

|             |                                                                                                                                      |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名         | たか はし けん<br>高 橋 健                                                                                                                    |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (医 学)                                                                                                                            |
| 学 位 記 番 号   | 医 博 第 3082 号                                                                                                                         |
| 学位授与の日付     | 平 成 19 年 3 月 23 日                                                                                                                    |
| 学位授与の要件     | 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当                                                                                                              |
| 研 究 科 ・ 専 攻 | 医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻                                                                                                                  |
| 学位論文題目      | Roles of Caspase-8 and Caspase-10 in Innate Immune Responses to Double-Stranded RNA<br>(二重鎖 RNA に対する自然免疫反応におけるカスパーゼ 8 とカスパーゼ 10 の役割) |
| 論文調査委員      | (主 査)<br>教 授 生 田 宏 一      教 授 湊      長 博      教 授 坂 口 志 文                                                                            |

### 論 文 内 容 の 要 旨

ウイルス感染において自然免疫は重要な役割を担っている。すなわち、ウイルスが宿主に感染すると、IRF ファミリーや NF- $\kappa$ B などの転写因子が活性化し、主に前者により I 型 IFN が、後者により炎症性サイトカインが誘導され、ウイルスは迅速に排除される。近年、RNA ヘリカーゼの一種である RIG-I や Mda5 が細胞内で複製するウイルスのセンサーの役割を果たし、この自然免疫による抗ウイルス反応の引き金を引くことが明らかとなった。

最近になり、RIG-I や Mda5 直下のアダプターである IPS-1 が発見され、IPS-1 が IRF ファミリーや NF- $\kappa$ B などの転写因子の活性化、そして I 型 IFN や炎症性サイトカインの誘導に中心的役割を担うことが明らかとなった。一方、これまでアポトーシス関連分子とされてきた FADD がこのウイルス感染における自然免疫機構に関与しているという報告がなされていたがその機序は不明であった。

FADD 欠損マウス由来胎児線維芽細胞を、二重鎖 RNA で刺激してウイルス感染を模倣すると、I 型 IFN や炎症性サイトカインの誘導がともに障害された。また、この細胞に IPS-1 を強制発現させると IPS-1 による IFN プロモーター活性化と NF- $\kappa$ B の活性化がともに障害された。これらのことから、FADD が IPS-1 の下流に位置する分子であり、二重鎖 RNA 刺激による IRF ファミリーや NF- $\kappa$ B などの転写因子の活性化に、しいては I 型 IFN や炎症性サイトカインの誘導に必須の分子であることが明らかとなった。

さらに、FADD を用いて酵母ツーハイブリッド法を行い、FADD と相互作用する分子としてカスパーゼ 10 を同定した。カスパーゼ 10 はアポトーシス関連分子であるカスパーゼ 8 と高い相同性を持つシステインプロテアーゼであり、両者は各種のアポトーシス刺激により自己切断されアポトーシスを引き起こすことが知られている。しかし、カスパーゼ 10 とカスパーゼ 8 の自然免疫における役割は不明であったため、次にこれに関して検討を行った。

免疫沈降実験によりカスパーゼ 10 とカスパーゼ 8 が FADD と相互作用を示すことを確認した。また、これらのカスパーゼは二重鎖 RNA 刺激により自己切断され、全長型のカスパーゼ 10 やカスパーゼ 8 では NF- $\kappa$ B の活性化は見られなかったが、切断型の分子では強い NF- $\kappa$ B の活性化能を示した。一方、IFN プロモーターに関しては、全長型、切断型ともにプロモーター活性は認めなかった。

次に、siRNA によりカスパーゼ 10 とカスパーゼ 8 をノックダウンし二重鎖 RNA で刺激すると、炎症性サイトカインの誘導のみ障害され、I 型 IFN の誘導は障害されなかった。カスパーゼ 10 はヒトのみに存在するため、カスパーゼ 8 欠損マウス由来胎児線維芽細胞を用いて二重鎖 RNA で刺激すると、siRNA の実験の場合と同様、炎症性サイトカインの誘導は障害されたが I 型 IFN の誘導は障害されなかった。このカスパーゼ 8 欠損細胞に IPS-1 を強制発現させると IPS-1 による NF- $\kappa$ B の活性化は障害されたが、IFN プロモーターの活性化は障害されなかった。

以上のことから、カスパーゼ 10 とカスパーゼ 8 は IPS-1 と FADD の下流分子であるが、FADD の場合と異なり、二重鎖 RNA 刺激に対する I 型 IFN の誘導には関わっておらず、NF- $\kappa$ B の活性化を通じての炎症性サイトカインの誘導に選択

的に関与していることが明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨

ウイルス感染において自然免疫は重要な役割を担っている。近年発見された RIG-I や Mda5 は、宿主細胞内でのウイルス認識受容体の役割を果たし、この RIG-I/Mda5 依存的経路が活性化することによって、ウイルスに対する自然免疫応答が惹起される。

本学位授与申請者は、これまで不明であったこの RIG-I/Mda5 依存的経路のシグナル伝達機構の解明をテーマに研究を行った。その結果、RIG-I と Mda5 の下流のアダプターとして IPS-1 を同定し、IPS-1 がこの RIG-I/Mda5 依存的経路の中心的分子であり、IRF3 や NF- $\kappa$ B などの転写因子の活性化を通じて I 型 IFN や炎症性サイトカインを誘導し、強力な抗ウイルス作用を発揮することを明らかにした。さらに、申請者はこの IPS-1 下流のシグナル伝達機構の解明を行い、アポトーシス関連分子として知られる FADD が IPS-1 による IRF3 活性化と NF- $\kappa$ B 活性化の両者に関与していることを明らかにした。また、FADD と相互作用を示す Caspase-8 と Caspase-10 もこの IPS-1 依存的経路のシグナル分子であり、この両者が FADD の下流で IPS-1 による NF- $\kappa$ B の活性化に特異的に関与していることを明らかにした。

以上の研究はウイルス感染における自然免疫機構の解明に貢献し、将来的にはウイルス感染症の新たな治療法の開発に寄与することが期待される。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成19年1月29日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。