

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890049

研究課題名（和文） TLR3下流II型IFN応答の制御機構の解明

研究課題名（英文） The regulation mechanism of TLR3 dependent type II IFN response

研究代表者

根岸 英雄 (NEGISHI HIDEO)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60514297

研究成果の概要（和文）：

TLR3によるII型IFN産生機構について、コクサッキーウイルス(CVB3)を題材として解析した結果以下の成果を得た。

1. TLR3はCVB3複製の課程で生じる核酸を認識する事が示唆された。
2. TLR3は下流でIRF転写因子を活性化し、II型IFNを誘導することを明らかにした。
3. 上記の応答は様々なCD11b陽性のマクロファージで起こる事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

1. TLR3 recognizes the nucleic acid which is produced during CVB3's replication.
2. IRF family transcription factors are activated and induce the type II IFN mRNA in downstream of TLR3 signaling pathway.
3. Type II IFN is produced by CD11b positive macrophages in TLR3 dependent manner.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	790,000	237,000	1,027,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,890,000	558,000	2,418,000

研究分野：ライフサイエンス

科研費の分科・細目：免疫学

キーワード：TLR、II型IFN、CVB3、

1. 研究開始当初の背景

病原体認識機構の一つである Toll 様受容体 (TLR) は現在までにヒトで 10 種類、マウスで 13 種類が同定されており、それぞれ特異的な病原体分子関連パターンを認識することが知られている。TLR の中でも、TLR3 はウイルス由来の二重鎖 RNA を認識し、I 型 IFN を誘導することで抗ウイルス応答に重要な役割を果たすと考えられてきた。しかしながら、水疱性口内炎ウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、レオウィルス等の RNA ウイルス感染に対して TLR3 欠損マウスは正常に抗ウイルス応答を惹起できることが報告されているだけでなく、インフルエンザウイルスやウエストナイルウイルス感染に関してはむしろ、TLR3 欠損マウスは耐性を示す事が知られている。また、脳心筋炎ウイルスに関しては TLR3 の重要性を示す報告と、重要性がないとする報告の両方があり、TLR3 の抗ウイルス応答における役割は不明な点が多い。

一方、コクサッキーB ウイルス (CVB3) はピコルナウイルスウイルス科に属する、+鎖 RNA ウイルスであり、重篤な心筋炎の原因ウイルスとして、公衆衛生上、重要な感染症のひとつであるが、現在までに効果的な治療法は確立されておらず、抗ウイルス応答における自然免疫応答の役割についても不明な点が残されている。

申請者は先攻研究において、TLR3 が CVB3 に対する抗ウイルス応答に重要である事を発見した (Negishi H et al. PNAS 2008 vol. 105 p20446)。TLR3 は CVB3 に応答する際、I 型 IFN 産生には関与せず、II 型 IFN の誘導に強く関与し、この TLR3-II 型 IFN 応答が TLR3 による抗ウイルス応答の中核を担っている。また、このような II 型 IFN 応答は HSV

や VSV などの他のウイルス感染に対しても有効であるが、特に I 型 IFN 応答が感染防御に不十分であるときにその重要性を強く示し、一方で、CVB3 が他のウイルスと比較して非常に低いレベルの I 型 IFN しか誘導しないことから、TLR3-II 型 IFN 応答は、I 型 IFN 応答だけではウイルスの排除に不十分である際の奥の手として重要な役割を果たしている事が示唆された。

この研究は I 型 IFN 応答と TLR3-II 型 IFN 応答による、二重の抗ウイルス防御機構の存在を示し、I 型 IFN 応答のバックアップというユニークな TLR3 の役割を明らかにしたことで、抗ウイルス応答の理解に新たな進展をもたらした。一方で、公衆衛生上、重要な感染症である CVB3 に対する抗ウイルス応答を解明し、CVB3 に対する治療法確立における重要な分子基盤を供した。

しかしながら一方で、TLR3 が CVB3 の何を認識し、どのような細胞において機能するかだけでなく、どのような機構で TLR3 下流の II 型 IFN 産生が制御されるかは不明なままであった。

