



Title	Role of TANK-Binding Kinase 1 and Inducible I $\kappa$ B Kinase in IFN Responses against Viruses in Innate Immune Cells
Author(s)	松井, 孝介
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47457">https://hdl.handle.net/11094/47457</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	まついこうすけ 松井孝介
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第20922号
学位授与年月日	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 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Role of TANK-Binding Kinase 1 and Inducible I $\kappa$ B Kinase in IFN Responses against Viruses in Innate Immune Cells (ウイルス感染時のインターフェロン応答における TBK1、IKK-i の役割)
論文審査委員	(主査) 教授 審良 静男  (副査) 教授 菊谷 仁 教授 松浦 善治

### 論文内容の要旨

#### [ 目的 ]

ウイルス感染に対し細胞は I 型インターフェロン (IFN) や炎症性サイトカインを産生することで感染防御を行っている。近年、自然免疫系が感染したウイルスに特異的な構造である、核酸やタンパク質を認識し IFN 産生につながっていることが明らかとなってきた。RNA ウイルス核酸の認識には Toll-like receptor (TLR) 及び、細胞質内の受容体である RIG-I と MDA5 が関わるということが明らかとなっている。TLR3 は TRIF、RIG-I/MDA5 は IPS-1 というアダプターを介して細胞内にシグナルを伝達する。

TANK-binding kinase 1 (TBK1、T2Kとも呼ばれる) 及び inducible I $\kappa$ B kinase (IKK-i、IKK $\epsilon$ とも呼ばれる) といった2つの kinase は IFN-regulatory factor (IRF) 3、及び IRF7 をリン酸化し、これらのリン酸化された転写因子は IFN 誘導遺伝子群の転写を活性化する。これまで、遺伝子欠損マウスを用いた解析から TBK1 欠損マウスが胎生致死であり、胎児線維芽細胞 (MEF) において TBK1 が TLR 刺激に対する IFN 産生に重要な役割を果たしている事が明らかとなっていた。また、IKK-i 欠損マウスは IFN 産生に異常を認めなかった。TBK1 欠損マウスは TNF シグナルの無い状況下では、成体のマウスを得ることが出来る。成体より得られたマクロファージ等の免疫担当細胞においては、TBK1 欠損マウス由来の細胞でも RNA ウイルス感染に対する IFN 産生を認めた。

この2つの kinase の免疫細胞での機能は未だ解析されていなかった。そこで TBK1、IKK-i、TNF を三重に欠損するマウスを作製し、免疫細胞での IFN 産生に対する役割を検討した。

#### [ 方法ならびに成績 ]

TNF/TBK1 の2重欠損 (TNF<sup>-/-</sup>TBK1<sup>-/-</sup>) マウスは成体を得ることが出来たが、TNF<sup>-/-</sup>TBK1<sup>-/-</sup>IKKi<sup>-/-</sup> マウス (以下すべて TNF<sup>-/-</sup> バックグラウンドのため TNF<sup>-/-</sup> は未記入) は胎生 13.5 日頃に致死であり、成体を得ることが出来なかった。そこで、胎齢 13.5 日の胎児より得られた肝細胞を GM-CSF、M-CSF または Flt3L を用いて自然免疫細胞を誘導した。GM-CSF、M-CSF により誘導された Conventional 樹状細胞 (cDC)、マクロファージや、Flt3L により誘導された plasmacytoid DC (pDC) の細胞表面マーカーの発現には遺伝子欠損細胞間で差を認めなか

った。

まず、cDCのTLRリガンド刺激やNew Castle Disease Virus (NDV)感染に対するIFN誘導遺伝子の発現は野生型、IKK-i<sup>-/-</sup>そしてTBK1<sup>-/-</sup>細胞では認められたのに対し、TBK1<sup>-/-</sup>IKK-i<sup>-/-</sup>細胞では完全に欠如していた。炎症により発現誘導されるKC遺伝子の発現はTBK1<sup>-/-</sup>IKK-i<sup>-/-</sup>細胞でも正常に認めたことからTBK1<sup>-/-</sup>IKK-i<sup>-/-</sup>細胞においてはIFN産生系が特異的に異常を示したものと思われた。

更に、microarrayを用いてcDCのNDV感染に対する遺伝子発現を網羅的に解析すると、様々なIFN誘導遺伝子群の発現が一様に欠如していた。cDCやマクロファージにRIG-I、及びMDA5で認識されるVesicular Stomatitis virus、Influenza virus、Encephalomyocarditis virusなどのRNAウイルスを感染させた時のIFN産生を解析すると、cDC、マクロファージにおいては、TBK1またはIKK-i欠損細胞で確認できたIFN産生がTBK1/IKK-i二重欠損細胞で完全に消失していた。

Flt3Lから誘導したpDCにおいてはTLR9で認識されるCpG-DNA刺激、NDV感染に対しTBK1/IKK-i二重欠損細胞においてもIFN- $\alpha$ 産生を認めた。

#### [ 総括 ]

2重欠損マウスは胎生致死のため、今回の解析では胎児肝細胞より自然免疫細胞を分化誘導し様々なRNAウイルスを感染させることで、これらの細胞のIFN応答におけるTBK1、IKK-iの役割を解析した。

TBK1<sup>-/-</sup>IKK-i<sup>-/-</sup>cDCやマクロファージはRIG-I及びMDA5により認識されるウイルスに対するIFN産生が欠如していたことから、TBK1/IKK-iはRIG-I、MDA5、TLR3によるシグナルすべてに対し、IFN誘導に必須の役割を果たしていることが明らかとなった。

一方、Flt3Lで誘導したpDCではTBK1、IKK-iの有無に関係なくIFN産生を示した。これまでの研究によりpDCにおいてはTLR9からアダプター分子MyD88を介して直接IRF-7が活性化される事が明らかとなっている。pDCにおいてTBK1/IKK-i非依存性にIFN- $\alpha$ 産生が見られたことは、TBK1/IKK-i経路が細胞特異的に機能していることを示している。

### 論文審査の結果の要旨

TANK-binding kinase 1 (TBK1) と Inducible I $\kappa$ B kinase (IKK-i) はI型インターフェロン (IFN) の産生をIFN-regulatory factor-3/7をリン酸化することにより制御している。胎児線維芽細胞を用いた解析からTBK1がToll-like receptorリガンドやウイルス感染に対するIFN反応に重要な役割を果たすことが知られていたが、免疫細胞における役割は解析されていなかった。そこで、胎児肝細胞よりマクロファージや樹状細胞など自然免疫細胞に誘導しさまざまなRNAウイルス感染に対する応答を検討した。するとconventionalな樹状細胞、マクロファージにおいて、TBK1もしくはIKK-iを単独に欠損した細胞では認められたIFNやIFN誘導遺伝子の発現が、TBK1/IKK-i二重欠損細胞では消失していた。一方、Flt3Lで誘導したプラズマサイト様樹状細胞ではTBK1、IKK-iの有無に関係なくIFNを産生した。このように本研究は、TBK1、IKK-iを介したシグナルがconventional樹状細胞、マクロファージで必須の役割を示す事、プラズマサイト様樹状細胞では他の機構が重要であり、細胞特異的に機能することを新たに証明した。従って本研究は学位の授与に値すると考えられる。