でヒト結膜上皮細胞における HAdV-D 感染時の IFN の誘導は、cGAS-STING 経路依存的であることを示した。このことから、CR1 β が細胞質内で cGAS-STING シグナル伝達に関わっている分子を活性化している可能性も考えられ、CR1 β タンパク質がどのような機構で感染細胞の IFN の発現誘導を増強するのかについては今後詳細に調べていく必要がある。また近年では、CR1 β タンパク質のアミノ酸配列と重症度との関連も示唆されており、CR1 β は型によって遺伝子発現の機構、または、細胞外への分泌されやすさなどが異なっていることも考えられる。

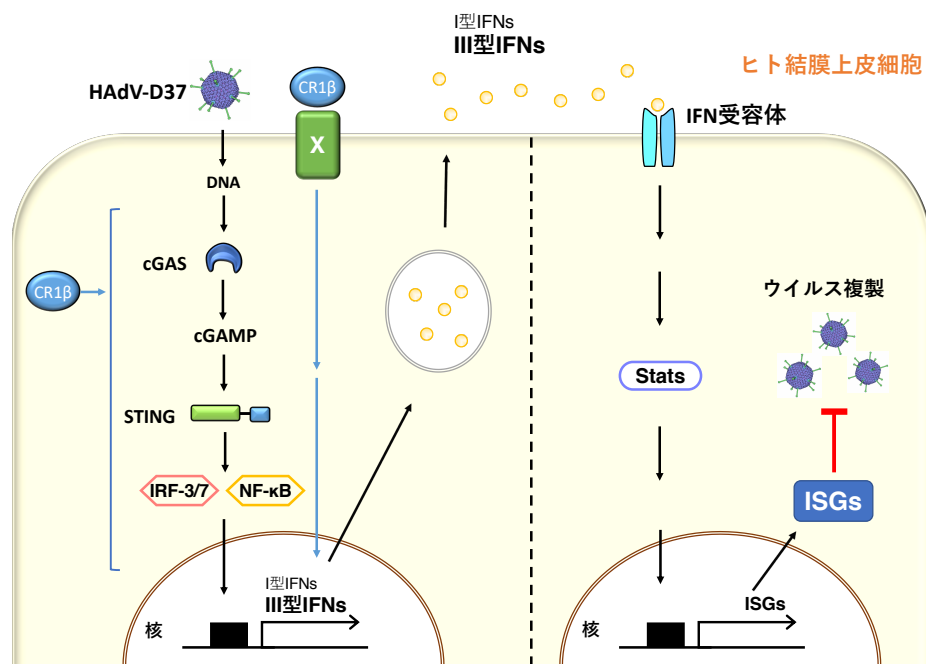


図 13. HAdV-D 感染ヒト結膜上皮細胞での自然免疫応答 (仮説)

HAdV-D が侵入すると、その DNA を細胞質 DNA センサーである cGAS が認識し、下流シグナル経路を活性化させることによって IFN が誘導される。誘導された IFN はウイルスの複製を抑制する。一方で、ウイルスタンパクである CR1 β は感染細胞で IFN の誘導を増強させ、抗ウイルス応答に働く。

4.2 EKC 起因 HAdV へのペルオキソー硫酸水素カリウム配合剤の不活化効果

EKC は主に HAdV-D8、-D19a (64)、-D37 によって引き起こされるとされていたが、近年新型である HAdV-D53、-D54、-D56 などが出現し、日本国内で検出されている (Gonzalez et al., 2019; Ishiko and Aoki, 2009)。これらの型は感染力が強く、病院内に伝染する。このような院内感染の制御は解決すべき重要な問題の一つである。本研究では、ペルオキソー硫酸水素カリウム配合剤と次亜塩素酸ナトリウムの HAdV-D に対する不活化効果を比較することで、ペルオキソー硫酸水素カリウム配合剤が眼科での EKC の院内感染の予防に有用であることを明らかにした。

0.1%の次亜塩素酸ナトリウムは HAdV に対して最も効果的な中水準消毒薬であるが、金属腐食性や刺激臭などにより、病院などの環境衛生管理の使用には制限があった (Akanuma, 2007; Fukuzaki, 2006)。それに対し、ペルオキソー硫酸水素カリウム配合剤は金属、特にステンレスに対する影響はほとんどなく (Okau et al., 2015)、塩素系消毒薬特有の刺激臭もなく、さらに簡単に調整でき、1 週間程度活性を保持することができる塩素系の環境洗浄剤である。ペルオキソー硫酸水素カリウム配合剤はその性質から、これまで次亜塩素酸では消毒ができなかった、眼科で頻用されている、トノメーター、細隙顕微鏡、点眼瓶などの医療機器の消毒への応用が期待される。

ペルオキソー硫酸水素カリウム配合剤は幅広い抗菌スペクトルを持ち、B 型及び C 型肝炎ウイルス、ポリオウイルス、エンテロウイルス、ネコカリシウイルス、芽胞、真菌など様々な微生物に不活化効果があるとされている (Eleraky et al., 2002; Gasparini et al., 1995; Hernandez et al., 2000; Chan and Abu Bakar, 2005; Roongruangchai et al., 2010; Ogura et al., 2015)。HAdV に対しては、HAdV-C5、-C6 を不活性化できるという報告がある (McCormick and Maheshwari, 2004)。塩素系の消毒薬は HAdV のカプシドタンパクを破壊することによって、不活化すると考えられている。HAdV には多くの型があり、構成タンパク質も異なっており、特にカプシドタンパクを構成する 3 つのタンパク質は、型の分類に用いられるほど、種及び型間で最もアミノ酸配列の違いが大きいタンパク質である。さらに近年の日本国内での長期調査の報告では、型間の違いだけでなく、型内の遺伝子の変異までもがアデノウイルス性角結膜炎の流行と関与していることが示唆されており (Ariga et al., 2005)、HAdV 構成タンパク質の違いはウイルス学的特徴に影響していることが考えられる。一方で、ペルオキソー硫酸水素カリウム配合剤のその他の HAdV、特に EKC 関連 HAdV-D に対する消毒効果については全く評価されていなかった。我々の結果はペルオキソー硫酸水素カリウム配合剤が HAdV-C5、-C6 とはカプシドタンパク質の大きく異なる HAdV-D にも不活化効果を有することを示した。このことから、他の HAdV に対するペルオキソー硫酸水素カリウム配合剤の不活化効果も期待できる。

本研究では、ペルオキソー硫酸水素カリウム配合剤が HAdV-D54 に対して、次亜塩素酸ナトリウムより不活化効果が高いことを示した。HAdV-D54 は 2000 年に日本の病院における院内感染の際に分離されたのが最初の報告である (Ishiko et al., 2008)。その後、日本

国内においてしばしば検出され、特に近年では高頻度に分離されている（Gonzalez et al., 2019）。HAdV-D54 はカプシドタンパクをコードしているゲノム配列が特有であるが（Gonzalez et al., 2019）、そのウイルス学的特徴についてはほとんど明らかとなっていない。金子らが他の EKC 起因 HAdV-D 種と比較して、HAdV-D54 は CPE の観察までに時間がかかることを報告している（Kaneko et al., 2011）。この報告と関連して、A549 細胞において HAdV-D54 の増殖速度が試験した HAdV の中で最も遅いことを確認した（図 29、補足資料）。HAdV-D54 の持つ特有の因子や、その宿主細胞との相互作用が低い増殖速度や CPE に関与している可能性が示唆される。

本研究では、ペルオキソ－硫酸水素カリウム配合剤が EKC 関連 HAdV-D に対して強い不活化効果を持つことを示した。ペルオキソ－硫酸水素カリウム配合剤の利便性を考慮すると、本研究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。

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

1 背景

ほぼ全ての微生物は、c-di-AMP (cyclic di-AMP)、c-di-GMP (cyclic di-GMP)、トリヌクレオチドといった多様な環状ジヌクレオチド (CDNs) を産生する、CD-NTases (cGAS/DncV-like nucleotidyltransferases) をコードしていることが示されている (Jenal et al., 2017)。これらの CDNs は微生物でセカンドメッセンジャーとして供給され、脂質合成、細胞壁の恒常性維持、バイオフィルムの形成など様々なプロセスのシグナル経路を制御している (Corrigan and Gründling, 2013; Romling et al., 2013; Whiteley et al., 2019)。これらの微生物の各種プロセスにおける役割に加えて、CDNs は微生物細胞外に放出され、哺乳類の自然免疫システムによって認識されることで、宿主細胞と微生物間のシグナルの活性化につながる (Woodward et al., 2010)。この点に関連して、STING は微生物セカンドメッセンジャーである c-di-GMP や c-di-AMP のセンサーとして働くが (Burdette et al., 2011)、これらの分泌された CDNs がどのように細胞内に存在する STING を活性化するのはほとんど明らかとなっていない。

微生物の産生する CDNs とは別に、細胞質 DNA を cGAS が認識することによって産生される cGAMP も、STING を介して自然免疫応答を活性化させる CDNs の一種である。cGAMP は微生物感染細胞だけでなく、ガン細胞などでも産生されることが示唆されており、ガンの治療応用の可能性も期待されている (Li et al., 2016)。さらに、全身性エリテマトーデス (SLE) などの自己免疫疾患の患者の PBMCs において、cGAMP の上昇が認められているなど (An et al., 2017; Kato et al., 2018)、cGAMP の調節は幅広い分野で注目されている。cGAMP は細胞間のギャップ結合やウイルス粒子を介して細胞間を移動することも報告されている (Ablasser et al., 2013b; Bridgeman et al., 2015)。さらに、細胞外の cGAMP が STING 依存的なシグナルを介してガンに対する自然免疫応答を活性化することも示されており (Marcus et al., 2018)、cGAMP が感染細胞やガン細胞などから細胞外スペースへと放出され、自然免疫応答を活性化していることが示唆されるが、実際に cGAMP が細胞外に出ているのか、またその活性化機構は不明である。

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。

2 材料と方法

2.1 マウスとウイルス

BALB/c マウスは CLEA Japan から、cGAS KO マウスは Jackson Laboratory からそれぞれ入手した。HSV-1 (1×10^6 pfu/mice; 静脈内投与 [i.v.]), MVA (1×10^7 pfu/mice; i.v.)、EMCV (1×10^5 pfu/mice; 腹腔内投与 [i.p.]), IAV (A/Puerto Rico/8/1934 H1N1 株, 1×10^5 pfu/mice; 鼻腔内投与 [i.n.]), NDV (LaSota strain, 80 hemagglutination units (HAU)/mice; i.p.) をマウスに感染させた。ARL67156 は PBS で溶解し、ウイルス感染前に 2 mg/kg を i.p. で接種した。抗体実験には、 α -C-STING 抗体及び α -MAVS 抗体 (10 μ g/mice) を用い、抗体処理 3 時間後に EMCV (i.p.)、HSV-1 (i.v.)、IAV (i.n.) をそれぞれ感染させた。示した時間後、血清と細胞をさらなる実験に用いた。これらの病原体ならびに動物実験は北海道大学の病原体委員会と動物実験委員会に申請を行い、許可を得て実施した。

2.2 細胞

THP-1 と MonoMac6 細胞は RPMI 1640 培地 (Sigma) に 10% 非働化 FBS (Fetal bovine serum; ウシ胎児血清、Gibco) を加えたものを使用した。U937、HeLa、HCT116、HEK293T、HEK293 細胞は ATCC の推奨培地を用いて培養した。HPA EpiC 細胞は ScienCell research laboratories から購入し、添付の製品プロトコルに従い、推奨培地を用いて培養した。DC2.4、RAW264.7、B16F10、CT26、NIH3T3、MEF 細胞は ATCC の推奨培地及び先行研究の培地を使用した (Ichihara et al., 2010)。THP-1 と U937 細胞をマクロファージに分化させるために、100 nM の PMA (P1585; Sigma) で 24 時間処理した。PBMCs は健康なボランティア (北海道赤十字血液センターより提供された) の末梢静脈血から Lymphoprep™ (AXS) 密度勾配遠心法により分離した。ヒト初代 CD14 陽性単球は磁気ビーズを使用した磁気細胞分離法 (MACS, Miltenyi Biotec) で添付の製品プロトコルに従い、PBMCs から分離した。これらの臨床サンプルを用いた実験は北海道大学の倫理委員会に申請を行い、許可を得て実施した。この研究計画はヘルシンキ宣言に従い、北海道大学の倫理委員会の許可を得た。

2.3 定量 Real-time PCR 法

ISOGEN (ニッポンジーン) を用いてチオシアン酸グアニジンフェノールクロロホルム法にて培養細胞から RNA の回収を行い、DNase および RNase free の水に溶解した。抽出した RNA に DNase I (Invitrogen) を加え 25°C で 15 分間反応させることで DNase 処理を行い、DNA を分解させた。反応後 25 mM EDTA 1 μ l を加え 65°C で 10 分間反応させることで、DNase I を失活させた。その後、ReverTra Ace® qPCR RT Kit (TOYOBO) を用いて RNA を逆転写し、cDNA を合成した。

定量的 PCR は SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara) を用いてインターカレーター法にて

行い、StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) で定量し、 $\Delta\Delta C_t$ 法にて解析した。なお、反応条件は、95°C 10 秒間の初期変性後、95°C 5 秒間の変性反応、60°C 30 秒間のアニーリング及び伸長反応の 2 ステップを 45 サイクル行った。内部標準としては *GAPDH* を使用した。使用したプライマーの配列は表 4 (補足資料) に記した。

2.4 CRISPR-Cas9 システムを用いたノックアウト細胞作製

cGAS と STING ノックアウト THP-1 細胞を作製するために、Feng Zhang (Addgene plasmid #52961) から得た lentiCRISPR v2 system (Sanjana et al., 2014) を使用した。cGAS と STING を標的とした gRNA (表 6、補足資料) を組み込んだプラスミドを HEK293T 細胞に導入し、72 時間後にレンチウイルスを回収した。これらのウイルスを THP-1 細胞に感染させ、ピューロマイシン (1 μ g/ml) 含有培地で 2 週間培養した。ピューロマイシン耐性細胞を限界希釈法によりクローン化し、DNA 配列決定で変異が入っていること、免疫ブロット法で標的タンパク質の発現がないことを確認した。

2.5 プラスミド作製と遺伝子導入

pLV SIN-CMV vector (Takara) に KOD Plus ver2 (TOYOBO) により増殖させた各種 STING 配列を組み込み、STING 発現ベクターを作製した。作製したベクターを pMISSION VSV-G (Sigma)、pMISSION GAG POL (Sigma) とともに HEK293T 細胞に FuGENE® 6 Transfection Reagent (Promega) を使用しプラスミドを導入し、72 時間後に STING 発現レンチウイルスを回収した。作製したレンチウイルスは STING KO THP-1 細胞に感染させ、72 時間後にさらなる解析に用いた。

Bruce Mayer 教授に分与して頂いた pEBG vector に KOD DNA Polymerase (TOYOBO) を用いて増幅した STING のフラグメントを組み込み、GST 融合 STING 発現ベクターを作製した。

2.6 間接蛍光抗体法

カバーガラス上に播種した細胞を、2% bovine serum albumin/PBS (バッファー1) で希釈した一次抗体にて 4°C で 30 分静置し細胞外染色した。その後、4% パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液 (Wako) で固定し、バッファー1 で 30 分間ブロッキングをした。細胞内を染色するために、4% パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液で固定された細胞を 0.2% Triton X-100/PBS で細胞膜透過処理を行い、バッファー1 でブロッキングをした。その後、バッファー1 で希釈した一次抗体で 37°C に 1 時間静置し、染色した。一次抗体処理したカバーガラスをバッファー1 で洗い、Alexa Fluor 488/594 (Invitrogen) が結合した二次抗体で 37°C に 1 時間静置した。次に、PBS で洗ったカバーガラスを Hoechst 33342 (Invitrogen) を含む Slowfade Gold antifade reagent (Invitrogen) とともにスライドガラスに封入した。蛍光顕微鏡観察は IX-81S confocal microscope (Olympus) を用いた。間接免疫蛍光染色に用

いた抗体は表 7（補足資料）に記した。

2.7 細胞膜タンパク質のビオチン化と細胞分画

15 cm ディッシュに播種した分化させた THP-1 細胞を氷上にて、PBS で 3 回洗い、Biotin-SS-Sulfo-OSu (1 mg/ml; Dojindo) で標識した。15 mM グリシンで反応を停止し、PBS で 2 回、ホモジナイズバッファー (10 mM HEPES-KOH [pH 7.5]、0.25 M スクロース、1 mM EDTA) で 1 回洗った。回収した細胞をホモジナイズバッファーに懸濁し、27 ゲージの注射針を 20 回通してホモジナイズし、1,000g で 10 分間遠心した。上清を回収し、さらに 100,000g で 1 時間遠心し、細胞質と膜分画に分けた。膜分画を 2-24% の OptiPrep (AXS) 勾配の上に重ね、100,000g で 3 時間遠心した。遠心後、上から 24 の分画 (各 0.17 mL) を回収した。各分画をバッファー (20 mM HEPES、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1% NP-40、1 mM PMSF、1 µg/ml leupeptin [pH 7.3]) に溶解し、超音波処理をした後、15,000g で 4°C 10 分間遠心した。上清を回収し、Dynabeads M-280 Streptavidin (Invitrogen) を加え、1 時間穏やかに震とうした。ビーズを wash バッファー (20 mM HEPES、150 mM NaCl、1 mM EDTA、0.5% NP-40 [pH 7.3]) で 3 回洗い、サンプルバッファー (125 mM Tris-HCl、4% SDS、20% Glycerol、0.002% BPB、10% 2-Mercaptoethanol [pH 6.8]) でタンパク質を溶出させ、免疫ブロット法で解析した。

2.8 トリプシン処理

15 cm ディッシュに播種された THP-1 細胞をトリプシン (Wako) で 30 分間処理し、ER 膜分画を上記の方法で回収した。

2.9 FACS 解析

2% FBS/PBS で 2×10^5 個の細胞を懸濁し、Human TruStain FcX™ (Fc Receptor Blocking Solution; Biolegend) でブロッキングした。細胞懸濁液を 2% FBS/PBS で洗い、抗体を加え氷上で 30 分間静置し細胞外染色をした。細胞内染色は、Fixation/Permeabilization Solution Kit (BD) を用いて、添付の製品プロトコルに従って行った。染色した細胞は BD FACS Canto II flow cytometer (BD) で解析をした。FACS 解析に使用した抗体は表 7（補足資料）に記した。

2.10 cGAMP pull-down アッセイ

THP-1 細胞を溶解バッファー (20 mM HEPES、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1% NP-40、1 mM PMSF、1 µg/ml leupeptin [pH 7.3]) で回収し、2 µg の α -C-STING 抗体 (Bioss) 及び control IgG 抗体を細胞溶解液 (1 mg) に加え、1 時間穏やかに震とうした。その後、cGAMP アガロースビーズ (Biolog) を加え、1 時間穏やかに震とうした。回収したビーズを wash バッファー (20 mM HEPES、150 mM NaCl、1 mM EDTA、0.5% NP-40 [pH 7.3])

で3回洗い、サンプルバッファーでタンパク質を溶出し、免疫ブロット法で解析した。

2.11 免疫ブロット法

プレートに播種された細胞を PBS で洗い、溶解バッファー (50 mM Tris-HCl [pH 7.4]、0.5% SDS) で細胞を溶解し、超音波処理をした後、95°Cで10分加熱した。Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo) を用いて添付の製品プロトコルに従いタンパク量を定量し、サンプルバッファーを加え95°Cで3分間ボイルした。得られたサンプルをポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Leammli 法) により分離し、タンパク質を PVDF メンブレンに転写した。その後、ブロッキングバッファーでブロッキングし、Solution 1 (TOYOBO) で希釈した一次抗体を加え4°Cで一晩インキュベートした。TBS-T (20 mM Tris-HCl [pH 7.4]、150 mM NaCl、0.1% Tween 20) で洗い、HRP 標識二次抗体を加え1時間インキュベートし、Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo) と反応させ、Amersham Imager 680 (GE Healthcare) でタンパク質を検出した。免疫ブロット法で使用した抗体は表7 (補足資料) に記した。

