

## 論文内容要旨

### 論文題目

口腔粘膜細胞における単純ヘルペスウイルス由来 DNA の認識機構

学位申請者 鳴瀬 貴子

DNA ウイルスに分類される単純ヘルペスウイルス (HSV) は口腔粘膜へ感染し、水疱、びらんなどの臨床症状を惹起するが、HSV 感染に対して、口腔粘膜細胞は何らかの初期免疫応答を行っていることが考えられる。申請者らは口腔粘膜細胞に発現している核酸受容体 RIG-I がウイルス由来 dsRNA を認識し、I 型 IFN の発現を誘導することで、抗ウイルス初期免疫応答を行っていることを報告してきた。しかし、口腔粘膜細胞におけるウイルス由来 DNA 認識機構については不明であった。

本研究で申請者は口腔粘膜における HSV 由来 DNA 認識および初期免疫応答機構を明らかにするため、不死化口腔粘膜上皮細胞 (RT7)、歯肉線維芽細胞 (GT1) に HSV 由来 double strand DNA (HSV dsDNA) を導入する実験系を用い、以下に示した結果を得た。

1. RT7, GT1 において、HSV dsDNA 細胞内導入はケモカイン CXCL10 の著しい発現を誘導した。
2. 両細胞において NF- $\kappa$ B 阻害剤(Bay11-7082)処理は HSV dsDNA で誘導される CXCL10 産生を抑制した。
3. HSV dsDNA の導入は I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化亢進と NF- $\kappa$ B の核移行を誘導した。  
以上より HSV dsDNA の細胞内導入に応答した CXCL10 の産生に NF- $\kappa$ B 活性化が関与することが判明した。
4. 新規 DNA 受容体 IFI-16 はウイルス由来 DNA を認識することが近年報告されているため IFI-16 の発現と細胞内局在を RIG-I と共に検討した結果、両細胞において RIG-I は細胞質に IFI-16 は核に局在していた。
5. 両細胞の全蛋白から HSV dsDNA に対する親和性分子を DNA pull-down アッセイで精製した結果、RIG-I と IFI-16 は共に親和性を持つことが判明した。
6. 両細胞において RIG-I ノックダウンは CXCL10 の誘導を抑制したが、IFI-16 ノックダウンは GT1 でのみ CXCL10 の誘導を阻害した。
7. 核に局在する IFI-16 が細胞質内 HSV dsDNA 応答性 CXCL10 産生に関与することは予想外であったが、興味深いことに GT1 において HSV dsDNA を導入に応答して IFI-16 が核から細胞質に移行することが判明した。一方 RT7 にはこの IFI-16 の細胞質移行が認められなかった。
8. 両細胞共に TNF- $\alpha$  単独処理での CXCL10 産生は HSV dsDNA 単独による CXCL10 産生と変わらなかったが、TNF- $\alpha$  存在下における HSV dsDNA 導入は、HSV dsDNA 単独による

CXCL10 の産生を著明に亢進した。

9. RT7における IFI-16 のノックダウンは HSV dsDNA 単独処理における CXCL10 産生は阻害しなかったが TNF- $\alpha$  存在下での HSV dsDNA 応答性 CXCL10 産生においては顕著な抑制効果を発揮した。

10. HSV dsDNA 応答性の CXCL10 誘導には NF- $\kappa$ B 活性化が必要である。強力な NF- $\kappa$ B 活性化因子である TNF- $\alpha$  の NF- $\kappa$ B 活性化による HSV dsDNA 応答の模倣を試みるため、TNF- $\alpha$  による細胞内受容体の発現誘導を検討した結果、TNF- $\alpha$  処理は両細胞の RIG-I の発現を誘導した。一方、TNF- $\alpha$  の添加は IFI-16 の発現に影響を及ぼさなかったが、GT1 のみに認められた HSV dsDNA 応答性の IFI-16 細胞質移行を RT7 に付与することが判明した。

以上の結果より、以下の点が明らかとなった。1) 口腔粘膜上皮細胞、線維芽細胞における HSV dsDNA の細胞内導入は NF- $\kappa$ B の活性化を經由し CXCL10 の発現を誘導する。2) 両細胞の RIG-I による HSV dsDNA の認識がその応答に関与する。3) 歯肉線維芽細胞において核局在 IFI16 は細胞質に移行し、HSV dsDNA の認識および CXCL10 発現誘導に参加する。4) 口腔粘膜上皮細胞においても TNF- $\alpha$  存在下では HSV dsDNA 依存的 IFI-16 の細胞質移行が達成され、HSV dsDNA 誘導性の CXCL10 産生亢進が達成される。

これらの発見より、口腔粘膜細胞の細胞内核酸受容体のウイルス由来 dsDNA の認識を介した初期免疫応答は炎症環境下における外的 TNF- $\alpha$  が共存すれば受容体の発現レベル、あるいは細胞内局在をチューニングし、口腔粘膜の DNA ウイルスに対する応答の促進に寄与する可能性が示唆された。