2. 研究の目的

本研究では、I 型 IFN の重要性が強調される中で今まで明らかにされていなかった、TLR3 を介した II 型 IFN による抗ウイルス応答をさらに解析することで、CVB3 感染治療における分子基盤を供するとともに、抗ウイルス応答に対する理解を独自の視点から解析、解明することを目的とする。

(1) TLR3 リガンドの特定

CVB3 の構造中に含まれによる TLR3 リガンドを特定する。構造タンパクまたはゲノム RNA のどのような領域が TLR3 に認識されるかを特定する。

(2) TLR3 下流の II 型 IFN 産生メカニズムの解明

TLR3 下流の II 型 IFN 産生にどのような転写因子が重要であるかを特定し、その転写因子による、II 型 IFN 産生の制御機構について、直接的または他の cytokine を介するのか、直接であれば promoter 上への結合の有無、および結合領域を明らかにする。

(3) TLR3-II 型 IFN 応答を行う細胞の特定

どのような臓器で CVB3 感染時に TLR3 を介して II 型 IFN 産生が行われるか明らかにする。また、どのような細胞が CVB3 感染時に TLR3 を介して II 型 IFN 産生を行っているかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) CVB3 中に含まれる TLR3 リガンドの特定

申請者は CVB3 による TLR3 を介した遺伝子誘導が CVB3 の複製に依存しないという結果を既に得ていた。そこで、CVB3 のウイルス粒子中に含まれる TLR3 リガンドを特定するため、まず、熱処理により CVB3 構造タンパク質を変成させた CVB3、または CVB3 から抽出したゲノム RNA を用いて WT および TLR3 欠損腹腔マクロファージを刺激し、TLR3 依存的な遺伝子誘導が起こるかどうかが検討し、TLR3 の認識部位がタンパク質もしくは RNA のどちらであるか決定した。この検討の課程の中で、当初は予期していなかったことであるが、誘導される遺伝子の種類によって、必要とされ

る CVB3 リガンドが異なる事が分かった。すなわち、炎症性サイトカインの誘導は、比較的 CVB3 の複製に依存しないのに対し、I 型 IFN は CVB3 の複製に非常に強く依存した。この検討から、CVB3 の受容体が複数存在する事が示唆されたが、II 型 IFN については、CVB3 の複製が必要である事も明らかとなり、複製の課程で生じるゲノム RNA を認識している事が示唆された。

(2) TLR3 下流の II 型 IFN 産生メカニズムの解明

申請者は既に TLR3 下流の II 型 IFN 誘導にある転写因子が関与することを示す結果を得ていた。これに加え、さらに TLR 下流において機能する事が知られている他の転写因子について、欠損マウス由来腹腔マクロファージを polyIC で刺激し、II 型 IFN の産生を検討することで TLR3 下流において II 型 IFN 産生に関わる転写因子群を明らかにした。さらにこれらの転写因子について、II 型 IFN プロモーターへの結合を ChIP assay により検討し、結合領域の特定を行なった。

(3) TLR3-II 型 IFN 応答を行う細胞の特定

申請者は TLR3 を介した II 型 IFN 産生は NK 細胞および適応免疫系細胞によらないという結果を既に得ていた。野生型および TLR3 欠損マウスに CVB3 を感染後、心臓、肝臓、脾臓、膵臓、腸、腎臓、肺を摘出、各臓器における TLR3 特異的な II 型 IFN mRNA 誘導を比較し、肝臓で TLR3-II 型 IFN 応答が強く起こっているか明らかにした。さらに肝臓から細胞を分離後、CVB3 感染による II 型 IFN mRNA の誘導を検討し、どの細胞で TLR3 特異的に II 型 IFN が産生されるかを特定した。

4. 研究成果

(1) TLR3はCVB3複製の課程で生じる核酸を認識する事が示唆された。

(2) TLR3は下流でIRF転写因子を活性化し、II型IFNを誘導することを明らかにした。

(3) 上記の応答は様々なCD11b陽性のマクロファージで起こる事を明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根岸 英雄 (NEGISHI HIDEO)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：60514297

(2) 研究分担

なし

(3) 連携研究者

なし