

[別紙 1]

論 文 の 内 容 の 要 旨

論文題目 表皮ランゲルハンス細胞における

Toll-like Receptor の発現および機能解析について

指導教官 玉置 邦彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 三井 浩

免疫機構は生体の生存に不可欠なホメオスターシス機構である。その中で特に重要なのは感染免疫である。これまでは主に T 細胞や B 細胞を中心とした、リンパ球の遺伝子再構成によって多種多様な抗原を特異的に認識する獲得免疫 (acquired immunity) の研究に重点が置かれてきた。しかしながら、生体は常にさまざまな病原体にさらされており、しばしばその侵入に対して速やかな認識、排除の機構が必要となる。このような免疫機構は自然免疫 (innate immunity) とよばれ、宿主免疫担当細胞と病原体との直接の作用より機能するため、非常に短時間で病原体の認識と反応が起こる。また、自然免疫はショウジョウバエなどの下等動物にも存在し、直接ゲノムにコードされた機構である。自然免疫を行う細胞は、病原体に共通した分子構造を認識するレセプターを持ち、レセプターからの一次的な刺激によって nuclear factor (NF)- κ B が活性化され、tumor necrosis factor (TNF)- α 、IL-6 などの炎症性サイトカインや NO が産生される。近年、この自然免疫について Toll-like Receptors (TLRs) が中心的な役割を担っていることが分かった。現在までにヒトおよびマウスにおいて TLR1-10 の 10 種類のファミリー構成分子が報告されており、それらに対応するリガンドも明らかになっている。例えば TLR2 はグラム陽性菌の *Staphylococcus aureus* Cowan I (SAC) やペプチドグリカン、TLR3 はウイルスの二

本鎖 RNA、TLR4 はグラム陰性桿菌の lipopolysaccharide (LPS)、TLR7 は imidazoquinoline が合成する imiquimod、TLR9 は細菌の非メチル化 CpG DNA を認識する。また、それぞれのレセプターは各免疫細胞で異なる発現様式を示している。これらの TLR ファミリーは共通して細胞内部分に MyD88 を介するシグナル伝達ドメインを持つ。また、TLR ファミリーには属さないが、TLR4 と同じように LPS を認識するレセプターとして RP105 が知られている。RP105 は細胞内シグナルドメインを有さないという点で TLR ファミリーと異なっている。

皮膚は紫外線や異物・微生物の侵入に対して単に物理的なバリアーとして機能しているだけでなく、ひとつの大きな免疫器官として種々の生物学的役割を演じている。例えばランゲルハンス細胞 (Langerhans cells, LC) は皮膚の最外層を構成する表皮に存在し、強力な抗原提示能を有する DC として皮膚での免疫調節において重要な役割を担っている。LC は通常 immature な状態で表皮に存在し、この状態では抗原を取り込む機能が強い反面、T 細胞への抗原提示能は弱い。しかし細菌やウイルスなどの病原体と接触すると活性化されて mature な状態となり、co-stimulatory molecules (B7-1 および B7-2) や I-A^d の発現が増強する。同時に T 細胞の活性化に必要なサイトカインの産生量も大きく変化し、形態的にも細胞が大型となり樹状突起を伸ばすようになる。単離された直後の LC (fresh LC) は形態的にも機能的にも immature LC に類似し、2-3 日 in vitro で培養した LC (cultured LC) は mature LC に相当する。今までの報告では TLRs への刺激が DC の maturation に大きく影響していることが示されており、一般にヒト DC では TLRs への刺激により IL-12、IP-10 などの Th1 系サイトカインや IL-6 などの炎症性サイトカインの分泌が増強し、TARC など Th2 系サイトカインの分泌は減弱する。さらにヒト DC においては maturation と共に TLR4 の発現が増強することも報告されている。

DC による多様な免疫調節機構は DC の subset / lineage の多様性によって支えられている。例えば、マウスの DC subsets については現在までに少なくとも 5 つの表現型に分類されている。そのうち 3 つのポピュレーション (CD11c⁺CD11b⁺CD4⁻、CD11c⁺CD11b⁺CD4⁺、CD11c⁺CD8 α ⁺CD11b⁻) は脾臓に存在し、残り 2 つのポピュレーション (CD11c⁺CD11b^{lo} CD8 α ⁻CD4⁻、CD11c⁺ langerin⁺) は所属リンパ節、皮

