

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 刈間理介

グラム陰性桿菌感染症においては、菌の外膜の構成成分である LPS が、生体の免疫反応の惹起に中心的な働きをなしていると考えられている。現在、LPS の受容体としては、GPI アンカー型受容体である CD14 と、細胞内ドメインが IL-1 受容体と極めて高いホモロジーをもつ TLR4 の、2 種類の受容体が知られており、このうち TLR4 は MD2 と複合体を形成することで、LPS の刺激を細胞内に伝える機能を担っている。近年、LPS に対する細胞内シグナル伝達の分子機序はめざましく解明されてきたが、細胞膜における LPS およびその受容体の分子機序には依然として多くの不明な点が残されている。特に、LPS が CD14 に結合した後の TLR4 との相互作用の分子機序や、この過程における MD2 の機能に関しては、いまだ明らかにはされていない。本研究では、これらの問題点を解明する目的で、生体試料の分子挙動をリアルタイムに観察することが可能な光学技術であるエバネッセント顕微鏡 (total internal reflection microscope ; TIRFM) を用いて、ヒトマクロファージおよびヒト CD14、TLR4、MD2 を遺伝子導入し発現させた CHO 細胞の細胞膜における Alexa594 蛍光分子で標識した LPS (Alexa594 LPS) の分子挙動の解析をおこない、下記の結果を得ている。

1. 形質導入していない CHO 細胞と、ヒト CD14 を単独で発現した CHO 細胞を用いて、LPS 結合タンパク (LBP) の存在の有無による Alexa594 LPS 投与後の細胞膜における蛍光像を比較することより、LPS は LBP 依存的に細胞表面の CD14 に特異的に結合することを示した。さらに、洗浄処理したスライドガラスに Alexa594 LPS 溶液を滴下し、ガラス面に付着した Alexa594 LPS の輝点を解析することにより、溶液中では Alexa594 LPS は多数の凝集体を形成することを示した。さらに、LPS は細胞膜には凝集体の状態では結合できず、凝集体を形成していない LPS および凝集体から解離した LPS のみが結合することを示した。

2. ヒト末梢血から分離・誘導したマクロファージにおいて、Alexa594 LPS を投与し細胞膜に結合した Alexa594 LPS の輝点の分子挙動を解析することにより、細胞膜に結合した直後の LPS は細胞膜上を自由拡散し、時間依存的に集合体を形成しつつ、細胞膜上での運動速度が低下することが示された。
3. ヒト CD14 のみを単独に発現した CHO 細胞と、ヒト CD14 とヒト TLR4・MD2 を共発現した CHO 細胞を用いて、それぞれの Alexa594 LPS の分子挙動を比較検討することにより、ヒト CD14 とヒト TLR4・MD2 を共発現した細胞では輝度が高く運動速度が遅い輝点の増加を認めたのに対し、CD14 のみを発現した場合には輝度が高い輝点は認めるが、運動速度の低下はきわめて制限されていることを示した。この結果より、CD14 強制発現細胞においては、LPS の集合体形成は TLR4 の存在の有無とは無関係に生じるが、集合体形成したのちに細胞膜上で LPS の運動速度が低下する過程には、TLR4・MD2 複合体との相互作用が強く関与していることが示された。
4. Methyl- β -cyclodextrin (MCD) で脱コレステロール処理を加え細胞膜のリピドラフトを破壊したヒトマクロファージにおける Alexa594 LPS の分子挙動の変化を解析することにより、MCD で前処理したマクロファージでは未処理のマクロファージと比較して、輝度の高い輝点の出現が著明に減少していることを示した。この結果より、マクロファージ細胞膜のリピドラフトが LPS の集合体形成に関与していることが示された。
5. LPS で前処理することにより細胞の LPS 反応性が低下した LPS トレランスの状態にあるヒトマクロファージの細胞膜での Alexa594 LPS の分子挙動には、未処理のマクロファージでの分子挙動との有意な違いは認められず、LPS トレランスが生じる原因は細胞膜における変化によるものではないことが示唆された。

以上、本論文はエバネッセント顕微鏡を用いることにより、生きた細胞の細胞膜における LPS の分子挙動の可視化に初めて成功し、多角的な解析を通して有意義な知見を示している。本研究は、グラム陰性桿菌感染症での生体の免疫応答惹起において中心的な働きをなす LPS の細胞活性化機序の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。