

審査の結果の要旨

氏名 劉凱文

本論文は、エンドソーム・リソソームで機能する RNA 分解酵素 RNaseT2 がマクロファージにおける RNA 特異的 Toll 様受容体 (TLR) 応答を制御する分子機構を解析した結果が記載されている。

TLR は自然免疫における病原体センサーであり、病原体関連の分子パターンを認識し、免疫応答を誘導する。核酸リガンドを認識する TLR はエンドソーム・リソソームに局在し、ウイルスや細菌由来の核酸に対して免疫応答を起こす。TLR3 は二本鎖 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) を、TLR7 とヒト TLR8 は一本鎖 RNA (single-stranded RNA, ssRNA) をそれぞれ認識する。TLR7 とヒト TLR8 の構造科学的解析から、これらの TLR は RNA の代謝産物であるヌクレオシドとオリゴヌクレオチドに結合することが分かった。ヒト TLR8 の応答に RNase2 と RNaseT2 による RNA の分解が必要である。また、TLR3 を活性化するには、dsRNA の長さが 40~50 bp 以上であることが必要であると報告されている。これらの研究を受け、RNA の代謝酵素である RNase がヒト TLR8 以外の RNA センサーの応答に関与するのか、本研究において検討した。RNase スーパーファミリーの中、エンドソーム・リソソームで機能しうる、RNase A と T ファミリーに注目した。RNase A ファミリーに属する RNase6 は、皮膚や尿路で抗細菌機能を持つ。哺乳類における RNase T ファミリー唯一のメンバーである RNaseT2 は、ヒトの Leukoencephalopathy の原因遺伝子であることが分かっている。

最初マクロファージ、樹状細胞における RNase A ファミリーメンバーと RNaseT2 の発現を調べた。その結果マクロファージ系の細胞では RNase4 と T2 が高く発現しており、樹状細胞では RNaseT2 が高く発現していた。また、リガンド刺激や I 型インターフェロン処理によって、RNase4 の発現が抑制され、RNaseT2 の発現が誘導された。この結果を受け、この二種類の RNase の、マクロファージ免疫応答における役割を検討した。マクロファージ細胞株である J774 で RNase4 と T2 の欠損細胞を作成し、RNA リガンドに対する応答を調べた。RNase4 欠損細胞では TLR7 のリガンドである polyU に対する応答が野生型より低くなった。RNaseT2 欠損細胞では TLR3 のリガンドである poly(I:C) に対する応答が高くなり、polyU に対する応答が低くなった。また、RNaseT2 欠損マウス由来の骨髄マクロファージと樹状細胞でも細胞株と同じ表現型が見られた。これらの結果から、RNaseT2 が TLR3 の応答を抑制し TLR7 の応答に必要であることが分かった。

RNaseT2 が TLR3 と TLR7 の応答を制御するメカニズムを調べるため、論文は三つの仮説について検証した。まず、RNaseT2 が TLR3 と TLR7 の発現に影響している可能性を検討したが、野生型と RNaseT2 欠損細胞において、TLR3 と TLR7 の発現量に変化はなかった。次に、RNA の細胞への取り込みに RNaseT2 が関与している可能性を検討した。Rhodamine で標識さ

れた poly(I:C)を用いて、細胞への取り込みを確認した結果、欠損細胞と野生型に違いは認められなかった。最後に、RNaseT2 の RNase 活性が TLR3、TLR7 応答に影響している可能性を検討した。そこで、野生型、推測された活性部位に変異を入れた変異体(H69A、E118V と H122A)、及び RNaseT2 欠損による Leukoencephalopathy で報告された変異 C188R を導入した RNaseT2 を作成し、それぞれのタンパク質を精製した。野生型の RNaseT2 は、ssRNA だけでなく、dsRNA に対しても分解活性を示した。一方、H122A と C188R 変異体にはこの活性がなかった。これらの野生型 RNaseT2 と変異体を RNaseT2 欠損細胞に発現し、RNA リガンドで刺激した結果、野生型 RNaseT2 または RNase 活性を持つ変異体は、増強された TLR3 応答を抑制したが、RNase 活性が低下した変異体では TLR3 応答の低下は認められなかった。また、RNaseT2 の欠損により低下していた polyU に対する TLR7 応答は、野生型 RNaseT2 では回復したが、RNase 活性を失った変異型 RNaseT2 では、レスキューが認められなかった。これらの結果は RNase 活性が RNaseT2 の TLR 応答制御に必要であることを示した。

次に、RNaseT2 の細胞内での局在を調べた。骨髄マクロファージを用いて密度勾配遠心分離で細胞内小器官を分離し、得られたフラクションを抗 RNaseT2 抗体と細胞内小器官マーカーに対する抗体でプロットした。その結果、RNaseT2 がエンドソームやリソソームのマーカーと同じフラクションから検出された。また、poly(I:C)で刺激した細胞において、後期エンドソームとリソソームのフラクションにおいて、RNaseT2 の量が増加していた。次に、RNaseT2 を発現した J774 マクロファージ細胞株を用いて、蛍光共焦点顕微鏡で RNaseT2 と細胞内小器官マーカーの共局在を調べた。強制発現の RNaseT2 がリソソームマーカーの Lamp1 と一番高い共局在を示した。また、rhodamine で標記された poly(I:C)との共局在も確認された。これらの結果から、RNaseT2 が TLR3 や TLR7 と同様にエンドソーム・リソソームに局在し、RNA リガンドの分解で TLR3 と TLR7 の応答を制御している可能性が示された。

本論文は、RNaseT2 の TLR7、TLR3 応答に対する影響を初めて報告したものである。マクロファージの RNA に対する自然免疫応答は RNA の分解によって制御されていることを示している。特に、RNaseT2 が欠損したマクロファージの RNA に対する自然免疫応答が TLR7 から TLR3 にシフトするという知見は、RNaseT2 欠損で認められる Leukoencephalopathy の病態解明の観点からも興味深い。なお、本論文の研究は佐藤 亮太、柴田 琢磨、平沼 亮祐、Tatjana Reuter、福井 竜太郎、張 韻、一戸 猛志、小沢 学、吉田 進昭、Eicke Latz、三宅 健介との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

よって本論文は博士（医科学）の学位請求論文として合格と認められる。