

## 審査の結果の要旨

氏名 村上 祐輔

本研究は、二重鎖 RNA の自然免疫受容体として抗ウイルス免疫などを誘導する Toll 様受容体 3 (TLR3) のリガンド認識機構の解明と、新たに樹立した抗マウス TLR3 単クローン抗体を用いてマウス免疫細胞表面に TLR3 が発現しているのかを解析したものであり、下記の結果を得ている。

1. *Tlr3*<sup>-/-</sup> BALB/c マウスに、TLR3 を強制発現した Ba/F3 細胞を免疫しハイブリドーマを作製した結果、マウス TLR3 を特異的に認識する CaT3 と PaT3 という 2 つの単クローン抗体の樹立に成功した。これらの抗体を用いてマウス脾臓より採取した cDC と B 細胞サブセットの細胞表面を解析した結果、CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>DC と辺縁帯 B 細胞で細胞表面 TLR3 が強く発現していることが判明した。また、細胞膜透過染色の結果、これらの細胞サブセットでは TLR3 の発現が他のサブセットと比較して高かった。
2. TLR3 の切断部位を同定するために、RAW264.7 細胞に TLR3-GFP を強制発現させ抗 GFP 抗体で TLR3 を精製後、SDS-PAGE と Western blotting を用いて TLR3 の C 末端側 (TLR3C) 分子を予測し、TLR3C のアミノ酸 N 末端配列を解析した。その結果、TLR3C は S343 から開始することが判明したため、TLR3 の切断部位は A342 と S343 の間であると考えた。
3. TLR3N と 3C の会合を解析するために、Ba/F3 細胞に TLR3N と 3C を共発現させ、片方の断片で免疫沈降し、共沈してくるもう一方の断片を検出した。TLR3N で免疫沈降した場合、TLR3C は共沈したが、TLR3C で免疫沈降した場合、TLR3N は共沈しなかった。この結果から、TLR3N と 3C の会合はそれほど強い会合ではないことが示唆された。
4. リガンド応答に TLR3N が必要かを検討するために、TLR3N または TLR3C 単独発現もしくは共発現した細胞をリガンド刺激し、IFN- $\beta$  プロモーターと NF- $\kappa$ B の活性化を解析した。TLR3N または 3C 単独発現はリガンド応答しなかったが、共発現した細胞ではリガンド応答が認められたため、TLR3 のリガンド応答には TLR3N が必要なことが判明した。
5. 細胞表面 TLR3 を標的として PaT3 を処置した結果、J774.1 細胞や骨髄から誘導したマクロファージ (BM-Mcs) で TLR3 応答を増強することが判明した。この増強のメカニズムとして、PaT3 と TLR3 は細胞内に取り込まれた後も安定した複合体を形成し、PaT3 は TLR3N と 3C の複合体の会合を強めることでリガンド応答を増強することが示唆された。

以上、本論文は独自に樹立した抗体を用いて免疫細胞表面に TLR3 が発現していることを初めて明らかにした。また、TLR3 の切断部位を同定しリガンド応答に

TLR3Nが必要なことを明らかにした。さらに PaT3 の処置でマクロファージの TLR3 応答が増強したことから PaT3 がアジュバントとしての機能を持つ可能性があることを示唆した。これらの結果は TLR3 応答の分子基盤の解明に貢献をなすと考えられ学位の授与に値するものと考えられる。