2.12 ELISA

マウスの血清中の 2'3'-cGAMP は 2'3'-cGAMP ELISA Kit (Cayman Chemical) を用いて、添付の製品プロトコルに従い行った。細胞上清中の IFN-β と IFN-λ1 タンパク質を VeriKine™ Human IFN-β ELISA kit (PBL) と、Human IL-29 ELISA kit (Invitrogen) を用いて、添付の製品プロトコルに従いそれぞれ測定した。VeriKine-HS™ Mouse IFN-β Serum ELISA kit (PBL) と DIY Mouse IFN Lambda 2/3 ELISA kit (PBL) を添付の製品プロトコルに従い、マウスの血清中の IFN-β と IFN-λ2/3 タンパク質をそれぞれ測定した。

2.13 siRNA による遺伝子ノックダウン

マクロファージに分化させた THP-1 細胞に 20 nM の cGAS 及び STING を標的とした siRNA (表5、補足資料) を、OPTI-MEM (Gibco) と 2 μl DharmaFECT 4 (Dharmacon) を用いてトランスフェクションした。MonoMac6 細胞はエレクトロポレーション (NEPA21; Nepagene) を用いて、添付の製品プロトコルに従い siRNA をトランスフェクションした。トランスフェクションから48時間後の細胞をさらなる解析に使用した。

2.14 ヘマトキシリン・エオジン染色

マウスから摘出した組織をホルマリンで固定し、Mayer's hematoxylin (Wako) と 1% Eosin Y (Wako) で染色した。

2.15 ルシフェラーゼアッセイ法

12 well プレートに単層培養された HEK293T 細胞に GST 融合 STING 発現ベクターを、ル

シフェラーゼレポータープラスミド (p-125-Luc) を 0.1 μ g、内部標準として Renilla ルシフェラーゼレポータープラスミド (pTK-RL; TOYO INK) を 1 ng と共に、OPTI-MEM と Lipofectamine 2000 Reagent を用いてリポフェクション法にてトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後の細胞を解析した。細胞抽出液回収から測定までは、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて製品プロトコルに従って行った。また測定する機器はフォトンカウンター (Centro LB 960; BERTHOLD) を使用した。

2.16 GST pull-down アッセイ

6 well プレートに単層培養された HEK293T 細胞に GST 融合 STING 発現ベクターを OPTI-MEM と Lipofectamine 2000 Reagent を用いてリポフェクション法にてトランスフェクションした。24 時間後に溶解バッファー (20 mM HEPES、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1% NP-40、1 mM PMSF、1 μ g/ml leupeptin [pH 7.3]) で回収し、30 分間 4°C で穏やかに振とうし、15,000 rpm で 10 分間遠心し上清を回収した。その後、グルタチオンビーズ (GE Healthcare) を加え、4°C で 1 時間半穏やかに震とうした。回収したビーズを wash バッファー (20 mM HEPES、150 mM NaCl、1 mM EDTA、0.5% NP-40 [pH 7.3]) で 4 回洗い、サンプルバッファーでタンパク質を溶出し、免疫ブロット法で解析した。

2.17 データ解析

統計解析の P 値を決定するために両側のスチューデントの t 検定を行った。

3 結果

3.1 ウイルス感染で cGAS 依存的に cGAMP が細胞外に産生される

まずウイルス感染細胞において、cGAMP が細胞外へと誘導されているのかを ELISA 法を用いて調べた。マウス胎児線維芽細胞 (MEF) に DNA ウイルスである単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1)、ワクシニアウイルス (MVA)、RNA ウイルスである A 型インフルエンザウイルス (IAV)、脳心筋炎ウイルス (EMCV)、ニューカッスル病ウイルス (NDV) を感染させ、培養上清中の cGAMP を測定したところ、DNA ウイルスである HSV-1 と MVA 感染細胞では上清中の cGAMP 量が上昇していた (図 14A)。次に、生体内において、cGAMP が細胞外に放出されるのかを調べたところ、DNA ウイルスのみならず、RNA ウイルス感染においてもマウスの血中で cGAMP 量の上昇が認められた (図 14B)。RNA ウイルス感染時の cGAMP の誘導が cGAS 依存的であるのかを、cGAS ノックアウトマウスを用いて検討したところ、興味深いことに、RNA ウイルスも cGAS 依存的に cGAMP を産生していることが明らかとなった (図 14C)。これらの結果より、生体内でのウイルス感染では、DNA と RNA ウイルスの両方で、cGAS 依存的に血中へ cGAMP が放出されていることが示された。

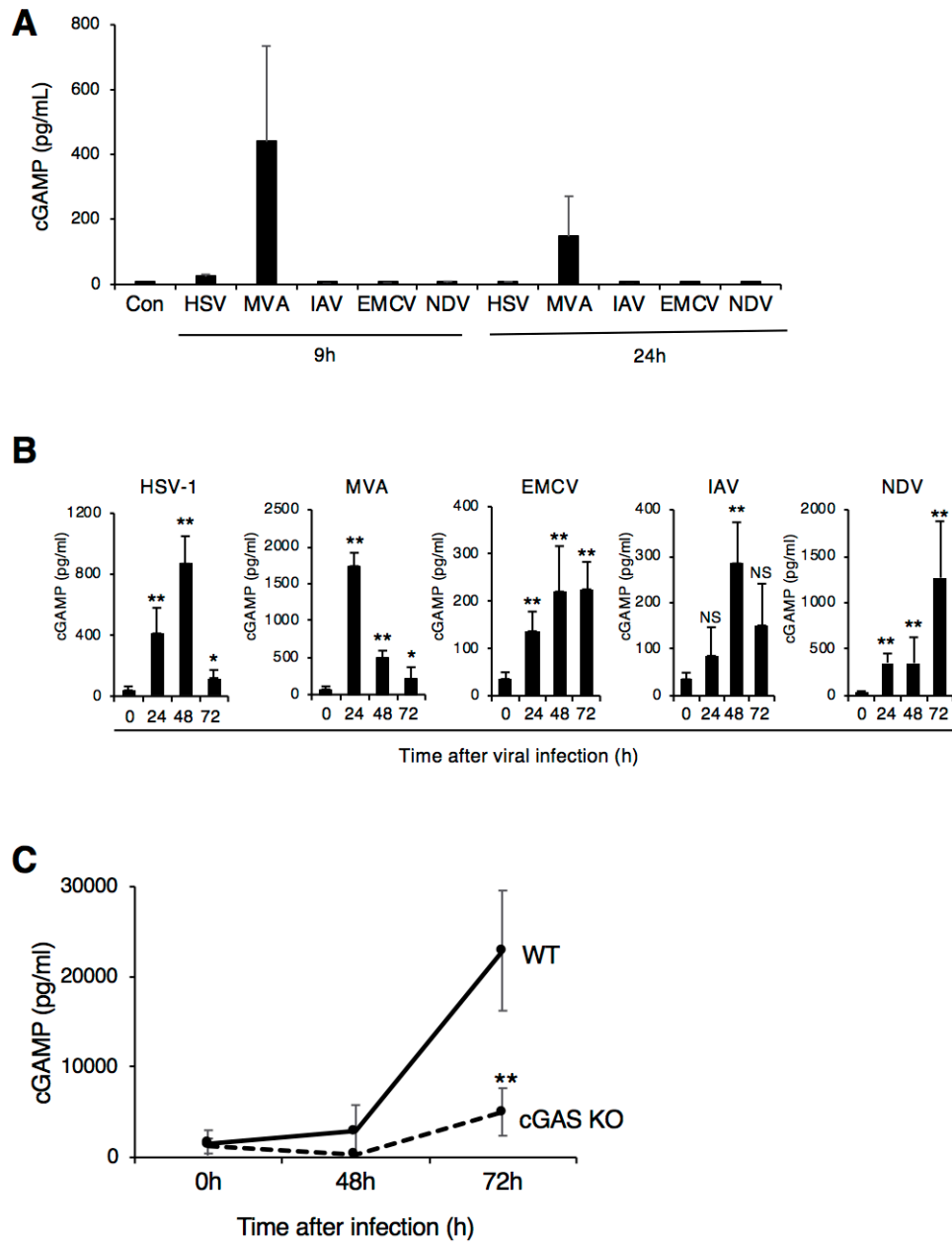


図 14. ウイルス感染による cGAS 依存的な細胞外 cGAMP 量の上昇

(A) MEF に HSV-1、MVA、EMCV、IAV、NDV を感染させ、9、24 時間後の培養上清中の cGAMP の量を ELISA で定量した。

(B) HSV-1、MVA、EMCV、IAV、NDV に感染させた BALB/c マウスの 0、24、48、72 時間後の血清中の cGAMP 量を ELISA で測定した。

(C) WT 及び cGAS KO マウスに EMCV を感染させ、感染後 48、72 時間の血清中の cGAMP を測定した。

データは 3 回の独立した実験から得られた平均値±SD で表した。** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$ vs コントロール。

3.2 血球系の細胞では細胞外 cGAMP 刺激で STING 依存的に IFN が産生される

ウイルス感染の間、マウスの血清中の cGAMP のレベルが有意に上昇していたことから、細胞外の cGAMP が抗ウイルス自然免疫応答の活性化に働いているのではないかと考えた。そこで、様々な種類の細胞に対して細胞外 cGAMP 刺激を行い、IFN- β と IFN- λ 1 の誘導を調べた。その結果、THP-1、U937、MonoMac6、ヒト末梢血単核細胞 (PBMCs) といった血球系の細胞において、他の細胞と比較して両方の IFN の誘導が有意に高いことがわかった (図 15A、B)。さらに、ヒトとマウスの血球系細胞両方で、環状ジヌクレオチド (CDNs) の一種である c-di-GMP の細胞外刺激に対しても、*IFNB1* の mRNA の誘導が確認された (図 15C)。以上の結果から、血球系の細胞では、細胞外 CDNs を認識して、自然免疫応答を活性化する機構があることが示唆された。

通常、cGAMP などの CDNs は細胞内で、ER 膜上に存在する STING によって認識され、自然免疫応答を活性化することが知られている。そこで、細胞外の cGAMP も STING によって認識されているのかを確認するために、STING を標的とした siRNA を用いて IFN の誘導性が変化するかを調べた。THP-1、MonoMac6 細胞において、STING をノックダウンした場合にのみ *IFNB1*、*IFNL1* 両方の遺伝子誘導が低下した (図 16A、B)。さらに STING と cGAS のノックアウト (KO) THP-1 細胞を作製し (図 16C、D)、細胞外 cGAMP の応答性を比較したところ、ノックダウンの結果と同様に、STING KO THP-1 では IFN の誘導は認められなかった (図 16E)。このことから、細胞外の cGAMP は STING を介して自然免疫応答を活性化していることが明らかとなった。

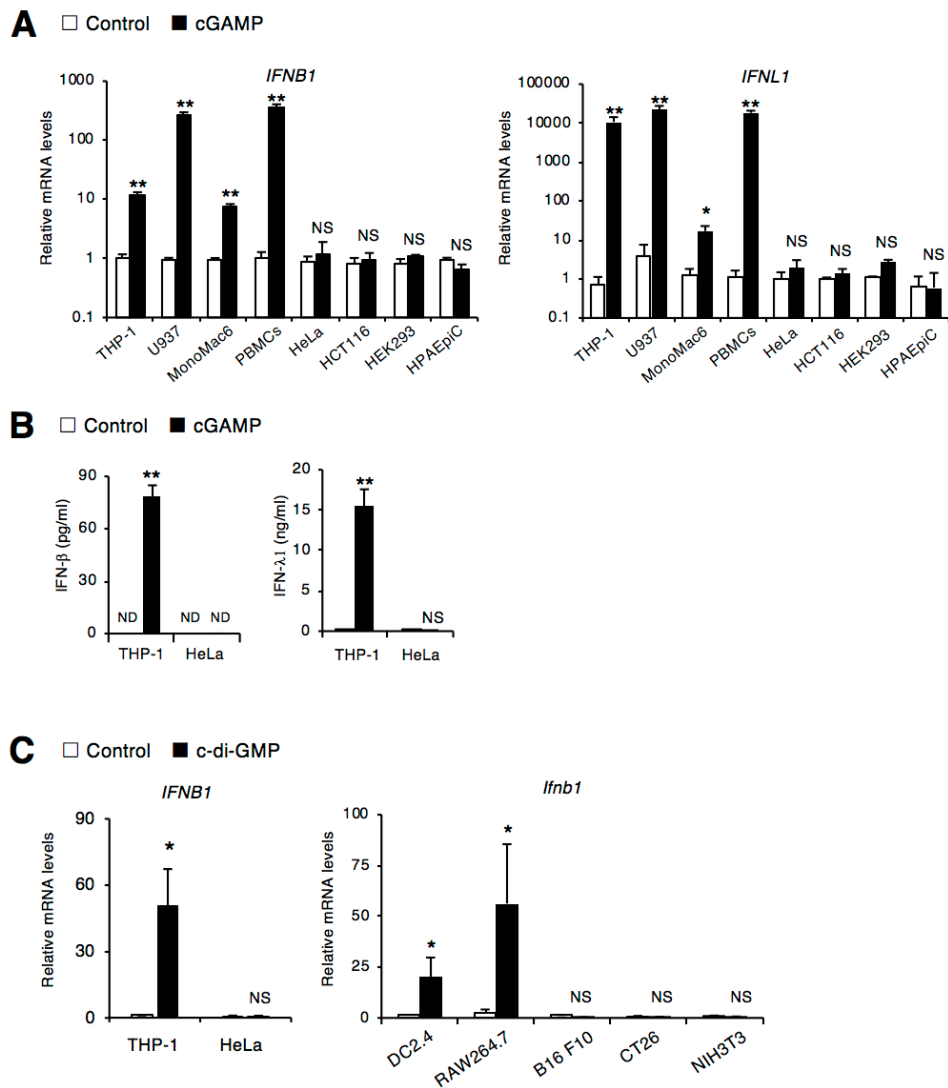


図 15. 細胞外 cGAMP 刺激による血球系細胞での IFN 応答

(A) THP-1、U937、MonoMac6、PBMCs、HeLa、HCT116、HEK293、HPAEpiC 細胞における細胞外 cGAMP 刺激後 6 時間の *IFNB1* と *IFNL1* の mRNA 量を Real-time PCR で定量した。

(B) THP-1 と HeLa 細胞に細胞外 cGAMP 刺激をし、24 時間後の培養上清中の IFN-β と IFN-λ1 を ELISA で定量した。

(C) 図示したヒトとマウスの細胞に細胞外 c-di-GMP 刺激をし、6 時間後に *IFNB1* 及び *Ifnb1* の mRNA を Real-time PCR にて測定した。

データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 ± SD で表した。** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$ vs コントロール。NS, not significant。ND, not detected。

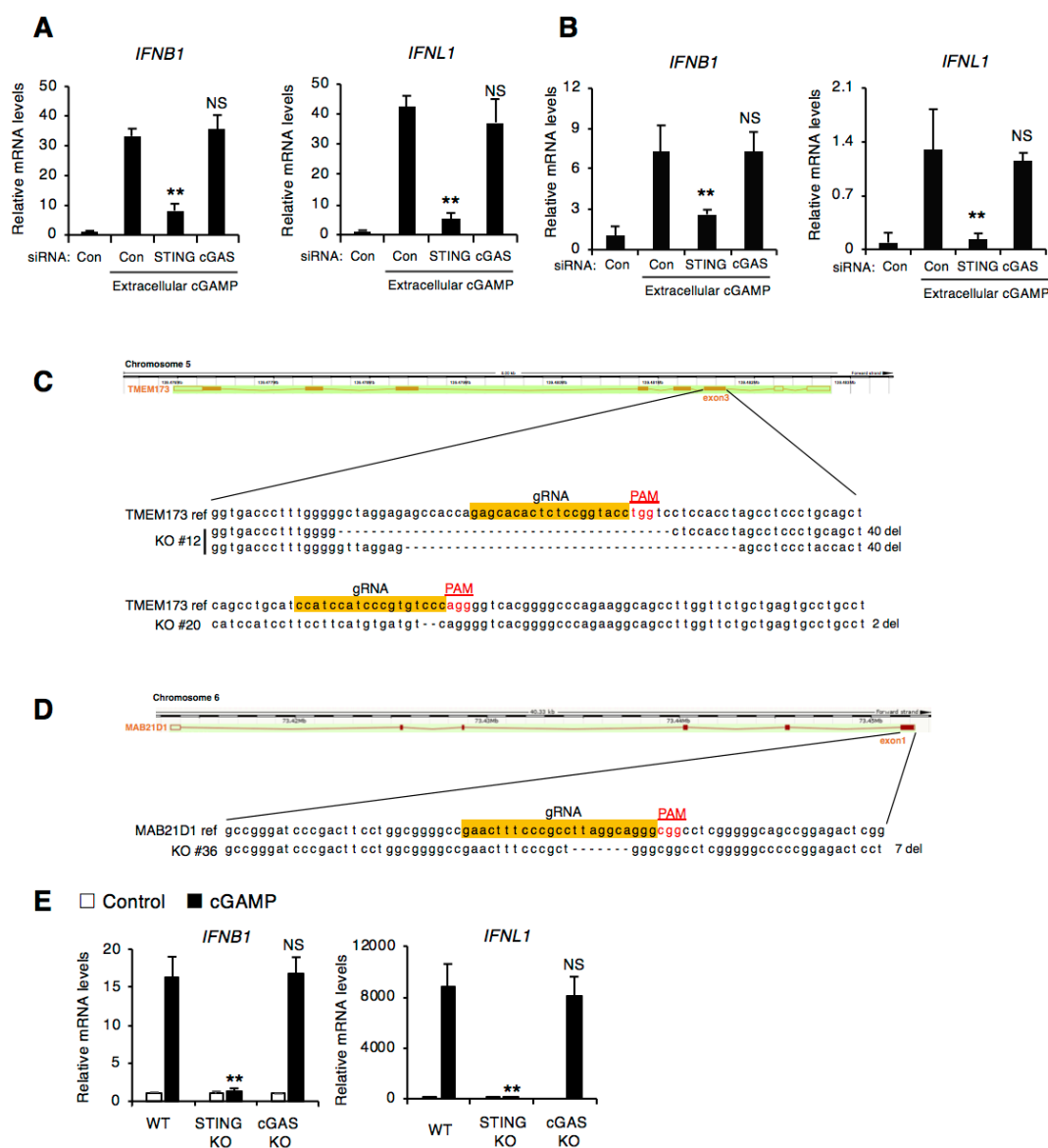


図 16. 細胞外 cGAMP 刺激による IFN 誘導は STING を介する

(A、B) コントロール siRNA (Con) 及び STING と cGAS を標的とした siRNA をトランスフェクションした THP-1 (A)、MonoMac6 (B) 細胞に細胞外 cGAMP 刺激をし、6 時間後の *IFNB1* と *IFNL1* の mRNA を Real-time PCR で定量した。

(C、D) 5 番染色体の *TMEM173* 遺伝子のエクソン 3 (C) と 6 番染色体の *MAB21D1* 遺伝子のエクソン 1 (D) に設計した gRNA (黄色) を用いて作製した KO 細胞のゲノム配列を示した。

(E) WT と STING KO 及び cGAS KO THP-1 細胞に細胞外 cGAMP 刺激をした。6 時間後に RNA を回収し、*IFNB1* と *IFNL1* を Real-time PCR で測定した。

データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 ± SD で表した。** $P < 0.01$ vs コントロール。NS, not significant。

