

受賞対象論文

Kajita A, Morizane S, Takiguchi T, Yamamoto T, Yamada M, Iwatsuki K : Interferon-Gamma Enhances TLR3 Expression and Anti-Viral Activity in Keratinocytes. *J Invest Dermatol* (2015) 135, 2005-2011.

梶 田 藍
Ai Kajita

岡山大学病院 皮膚科

Department of Dermatology, Okayama University Hospital



<プロフィール>

昭和57年生まれ
 平成19年3月 山口大学医学部医学科卒業
 平成19年4月 国立病院機構岡山医療センター 研修医
 平成21年4月 岡山大学病院 皮膚科
 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程入学
 平成24年5月 川崎医科大学附属川崎病院 皮膚科
 平成24年10月 倉敷第一病院 皮膚科
 平成27年7月 岡山大学病院 皮膚科
 平成27年9月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程修了
 現在に至る

研究の背景と経緯

Toll-like receptors (TLRs) は pattern-recognition receptors の一つとして知られており、特定の病原微生物の産物を認識し、免疫応答を誘導する働きがある。現在ヒトでは10種類の TLRs が報告されている¹⁾。の中でも TLR3は二重鎖 RNA のセンサーであり、ウイルス感染において重要な役割を担っていると考えられている²⁾。

以前我々は TLR3の発現が単純ヘルペスウイルス (HSV) に感染した表皮角化細胞で増強していることを確認している³⁾。HSV 1型 (HSV-1) は二重鎖 DNA ウイルスであり、感染細胞で二重鎖 RNA を產生する⁴⁾。TLR3は中枢神経系において HSV-1 に対する自然免疫応答において重要な役割を担っていることがすでに報告されている⁵⁾。そこで我々は、単純疱疹のようなウイルス感染時の表皮角化細胞での TLR3の発現制御機構に着目した。

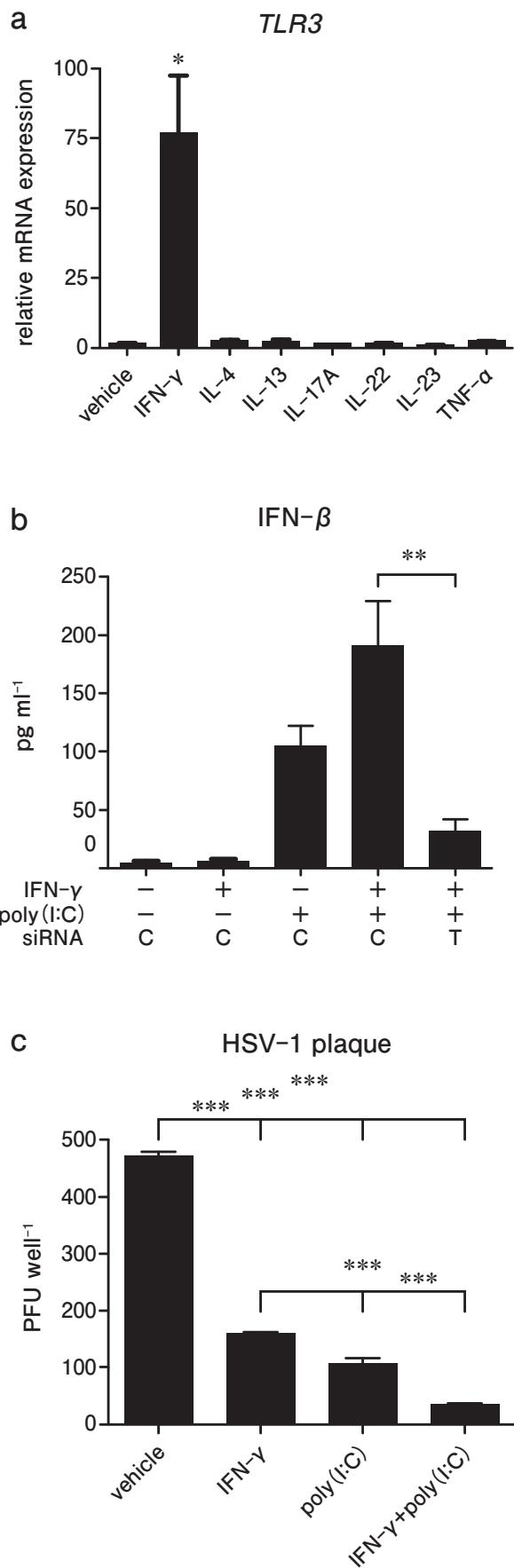
CD4陽性T細胞がCD8陽性T細胞と同様にヘルペスウイルス感染時の水疱形成に関与していることはすでに報告されている⁶⁾。Th1ならびにTh17細胞がHSV 感染時に特に重要な役割を担うことも報告されている⁷⁾。しかし表皮角化細胞における Th1ならびに Th17サイトカインの TLR3への影響は十分には解明されていな