膚などに存在する。近年、第6のポピュレーションとして plasmacytoid DC precursor (CD11c^{int}Gr-1⁺B220⁺) がリンパ組織や血液中に見つかっている。これら6つの subset における TLRs の発現様式は多様であることが分かっている。しかし、他のポピュレーション、例えば LC (CD11c⁺ langerin⁺ E-cadherin⁺) における TLRs の発現様式については検討されていない。また、同一の TLR が異なる2つの DC subset に発現している場合でも、そのレセプターを介する同一刺激に対して異なった反応がみられることも知られている。そこで今回、主に細菌感染を念頭に置いて、LC における TLR2、4、7、9 の発現につき検討を行った。さらに、各リガンドにより細胞に刺激を加え、IL-6、IL-12、IP-10、TARC/CCL17 の産生量の変化についても検討を行った。現在 DC の研究の多くは CD34⁺ 血液幹細胞や単球といった前駆細胞にサイトカイン (GM-CSF や IL-4) を加え、in vitro で DC を誘導する手法を用いている。実際このような方法によって大量の DC を得ることが可能となり、DC の研究は飛躍的に進歩した。しかしこのようにして作成した DC 類似細胞が in vivo での実際の DC と全く同一であるという保証はない。この問題を解決するために、panning 法によりマウス表皮より直接 LC を採取し authentic LC として解析の対象とした。さらに、LC の DC subset の中での位置づけを明確とする目的で、LC と同様に生体内の resident cell である splenic CD11c⁺ DC を脾臓より採取して LC と比較した。LC は上述したポピュレーションのうち CD11c⁺ langerin⁺ に相当し、splenic CD11c⁺ DC は脾臓における3つのポピュレーション (CD11c⁺CD11b⁺CD4⁻、CD11c⁺CD11b⁺CD4⁺、CD11c⁺CD8 α ⁺CD11b⁻) をまとめたものに相当する。

今回の研究で、マウス LC において細菌感染に関わる TLRs の発現と機能を調べることにより次のような結果を得た。

- 1) Fresh LC において TLR2、4、9、RP105 の mRNA の発現が認められたが、TLR7 の発現は認められなかった。
- 2) Fresh LC において TLR2、4、RP105 の蛋白の発現が認められた。
- 3) Cultured LC において TLR4 の発現量を fresh LC と比較したところ、有意差はみられなかった。
- 4) SAC の刺激により LC および DC において IL-6、IL-12p40、IP-10 の産生が

増強した。同刺激により LC では TARC の産生が抑制されたが、DC では変化はみられなかった。

- 5) LPS の刺激により LC および DC において IL-6、IP-10 の産生が増強したが、LC の IL-12p40 は変化なく、TARC の産生は抑制された。また DC では IL-12p40 の産生が抑制されたが TARC の産生には変化はみられなかった。
- 6) CpG の刺激により LC および DC において IL-6、IL-12p40、IP-10 の産生が増強した。LC では TARC の産生が抑制され、DC では変化がみられなかった。
- 7) SAC、LPS、CpG の刺激により LC および DC における I-A^d、B7-1、B7-2 の発現量に変化はみられなかった。

以上から、(1) マウス LC における TLRs の発現様式はマウス splenic DC の一部を構成している CD11c⁺CD11b⁺CD4⁻と最も類似していることから、これに近い lineage に属するものと考えられた。また、(2) マウス LC はヒト LC と同様に、in vitro では免疫反応をおおむね Th1 系へ誘導することを明らかにした。しかし、(3) TLR4 への刺激によりマウス LC における IL-12p40 の産生が増強されず、この反応はヒト LC における反応とは異なっていた。さらに、(4) マウス LC における IL-6 や IL-12 の産生は splenic DC に比べると少なく、TARC の産生は splenic DC に比べ LC で強いことを明らかにした。自然免疫はその性質が子孫へ直接遺伝していくこと、獲得免疫の発動を補完する形で感染初期から機能することを考えると極めて重要なシステムである。その中心となっている TLRs は、さまざまな菌体成分に対して多様な反応性を有しており、さらにそれらが複雑に関係しあっている。これらの機序を解明することで、将来的には人類の様々な疾患に対する予防や治療に結びつくものと期待される。