3.3 cGAMP のトランスポーターである SLC19A1 は高濃度の時のみ働く

最近、細胞膜タンパク質である SLC19A1 が細胞外 cGAMP のトランスポーターとして働き、自然免疫応答を活性化するという報告がされていた (Luteijn et al., 2019; Ritchie et al., 2019)。しかしながら、これらの実験で用いられていた cGAMP は非常に高濃度であり、通常実験で使用する cGAMP の濃度とは大きく異なっていた。そこで、SLC19A1 が低濃度でも cGAMP のトランスポーターとして働くのかを siRNA を用いたノックダウン系で検討した。THP-1 細胞において、十分に *SLC19A1* の mRNA が低下している条件下で (図 17A)、細胞外 cGAMP 刺激をしたところ、高濃度 (100 μ M) では先行研究と同様に *IFNB1* と *IFNL1* の遺伝子誘導が低下したが、低濃度 (6 μ M) ではどちらの IFN の誘導も変化しなかった (図 17B、C)。以上より、SLC19A1 タンパク質は細胞外 cGAMP が高濃度の時にのみ非積極的にトランスポーターとして働き、自然免疫応答を活性化することが示唆された。

さらに、実際に低濃度で cGAMP 処理をした際に、cGAMP が細胞質内へと輸送されないのかを FITC でラベルされた cGAMP (FITC-cGAMP) を用いて確認した。細胞外 cGAMP 応答性の細胞である、THP-1、U937、MonoMac6、PBMCs においては細胞の表面に蛍光が観察されるのに対し、IFN を誘導しなかった細胞では蛍光は見られなかった (図 18A)。一方で、高濃度の FITC-cGAMP 処理では、細胞内刺激 (図 18A) と同様に cGAMP が細胞質内で検出されていた (図 18B)。これらの結果より、本研究で使用している低濃度の cGAMP の系では、cGAMP は細胞表面で認識されている可能性が示唆された。

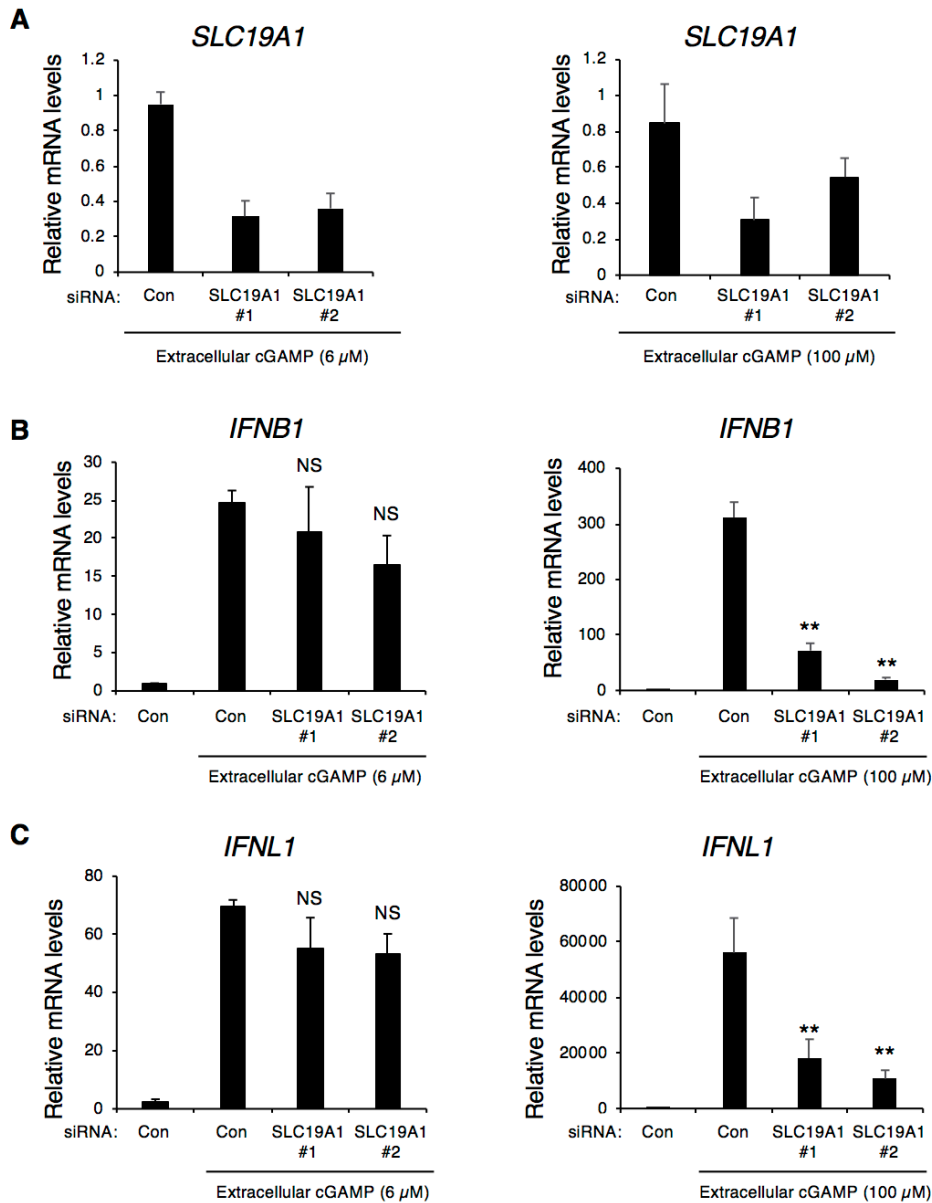


図 17. 低濃度の細胞外 cGAMP 刺激では SLC19A1 非依存的に IFN を誘導する

(A) コントロール siRNA (Con) 及び *SLC19A1* を標的とした siRNA をトランスフェクションした THP-1 細胞を 48 時間後に RNA を回収し、*SLC19A1* の mRNA 量を Real-time PCR で定量した。

(B, C) コントロール siRNA (Con) 及び SLC19A1 を標的とした siRNA をトランスフェクションした THP-1 細胞に低濃度 (6 μ M) と高濃度 (100 μ M) の細胞外 cGAMP 刺激をし、6 時間後の *IFNB1* (B) と *IFNL1* (C) の mRNA を Real-time PCR で定量した。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 $\pm$ SD で表した。** $P < 0.01$ vs コントロール。NS, not significant.

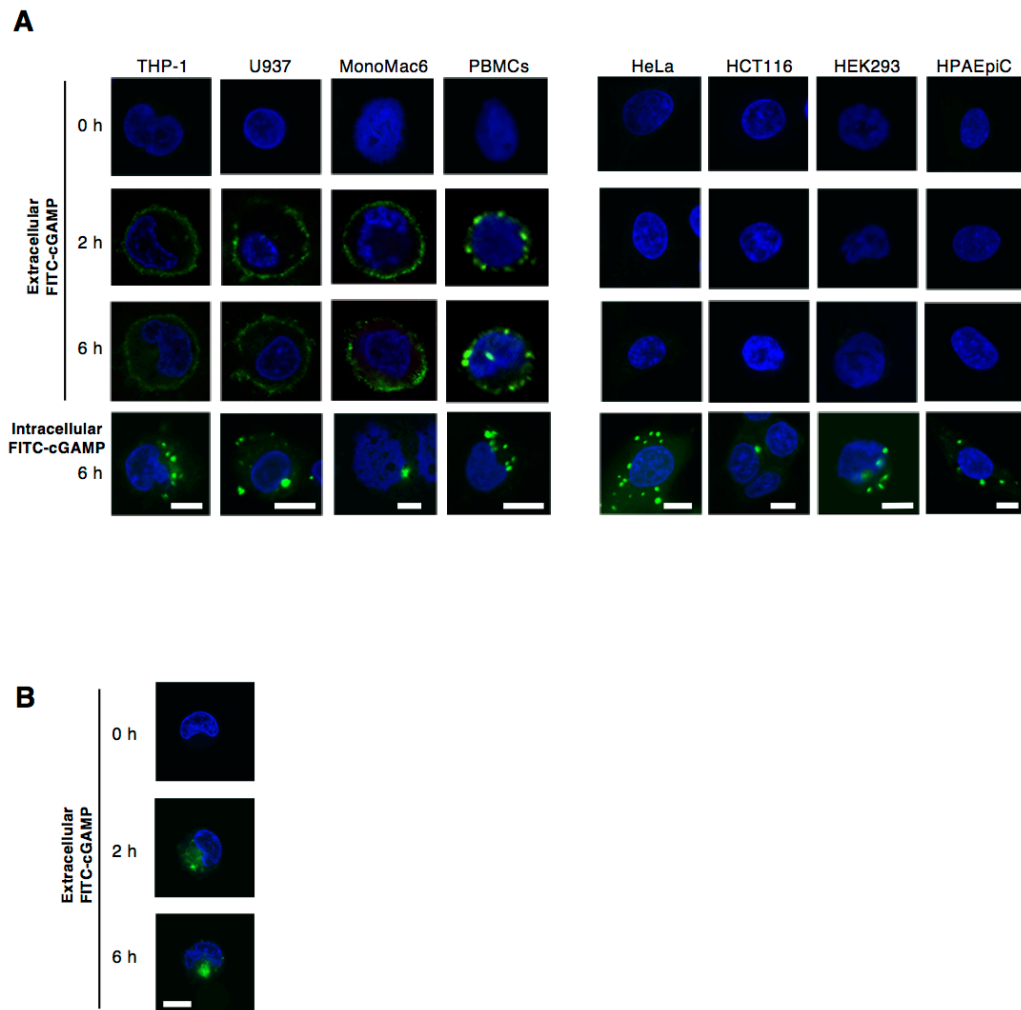


図 18. 低濃度 cGAMP は細胞質内に侵入せず、細胞表面に集積する

(A) 図示した各種細胞に FITC-cGAMP (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で細胞内、細胞外刺激をした 2、6 時間後の動態を免疫蛍光染色で観察した。

(B) THP-1 細胞に FITC-cGAMP (100 μM) で細胞外刺激をした 2、6 時間後の動態を免疫蛍光染色で観察した。スケールバー：10 μm 。

3.4 細胞外 cGAMP 応答性の細胞では STING が細胞表面に局在し、細胞表面で cGAMP と結合している

これまでの結果より、CDNs の受容体である STING タンパク質が細胞表面に局在し、細胞外の cGAMP を直接的に認識していることが考えられた。これを確認するために、膜透過処理を行わずに α -C-STING 抗体で蛍光染色を行ったところ、THP-1、U937、MonoMac6、PBMCs といった細胞外 cGAMP 刺激で IFN を誘導した細胞では、STING が細胞表面に局在していた (図 19A)。これらの細胞の細胞膜上の STING の局在は FACS 解析でも確認された (図 19B)。対照的に、IFN を誘導しなかった細胞 (HeLa、HCT116、HEK293、HPAEPiC) では、膜透過処理なしでは細胞膜の STING は検出されなかった (図 19A、B)。一方で、膜透過処理をした細胞では、細胞外 cGAMP 刺激での IFN 誘導とは関係なく全ての細胞で α -C-STING 抗体により染色された (図 19A)。

さらに、末梢血の初代ヒト血球系細胞のどの集団で STING が細胞表面に局在しているのかを調べた。CD11b 陽性マクロファージ、CD11c 陽性樹状細胞、CD56 陽性ナチュラルキラー (NK) 細胞、CD19 陽性 B 細胞、CD3 陽性 T 細胞の細胞表面 STING の存在を FACS で解析したところ、CD11b 陽性マクロファージと CD11c 陽性樹状細胞で細胞表面の STING が確認された (図 19C)。

次に、実際に細胞表面で STING と cGAMP が相互作用しているのかを蛍光染色で確認した。細胞外 FITC-cGAMP 刺激をした THP-1 細胞では、STING と cGAMP が細胞表面上に共局在していたが、STING KO THP-1 細胞では認められなかった (図 19D)。一方、FITC-cGAMP を細胞内にトランスフェクションした場合では、細胞質内で STING と cGAMP の共局在が見られた (図 19D)。これらの結果は、ヒトのモノサイトでは細胞外の cGAMP を STING 依存的に細胞表面上で認識できる可能性を示唆している。

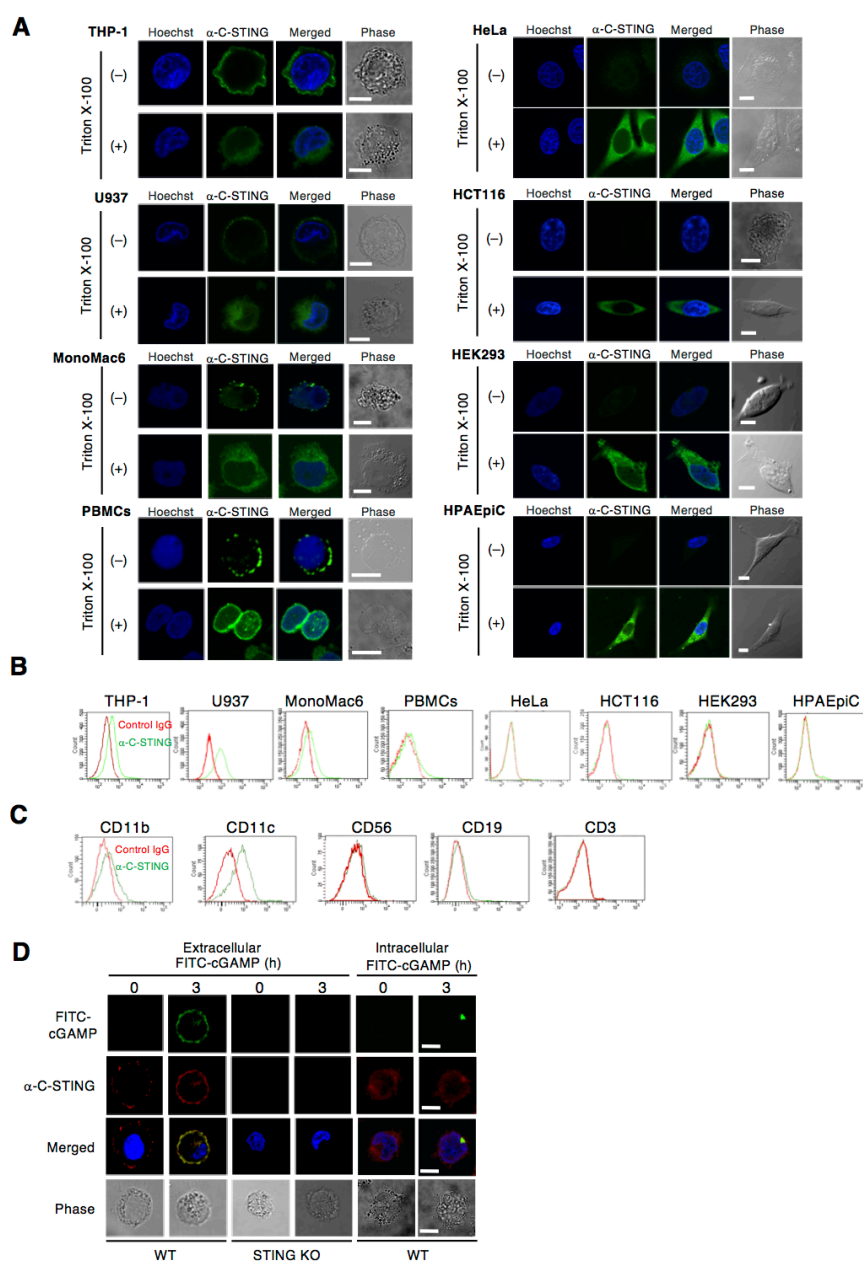


図 19. ヒトの単球では STING が細胞表面に局在し、cGAMP と細胞膜上で相互作用する

(A) Triton X-100 で膜透過処理をした細胞 (+) としていない細胞 (-) の STING タンパク質の免疫染色をした。核は Hoechst 色素で染色した。

(B) (A) で解析した細胞をコントロール IgG または α -C-STING 抗体を用いて FACS 解析をした。

(C) ヒト PBMCs の CD11b、CD11c、CD56、CD19、CD3 陽性細胞をコントロール IgG または α -C-STING 抗体を用いて FACS 解析をした。

(D) FITC-cGAMP 刺激後 3 時間の WT 及び STING KO THP-1 細胞における、細胞外処理した FITC-cGAMP と細胞表面 STING の共局在を蛍光免疫染色で検討した。細胞内刺激した FITC-cGAMP の結果についても同様に示した。スケールバー：10 μ m。

3.5 STING は細胞膜上ではなく ER に局在し、TM5 を介して細胞外へと C 末端領域を表出させている

cGAMP と STING が細胞表面上で相互作用していた結果から、モノサイト系の細胞のようなある特定の細胞集団で、STING は ER 膜上だけではなく、形質膜上にも局在しているのではないかと仮説をたてた。これを立証するために、まず、THP-1 細胞の細胞表面タンパク質をビオチンで標識し、ショ糖密度勾配遠心法によって細胞分画を行った。驚くべきことに、ビオチン化された STING は、細胞膜のマーカーであるビオチン化された CD11b 受容体が検出された分画 (1-7) ではなく、ER マーカーであるカルネキシンが検出された分画 (15-19) と同じフラクションで検出された (図 20A)。STING と同じく ER に局在しているカルネキシンタンパク質はこの実験条件下では、ビオチンで標識されたタンパク質として精製されなかった (図 20A)。このことから、ER に局在している STING がリガンド結合部位である C 末端領域の一部を細胞膜を貫通させて細胞外へと表出させている可能性を考えた。これを検討するために、トリプシン処理をして細胞外タンパク質を切断した THP-1 細胞から ER 分画を行い、STING の N 末端に対する抗体 (α -N-STING) と C 末端に対する抗体 (α -C-STING) でタンパク質を検出した。その結果、トリプシン処理した THP-1 細胞では、 α -C-STING 抗体では検出されなかった STING タンパク質より小さい分子量 (約 20 kDa) のバンドが、 α -N-STING 抗体では検出された (図 20B)。一方で、カルネキシンタンパク質はトリプシン処理による切断を受けていなかった (図 20B)。さらに、N 末端に Flag でタグ付けした STING タンパク質を STING KO THP-1 細胞に発現させ、Flag 抗体 (α -Flag) と α -C-STING で免疫染色を行った。膜透過処理をしない細胞では、 α -Flag 抗体では検出されなかったが、 α -C-STING では細胞表面に STING が検出できた (図 20C)。膜透過処理を行った細胞では α -Flag、 α -C-STING の両方の抗体で染色された (図 20C)。STING の C 末端は細胞外で検出できるが、N 末端はできなかったことから、STING の C 末端は細胞外へと表出しているが、N 末端は細胞外に出ていないことが示された。

STING は 5 番目の膜貫通領域 (TM5) を持つことが推測されており (Ishikawa and Barber, 2008)、この領域が細胞膜を貫通し、C 末端を細胞外に表出させている可能性を考えた。そこで、TM5 を欠損させた STING 変異体 (STING Δ TM5) を STING KO THP-1 細胞に発現させたところ、細胞表面の STING が検出されなくなった (図 20D)。これと一致して、STING Δ TM5 を発現させた細胞では細胞外 cGAMP 刺激に対する *IFNL1* の遺伝子誘導もされなかった (図 20E)。

以上の結果より、ER に存在している STING タンパク質が、リガンド結合領域である C 末端の一部を、おそらく TM5 を介して、細胞外へと表出させていることが示唆された (図 20F 右)。

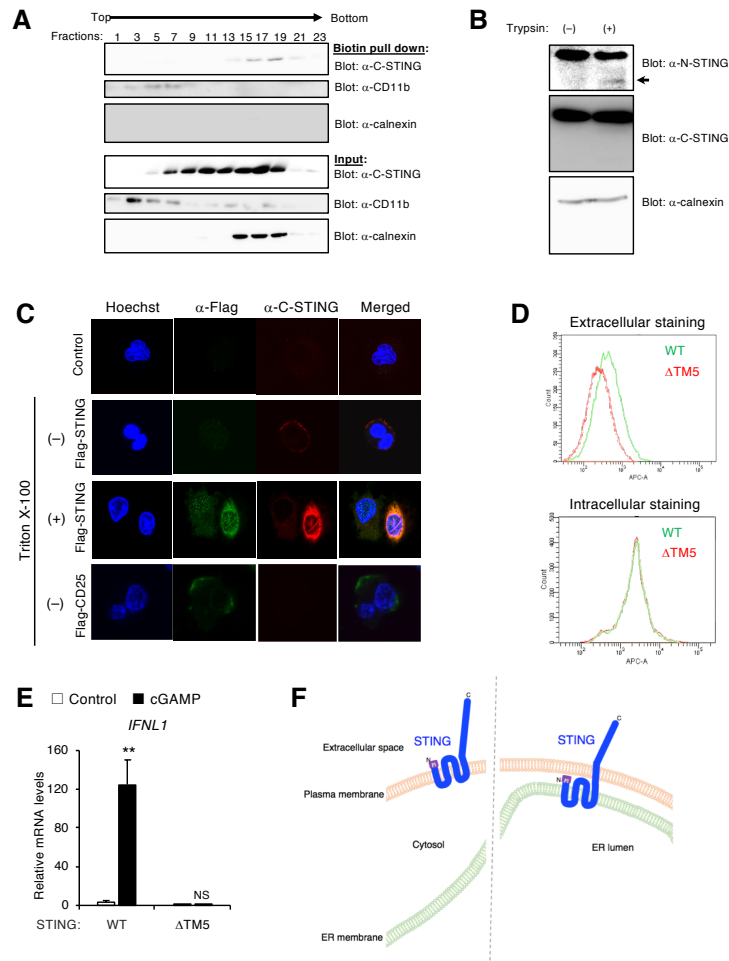


図 20. ER の STING は細胞膜を貫通して、C 末端の一部を細胞外に表出させている

(A) 細胞膜タンパク質をビオチン化標識した THP-1 細胞をショ糖密度勾配遠心法によって分画し、各分画のビオチン化タンパク質をストレプトアビジンビーズによって精製し、α-C-STING、α-CD11b、α-calnexin 抗体で免疫ブロットにて検出した。

(B) トリプシン処理した THP-1 細胞の ER 分画を、α-C-STING、α-N-STING、α-calnexin 抗体を用いて免疫ブロットにて検出した。矢印は切断された STING を示している。

(C) Flag タグ付きの STING と CD25 を発現させた STING KO THP-1 細胞を、α-C-STING と α-Flag 抗体で免疫染色をした。

(D) WT 及び TM5 を欠損させた (ΔTM5) STING を発現させた STING KO THP-1 細胞の細胞表面の STING を、α-C-STING を用いて FACS 解析をした。

(E) (D) の細胞に細胞外 cGAMP 刺激をし、6 時間後に *IFN1* の mRNA を Real-time PCR で定量した。

(F) STING の C 末端領域の細胞外表出の予想されるモデルを示した。N 末端が細胞表面に局在している局在パターン (左) と、ER 膜上に局在しているパターン (右)。

データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 ± SD で表した。** $P < 0.01$ vs コントロール。NS, not significant.

