

論文の内容の要旨

論文題目

「**Toll-like receptor 3 応答における mammalian target of rapamycin の機能解析**」

氏名：佐藤 亮太

非自己を認識してから、そのパターンに当てはまる免疫応答を開始する獲得免疫と違い、自然免疫は特定のパターンがある非自己を即座に認識し応答するため、迅速に応答を立ち上げることが可能であり、初期段階の免疫応答としての利点を持つ。また、自然免疫は感染症から身を守る感染防御という正の部分と、誤って自己成分を認識することで自己免疫疾患や動脈硬化、乾癬などに関わる負の部分が存在することが明らかになってきており、自然免疫機構における分子機構解明は生命科学においても非常に重要なだけでなく、様々な感染症や内因性炎症性疾患の治療にもつながると考えられる。自然免疫機構の構成成分である核酸 TLR は非自己成分として認識しにくい核酸をターゲットとしており、さらに、その応答制御破綻が自己免疫疾患の一つの原因である可能性が示されていることから、核酸 TLR は緻密な応答制御が必要であることは明らかである。

その中でも、TLR3 は免疫細胞だけでなく繊維芽細胞などにも発現しており、ウイルス感染の初期免疫応答に関わる。ヘルペスウイルス (Herpes Simplex Virus, HSV) は DNA ウイルスの一種であり、ヒトにおいて感染症を始め癌など多くの疾患に関わることが知られている。TLR3 の機能欠損変異があると、ヘルペス脳炎にかかりやすいことが報告されている。神経細胞や繊維芽細胞においては TLR3 が主要な病原体センサーであることから、TLR3 がヘルペス感染に対する免疫応答に重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、TLR3 の HSV 応答制御機構に関してはほとんど分かっていないのが現状である。繊維芽細胞などの非血液細胞に発現する TLR3 がいかにヘルペスウイルスに応答するのか、その分子機序の解明はヘルペス脳炎発症の病態理解において重要であることは言うまでもない。

mTOR は代謝センサーの一つであり、複合体を形成し細胞外からの環境因子を統合し、多様なタンパク質の転写翻訳を促進することで細胞内の代謝状態と免疫応答などの細胞機能との連携を調節している。mTOR は TLR7、TLR9 によって誘導される I 型インターフェロン産生に重要な役割を果たしていることが報告されている。しかしながら TLR3 によって誘導される応答における mTOR の役割については不明な点が多い。そこで繊維芽細胞を用いて、TLR3 の HSV-1 に対する応答についての解析を、mTOR に着目して研究を進めた。

繊維芽細胞株である NIH3T3 において TLR3 応答関連分子である Unc93B1 がほとんど発現

しておらず、poly(I:C)刺激による RANTES 産生が見られないことから、Unc93B1 と TLR3 を強制発現させた NIH3T3 細胞を用いて実験を進めることとした。TLR3 の局在を共焦点顕微鏡により確認したところ、Lamp1 と共局在していたことから、TLR3 はライソソームに局在していることが示された。TLR3 を含むライソソームは核周辺に局在しており、リガンド(二重鎖 RNA、poly(I:C))刺激後の TLR3 発現ライソソームは細胞膜方向に展開していることが示された。

TLR3 の細胞内移行は、HSV 感染系でも認められた。poly(I:C)刺激や HSV 感染系において細胞の微小管やアクチンの再構築が検出されたことから、GTPase の細胞内移行への関与が示唆された。ライソソームの細胞内移行に関わる GTPase である Rab7a と TLR3 が会合しライソソームで共局在していたことから、TLR3 発現ライソソームは poly(I:C)刺激により伸長および重合した微小管に Rab7a を介して結合し、核辺縁から細胞膜方向に展開することが示唆された。