い。そこで今回我々は表皮角化細胞において Th1サイトカインである IFN- γ が TLR3の発現を誘導し抗ウイルス活性を増強しているかについて検討した。

研究成果の内容

1. Th1サイトカインである IFN- γ は表皮角化細胞において TLR3の発現を増強する

我々は正常ヒト表皮角化細胞 (NHEKs) を炎症性サイトカインで刺激し、どの炎症性サイトカインが TLR3の発現を増強しているかについて調べた。Th1サイトカインである IFN- γ が TLR3mRNA の発現を顕著に増強していたのに対し、Th2サイトカインである IL-4 や IL-13、Th17サイトカインである IL-17、IL-22、IL-23は TLR3の発現を増強しなかった (図 a)。タンパク質レベルでも同様の結果がみられた。IFN- γ は0.1から100ng/mlの間では容量依存性に TLR3mRNA の発現を増強させた。IFN- γ 添加後48時間後に TLR3mRNA の発現のピークがみられた。IFN- γ はシグナル伝達兼転写活性化因子 (STAT1) を活性化することが知られている。我々は TLR3の発現が STAT1依存性であるかどうかを調べた。siRNA によって STAT1をノックダウンさせると TLR3の発現が著明に抑制された。



2. 表皮角化細胞において IFN- γ と poly (I : C) は相乗的に IFN- β , IL-6, IL-8 及び HBD-2 の発現を増強する

表皮角化細胞での TLR3 の機能を評価するために, TLR3 のリガンドである poly (I : C) 存在下において, I 型インターフェロンである IFN- β , 炎症性サイトカインである IL-6, ケモカインの IL-8, 抗菌ペプチドの HBD-2 の mRNA が増加するかを調べた. poly (I : C) 単独でも mRNA は増加しているが, IFN- γ 存在下では著明に増加した. ELISA 法を行い, タンパク質レベルにおいても同様であることを確認した.

3. 表皮角化細胞において IFN- γ と poly (I : C) の相乗効果による IFN- β の誘導は TLR3 を介している

我々は次に表皮角化細胞において IFN- γ と poly (I : C) の相乗効果は TLR3 を介しているかどうかを調べた. IFN- γ と poly (I : C) によって誘導された IFN- β は, endosomal acidification inhibitor であり, エンドソームでの TLR のシグナルをブロックするクロロキンによって顕著に抑制された. さらに, siRNA を用いて IFN- β の誘導に TLR3 が必要かどうかを調べた. TLR3 siRNA により, IFN- γ と poly (I : C) 存在下での IFN- β タンパク質の発現は著明に抑制された (図 b).

4. 表皮角化細胞において IFN- γ は poly (I : C) に誘導された抗ウイルス活性を増強する

poly (I : C) によって誘導された TLR3 のシグナルは表皮角化細胞での抗ウイルス活性を増強することが報告されている⁸. 我々は HSV-1 に感染した表皮角化細胞に IFN- γ と poly (I : C) の共刺激を加えるとウイルスの増殖に影響を及ぼすかを調べた. IFN- γ 単独を加えるとウイルスの増殖は抑制されたが, IFN- β の発現には影響を及ぼさなかった. しかし IFN- γ と poly (I : C) の共刺激では, それぞれ単独に刺激を加えた場合と比較して著明にウイルスのplaques数は減少し