3.6 ER-PM 接着タンパク質 E-Syts は STING の細胞外表出に重要である

次に、ER に存在している STING タンパク質が、どのように C 末端の一部を細胞外に表出させているのかについて検討した。これまでに、ER と細胞膜 (PM) が約 10-20 nm の距離で並置している、ER-PM コンタクトサイトと呼ばれる領域について幾つかのレビューが報告されている (Carrasco and Meyer, 2011; Stefan et al., 2013; Muallem et al., 2017; Stefan, 2018; English et al., 2009; Malmersjö and Meyer, 2013; Saheki and De Camilli, 2017)。ER-PM コンタクトサイトは脂質の輸送や、シグナル伝達などを仲介しているとされている (Saheki et al., 2016)。そこで、ER-PM コンタクトサイトで、ER に局在している STING がその C 末端を細胞外へと表出させていると考えた。Extended シナプトタグミン (E-Syts) ファミリーが定常状態の細胞において ER と PM の接着タンパク質として働くことが知られていることから (Giordano et al., 2013; Chang et al., 2017)、E-Syts のすべて、E-Syt1、E-Syt2、E-Syt3 の 3 つを siRNA によってノックダウンして (図 21A)、STING 細胞外表出への影響を調べた。FACS と蛍光染色により細胞表面の STING の存在を確認したところ、E-Syts をノックダウンした細胞では STING が検出されなかった (図 21B、C)。この結果と一致して、ノックダウン細胞では細胞外 cGAMP 刺激における *IFNB1*、*IFNL1* の mRNA の誘導が低下していた (図 21D)。さらに、BAPTA-AM 処理によって、E-Syts 依存 ER-PM コンタクトの形成を阻害したところ (Chang et al., 2013)、STING の細胞表面への表出が阻害された (図 21E)。これらの結果は、ER-PM 接着タンパク質である E-Syts は STING による細胞外 cGAMP の認識に必要であり、このことは ER-PM コンタクトサイトが STING のリガンド結合領域である C 末端を細胞外に表出させるためのプラットフォームであることを示唆している。

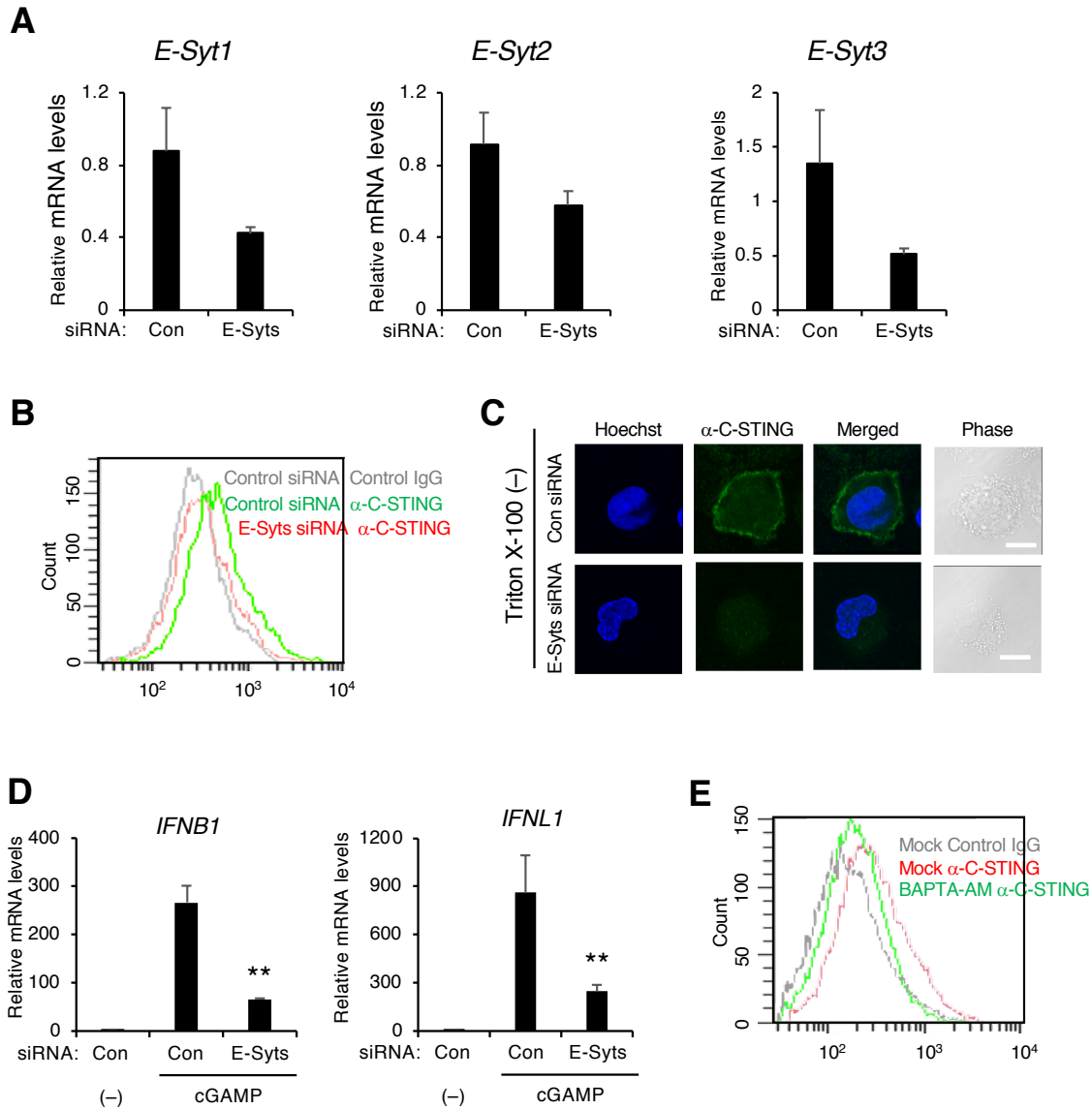


図 21. ER-PM 接着タンパク質 E-Syts は STING の細胞外表出を制御している

(A) コントロール siRNA (Con) 及び E-Syts (E-Syt1、E-Syt2、E-Syt3) を標的とした siRNA をトランスフェクションした 48 時間後の THP-1 細胞の mRNA を Real-time PCR で定量した。

(B、C) (A) の細胞をコントロール IgG または α -C-STING 抗体を用いて FACS 解析 (B) 及び、間接蛍光免疫染色 (C) をした。スケールバー：10 μ m。

(D) (A) の細胞に細胞外 cGAMP 刺激をした 6 時間後の *IFNB1* と *IFNL1* の mRNA 量を Real-time PCR で測定した。

(E) 10 μ M の BAPTA-AM を処理した 24 時間後の細胞表面 STING を FACS で解析した。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 $\pm$ SD で表した。** $P < 0.01$ vs コントロール。

3.7 細胞外 cGAMP 刺激では細胞表面直下で TBK1、IRF-3 が活性化される

細胞外 cGAMP 刺激が細胞表面の STING を介して細胞内の自然免疫シグナルを活性化できるのかについて検討した。まず、細胞外 cGAMP 刺激で STING の下流の TBK1 と IRF-3 が活性化されているのかを、リン酸化 TBK1 (pTBK1) 及びリン酸化 IRF-3 (pIRF-3) に対する抗体で、cGAMP 刺激した細胞を蛍光染色で解析した。細胞外刺激をした THP-1 及びヒト初代 CD14 陽性モノサイトでは、pTBK1 と pIRF-3 が細胞表面直下で検出された(図 22)。この局在パターンは全体の 50-70%ほどを占めており、pTBK1 と pIRF-3 が核付近に局在している細胞内 cGAMP 刺激 (Transfection) とは異なる局在を示していた。以上の結果から、細胞外 cGAMP 刺激による STING 下流シグナルの活性化は細胞の表面付近で起きており、細胞内刺激とは異なる活性化機構であることが示唆された。

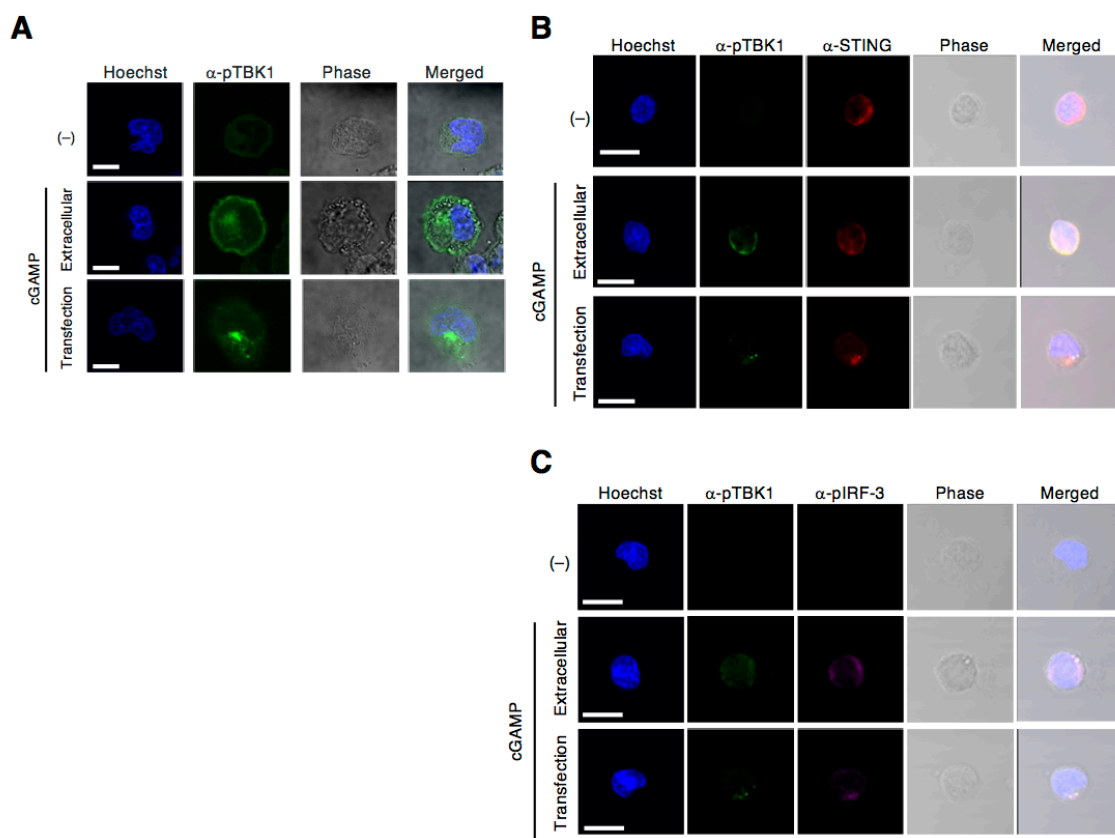


図 22. 細胞外 cGAMP 刺激ではリン酸化 TBK1 とリン酸化 IRF-3 の局在が細胞内刺激と異なる

cGAMP 刺激後 2 時間の、THP-1 における pTBK1 (A)、ヒト CD14 陽性モノサイトにおける pTBK1 と STING (B)、ヒト CD14 陽性モノサイトにおける pIRF-3 と STING (C) の局在を間接蛍光免疫染色法で確認した。スケールバー：10 μm。

3.8 STING は N 末端領域でも TBK1 と結合し、その下流経路を活性化する

STING は C 末端の C terminal tail (CTT) と呼ばれる領域で TBK1 と結合することで、リン酸化を受け、その下流シグナルを活性化することが知られている (Tanaka and Chen, 2012)。一方で、本研究では CTT を含む C 末端側が細胞外に表出されている可能性を示している。そこで、CTT 領域ではない他のドメインと TBK1 が結合し、その下流シグナルを活性化している可能性について検討した。まず、CTT を欠損させた STING (STING Δ CTT) を STING KO THP-1 細胞に発現させ、細胞外 cGAMP 刺激時の TBK1 のリン酸化 (pTBK1) を確認したところ、TM5 を欠損させた STING では pTBK1 が検出されなかったのに対し、CTT を欠損させた STING 発現細胞では、TBK1 はリン酸化されていた (図 23A, B)。これと一致して、CTT を欠損させても、細胞外 cGAMP 刺激時の *IFNL1* の遺伝子誘導は WT を発現させた時と比較して変化していなかった (図 23C)。一方で、細胞内 cGAMP 刺激 (Transfection) では IFN の誘導が有意に低下していた (図 23C)。このことから、細胞外の cGAMP による IFN 誘導は、STING の CTT 領域非依存的であることが示された。

次に、TBK1 と結合する STING の領域を調べた。STING の N 末端側から、4 つのフラグメントに分割し (F1-F4、図 24A)、HEK293T 細胞に GST 融合 STING フラグメントを発現させ、TBK1 との結合を GST pull-down アッセイと免疫ブロットで確認した。その結果、F4 (CTT 領域) だけでなく、F1 とも TBK1 が結合していることが明らかとなった (図 24B)。さらに、F1 及び F4 領域を欠損させた STING 変異体 (図 24C) の IFN 応答活性化を調べたところ、F1 と F4 両方が IFN の誘導に必要であることがわかった (図 24D)。以上より、STING は CTT のみではなく、N 末端領域でも TBK1 と結合し、IFN 応答を活性化させることが示された。

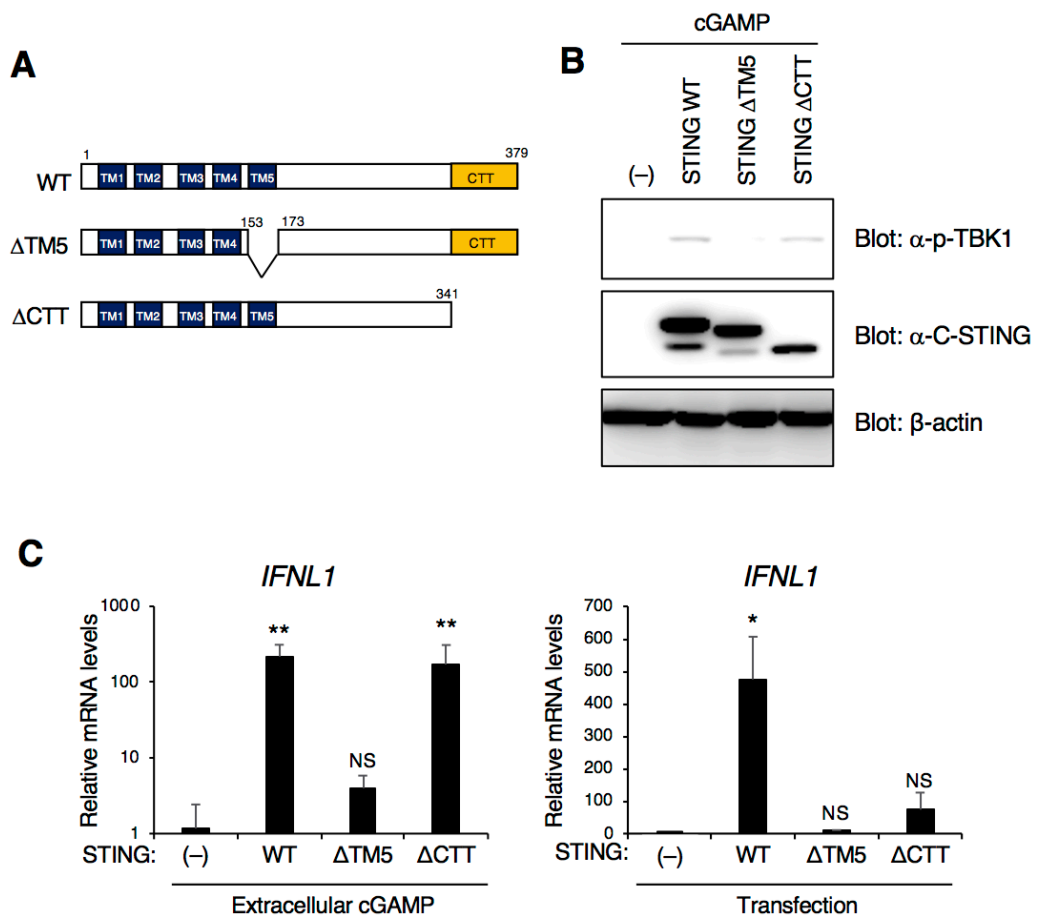


図 23. STING の CTT 領域は細胞外 cGAMP 刺激による IFN 応答に必須ではない

(A) STING 変異体の模式図を示した。数字はアミノ酸残基を示している。TM : Transmembrane domain。CTT : C terminal tail。

(B) (A) で図示した STING 変異体を発現させた STING KO THP-1 細胞に細胞外 cGAMP 刺激をし、タンパク質をα-pTBK1、α-C-STING、β-actin 抗体で検出した。

(C) (B) の細胞に細胞外及び細胞内 (Transfection) cGAMP 刺激をし、6 時間後の *IFNL1* の mRNA 量を Real-time PCR で定量した。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 ± SD で表した。** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$ vs コントロール。NS, not significant。

