

[研究の背景と目的]

ウイルスに感染した際、ウイルスを体内から排除するための初期の防御応答として自然免疫系が働く。自然免疫系において細胞がウイルスを排除する戦略の一つに I 型インターフェロン (IFN) の産生がある。この戦略においては、まず侵入した RNA ウイルスや DNA ウイルスから産生された二本鎖 RNA (dsRNA) や二本鎖 DNA が細胞内センサーによって認識され、その後のシグナル伝達によって感染細胞において I 型 IFN の発現が誘導される。感染細胞によって分泌された I 型 IFN は感染細胞自身や周囲の細胞によって受容体を介して受容され、それらの細胞に IFN stimulated genes (ISGs) の発現を誘導する。ISGs を発現した細胞はウイルスの増殖しにくい状態である抗ウイルス状態となる。

感染初期にウイルスを排除する戦略として、もう一つ重要なのがアポトーシスの誘導である。アポトーシスという戦略においては感染細胞が死ぬことによってウイルスの増殖の場所をなくし、ウイルスの排除に貢献すると考えられている。

これまでの研究では「細胞を集団全体として観察」することで、ウイルス感染後に I 型 IFN の産生とアポトーシスの両方が誘導されることが示されてきた。また、dsRNA の刺激やインフルエンザウイルスなどの感染において感染細胞が分泌した I 型 IFN は細胞にアポトーシスを誘導することも報告されている。I 型 IFN は分泌因子であり、I 型 IFN を産生した細胞自身と周囲の細胞のどちらにも作用する。これらの結果から、I 型 IFN を産生した細胞でアポトーシスも誘導されると考えられてきた。しかし、I 型 IFN の産生とアポトーシスの誘導を「1 細胞ごとに観察」した例はほとんどない。このため、本当に同じ細胞で両方の応答が誘導されているかは分かっていない。もし、I 型 IFN を産生している細胞がアポトーシスしてしまうと、十分な量の I 型 IFN が産生されないことが予想される。では、I 型 IFN を産生する細胞とアポトーシスする細胞は本当に同じ細胞なのだろうか。これを調べるため、本研究では、これら 2 つの応答に注目して一細胞ごとの応答を観察することを目指した。

[結果]

1. I 型 IFN の産生とアポトーシスを 1 細胞ごとに検出する系の構築

本研究ではまず I 型 IFN の産生を検出するために、I 型 IFN の一つである IFN β のレポーターマウスを用いた。このマウス由来の細胞では、IFN β が発現すると内部リボソーム導入部位 (IRES 配列) を介して yellow fluorescent protein (YFP) を発現する。このため、IFN β を産生した細胞は YFP 陽性となる。一方、アポトーシスを検出するために AnnexinV binding assay を行い、アポトーシス細胞を AnnexinV 陽性細胞として検出した。

IFN β のレポーターマウス由来のマウス胎児由来線維芽細胞 (MEF) に対しウイルス模倣刺激として dsRNA をトランスフェクションし、I 型 IFN の産生とアポトーシスの誘導が起こるか確かめた。すると、dsRNA をトランスフェクションして 24 時間後の MEF の細胞集団で YFP 陽性細胞も AnnexinV-Cy5 陽性細胞も増加したことから、I 型 IFN の産生もアポトーシスも誘導されたことが確認された。このとき YFP と AnnexinV-Cy5 のうち、YFP 単独陽性細胞と AnnexinV-Cy5 単独陽性細胞が両方陽性の細胞に比べて多く存在した。さらに、MEF に対して水泡性口内炎ウイルス (VSV) を感染させても同様の結果が得られたことから、MEF においてウイルス感染に対しアポトーシスを誘導せずに I 型 IFN を産生する細胞集団 (以下、I 型 IFN 産生集団と呼ぶ) と I 型 IFN を誘導せ

ずにアポトーシスする細胞集団(以下、アポトーシス集団と呼ぶ)という2つの異なる集団が存在することが示唆された。

2. I型IFN産生細胞とアポトーシス細胞で何が異なるかの検証

ここまでの結果から個々の細胞の挙動を追跡することにより、一見均一に見える細胞中においてもIFNを産生集団とアポトーシス集団という2つの異なる集団が存在している可能性が示された。これは、感染細胞の中で役割分担があることを表す。では、IFN産生集団とアポトーシス集団の違いはどのようにして生じるのだろうか。まず大きく分けて2つの可能性が考えられた。ひとつは、IFN産生集団とアポトーシス集団が「もともと」異なる細胞種であるという可能性、もうひとつは、同種の細胞であったにも関わらず、応答が異なるという可能性である。この2つの可能性を区別するために単一の細胞から増殖させたMEFのクローン細胞を用意し、それまでと同様に二本鎖RNAをトランスフェクションしたところ、クローン化していないMEFの場合と同様、YFP単独陽性の細胞とAnnexin V-Cy5単独陽性細胞がともにコントロールに比べて増加した。この結果から遺伝的に均一なクローン集団においてもI型IFN産生集団とアポトーシス集団という2つの異なる集団に分かれることが示された。