次に mTOR が、TLR3 の応答および細胞内移行に関わるかどうかについて検討した。mTOR は機能の異なる 2 つの複合体、mTORC1、mTORC2 を形成する。poly(I:C)刺激による微小管の重合や TLR3 を含むライソソームの細胞内移行は mTOR 阻害剤である Torin1 処理によって阻害され、mTORC1 阻害剤である Rapamycin では阻害できないことから、mTORC2 活性が重要であることが示唆された。mTORC2 は、これまで細胞骨格の制御に重要であることが報告されていることから、mTORC2 活性化が、微小管重合に関わると考えられる。poly(I:C)刺激後の RANTES 産生も Torin1 処理によって阻害され、Rapamycin では阻害できないことから、mTORC2 が関与する可能性が示された。また、poly(I:C)刺激後の Torin1 処理細胞においては、刺激依存的な Erk のリン酸化は変わらないが、p38 や p65 のリン酸化が減弱していた。この結果から、p38 および NF- κ B の活性化に mTORC2 が関与する可能性が示された。

mTOR は代謝センサーとして、血清中に含まれるアミノ酸や成長因子から刺激を受け、下流のシグナルを活性化することで、細胞の代謝や生存、増殖を行っていることが知られていることから、血清存在下、非存在下における TLR3 応答を検討した。血清非存在下では poly(I:C)刺激による TLR3 の細胞内移行が認められなかったが、RANTES の産生や mTOR、Rictor のリン酸化が認められた。血清を加えることで、TLR3 の細胞内移行が認められ、poly(I:C)刺激後の mTOR、Rictor のリン酸化に差異が見られた。さらに、共焦点レーザー顕微鏡でリン酸化された mTOR や Rictor と TLR3 の局在を比較したところ、血清非存在下では、活性化型 Rictor は poly(I:C)刺激後にのみ検出され、TLR3 との共局在を示した。興味深いことに、血清存在下では無刺激時から細胞質に活性化型 Rictor が検出され、核周囲に局在する TLR3 との共局在は認められなかった。リガンド刺激後は、TLR3 が核周囲から細胞膜方向に展開し、活性化型 Rictor と TLR3 の共局在が認められた。リン酸化型 mTOR は、血清存在下でリガンド刺激前から TLR3 と共局在を示しており、リガンド刺激後も TLR3 と共局在が認められることから、TLR3 と共に移行している可能性が示された。これらの結果より、血清による Rictor の活性化が TLR3 細胞内移行

に重要である可能性が示唆された。TLR3 の細胞内移行が血清の存在に依存することから、何らかの血清因子が TLR3 の細胞内移行に必要である可能性が示唆される。mTORC1 は、成長因子だけでなく、アミノ酸やグルコースでも活性化される。しかし、TLR3 の細胞内移行に関与する mTORC2 では、成長因子以外に活性化する血清因子が報告されていない。我々の用いた無血清培養液にはすでにアミノ酸や糖が含まれているが、脂肪酸は含まれていないことから、脂肪酸が mTORC2 を活性化する可能性について検討した。血清及び脂肪酸を除去した条件や脂肪酸合成阻害剤の存在下では TLR3 を含むライソソームは、血清非存在下と比べ核の周辺にさらに強く集積し、poly(I:C)刺激による RANTES 産生が低下していた。さらに、脂肪酸欠損条件下に飽和脂肪酸を加えると、poly(I:C)刺激で、mTORC2 活性化、RANTES 産生、TLR3 の細胞内移行が認められた。これらの結果は、脂肪酸が mTORC2 活性化に必須であり、mTORC2 が RANTES 産生と TLR3 の細胞内移行を誘導している可能性を示唆している。

TLR3 の細胞内移行における生体内の意義について検討するため TLR3 を介した IFN 産生を検証した。しかし、我々の用いた繊維芽細胞株は HSV 感染系において I 型 IFN 産生が検出されなかった。そこで胎児由来繊維芽細胞 (Mouse Embryonic Fibroblast, MEF) 細胞において HSV 感染系で I 型 IFN 産生が認められた。この細胞を用いて、TLR3 の局在、I 型 IFN 産生、mTORC2 の活性化の関係を検討した。Rapamycin 処理および Torin1 処理細胞において I 型 IFN 産生が低下していた。このことから、IFN 産生には mTORC1 および mTORC2 の活性化が関わる可能性が示された。細胞内移行に重要であると示唆された Rab7a 遺伝子を欠損した細胞や細胞内の脂肪酸合成を阻害する薬剤を用いて I 型 IFN 産生への影響を検討したところ、HSV 感染系において I 型 IFN 産生誘導には、Rab7a、脂肪酸合成の両方が必要であることが示された。これらの結果より、TLR3 および Unc93B1 強制発現繊維芽細胞株において、mTORC2 が TLR3 応答における RANTES 産生、および TLR3 の細胞内移行を介した I 型インターフェロン産生に寄与することが示された。