

## [課程一 2]

## 審査の結果の要旨

氏名 前村 忠

本研究は、インフルエンザウイルス感染時に肺から放出されるエクソソーム内の microRNA(miRNA)の機能を明らかにするため、気管支肺胞洗浄液(BALF)中のエクソソームに着目して解析を行い、下記の結果を得ている。

1. インフルエンザウイルス(PR8 株)感染マウスから継時的に気管支肺胞洗浄液(BALF)を採取しエクソソームのマーカー蛋白質である CD63 と CD9 の発現量を western blot. で解析した結果、経時的に発現が増加したため、PR8 株感染時に BALF エクソソームが増加することが示された。
2. PR8 株を感染させたマウスの BALF エクソソーム内 miRNA のプロファイルをマイクロアレイにて解析した結果、感染後経時的にエクソソーム内に誘導される miRNA の種類が増加すること、さらに PR8 株感染マウスと poly(I:C)を経鼻接種したマウスの BALF エクソソーム内には共通の miRNA が存在していることが示されたことから、インフルエンザウイルス感染時の BALF エクソソーム内 miRNA は自然免疫応答に関与する可能性が示唆された。
3. マイクロアレイの結果から選抜した miRNA について、マウス II 型肺胞上皮細胞(MLE12)で機能解析を行った結果、miR-483-3p、miR-374c-5p、miR-466i-5p を導入した細胞でウイルス感染時の IFN- $\beta$  遺伝子や炎症性サイトカイン遺伝子の発現が有意に増加することが示された。
4. miR-483-3p は、PR8 株のみならず季節性のインフルエンザウイルス株である A(H1N1)pdm09、鳥インフルエンザウイルスである H7N9、H5N1 亜型のウイルスを感染させたマウスの BALF エクソソームにも多く存在しており、BALF エクソソーム内への miR-483-3p の誘導はインフルエンザウイルス感染時の宿主応答として保存されたメカニズムであることが示された。
5. miR-483-3p を導入した MLE12 では転写因子である IRF3 と NF- $\kappa$ B の核移行が促進しており、さらに RIG-I like receptors を介するシグナル伝達に重要な分子である MAVS をノックダウンした細胞では miR-483-3p による IFN- $\beta$  発現増加が認められないことから miR-483-3p は RIG-I シグナル経路依存的に機能していることが示された。
6. miR-483-3p を導入した MLE12 での遺伝子発現マイクロアレイ解析により、miR-483-3p の標的遺伝子として RIG-I シグナル経路の負の制御因子である RNF5 を見

出した。miR-483-3p 導入細胞で RNF5 は蛋白質レベルで発現が低下しており、さらに 3'UTR ルシフェラーゼレポーターアッセイの結果、配列特異的に miR-483-3p により制御されていることが示されたが、RNF5 をノックダウンした MLE12 では IFN- $\beta$  遺伝子の発現増加は認められなかった。一方で RNF5 を過剰発現させた細胞では IFN- $\beta$  遺伝子の発現低下が認められた。

7. マイクロアレイの結果をもとに IFN- $\beta$  遺伝子の発現を増加させる遺伝子のスクリーニングを行った結果、RNF5 に加えて、miR-483-3p の標的遺伝子、さらに RIG-I シグナル経路の負の制御因子として CD81 を見出した。CD81 をノックダウンした MLE12 では IFN- $\beta$  遺伝子の発現増加を認めた。miR-483-3p 導入 MLE12 で CD81 は蛋白質レベルで発現が低下しており、さらに 3'UTR ルシフェラーゼレポーターアッセイの結果、配列特異的に miR-483-3p により制御されていることが示された。
8. 高病原性鳥インフルエンザウイルスである H5N1 亜型のウイルスを感染させたマウスの血清中エクソソームでは miR-483-3p が有意に多く存在していることが示された。miR-483-3p はエクソソームを介して移行したマウス血管内皮細胞(MS1)においても、炎症性サイトカイン遺伝子の発現を増加させた。

以上、本論文はインフルエンザウイルス感染時に肺より放出されるエクソソーム内に存在する miRNA の有する自然免疫活性化機構を明らかにした。本研究は、これまで不明であったインフルエンザウイルス感染時の肺由来エクソソームの機能の解析に寄与すると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。