しかし、たとえ遺伝的に均一な細胞であっても、一方の応答を起こしやすくするような何らかのバイアスが一部の細胞に存在していた可能性も考えられる。例えばIFNの産生を選択した細胞は、次に刺激した時にもIFNの産生を選択し、一度目の刺激に対してYFPもAnnexinV-Cy5も陽性にならなかったdouble negative細胞は二度目の刺激に対してもどちらの応答も誘導しないといったバイアスである。これを調べるために、dsRNA刺激後にI型IFN産生を選択しYFP単独陽性になった細胞やdouble negative細胞をFACSで単離し、数週間培養してYFPの蛍光が消失した後に二度目のdsRNA刺激を行った。すると、一度目の刺激に対してI型IFNの産生を選択した細胞も、どちらの応答も誘導しなかった細胞もI型IFN産生細胞とアポトーシス誘導細胞に同様の割合で分かれた。このことから、過去に選択した応答の履歴に依存するようなバイアスがないことが示唆された。従って、どの応答を選択するかについてはあらかじめ決まっているのではなく、確率論的なプロセスが関与する可能性が考えられる。

3. I型IFN産生集団とアポトーシス集団の相互作用の検証

ではI型IFN産生集団とアポトーシス集団の割合は何によって決まるのだろうか。まずI型IFN選択細胞とアポトーシス選択細胞がお互いに影響しあうのか検証した。

まず、zVADによってアポトーシスを阻害した場合にdsRNAによるI型IFN産生細胞の割合が変化するかを調べた。すると、zVAD処理によってアポトーシスする細胞の割合が減少しただけでなく、YFP単独陽性になる細胞の割合も有意に減少した。従ってアポトーシス選択細胞がI型IFN選択細胞の割合に影響を与えることが示唆された。次に、I型IFNの受容体(IFNAR)を欠損するMEFを用いてI型IFNのシグナル伝達を阻害した場合、dsRNAによるアポトーシス誘導細胞の割合が変化するか調べた。すると、dsRNA刺激によるI型IFN選択細胞の割合が減少しただけでなく、アポトーシスする細胞の割合も減少していた。さらにI型IFNのシグナル伝達を促進した場合にアポトーシス細胞の割合が増加するのかわかるか調べた。IFN β で細胞を前処理しておくことでI型IFN産生細胞の割合が増加することが知られている。細胞をIFN β で前処理した後にdsRNAで刺激したところ、前処理によってI型IFN産生細胞の割合が増加するだけでなく、アポトーシス細胞の割合も増加した。以上より、I型IFN産生集団とアポトーシス集団がそれぞれお互いに促進的に影響を与え合い、それぞれの抗ウイルス応答を選択する細胞の割合が決まる可能性が見出された。

[総括]

本研究において井上萌は、これまで細胞集団全体として観察されることがほとんどであったI型IFNの産生とアポトーシスを1細胞ごとに同時に観察することによって、一見均一に見える細

胞集団の中でも I 型 IFN を産生する集団とアポトーシスする集団という異なる集団が存在することを初めて示した。これは、感染細胞の中でも IFN 産生によって周囲に感染を知らせる細胞と、自殺によって感染の場をなくす細胞という「役割分担」があることを意味する。更に、IFN を産生するかアポトーシスするかという役割分担は各細胞によって固有に決められたものではなく、確率論的プロセスである可能性も明らかにした。最後に IFN 産生集団とアポトーシス集団の割合を決める機構として、それぞれの細胞集団がお互いの応答を促進するという、フィードフォワード型の制御が行われていることを示した。I 型 IFN の産生もアポトーシスも生体にとって不利益になる場合があることが報告されている。本研究で見出された I 型 IFN の産生とアポトーシスの使い分けのメカニズムを解明出来れば、感染細胞の抗ウイルス応答の使い分けを人為的に操作できる可能性がある。感染細胞の抗ウイルス応答の使い分けを人為的に制御することは、抗ウイルス応答が個体に与える悪影響を回避しながら、ウイルスを排除する治療方法となり得る。このため本研究は医学・薬学分野に貢献するものである。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。