

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 佐藤 亮太

本研究は Toll-like receptor 3 (TLR3)応答制御機構における mammalian target of rapamycin (mTOR)の機能を、TLR3 および Unc93B1 強制発現線維芽細胞株を用いた解析により見出したものであり、下記の結果を得ている。

1. 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。刺激依存的細胞内移行は HSV 感染系でも確認された。
2. poly(I:C)刺激や HSV 感染後に細胞の微小管やアクチンの再構築が検出された。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リガンド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。
3. poly(I:C)刺激による微小管の重合や TLR3 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。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- $\kappa$ B の活性化に mTORC2 が関与する可能性が示された。

4. 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認められた。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。
5. 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。
6. 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。細胞内移行に関わると示唆された 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。

以上、本論文は 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を明らかにした。自然免疫機構における mTORC2 の機能についてはこれまで未知に等しく、TLR3 応答制御機構の解明について重要な貢献をなすと考え、学位の授与に値すると考えられる。