図 a : 正常ヒト表皮角化細胞 (NHEKs) を炎症性サイトカインで刺激し, mRNA を回収, TLR3 の発現をリアルタイム PCR で評価した. b : NHEKs に control siRNA と TLR3 siRNA を導入し, IFN- γ , poly (I : C) で刺激した. 培養上清を回収し, ELISA で IFN- β の濃度を測定した. c : NHEKs を IFN- γ , poly (I : C) で刺激し, HSV-1 と共培養し感染させた. クリスタルバイオレットを用いてウイルスのplaques数を測定した.
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. C, control siRNA ; T, TLR3 siRNA. (転載許可を得て受賞論文より引用)

ていた(図c).

5. ヘルペスウイルスによる水疱周囲では IFN- γ を產生する細胞が増殖している

我々の *in vitro* の実験で、経皮的にウイルスに感染した際、IFN- γ は自然免疫機構に影響を及ぼすことが示唆された。次に我々はヘルペスウイルスに感染した病変では IFN- γ が產生されているかどうかを調べた。免疫染色を行うとヘルペスウイルスによる水疱周囲で IFN- γ 陽性のリンパ球が確認された。

研究成果の意義、今後の展開や展望

IFN- γ は20kDaのII型インターフェロンであり、T細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、樹状細胞、B細胞など様々な細胞から分泌されるが、特にTh1細胞から分泌される⁹⁾。IFN- γ は免疫応答を Th1 phenotype へと傾け、自然免疫、特に細胞傷害性免疫やマクロファージの活性化を増強する。IFN- γ は IFN $\text{GR}1$ と IFN $\text{GR}2$ の複合体からなる IFN- γ receptor (IFN GR) に結合する。IFN $\text{GR}1$ subunit は Jak1 に結合し、IFN $\text{GR}2$ は Jak2 に結合する。Jak1 と Jak2 が結合すると STAT1 をリン酸化、活性化し、ホモ二量体を形成する。STAT1 ホモ二量体は核内へ移行し、promoter IFN- γ -activation site elements に結合し、IFN- γ regulate gene の転写を促進または抑制する¹⁰⁾。今回我々は NHEKs においては IFN- γ による TLR3 の発現は STAT1 に依存することを発見した。しかし、STAT1 が直接 TLR3 遺伝子のプロモーター領域に結合するかどうか、また何らかの IFN- γ regulated molecule が二次的に TLR3 の発現を誘導するかどうか、さらなる研究が必要である。

次に、NHEKs において IFN- γ と poly (I : C) は相乗的にサイトカインや抗菌ペプチドの発現を増強することを発見した。また、IFN- γ と poly (I : C) による IFN- β の誘導が TLR3 を介していることも発見した。以前我々のグループは、抗菌ペプチド、Cathelicidin/LL-37 は TLR9 の発現と機能を増強することを報告している¹¹⁾。今回の発見も同様に相乗効果が TLR3 の発現と機能を増強していることを示している可能性が考えられる。

さらに NHEKs での共刺激による抗ウイルス活性についても着目した。今回は NHEKs においては IFN- γ が TLR3 の発現を増強するという結果になった。IFN- γ

単独、IFN- β 、いくつかの抗菌ペプチドは抗ウイルス活性を持っていることが報告されている¹²⁾。NHEKs では、IFN- β が抗ウイルス活性を持つ最も重要な因子であると報告しているものもある¹³⁾。今回は IFN- γ 単独で IFN- β の発現を直接増強していることは示せなかつたが、共刺激によって抗ウイルス活性を増強する現象は、TLR3 を介して IFN- β の発現が増強することによると考えられる。しかし技術的な問題もあり、今回我々は抗ウイルス活性の増強と IFN- β の関連について何らかの結果を示すことができなかつた。さらなる研究が必要である。

単純疱疹の水疱の表皮角化細胞では、IFN- γ により誘発された主要組織適合抗原複合体 (MHC) class II が浸潤している。CD4陽性T細胞より分泌され、水疱周囲で多くみられることが報告されている¹⁴⁾。今回我々は単純疱疹の水疱周囲にリンパ球の形態を呈する IFN- γ 産生細胞が浸潤していることを確認した。以前我々のグループで単純疱疹の水疱周囲では CD3 陽性細胞、CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞が存在していること、CD20 陽性細胞や CD56 陽性細胞は確認されないと報告している¹⁵⁾。以上より、IFN- γ 産生細胞は CD4 陽性 Th1 細胞または CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞であると考えられる。