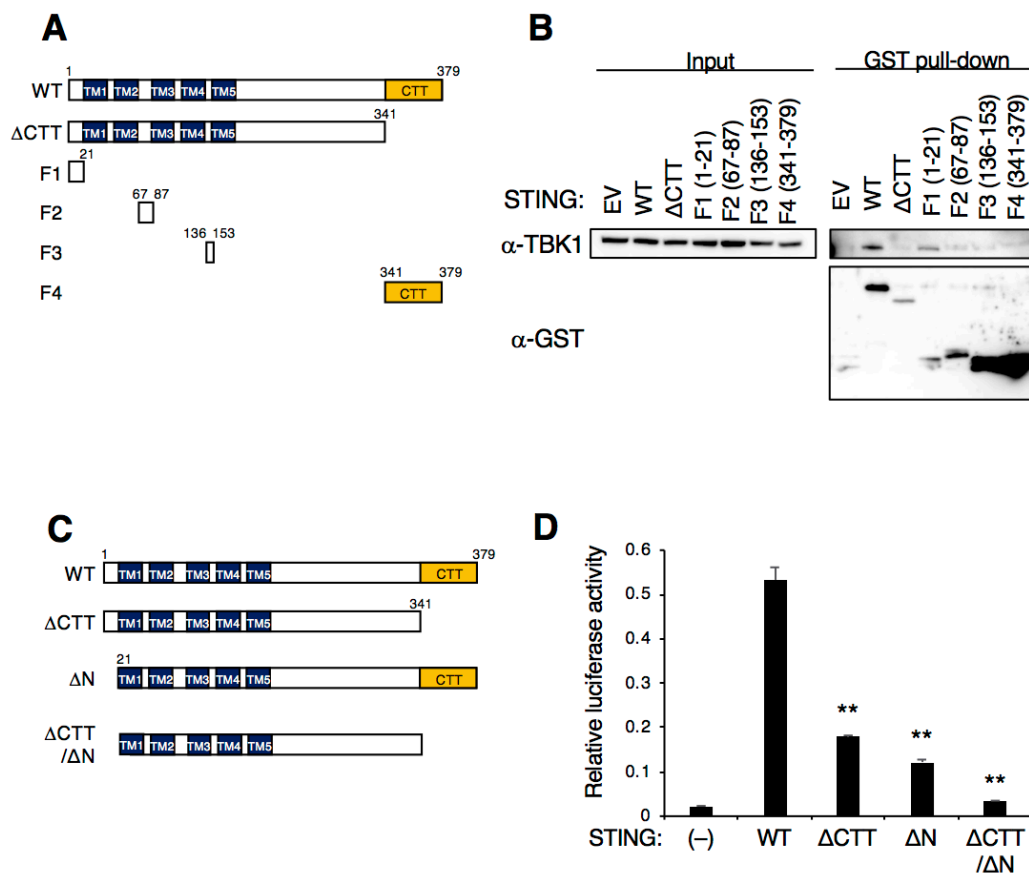


図 24. STING の N 末端は TBK1 と結合し、下流シグナルを活性化する

(A) STING フラグメントの模式図を示した。数字はアミノ酸残基を示している。TM : Transmembrane domain. CTT : C terminal tail。

(B) GST 融合 STING フラグメントを HEK293T 細胞に発現させ、24 時間後に細胞抽出液からグルタチオンビーズでタンパク質を精製した。回収したタンパク質を α -TBK1、 α -GST 抗体を用いて免疫ブロットで検出した。

(C) STING 変異体の模式図を示した。数字はアミノ酸残基を示している。TM : Transmembrane domain. CTT : C terminal tail。

(D) 各種 STING 変異体を発現させた HEK293T 細胞の 24 時間後の p125-Luc のルシフェラーゼ活性を測定した。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 $\pm$ SD で表した。** $P < 0.01$ vs WT。

3.9 STING の中和抗体によって細胞外 cGAMP 刺激による IFN の誘導が阻害される

STING を阻害できる α -C-STING 抗体を用いて、細胞外 cGAMP によって誘導される STING シグナル伝達のさらなる役割を検討した。まず、 α -C-STING が cGAMP のような CDNs と STING の結合を阻害することを、cGAMP が結合したアガロースビーズを用いた pull-down アッセイ及び免疫ブロッティング、FACS 解析で確認した (図 25A、B)。次に α -C-STING を処理した PBMCs に細胞外 cGAMP 刺激をしたところ、IFN- β 、IFN- λ 1、IL-6 の mRNA の誘導が阻害された (図 25C)。一方で、 α -C-STING 抗体は細胞内 cGAMP 刺激 (Transfection) に関しては、すべての mRNA の誘導を阻害しなかった (図 25C)。これと一致して、 α -C-STING 抗体は TBK1 と IRF-3 のリン酸化も細胞外刺激の時のみ抑制した (図 25D)。 α -C-STING 処理をした THP-1 細胞においても、PBMCs と同様の結果が得られた (図 25E、F)。以上より、細胞表面の STING が、自然免疫サイトカイン応答を誘導する細胞外 cGAMP 刺激による、細胞内シグナルの活性化を媒介していることが示唆された。

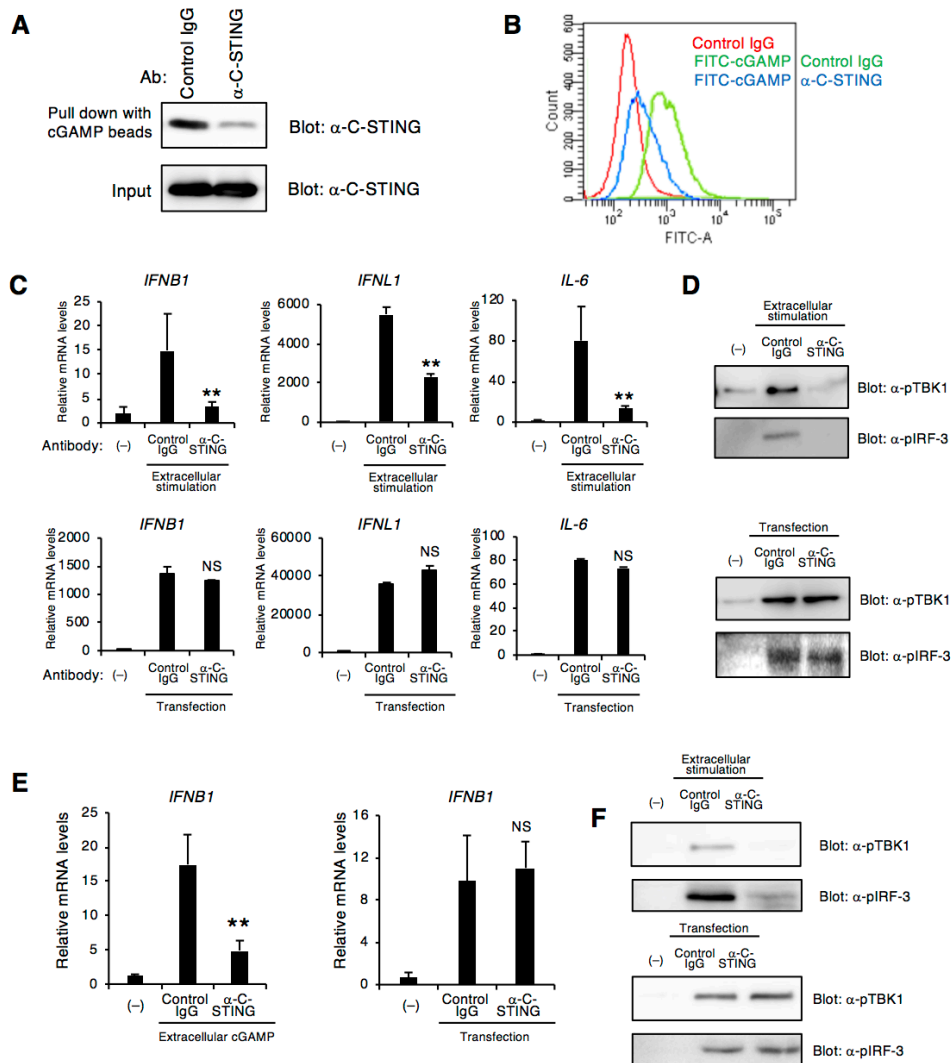


図 25. STING 抗体による細胞表面 STING の阻害は細胞外 cGAMP 刺激によって誘導される抗ウイルス自然免疫シグナルを抑制する

(A) 本研究で使用している α-C-STING 抗体で処理した THP-1 細胞を cGAMP アガロースビーズでタンパク質を精製し、免疫ブロットで STING タンパク質を検出した。

(B) (A) の細胞に FITC-cGAMP 刺激をし、FACS 解析を行った。

(C) コントロール抗体 (Control IgG) 及び α-C-STING 抗体で処理をした PBMCs の cGAMP 刺激後 6 時間の *IFNB1*、*IFNL1*、*IL-6* の mRNA を Real-time PCR で定量した。

(D) (C) からタンパク質を抽出し、α-pTBK1 抗体と α-pIRF-3 抗体を用いて免疫ブロットで検出した。

(E) コントロール抗体 (Control IgG) 及び α-C-STING 抗体で処理をした THP-1 細胞を cGAMP 刺激し、6 時間後の *IFNB1* と *IFNL1* の mRNA を Real-time PCR で定量した。

(F) (E) の細胞からタンパク質を回収し、α-pTBK1 抗体と α-pIRF-3 抗体で検出した。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 ± SD で表した。** $P < 0.01$ vs コントロール。NS, not significant。

3.10 細胞外に表出している STING は *in vivo* のウイルス感染の制御に重要である

最後に、マウスにおいてウイルス感染時に起こる細胞外 cGAMP の上昇によって、STING シグナルが活性化され、抗ウイルス免疫を活性化するのかどうかを検討した。まず、 α -C-STING 抗体と STING と同じ細胞内アダプター分子である MAVS に対する抗体(α -MAVS) をマウスに処理して、ウイルス感染による自然免疫応答の活性化を比較した。 α -C-STING 抗体を処理したマウスでは、HSV-1、EMCV、IAV の感染後 2 日目のウイルス量が有意に増加していた (図 26A、B、C)。これと一致して、 α -C-STING は、ウイルス感染で誘導される IFN- β 、IFN- λ 2/3 産生を阻害していた (図 26A、B)。さらに、 α -C-STING を接種したマウスでは、EMCV 感染後の心臓組織における心筋細胞の数が低下していた (図 26D)。同様な結果が、IAV を感染させたマウスの肺組織においても観察された (図 26E)。

ENPP1 (ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 1) タンパク質は細胞外の cGAMP を分解することが報告されていたので (Li et al., 2014)、ENPP1 を阻害することで、マクロファージや樹状細胞で STING 依存的な抗ウイルス IFN 応答を増強させることによるウイルス感染の制御を考えた。ENPP1 の阻害剤である ARL67156 を処理したマウスにおいて、ウイルス感染時に血中の cGAMP の量がより上昇していることが確認できた (図 27A)。これと一致して、HSV-1 及び EMCV 感染させたマウスにおいて、ARL67156 を処理した場合には血中の IFN- β の誘導が増強され、また、ウイルスの量も低下していた (図 27B、C)。ENPP1 阻害剤による IFN- β の上昇は、 α -C-STING 抗体によって阻害されたことから、この抗ウイルスサイトカインの誘導は細胞表面 STING 依存的であることが示唆された (図 27D)。これらの結果より、細胞表面の STING を介する IFN 産生は、細胞外 cGAMP の上昇と同様に、生体内でのウイルス感染に対する自然免疫応答の活性化に重要であることが示された。

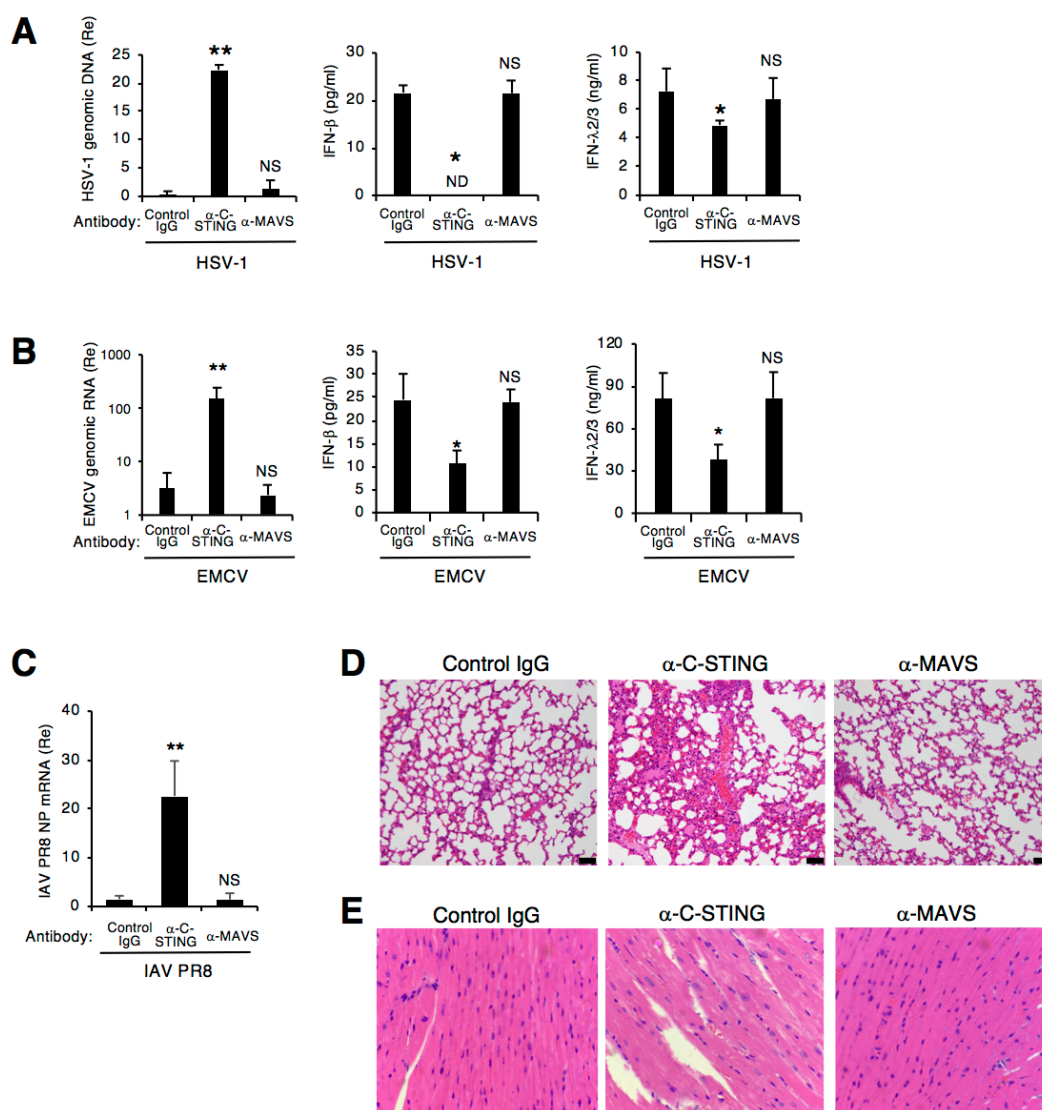


図 26. α-C-STING 抗体はウイルス感染したマウスの抗ウイルス自然免疫応答を阻害する
 (A-C) コントロール抗体 (Control IgG)、α-C-STING、α-MAVS 抗体を投与したマウスに、(A) HSV-1 を i.v. で感染させた 48 時間後の脳組織を回収して、HSV-1 のゲノム DNA を Real-time PCR で定量した。また、血清中の IFN-β と IFN-λ2/3 の量を ELISA で測定した。(B) EMCV を i.p. で感染させ、48 時間後に心臓組織を回収して、EMCV のゲノム RNA を Real-time PCR で定量した。また、血清中の IFN-β と IFN-λ2/3 の量を ELISA で測定した。(C) IAV を i.n. で感染させた 48 時間後の肺組織中の IAV PR8 NP mRNA 量を Real-time PCR で定量した。

(D、E) コントロール抗体 (Control IgG)、α-C-STING、α-MAVS 抗体で処理したマウスに EMCV (D) 及び IAV (E) を感染させた 48 時間後に脳組織と肺組織をパラフィン固定し HE 染色した。スケールバー：50 μm。
 データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 ± SD で表した。** P < 0.01、* P < 0.05 vs コントロール。NS, not significant. ND, not detected。

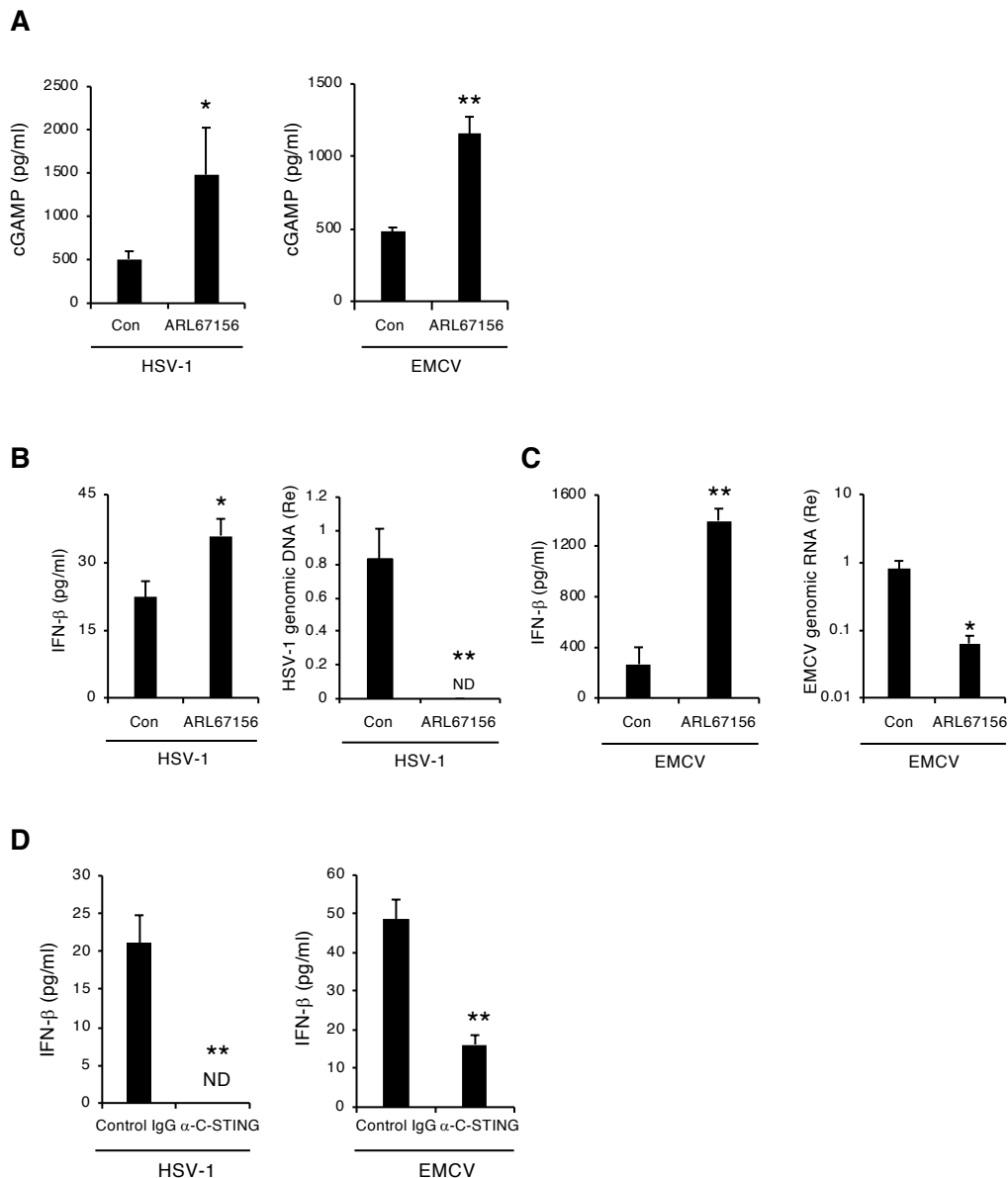


図 27. マウスの血中 cGAMP 量を増強させることで、ウイルス感染を制御できる

(A) PBS (Con) または ARL67156 を投与した BALB/c マウスに HSV-1、EMCV を感染させた 48 時間後の血中の cGAMP 量を ELISA で定量した。

(B、C) PBS (Con) または ARL67156 を投与したマウスに HSV-1 (B)、EMCV (C) を感染させ、48 時間後に血中の IFN-β を ELISA で定量した。また、脳組織の HSV-1 ゲノム DNA (B) と心臓組織の EMCV ゲノム RNA (C) を Real-time PCR で定量した。

(D) ARL67156 を投与したマウスにコントロール抗体 (Control IgG) または α-C-STING 抗体を投与し、HSV-1 及び EMCV を感染させた。48 時間後に血清の IFN-β を ELISA で測定した。

データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 ± SD で表した。** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$ vs コントロール。ND, not detected.

4 考察

本研究では、生体内において、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、ウイルス感染に対する IFN 応答を誘導するために細胞内 TBK1-IRF-3 シグナル経路を活性化するという、ER タンパク質 STING のこれまで知られていなかった役割を明らかにした。これは、STING が C 末端の一部を細胞外に表出させていることで引き起こされており、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。 α -C-STING 抗体による STING の細胞外 cGAMP 認識の阻害は、ウイルス感染時のマウスにおける抗ウイルス自然免疫応答を抑制し、さらに、cGAMP 分解酵素である ENPP1 の阻害剤によってマウスの血中 cGAMP の量を増強させることにより、STING シグナルが増強されることも示し、STING を介する細胞外 cGAMP の調節によるウイルス制御の可能性を見出した。

STING は、ER-PM コンタクトの形成を媒介している接着タンパクの一つとして知られているカルシウムセンサーの STIM1 (stromal interaction molecule 1) と相互作用することが報告されている (Srikanth et al., 2019)。このことは、ER に局在している STING の ER-PM コンタクトサイトへの移行や細胞外 CDNs の認識を STIM1 が制御している可能性を示唆している。STIM1 は細胞内のカルシウム量が低下した際に ER-PM コンタクトサイトへと移行するが、BAPTA-AM 処理によるカルシウムの低下では、ER に存在している STING の細胞外への表出を抑制しており (図 21E)、STIM1 と STING の細胞表面移行との関連性は不明である。また、TRAM (TRIF-related adaptor molecule)、TIRAP (Toll-interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein)、cGAS などのその他の自然免疫メディエーターも PIP_2 と相互作用することで、細胞膜に局在することが報告されており (Kagan and Medzhitov, 2006; Kagan et al., 2008; Barnett et al., 2019)、ER-PM コンタクトサイトが自然免疫応答制御のシグナリングハブである可能性を示唆している。

本研究で、細胞外の cGAMP が細胞外に表出している STING の C 末端領域と結合することにより活性化される細胞内抗ウイルスシグナル経路は、細胞質内の cGAMP によって活性化されるシグナル伝達とは異なる経路であることを示した。細胞内に CDNs が存在する場合、STING はリガンドである CDNs と結合すると、C 末端領域 (CTT) を露出させ、そこに TBK1 をリクルートすることで、細胞内シグナルを活性化させる (Tsuchiya et al., 2016)。cGAS の N 末端が自然免疫応答の調節に関与しているという報告もあり (Barnett et al., 2019)、STING のその他の領域が自然免疫応答に関与している可能性も考えられる。これに関連して、本論文では、STING の N 末端領域が TBK1 と結合し、IFN 応答を誘導することを明らかにした (図 24)。一方で、この N 末端領域が細胞外刺激依存的な STING の活性化に必要であるのかという点に関しては、さらなる解析が必要である。

STING の C 末端領域に対する特異的な抗体は、リガンドの結合を阻害することによって、細胞外 cGAMP による STING シグナルを阻害し、マウスにおいて抗ウイルス応答を弱めた (図 26)。これに関連して、このユニークな STING の細胞表面の局在は IFN- γ によっ

て増強されたが、IFN- α では変化しなかった（図 30、補足資料）。このことより、ウイルス感染の間、ヘルパーT 細胞が Th1 細胞に分化するような、IFN- γ が産生されるサイトカイン環境において、STING による細胞外 CDNs 認識機構はより顕著である可能性が高い。これらの結果は、バクテリアから放出された CDNs を宿主細胞がどのように認識するのかについての手がかりを提供し、さらに、細胞内小器官の表面に発現している他の膜タンパク質の分子生物学、特に細胞内と細胞外環境の間の直接的な相互のコミュニケーションにおける役割という点において、新たな知見をもたらすと考えられる。

cGAS-STING 経路が多くの DNA ウイルスやヒト免疫不全ウイルス (HIV) に対する抗ウイルス応答の誘導に必須であることは広く知られている (Lahaye et al., 2013; Li et al., 2013; Schoggins et al., 2014)。しかしながら、cGAS と STING は、センダイウイルス、水疱性口内炎ウイルス、EMCV、ウェストナイルウイルス、デングウイルスといった RNA ウイルスに対する抗ウイルス応答にも重要である (Ishikawa and Barber, 2008; Schoggins et al., 2014; Ishikawa et al., 2009; Franz et al., 2018)。加えて、DNA ウイルスと RNA ウイルスの両方で、cGAS-STING 経路を阻害することによる免疫回避戦略を進化させている (Ma and Damania, 2016)。一部の細胞種において、STING は RIG-I や MAVS と相互作用をしている報告もあるが (Ishikawa and Barber, 2008)、*in vitro* 及び *in vivo* での RNA ウイルス感染に対する STING を介した自然免疫応答誘導の詳細なメカニズムはほとんど明らかとなっていない。この点に関連して、本研究では生体内での DNA ウイルスと RNA ウイルスの両方の感染において、血中の cGAMP 量が顕著に上昇していることを明らかにした (図 14B)。DNA ウイルス感染の間、cGAS は直接ウイルス由来の DNA を認識して cGAMP を産生する。RNA ウイルス感染に関しては、cGAS は二本鎖 RNA と結合することは報告されているが、これによって cGAMP の産生はされない (Civril et al., 2013)。一方で、今回 RNA ウイルスである EMCV 感染におけるマウスの血中 cGAMP の上昇が、cGAS 依存的であることが示された (図 14C)。従って、cGAS-STING 経路は、RNA ウイルス (おそらく DNA ウイルス) の感染後期においてこれまで知られていないメカニズムで、間接的に活性化されていることが考えられる。これを支持するように、ウイルス感染でミトコンドリアが障害を受け、その DNA を細胞質内に放出することで、cGAS-STING 経路が活性化され、宿主の生体防御応答を増強することが報告されている (West et al., 2015; Rongvaux et al., 2014; Sun et al., 2017)。さらに、ウイルス感染の間、自然免疫活性化のすべての働きを微調整するような、細胞外環境における cGAMP の細胞質からの受動的及び能動的な輸送や、cGAMP の分解や安定に関与するメカニズムが存在していることも考えられる。

本研究で、すべての種類の細胞ではなく、マクロファージや樹状細胞を含む特定の細胞集団でこの機構を備えており、それによって、自然免疫応答の効果的な誘導を引き起こすために、これらの抗原提示細胞の非感染細胞と感染細胞の両方が活性化され、これに続く獲得免疫応答の強力な活性化につながることを示した。これらの細胞が、細胞外に放出された CDNs を認識することによってだけでなく、cGAMP や他の CDNs が細胞内に大量に存在

しているであろう死細胞、感染細胞の貪食によっても選択的に活性化されるという可能性も十分考えられる。また、マクロファージや樹状細胞は微生物分子パターンと、自然免疫炎症反応を引き起こすダメージ関連分子パターン (DAMPs) の両方を認識するエフェクターであり、増加した血中及び細胞外の CDNs 量の STING による細胞外認識は、ガン免疫や自己炎症性疾患などにも関与している可能性が考えられる。加えて、自然の CDNs や合成 CDNs 化合物による STING シグナルの活性化による、感染やガンに対する自然免疫応答の調節は多大な注目を受けている (Corrales et al., 2015; Pardoll et al., 2015; Karaolis et al., 2005; Ebensen et al., 2007; Karaolis et al., 2014)。さらに、自然免疫細胞における、STING の C 末端領域を直接的に活性化または阻害する抗体による 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、さらにはそれら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も期待される。

第4章 結論

本研究では、EKC を引き起こす HAdV-D のヒト結膜上皮細胞への感染において、Ⅲ型 IFN を優位に誘導し、Ⅰ型 IFN はほとんど誘導されないことが明らかとなった。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。さらに、本研究ではマウスにウイルス感染をした際に、DNA ウイルスのみでなく、RNA ウイルス感染においても cGAS 依存的に cGAMP が細胞外へと産生され、STING を介して抗ウイルス自然免疫応答を活性化するという、HAdV 以外のウイルス感染に対する新規の自然免疫活性化機構も明らかとした。ウイルス感染によって誘導される細胞外の cGAMP を、分解酵素を阻害することで増強させると、抗ウイルス応答を持つサイトカインの誘導が上昇し、生体防御機構の活性化が増強され、細胞外の cGAMP を調節することによるウイルス感染の制御の可能性を示した。これらの結果は、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 ウイルス感染時の自然免疫活性化の新規機構を明らかとし、新たな感染制御戦略につながる知見をもたらした。

加えて、本研究では、細胞内の小器官である ER に局在している STING タンパク質が、リガンド結合部位である C 末端の一部を細胞膜を貫通させ細胞外領域へと表出させているという、細胞内膜タンパク質のこれまでにない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。

参考文献

- Ablasser, A., Goldeck, M., Cavar, T., Deimling, T., Witte, G., Röhl, I., Hopfner, K.P., Ludwig, J., and Hornung, V. (2013a). cGAS produces a 2' -5' -linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature* **498**, 380–384.
- Ablasser, A., Schmid-Burgk, J.L., Hemmerling, I., Horvath, G.L., Schmidt, T., Latz, E., and Hornung, V. (2013b). Cell intrinsic immunity spreads to bystander cells via the intercellular transfer of cGAMP. *Nature* **503**, 530–534.
- Ahn, J., Xia, T., Konno, H., Konno, K., Ruiz, P., and Barber, G.N. (2014). Inflammation-driven carcinogenesis is mediated through STING. *Nat. Commun.* **5**, 5166.
- Akanuma, M. (2007). Evaluation of Disinfectant against Adenovirus by Real-time Polymerase Chain Reaction. *J. Japanese Ophthalmological Soc.* **111**, 384–390.
- Alai, N. (2016). Enhancing best practices in ophthalmology for prevention of nosocomial epidemic keratoconjunctivitis infections. *Curr. Med. Res. Opin.* **32**, 1757–1758.
- An, J., Durcan, L., Karr, R.M., Briggs, T.A., Rice, G.I., Teal, T.H., Woodward, J.J., and Elkon, K.B. (2017). Expression of Cyclic GMP - AMP Synthase in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* **69**, 800–807.
- Anderson, K.P., and Fennie, E.H. (1987). Adenovirus early region 1A modulation of interferon antiviral activity. *J. Virol.* **61**, 787–795.
- Ank, N., Iversen, M.B., Bartholdy, C., Staeheli, P., Hartmann, R., Jensen, U.B., Dagnaes-Hansen, F., Thomsen, A.R., Chen, Z., Haugen, H., et al. (2008). An Important Role for Type III Interferon (IFN- λ /IL-28) in TLR-Induced Antiviral Activity. *J. Immunol.* **180**, 2474–2485.
- Aoki, K., Gonzalez, G., Hinokuma, R., Yawata, N., Tsutsumi, M., Ohno, S., and Kitaichi, N. (2019). Assessment of clinical signs associated with adenoviral epidemic keratoconjunctivitis cases in southern Japan between 2011 and 2014. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **95**, 114885.

- Ariga, T., Shimada, Y., Shiratori, K., Ohgami, K., Yamazaki, S., Tagawa, Y., Kikuchi, M., Miyakita, Y., Fujita, K., Ishiko, H., et al. (2005). Five New Genome Types of Adenovirus Type 37 Caused Epidemic Keratoconjunctivitis in Sapporo, Japan, for More Than 10 Years. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 726–732.
- Arnberg, N. (2013). Adenovirus E3 protein modulates leukocyte functions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 19976–19977.
- Baldrige, M.T., Lee, S., Brown, J.J., McAllister, N., Urbanek, K., Dermody, T.S., Nice, T.J., and Virgin, H.W. (2017). Expression of Ifnlr1 on Intestinal Epithelial Cells Is Critical to the Antiviral Effects of Interferon Lambda against Norovirus and Reovirus. *J. Virol.* **91**, e02079-16.
- Barbalat, R., Ewald, S.E., Mouchess, M.L., and Barton, G.M. (2011). Nucleic Acid Recognition by the Innate Immune System. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 185–214.
- Barber, G.N. (2015). STING: infection, inflammation and cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 760–770.
- Barnett, K.C., Coronas-Serna, J.M., Zhou, W., Ernandes, M.J., Cao, A., Kranzusch, P.J., and Kagan, J.C. (2019). Phosphoinositide Interactions Position cGAS at the Plasma Membrane to Ensure Efficient Distinction between Self- and Viral DNA. *Cell* **176**, 1432-1446.
- Biere, B., and Schweiger, B. (2010). Human adenoviruses in respiratory infections: Sequencing of the hexon hypervariable region reveals high sequence variability. *J. Clin. Virol.* **47**, 366–371.
- Bridgeman, A., Maelfait, J., Davenne, T., Partridge, T., Peng, Y., Mayer, A., Dong, T., Kaeffer, V., Borrow, P., and Rehwinkel, J. (2015). Viruses transfer the antiviral second messenger cGAMP between cells. *Science* **349**, 1228–1232.
- Broggi, A., Tan, Y., Granucci, F., and Zanoni, I. (2017). IFN- λ suppresses intestinal inflammation by non-translational regulation of neutrophil function. *Nat. Immunol.* **18**, 1084–1093.
- Burdette, D.L., and Vance, R.E. (2013). STING and the innate immune response to nucleic acids in the cytosol. *Nat. Immunol.* **14**, 19–26.

Burdette, D.L., Monroe, K.M., Sotelo-Troha, K., Iwig, J.S., Eckert, B., Hyodo, M., Hayakawa, Y., and Vance, R.E. (2011). STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature* **478**, 515–518.

Carrasco, S., and Meyer, T. (2011). STIM Proteins and the Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane Junctions. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 973–1000.

Chan, Y.F., and Abu Bakar, S. (2005). Virucidal activity of Virkon S on human enterovirus. *Med. J. Malaysia* **60**, 246–248.

Chang, C.L., Hsieh, T.S., Yang, T.T., Rothberg, K.G., Azizoglu, D.B., Volk, E., Liao, J.C., and Liou, J. (2013). Feedback Regulation of Receptor-Induced Ca²⁺ Signaling Mediated by E-Syt1 and Nir2 at Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane Junctions. *Cell Rep.* **5**, 813–825.

Chang, C.L., Chen, Y.J., and Liou, J. (2017). ER-plasma membrane junctions: Why and how do we study them? *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1864**, 1494–1506.

Chen, H., Sun, H., You, F., Sun, W., Zhou, X., Chen, L., Yang, J., Wang, Y., Tang, H., Guan, Y., et al. (2011). Activation of STAT6 by STING Is Critical for Antiviral Innate Immunity. *Cell* **147**, 436–446.

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

Civril, F., Deimling, T., De Oliveira Mann, C.C., Ablasser, A., Moldt, M., Witte, G., Hornung, V., and Hopfner, K.P. (2013). Structural mechanism of cytosolic DNA sensing by cGAS. *Nature* **498**, 332–337.

Cohen, P. (2018). Ubiquitin chains as second messengers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 212.

Corrales, L., Glickman, L.H., McWhirter, S.M., Kanne, D.B., Sivick, K.E., Katibah, G.E., Woo, S.R., Lemmens, E., Banda, T., Leong, J.J., et al. (2015). Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity. *Cell Rep.* **11**, 1018–1030.

Corrigan, R.M., and Gründling, A. (2013). Cyclic di-AMP: Another second messenger enters the fray. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 513–524.

Crowl, J.T., Gray, E.E., Pestal, K., Volkman, H.E., and Stetson, D.B. (2017). Intracellular Nucleic Acid Detection in Autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.* **35**, 313–336.

Davison, A.J. (2003). Genetic content and evolution of adenoviruses. *J. Gen. Virol.* **84**, 2895–2908.

Deng, L., Liang, H., Xu, M., Yang, X., Burnette, B., Arina, A., Li, X.D., Mauceri, H., Beckett, M., Darga, T., et al. (2014). STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors. *Immunity* **41**, 843–852.

Desmet, C.J., and Ishii, K.J. (2012). Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 479–491.

Diner, E.J., Burdette, D.L., Wilson, S.C., Monroe, K.M., Kellenberger, C.A., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Hammond, M.C., and Vance, R.E. (2013). The Innate Immune DNA Sensor cGAS Produces a Noncanonical Cyclic Dinucleotide that Activates Human STING. *Cell Rep.* **3**, 1355–1361.

Ebensen, T., Schulze, K., Riese, P., Link, C., Morr, M., and Guzmán, C.A. (2007). The bacterial second messenger cyclic diGMP exhibits potent adjuvant properties. *Vaccine* **25**, 1464–1469.

Eleraky, N.Z., Potgieter, L.N.D., and Kennedy, M.A. (2002). Virucidal Efficacy of Four New Disinfectants. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **38**, 231–234.

English, A.R., Zurek, N., and Voeltz, G.K. (2009). Peripheral ER structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 596–602.

Ferrari, R., Gou, D., Jawdekar, G., Johnson, S.A., Nava, M., Su, T., Yousef, A.F., Zemke, N.R., Pellegrini, M., Kurdistani, S.K., et al. (2014). Adenovirus Small E1A Employs the Lysine Acetylases p300/CBP and Tumor Suppressor Rb to Repress Select Host Genes and Promote Productive Virus Infection. *Cell Host Microbe* **16**, 663–676.

- Fonseca, G.J., Thillainadesan, G., Yousef, A.F., Ablack, J.N., Mossman, K.L., Torchia, J., and Mymryk, J.S. (2012). Adenovirus Evasion of Interferon-Mediated Innate Immunity by Direct Antagonism of a Cellular Histone Posttranslational Modification. *Cell Host Microbe* **11**, 597–606.
- Franz, K.M., Neidermyer, W.J., Tan, Y.J., Whelan, S.P.J., and Kagan, J.C. (2018). STING-dependent translation inhibition restricts RNA virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, E2058–E2067.
- Fukuzaki, S. (2006). Mechanisms of Actions of Sodium Hypochlorite in Cleaning and Disinfection Processes. *Biocontrol Sci.* **11**, 147–157.
- Galani, I.E., Triantafyllia, V., Eleminiadou, E.E., Koltsida, O., Stavropoulos, A., Manioudaki, M., Thanos, D., Doyle, S.E., Kotenko, S. V., Thanopoulou, K., et al. (2017). Interferon- λ Mediates Non-redundant Front-Line Antiviral Protection against Influenza Virus Infection without Compromising Host Fitness. *Immunity* **46**, 875–890.
- Gao, D., Li, T., Li, X.D., Chen, X., Li, Q.Z., Wight-Carter, M., and Chen, Z.J. (2015). Activation of cyclic GMP-AMP synthase by self-DNA causes autoimmune diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, E5699–E5705.
- Gao, P., Ascano, M., Wu, Y., Barchet, W., Gaffney, B.L., Zillinger, T., Serganov, A.A., Liu, Y., Jones, R.A., Hartmann, G., et al. (2013). Cyclic [G(2′,5′)pA(3′,5′)p] Is the Metazoan Second Messenger Produced by DNA-Activated Cyclic GMP-AMP Synthase. *Cell* **153**, 1094–1107.
- Gasparini, R., Pozzi, T., Magnelli, R., Fatighenti, D., Giotti, E., Poliseno, G., Pratelli, M., Severini, R., Bonanni, P., and De Feo, L. (1995). Evaluation of in vitro efficacy of the disinfectant Virkon. *Eur. J. Epidemiol.* **11**, 193–197.
- Gentili, M., Lahaye, X., Nadalin, F., Nader, G.P.F., Puig Lombardi, E., Herve, S., De Silva, N.S., Rookhuizen, D.C., Zueva, E., Goudot, C., et al. (2019). The N-Terminal Domain of cGAS Determines Preferential Association with Centromeric DNA and Innate Immune Activation in the Nucleus. *Cell Rep.* **26**, 2377–2393.