ウイルス感染における TLR3 の重要性と関連して、Th1 サイトカイン IFN- γ は HSV 感染のような経皮的ウイルス感染において自然免疫で重要な役割を果たしていることが示唆される。自然免疫が獲得免疫を誘導することはよく知られているが、ウイルス感染において、抗ウイルス活性のポジティブフィードバックループとして Th1 優位の獲得免疫応答が自然免疫応答を増強している可能性が示唆される。

TLR3 シグナリングのさらなる研究が進むことで、HSV 感染症に対する新たな治療法を拓く可能性がある。

文 献

- 1) Akira S, Takeda K, Kaisho T : Toll-like receptors : critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* (2001) 2, 675-680.
- 2) Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA : Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* (2001) 413, 732-738.
- 3) Takiguchi T, Morizane S, Yamamoto T, Kajita A, Ikeda K, Iwatsuki K : Cathelicidin antimicrobial peptide LL-37

- augments IFN-beta expression and anti-viral activity induced by double-stranded RNA in keratinocytes. *Br J Dermatol* (2014) 171, 492-498.
- 4) Jacobs BL, Langland JO : When two strands are better than one : the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology* (1996) 219, 339-349.
 - 5) Casrouge A, Zhang SY, Eidenschenk C, Jouanguy E, Puel A, Yang K, Alcais A, Picard C, Mahfoufi N, Nicolas N, Lorenzo L, Plancoulaine S, et al. : Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science* (2006) 314, 308-312.
 - 6) Morizane S, Suzuki D, Tsuji K, Oono T, Iwatsuki K : The role of CD4 and CD8 cytotoxic T lymphocytes in the formation of viral vesicles. *Br J Dermatol* (2005) 153, 981-986.
 - 7) Sloan DD, Jerome KR : Herpes simplex virus remodels T-cell receptor signaling, resulting in p38-dependent selective synthesis of interleukin-10. *J Virol* (2007) 81, 12504-12514.
 - 8) Kalali BN, Kollisch G, Mages J, Muller T, Bauer S, Wagner H, Ring J, Lang R, Mempel M, Ollert M : Double-stranded RNA induces an antiviral defense status in epidermal keratinocytes through TLR3-, PKR-, and MDA5/RIG-I-mediated differential signaling. *J Immunol* (2008) 181, 2694-2704.
 - 9) Meyer O : Interferons and autoimmune disorders. *Joint Bone Spine* (2009) 76, 464-473.
 - 10) Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA : Interferon-gamma : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* (2004) 75, 163-189.
 - 11) Morizane S, Yamasaki K, Muhleisen B, Kotol PF, Murakami M, Aoyama Y, Iwatsuki K, Hata T, Gallo RL : Cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 in psoriasis enables keratinocyte reactivity against TLR9 ligands. *J Invest Dermatol* (2012) 132, 135-143.
 - 12) Wilson SS, Wiens ME, Smith JG : Antiviral mechanisms of human defensins. *J Molecular Biol* (2013) 425, 4965-4980.
 - 13) Fujisawa H, Kondo S, Wang B, Shivji GM, Sauder DN : The expression and modulation of IFN-alpha and IFN-beta in human keratinocytes. *J Interferon Cytokine Res* (1997) 17, 721-725.
 - 14) Cunningham AL, Merigan TC : gamma Interferon production appears to predict time of recurrence of herpes labialis. *J Immunol* (1983) 130, 2397-2400.
 - 15) Morizane S, Suzuki D, Tsuji K, Oono T, Iwatsuki K : The role of CD4 and CD8 cytotoxic T lymphocytes in the formation of viral vesicles. *Br J Dermatol* (2005) 153, 981-986.

平成28年5月受理

〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

電話 : 086-235-7282 FAX : 086-235-7283

E-mail : gmd421029@s.okayama-u.ac.jp