- Ghebremedhin, B. (2014). Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* **4**, 26–33.
- Giordano, F., Saheki, Y., Idevall-Hagren, O., Colombo, S.F., Pirruccello, M., Milosevic, I., Gracheva, E.O., Bagriantsev, S.N., Borgese, N., and De Camilli, P. (2013). PI(4,5)P2-Dependent and Ca²⁺-Regulated ER-PM Interactions Mediated by the Extended Synaptotagmins. *Cell* **153**, 1494–1509.
- Gipson, I.K., Spurr-Michaud, S., Argu "eso, P., Tisdale, A., Ng, T.F., and Russo, C.L. (2003). Mucin Gene Expression in Immortalized Human Corneal–Limbal and Conjunctival Epithelial Cell Lines. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **44**, 2496.
- Gonzalez, G., Yawata, N., Aoki, K., and Kitaichi, N. (2019). Challenges in management of epidemic keratoconjunctivitis with emerging recombinant human adenoviruses. *J. Clin. Virol.* **112**, 1–9.
- Good, C., Wells, A.I., and Coyne, C.B. (2019). Type III interferon signaling restricts enterovirus 71 infection of goblet cells. *Sci. Adv.* **5**, eaau4255.
- Gordon, Y.J., Gordon, R.Y., Romanowski, E., and Araullo-Cruz, T.P. (1993). Prolonged recovery of desiccated adenoviral serotypes 5, 8, and 19 from plastic and metal surfaces in vitro. *Ophthalmology* **100**, 1835–1839; discussion 1839–1840.
- Gray, E.E., Treuting, P.M., Woodward, J.J., and Stetson, D.B. (2015). Cutting Edge: cGAS Is Required for Lethal Autoimmune Disease in the Trex1-Deficient Mouse Model of Aicardi–Goutières Syndrome. *J. Immunol.* **195**, 1939–1943.
- Hall, K., Blair Zajdel, M.E., and Blair, G.E. (2010). Unity and diversity in the human adenoviruses: exploiting alternative entry pathways for gene therapy. *Biochem. J.* **431**, 321–336.
- Hamada, N., Gotoh, K., Hara, K., Iwahashi, J., Imamura, Y., Nakamura, S., Taguchi, C., Sugita, M., Yamakawa, R., Etoh, Y., et al. (2008). Nosocomial outbreak of epidemic keratoconjunctivitis accompanying environmental contamination with adenoviruses. *J. Hosp. Infect.* **68**, 262–268.

Hamming, O.J., Terczyńska-Dyla, E., Vieyres, G., Dijkman, R., Jørgensen, S.E., Akhtar, H., Siupka, P., Pietschmann, T., Thiel, V., and Hartmann, R. (2013). Interferon lambda 4 signals via the IFN λ receptor to regulate antiviral activity against HCV and coronaviruses. *EMBO J.* **32**, 3055–3065.

Hernández, A., Martró, E., Matas, L., Martí 'n, M., and Ausina, V. (2000). Assessment of in-vitro efficacy of 1% Virkon® against bacteria, fungi, viruses and spores by means of AFNOR guidelines. *J. Hosp. Infect.* **46**, 203–209.

Ichiyanagi, T., Imai, T., Kajiwar, C., Mizukami, S., Nakai, A., Nakayama, T., and Udono, H. (2010). Essential Role of Endogenous Heat Shock Protein 90 of Dendritic Cells in Antigen Cross-Presentation. *J. Immunol.* **185**, 2693–2700.

Ishikawa, H., and Barber, G.N. (2008). STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* **455**, 674–678.

Ishikawa, H., Ma, Z., and Barber, G.N. (2009). STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* **461**, 788–792.

Ishiko, H., and Aoki, K. (2009). Spread of Epidemic Keratoconjunctivitis Due to a Novel Serotype of Human Adenovirus in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 2678–2679.

Ishiko, H., Shimada, Y., Konno, T., Hayashi, A., Ohguchi, T., Tagawa, Y., Aoki, K., Ohno, S., and Yamazaki, S. (2008). Novel Human Adenovirus Causing Nosocomial Epidemic Keratoconjunctivitis. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 2002–2008.

Ismail, A.M., Lee, J.S., Lee, J.Y., Singh, G., Dyer, D.W., Seto, D., Chodosh, J., and Rajaiya, J. (2018). Adenoviromics: Mining the Human Adenovirus Species D Genome. *Front. Microbiol.* **9**, 1–14.

Jenal, U., Reinders, A., and Lori, C. (2017). Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 271–284.

Jeremiah, N., Neven, B., Gentili, M., Callebaut, I., Maschalidi, S., Stolzenberg, M.C., Goudin, N., Frémond, M.L., Nitschke, P., Molina, T.J., et al. (2014). Inherited STING-activating mutation underlies a familial inflammatory syndrome with lupus-like manifestations. *J. Clin.*

Invest. **124**, 5516–5520.

Jewell, N.A., Cline, T., Mertz, S.E., Smirnov, S. V., Flano, E., Schindler, C., Grieves, J.L., Durbin, R.K., Kotenko, S. V., and Durbin, J.E. (2010). Lambda Interferon Is the Predominant Interferon Induced by Influenza A Virus Infection In Vivo. *J. Virol.* **84**, 11515–11522.

Jin, L., Waterman, P.M., Jonscher, K.R., Short, C.M., Reisdorph, N.A., and Cambier, J.C. (2008). MPYS, a Novel Membrane Tetraspanner, Is Associated with Major Histocompatibility Complex Class II and Mediates Transduction of Apoptotic Signals. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 5014–5026.

Kagan, J.C., and Medzhitov, R. (2006). Phosphoinositide-Mediated Adaptor Recruitment Controls Toll-like Receptor Signaling. *Cell* **125**, 943–955.

Kagan, J.C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S., and Medzhitov, R. (2008). TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon- β . *Nat. Immunol.* **9**, 361–368.

Kaneko, H., Suzutani, T., Aoki, K., Kitaichi, N., Ishida, S., Ishiko, H., Ohashi, T., Okamoto, S., Nakagawa, H., Hinokuma, R., et al. (2011). Epidemiological and virological features of epidemic keratoconjunctivitis due to new human adenovirus type 54 in Japan. *Br. J. Ophthalmol.* **95**, 32–36.

Karaolis, D.K.R., Cheng, K., Lipsky, M., Elnabawi, A., Catalano, J., Hyodo, M., Hayakawa, Y., and Raufman, J.P. (2005). 3',5'-Cyclic diguanylic acid (c-di-GMP) inhibits basal and growth factor-stimulated human colon cancer cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **329**, 40–45.

Karaolis, D.K.R., Means, T.K., Yang, D., Takahashi, M., Yoshimura, T., Muraille, E., Philpott, D., Schroeder, J.T., Hyodo, M., Hayakawa, Y., et al. (2014). Bacterial c-di-GMP Is an Immunostimulatory Molecule. *J. Immunol.* **178**, 2171–2181.

Kato, Y., Park, J., Takamatsu, H., Konaka, H., Aoki, W., Aburaya, S., Ueda, M., Nishide, M., Koyama, S., Hayama, Y., et al. (2018). Apoptosis-derived membrane vesicles drive the cGAS–STING pathway and enhance type I IFN production in systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* **77**, 1507–1515.

- Kitajewski, J., Schneider, R.J., Safer, B., Munemitsu, S.M., Samuel, C.E., Thimmappaya, B., and Shenk, T. (1986). Adenovirus VAI RNA antagonizes the antiviral action of interferon by preventing activation of the interferon-induced eIF-2 α kinase. *Cell* **45**, 195–200.
- Lahaye, X., Satoh, T., Gentili, M., Cerboni, S., Conrad, C., Hurbain, I., ElMarjou, A., Lacabaratz, C., Lelièvre, J.D., and Manel, N. (2013). The Capsids of HIV-1 and HIV-2 Determine Immune Detection of the Viral cDNA by the Innate Sensor cGAS in Dendritic Cells. *Immunity* **39**, 1132–1142.
- Lam, E., Stein, S., and Falck-Pedersen, E. (2014). Adenovirus Detection by the cGAS/STING/TBK1 DNA Sensing Cascade. *J. Virol.* **88**, 974–981.
- Lazear, H.M., Schoggins, J.W., and Diamond, M.S. (2019). Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity* **50**, 907–923.
- Li, L., Yin, Q., Kuss, P., Maliga, Z., Millán, J.L., Wu, H., and Mitchison, T.J. (2014). Hydrolysis of 2' 3' -cGAMP by ENPP1 and design of nonhydrolyzable analogs. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 1043–1048.
- Li, T., Cheng, H., Yuan, H., Xu, Q., Shu, C., Zhang, Y., Xu, P., Tan, J., Rui, Y., Li, P., et al. (2016). Antitumor Activity of cGAMP via Stimulation of cGAS-cGAMP-STING-IRF3 Mediated Innate Immune Response. *Sci. Rep.* **6**, 19049.
- Li, X.D., Wu, J., Gao, D., Wang, H., Sun, L., and Chen, Z.J. (2013). Pivotal Roles of cGAS-cGAMP Signaling in Antiviral Defense and Immune Adjuvant Effects. *Science* **341**, 1390–1394.
- Liu, Y., Jesus, A.A., Marrero, B., Yang, D., Ramsey, S.E., Montealegre Sanchez, G.A., Tenbrock, K., Wittkowski, H., Jones, O.Y., Kuehn, H.S., et al. (2014). Activated STING in a Vascular and Pulmonary Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **371**, 507–518.
- Luteijn, R.D., Zaver, S.A., Gowen, B.G., Wyman, S.K., Garelis, N.E., Onia, L., McWhirter, S.M., Katibah, G.E., Corn, J.E., Woodward, J.J., et al. (2019). SLC19A1 transports immunoreactive cyclic dinucleotides. *Nature* **573**, 434–438.
- Ma, Z., and Damania, B. (2016). The cGAS-STING Defense Pathway and Its Counteraction by Viruses. *Cell Host Microbe* **19**, 150–158.

Madisch, I., Harste, G., Pommer, H., and Heim, A. (2005). Phylogenetic Analysis of the Main Neutralization and Hemagglutination Determinants of All Human Adenovirus Prototypes as a Basis for Molecular Classification and Taxonomy. *J. Virol.* **79**, 15265–15276.

Malmersjö, S., and Meyer, T. (2013). Inside-Out Connections: The ER Meets the Plasma Membrane. *Cell* **153**, 1423–1424.

Marcus, A., Mao, A.J., Lensink-Vasan, M., Wang, L.A., Vance, R.E., and Raulet, D.H. (2018). Tumor-Derived cGAMP Triggers a STING-Mediated Interferon Response in Non-tumor Cells to Activate the NK Cell Response. *Immunity* **49**, 754–763.

Martinez-Martin, N., Ramani, S.R., Hackney, J.A., Tom, I., Wranik, B.J., Chan, M., Wu, J., Paluch, M.T., Takeda, K., Hass, P.E., et al. (2016). Erratum: Corrigendum: The extracellular interactome of the human adenovirus family reveals diverse strategies for immunomodulation. *Nat. Commun.* **7**, 16150.

McCormick, L., and Maheshwari, G. (2004). Inactivation of adenovirus types 5 and 6 by Virkon S. *Antiviral Res.* **64**, 27–33.

McWhirter, S.M., Barbalat, R., Monroe, K.M., Fontana, M.F., Hyodo, M., Joncker, N.T., Ishii, K.J., Akira, S., Colonna, M., Chen, Z.J., et al. (2009). A host type I interferon response is induced by cytosolic sensing of the bacterial second messenger cyclic-di-GMP. *J. Exp. Med.* **206**, 1899–1911.

Muallem, S., Chung, W.Y., Jha, A., and Ahuja, M. (2017). Lipids at membrane contact sites: cell signaling and ion transport. *EMBO Rep.* **18**, 1893–1904.

Nauheim, R.C., Romanowski, E.G., Araullo-Cruz, T., Kowalski, R.P., Turgeon, P.W., Stopak, S.S., and Gordon, Y.J. (1990). Prolonged recoverability of desiccated adenovirus type 19 from various surfaces. *Ophthalmology* **97**, 1450–1453.

Nice, T.J., Baldrige, M.T., McCune, B.T., Norman, J.M., Lazear, H.M., Artyomov, M., Diamond, M.S., and Virgin, H.W. (2015). Interferon- γ cures persistent murine norovirus infection in the absence of adaptive immunity. *Science* **347**, 269–273.

- Ogura, Y., Ozawa, T., Nojima, Y., and Kikuno, R. (2015). Antimicrobial Efficacy of Complex-Type Chlorine-Based Disinfectant Cleaner Against Several Pathogenic Microorganisms. *Japanese J. Infect. Prev. Control* **30**, 391–398.
- Okaue, A., Ozawa, T., Ogura, Y., Nojima, Y., Kikuno, R., and Shiraishi, T. (2015). Evaluation of Corrosiveness to Various Surface Materials of Complex Type Chlorine-Based Disinfectant Cleaner. *Japanese J. Infect. Prev. Control* **30**, 325–330.
- Pandey, S., Kawai, T., and Akira, S. (2015). Microbial Sensing by Toll-Like Receptors and Intracellular Nucleic Acid Sensors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a016246.
- Pardoll, D.M., Kim, Y., McWhirter, S.M., Lauer, P., Portnoy, D.A., Woodward, J.J., Leong, M., Dubensky, T.W., Glickman, L.H., Fu, J., et al. (2015). STING agonist formulated cancer vaccines can cure established tumors resistant to PD-1 blockade. *Sci. Transl. Med.* **7**, 283ra52.
- Rathinam, V.A., and Fitzgerald, K.A. (2011). Cytosolic surveillance and antiviral immunity. *Curr. Opin. Virol.* **1**, 455–462.
- Rehwinkel, J., and Reis e Sousa, C. (2013). Targeting the viral Achilles' heel: recognition of 5' - triphosphate RNA in innate anti-viral defence. *Curr. Opin. Microbiol.* **16**, 485–492.
- Ritchie, C., Cordova, A.F., Hess, G.T., Bassik, M.C., and Li, L. (2019). SLC19A1 Is an Importer of the Immunotransmitter cGAMP. *Mol. Cell* **75**, 372–381.
- Romling, U., Galperin, M.Y., and Gomelsky, M. (2013). Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **77**, 1–52.
- Rongvaux, A., Jackson, R., Harman, C.C.D., Li, T., West, A.P., de Zoete, M.R., Wu, Y., Yordy, B., Lakhani, S.A., Kuan, C.Y., et al. (2014). Apoptotic Caspases Prevent the Induction of Type I Interferons by Mitochondrial DNA. *Cell* **159**, 1563–1577.
- Roongruangchai, K., Kummalue, T., Sookkua, T., and Roongruangchai, J. (2010). Comparison of *Pouzolzia indica* methanolic extract and Virkon against cysts of *Acanthamoeba* spp. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **41**, 776–784.
- Russell, W.C. (2009). Adenoviruses: update on structure and function. *J. Gen. Virol.* **90**, 1–20.

Saheki, Y., and De Camilli, P. (2017). Endoplasmic Reticulum–Plasma Membrane Contact Sites. *Annu. Rev. Biochem.* **86**, 659–684.

Saheki, Y., Bian, X., Schauder, C.M., Sawaki, Y., Surma, M.A., Klose, C., Pincet, F., Reinisch, K.M., and De Camilli, P. (2016). Control of plasma membrane lipid homeostasis by the extended synaptotagmins. *Nat. Cell Biol.* **18**, 504–515.

Sanjana, N.E., Shalem, O., and Zhang, F. (2014). Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat. Methods* **11**, 783–784.

Schlee, M., and Hartmann, G. (2016). Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 566–580.

Schoggins, J.W. (2019). Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? *Annu. Rev. Virol.* **6**, 567–584.

Schoggins, J.W., MacDuff, D.A., Imanaka, N., Gainey, M.D., Shrestha, B., Eitson, J.L., Mar, K.B., Richardson, R.B., Ratushny, A. V., Litvak, V., et al. (2014). Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity. *Nature* **505**, 691–695.

Shang, G., Zhang, C., Chen, Z.J., Bai, X., and Zhang, X. (2019). Cryo-EM structures of STING reveal its mechanism of activation by cyclic GMP–AMP. *Nature* **567**, 389–393.

Spurrell, E., Gangeswaran, R., Wang, P., Cao, F., Gao, D., Feng, B., Wold, W., Tollefson, A., Lemoine, N.R., and Wang, Y. (2014). STAT1 Interaction with E3-14.7K in Monocytes Affects the Efficacy of Oncolytic Adenovirus. *J. Virol.* **88**, 2291–2300.

Srikanth, S., Woo, J.S., Wu, B., El-Sherbiny, Y.M., Leung, J., Chupradit, K., Rice, L., Seo, G.J., Calmettes, G., Ramakrishna, C., et al. (2019). The Ca²⁺ sensor STIM1 regulates the type I interferon response by retaining the signaling adaptor STING at the endoplasmic reticulum. *Nat. Immunol.* **20**, 152–162.

Stefan, C.J. (2018). Building ER-PM contacts: keeping calm and ready on alarm. *Curr. Opin. Cell Biol.* **53**, 1–8.

- Stefan, C.J., Manford, A.G., and Emr, S.D. (2013). ER-PM connections: sites of information transfer and inter-organelle communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* **25**, 434–442.
- Sun, B., Sundström, K.B., Chew, J.J., Bist, P., Gan, E.S., Tan, H.C., Goh, K.C., Chawla, T., Tang, C.K., and Ooi, E.E. (2017). Dengue virus activates cGAS through the release of mitochondrial DNA. *Sci. Rep.* **7**, 1–8.
- 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* **339**, 786–791.
- Sun, W., Li, Y., Chen, L., Chen, H., You, F., Zhou, X., Zhou, Y., Zhai, Z., Chen, D., and Jiang, Z. (2009). ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 8653–8658.
- Tabbara, K.F., Omar, N., Hammouda, E., Akanuma, M., Ohguchi, T., Ariga, T., Tagawa, Y., Kitaichi, N., Ishida, S., Aoki, K., et al. (2010). Molecular epidemiology of adenoviral keratoconjunctivitis in Saudi Arabia. *Mol. Vis.* **16**, 2132–2136.
- Takeuchi, R., Nomura, Y., Kojima, M., Uchio, E., Kobayashi, N., and Matumoto, M. (1990). A nosocomial outbreak of epidemic keratoconjunctivitis due to adenovirus type 37. *Microbiol. Immunol.* **34**, 749–754.
- Tanaka, Y., and Chen, Z.J. (2012). STING Specifies IRF3 Phosphorylation by TBK1 in the Cytosolic DNA Signaling Pathway. *Sci. Signal.* **5**, ra20.
- Teigler, J.E., Kagan, J.C., and Barouch, D.H. (2014). Late Endosomal Trafficking of Alternative Serotype Adenovirus Vaccine Vectors Augments Antiviral Innate Immunity. *J. Virol.* **88**, 10354–10363.
- Tsuchiya, Y., Jounai, N., Takeshita, F., Ishii, K.J., and Mizuguchi, K. (2016). Ligand-induced Ordering of the C-terminal Tail Primes STING for Phosphorylation by TBK1. *EBioMedicine* **9**, 87–96.
- Uchio, E., Ishiko, H., Aoki, K., and Ohno, S. (2002). Adenovirus detected by polymerase chain reaction in multidose eyedrop bottles used by patients with adenoviral keratoconjunctivitis. *Am. J. Ophthalmol.* **134**, 618–619.

Uzuner, H., Karadenizli, A., Er, D.K., and Osmani, A. (2018). Investigation of the efficacy of alcohol-based solutions on adenovirus serotypes 8, 19 and 37, common causes of epidemic keratoconjunctivitis, after an adenovirus outbreak in hospital. *J. Hosp. Infect.* **100**, e30–e36.

Wang, I.H., Suomalainen, M., Andriasyan, V., Kilcher, S., Mercer, J., Neef, A., Luedtke, N.W., and Greber, U.F. (2013). Tracking Viral Genomes in Host Cells at Single-Molecule Resolution. *Cell Host Microbe* **14**, 468–480.

Warren, D., Nelson, K.E., Farrar, J.A., Hurwitz, E., Hierholzer, J., Ford, E., and Anderson, L.J. (1989). A large outbreak of epidemic keratoconjunctivitis: problems in controlling nosocomial spread. *J. Infect. Dis.* **160**, 938–943.

West, A.P., Khoury-Hanold, W., Staron, M., Tal, M.C., Pineda, C.M., Lang, S.M., Bestwick, M., Duguay, B.A., Raimundo, N., MacDuff, D.A., et al. (2015). Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response. *Nature* **520**, 553–557.

Whiteley, A.T., Eaglesham, J.B., de Oliveira Mann, C.C., Morehouse, B.R., Lowey, B., Nieminen, E.A., Danilchanka, O., King, D.S., Lee, A.S.Y., Mekalanos, J.J., et al. (2019). Bacterial cGAS-like enzymes synthesize diverse nucleotide signals. *Nature* **567**, 194–199.

Windheim, M., Southcombe, J.H., Kremmer, E., Chaplin, L., Urlaub, D., Falk, C.S., Claus, M., Mihm, J., Braithwaite, M., Dennehy, K., et al. (2013). A unique secreted adenovirus E3 protein binds to the leukocyte common antigen CD45 and modulates leukocyte functions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, E4884–E4893.

Woo, S.R., Fuertes, M.B., Corrales, L., Spranger, S., Furdyna, M.J., Leung, M.Y.K., Duggan, R., Wang, Y., Barber, G.N., Fitzgerald, K.A., et al. (2014). STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Mediates Innate Immune Recognition of Immunogenic Tumors. *Immunity* **41**, 830–842.

Woodward, J.J., Iavarone, A.T., and Portnoy, D.A. (2010). c-di-AMP Secreted by Intracellular *Listeria monocytogenes* Activates a Host Type I Interferon Response. *Science* **328**, 1703–1705.

Wu, J., and Chen, Z.J. (2014). Innate Immune Sensing and Signaling of Cytosolic Nucleic Acids. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 461–488.

Wu, J., Sun, L., Chen, X., Du, F., Shi, H., Chen, C., and Chen, Z.J. (2013). Cyclic GMP-AMP Is an Endogenous Second Messenger in Innate Immune Signaling by Cytosolic DNA. *Science* **339**, 826–830.

Wutzler, P., and Sauerbrei, A. (2000). Virucidal efficacy of a combination of 0.2% peracetic acid and 80% (v/v) ethanol (PAA-ethanol) as a potential hand disinfectant. *J. Hosp. Infect.* **46**, 304–308.

Yawata, N., Selva, K.J., Liu, Y.C., Tan, K.P., Lee, A.W.L., Siak, J., Lan, W., Vania, M., Arundhati, A., Tong, L., et al. (2016). Dynamic change in natural killer cell type in the human ocular mucosa in situ as means of immune evasion by adenovirus infection. *Mucosal Immunol.* **9**, 159–170.

Yoneyama, M., and Fujita, T. (2010). Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. *Rev. Med. Virol.* **20**, 4–22.

Zanoni, I., Granucci, F., and Broggi, A. (2017). Interferon (IFN)- λ Takes the Helm: Immunomodulatory Roles of Type III IFNs. *Front. Immunol.* **8**.

Zhang, C., Shang, G., Gui, X., Zhang, X., Bai, X., and Chen, Z.J. (2019). Structural basis of STING binding with and phosphorylation by TBK1. *Nature* **567**, 394–398.

Zhang, X., Shi, H., Wu, J., Zhang, X., Sun, L., Chen, C., and Chen, Z.J. (2013). Cyclic GMP-AMP Containing Mixed Phosphodiester Linkages Is An Endogenous High-Affinity Ligand for STING. *Mol. Cell* **51**, 226–235.

Zheng, Y., Stamminger, T., and Hearing, P. (2016). E2F/Rb Family Proteins Mediate Interferon Induced Repression of Adenovirus Immediate Early Transcription to Promote Persistent Viral Infection. *PLOS Pathog.* **12**, e1005415.

Zhong, B., Yang, Y., Li, S., Wang, Y.Y., Li, Y., Diao, F., Lei, C., He, X., Zhang, L., Tien, P., et al. (2008). The Adaptor Protein MITA Links Virus-Sensing Receptors to IRF3 Transcription Factor Activation. *Immunity* **29**, 538–550.

補足資料

表 4. 定量 Real-time PCR に使用したプライマー配列

Gene	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
IFNB1 (human)	ATGACCAACAAGTGTCTCCTCC	GCTCATGGAAAGAGCTGTAGTG
Ifnb1 (mouse)	GAGCTCCAAGAAAGGACGAAC	GGCAGTGTAACCTCTTCTGTAT
IFNL1 (human)	CGCCTTGGAAGAGTCACTCA	GAAGCCTCAGGTCCCAATTC
IL-1B	GCCGCGTCAGTTGTTGTGGC	TGAGTCCGGAGCGTGCAGT
TNF α	ATGAGCACTGAAAGCATGATCC	GAGGGCTGATTAGAGAGAGGTC
IL-6 (human)	AACCTGAACCTTCCAAGATGG	TCTGGCTTGTTCTCTCACTACT
IL-8	GAATGGGTTTGCTAGAATGTGATA	CAGACTAGGGTTGCCAGATTAAAC
OAS1	AGAGACTTCCTGAAGCAGCG	GAGCTCCAGGGCATACTGAG
VIPERIN	TTCACCTCGCCAGTGCAACTAC	CGGTCTTGAAGAAATGGTCT
GAPDH (human)	CATGAGAAGTATGACAACAGCCT	AGTCCTTCCACGATACCAAAGT
Gapdh (mouse)	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
MAB21D1 (cGAS)	GGGAGCCCTGCTGTAACACTTCTTAT	CCTTTGCATGCTTGGGTACAAGGT
TMEM173 (STING)	CGAGGTGGAAGTGAACCACA	GTGGATTTGTGTGTGGACGC
ESYT1 (E-Syt1)	CATGTCAAGAGAGCGTGAGC	ACCCTGGGAAAGGTC TGTCT
ESYT2 (E-Syt2)	ACCCAAATCCTGTTGTCCAG	TTTTCCTCCCACACAGGTTC
ESYT3 (E-Syt3)	GGTGGATGAGTGGTTTGTCC	ACGAGAATGGCAGTGGAAG
SLC19A1	GGACAGGATCAGGAAGTACACG	CTTTGCCACCATCGTCAAGACC
HAdV E1A	GTTTTCTCTCCAGCGATTCA	GATGACTCATCCTCTGACAC
HAdV-D8 CR1 β	TCGTGCTGCTCTCTCTTCTTC	ACTGGCAGGTCTAATGGTC
HAdV-D37 CR1 β	TCGTGCTGCTCTCTCTTCTTC	ACTGGTGTGTCTGGGGGTC
HAdV-D53 CR1 β	TCGTGCTGCTCTCTCTTCTTC	ACTGGCGTATCTGAGGGTC
EMCV genomic RNA	GTCGTGAAGGAAGCAGTTCC	CACGTGGCTTTTGGCCGCAGAGGC
HSV-1 genomic DNA	TGGGACACATGCCTTCTTGG	ACCCTTAGTCAGACTCTGTTACTTACCC
IAV PR8 NP RNA	GATTGGTGGAATTGGACGAT	AGAGCACCATTCTCTCTATT

表 5. 本研究で使⽤した siRNA の配列

Target	Sequence (5'→3')
MYD88	CUGGAACAGACAAACUAUC
RIG-I	GUUGGAGGAGUAUAGAUUA
MDA5	GUUCAGGAGUUAUCGAACA
MAVS	CCACCUUGAUGCCUGUGAA
cGAS	AGAAAAUGUUGCAGGAAA
STING	GGCUGGCAUGGUCAUUUA
AIM2	CCCGAAGAUCAACACGCUUCA
IRF-3	CCUUCAUUGUAGAUCUGAU
IRF-7	CGCACAAGGUGUACGCGCU
RelA	GACAUUGAGGUGUAUUUCA
E-Syt1	CUUAUGAGGUGAUGGUACA
E-Syt2	CAGUGUUUGAUCAAAGCUU
E-Syt3	GUGUUUGAGUUCAUGGUGU
SLC19A1 #1	CAGUUAUACUCCGUGUACU
SLC19A1 #2	CUGAUCCUGUCCAUCAUCU

表 6. KO 細胞作製に使⽤した gRNA の配列

Target	Sequence (5'→3')
cGAS #1	GAAC TTCCCGCCTTAGGCAGGG
cGAS #2	GACTCGGTGGGATCCATCG
STING #1	GAGCACACTCTCCGGTACC
STING #2	CCATCCATCCCGTGTCCCAGGG

表 7. 本研究で使した抗体一覧

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
anti-C-STING (D2P2F)	Cell Signaling Technology	Cat# 13647
anti-C-STING	Bioss	Cat# bs-8335R
anti-C-STING (EPR13130)	Abcam	Cat# ab181125
anti-C-STING	R&D systems	Cat# AF6516
anti-N-STING (made in our laboratory using a polypeptide [amino acids 1–12 of human STING] as an antigen)	This paper	N/A
anti-calnexin (C5C9)	Cell Signaling Technology	Cat# 2679S
anti-pTBK1 (pS172) (D52C2)	Cell Signaling Technology	Cat# 5483
anti-pIRF-3 (pS396) (4D4G)	Cell Signaling Technology	Cat# 4947
anti-pIRF-3 (Ser396) (D6O1M)	Cell Signaling Technology	Cat# 10327
anti-MAVS (Rodent Specific)	Cell Signaling Technology	Cat # 4983
anti-CD11b (EP1345Y)	Abcam	Cat# ab52478
anti-CD11b (M1/70)	Biolegend	Cat# 101207
anti-CD3 (HIT3a)	Biolegend	Cat# 300307
anti-CD14 (HCD14)	Biolegend	Cat# 325605
anti-CD11c (3.9)	Biolegend	Cat# 301605
anti-CD19 (4G7)	Biolegend	Cat# 392505
anti-CD56 (HCD56)	Biolegend	Cat# 318305
anti-Flag (M2)	Sigma	Cat# F7425
anti-PIP2	Abcam	Cat# ab2335
Alexa Fluor 594 donkey anti-sheep IgG	Invitrogen	Cat# A11016
Alexa Fluor 594 chicken anti-mouse IgG	Invitrogen	Cat# A21201
Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG	Invitrogen	Cat# A21206
Alexa Fluor 488 chicken anti-rabbit IgG	Invitrogen	Cat# A21441
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG	Invitrogen	Cat# A11029
Normal Rabbit IgG	MBL	Cat# PM035
Rabbit (DA1E) mAb IgG (Alexa Fluor® 647 Conjugate)	Cell Signaling Technology	Cat# 2985S

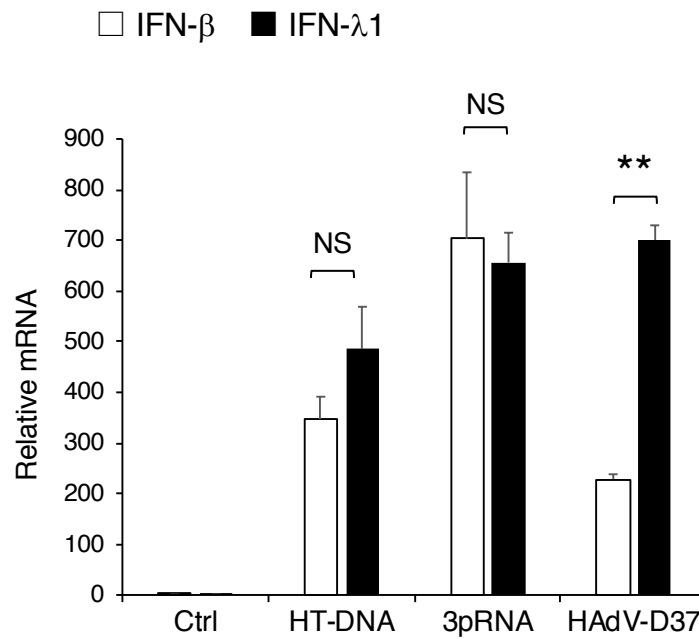


図 28. 細胞質核酸センサーのリガンド刺激では I 型と III 型 IFN が同程度誘導される

HCjE 細胞に HAdV-D37 感染及び HT-DNA または 3pRNA をリポフェクション法によって細胞へと導入し、12 時間後の *IFNB1* と *IFNL1* の mRNA の量を Real-time PCR にて測定した。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値±SD で表した。** $P < 0.01$ vs IFN-β。NS, not significant.

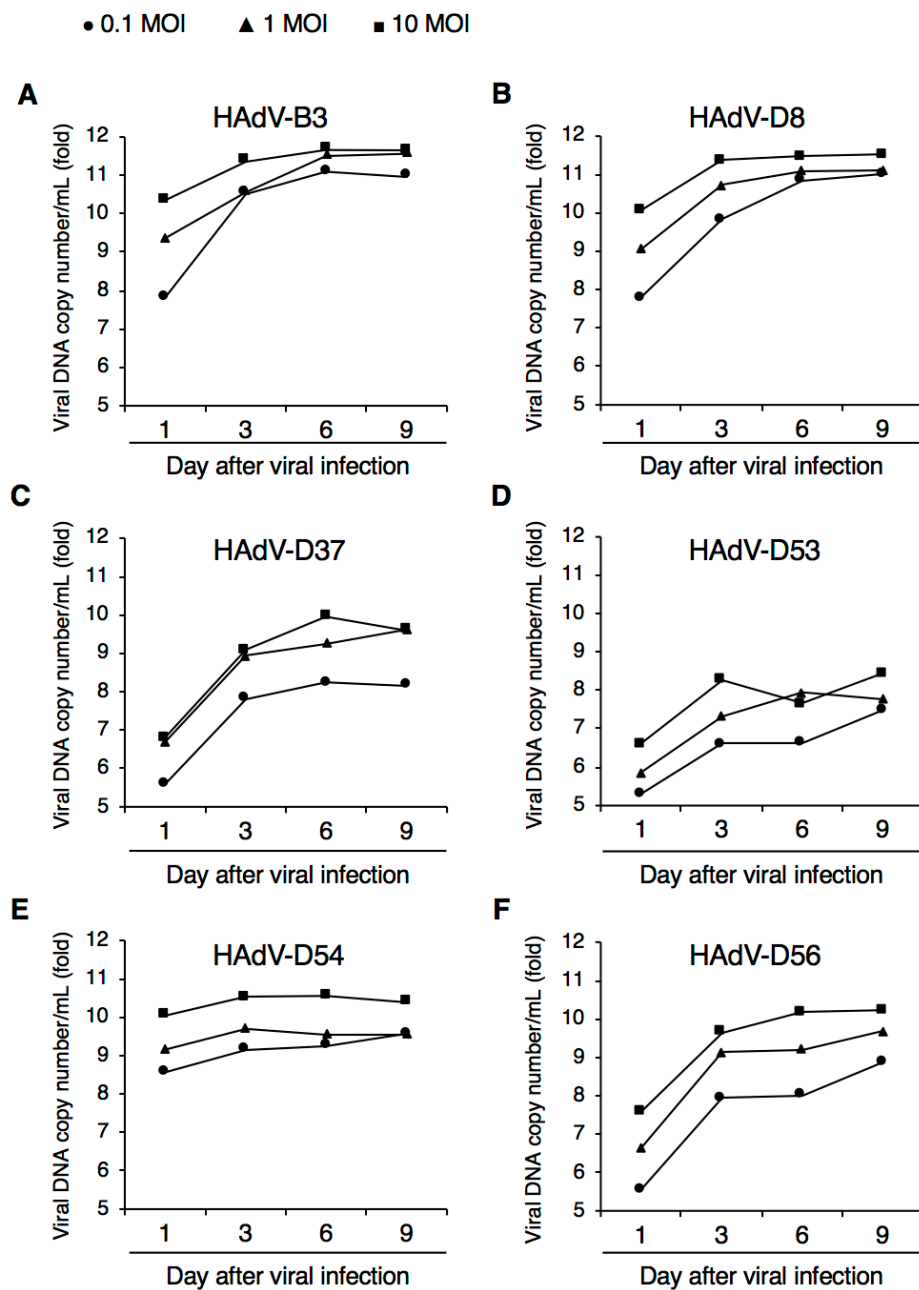


図 29. HAdV の増殖曲線

A549 細胞に HAdV-B3 (A)、HAdV-D8 (B)、HAdV-D37 (C)、HAdV-D53 (D)、HAdV-D54 (E)、HAdV-D56 (F) を 3 つの MOI (0.1; ●、1; ▲、10; ■) で感染させ、1、3、6、9 日後に HAdV の DNA コピー数を Real-time PCR にて測定した。

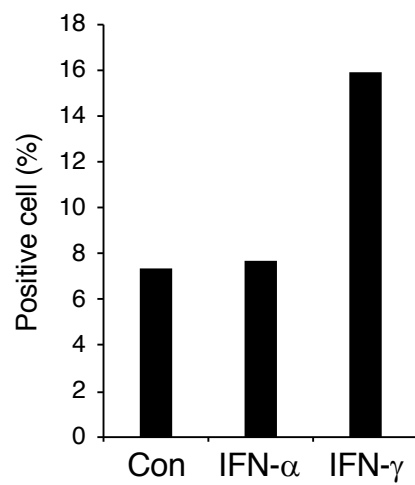


図 30. IFN- γ 処理によって細胞表面 STING の表出が増加する

PMA でマクロファージに分化させた THP-1 細胞に IFN- α (10,000 unit/ml) または IFN- γ (100 ng/ml) を処理し、24 時間後に α -C-STING 抗体を用いて細胞表面の STING を FACS で測定した。

謝辞

共同研究者の北市伸義先生、八幡信代先生には本研究で使用したウイルスを提供、さらに実験的な技術をご指導して頂いたこと、誠に感謝致します。

また、共同研究者の青木功喜先生、大野重昭先生、Gabriel Gonzalez 先生には実験材料の入手を始め、研究に関する多くのご助言を頂き誠に深く感謝いたします。

熊本県保健環境科学研究所の橋本慎太郎氏、及び日隈眼科医院の日隈陸太郎氏には、研究に必要な材料を提供して頂いたこと、深く御礼申し上げます。

pEBG vector を提供していただいた Bruce Mayer 教授、p125-Luc プラスミドを提供していただいた京都大学の藤田尚志教授、HCjE 細胞を提供していただいた Ilene K. Gipson 教授に厚く御礼申し上げます。

指導教員である高岡晃教教授には、研究をする機会を与えていただき、また、多くの御助言を頂きましたこと誠に深く感謝致します。

指導教員である佐藤精一講師には、学生生活、研究全般にわたっての丁寧なご指導、心からお礼を申し上げます。

解析や実験に関する多くの御助言をして頂きました山田大翔助教、ならびに宮下陽平さんを始めとした本研究室の皆様方、大変お世話になりました、ここに感謝の意を示します。