

論文の内容と要旨

論文題目 グラム陰性桿菌のリポ多糖 (LPS) および鞭毛蛋白フラジェリンによる Toll 様受容体からの細胞内シグナル伝達とその機能の解明

指導教官 小池 和彦

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

学生番号 07434

氏名 奥川 周

細菌感染症治療は抗菌薬の開発により、軽症例では容易に治療できるようになった一方で、耐性菌の出現や高齢者、HIV 感染者などの日和見患者の増加により感染症が重篤化し、敗血症による敗血症性ショック、全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome) から死に至ることも

多い。さまざまな治療にもかかわらず、これらに対する有効な治療法は未だ存在しない。敗血症性ショック、全身性炎症反応症候群などの重篤な病態は、細菌の感染力や生体への影響力などの細菌側の要因と、生体における免疫システムの過剰反応やバランスの破綻などの生体側の要因によっても起こると推測される。そのため、細菌感染症時の免疫反応を理解することは、敗血症治療の一助になると考えられる。

生体における免疫システムは主に自然免疫と獲得免疫に分けられ、自然免疫において、マクロファージおよび樹状細胞などの細胞が近年 Toll 様受容体 (Toll-like receptor; TLR) を介して病原体と自己を識別し、免疫応答を行っていることが判明した。例えば、TLR の一つ TLR4 のリガンドがグラム陰性桿菌の細菌リポ多糖 (LPS) であり、グラム陰性桿菌の鞭毛の蛋白であるフラジェリンが TLR5 のリガンドであることが報告されている。TLR はこのような微生物成分を抗原提示細胞からの抗原提示を受けずに直接認識し、免疫反応を起こすという点で、自然免疫において重要な役割を果たしている。そのため、TLR からの細胞内シグナル伝達やその機能を理解することは、細菌性敗血症の病態を理解する上で極めて重要であると考えられる。そこで、本研究では日常の診療でよく遭遇するグラム陰性桿菌の敗血症の病態を解明する目的で、LPS をリガンドとする TLR4 と、フラジェリンをリガンドとする TLR5 に着目し、これら TLR の細胞内シグナル伝達と機能について検討した。

TLR4 シグナル伝達では、チロシンキナーゼの働きについて主に検討した。TLR はいずれもリガンドからの刺激を受けると、アダプター蛋白である MyD88 と受容体が結合し、IRAK などのセリンスレオニンキナーゼが活性化され、MAPK および NF- κ B などが活性化することが既に報告され、その他、TIRAP/Mal などの MyD88 を介さないシグナル伝達系も発見されている。また、LPS 刺激ではチロシンキナーゼ (PTK) のうち Src ファミリーキナーゼ (Hck、Lyn) や Janus キナーゼ (Jak) ファミリーの Jak2 もシグナル伝達に関与していることが報告されているが、これらの PTK がシグナルを下流にどのように伝達し、炎症性サイトカインの産生に至る分子機序についてはほとんど解明されていなかった。

そこで、私は PTK の一つである Jak2 に注目し、マウスマクロファージ様細胞系細胞株 RAW264.7 細胞を用い、LPS 刺激による TLR4 細胞内シグナル伝達における Jak2 の機能を解明する実験を行った。

本実験の最初に、市販されている LPS には TLR2 のアゴニストが混入している可能性が報告されているため、TLR2 のアゴニストを除去する目的で既報のフェノール抽出法を用い LPS 再精製を行った。この再精製 LPS が TLR2 を遺伝子導入した HEK293 細胞において、NF- κ B を活性化させないことをまず確認し、この再精製 LPS を用い一連の実験を行った。

LPS 刺激による炎症性サイトカイン産生に重要であると報告されている 3 つの MAPK、ERK (extracellular-signal-related kinase)、p38、JNK (c-Jun NH₂-terminal protein kinase) の活性化が、RAW 細胞でも認められた。次に、私たちが着目した PTK の一つである Jak2 が LPS 刺激により活性化されることを確認した。この活性化は抗 TLR4 中和抗体により抑制されることから、Jak2 は TLR4 を介して活性化されることが証明された。

次に Jak2 と 3 つの MAPK、ERK、p38、JNK との関連を検討するため、Jak2 阻害薬 AG490 あるいはキナーゼ欠損 Jak2 の遺伝子導入により Jak2 の活性化を抑制したところ、LPS 刺激による ERK のリン酸化には影響を与えないが、p38 と JNK のリン酸化を抑制した。

LPS 刺激で MAPK を制御していることが報告されている PI-3K の活性化を、PI-3K のチロシンリン酸化にて確認した。さらに PI3-K 阻害薬 LY294002 による MAPK への影響を検討したところ、Jak2 活性化抑制実験と同様に PI3-K の活性化抑制により、ERK のリン酸化には変化を認めないが、p38、JNK のリン酸化は抑制された。以上より、Jak2 と PI3-K が TLR4 からの同一のシグナル伝達経路にあることが推測された。Jak キナーゼの主要な機能は STAT 転写因子の活性化であるが、その他にも PI3-K の活性化に直接関与していると推測されている。そこで、LPS 刺激における Jak2 と PI-3K の関連を AG490 処理あるいはキナーゼ欠損 Jak2 を遺伝子導入した細胞を用い実験を行ったところ、Jak2 活性化を低下させると PI3-K のチロシンリン酸化の低下が認められた。また、この反応の際、LPS 刺激後に Jak2 と PI3-K が複合体を形成することも確認した。

マクロファージは LPS 刺激で IL-1 β などの炎症性サイトカインを産生することが知られているが、RAW 細胞でも p38、JNK、PI3-K、Jak2 の各阻害剤により、IL-1 β の産生が用量依存性に抑制され、また、野生型あるいはキナーゼ欠損 Jak2 を遺伝子導入した RAW 細胞でも、IL-1 β の産生がコントロールと比較し、野生型では亢進し、キナーゼ欠損型では抑制された。このように p38、JNK、PI3-K、Jak2 のいずれも IL-1 β 産生に関与していた。

以上より、LPS 刺激による TLR4 シグナル伝達において Jak2 は PI3-K と MAPK の p38、JNK 活性化を制御し、炎症性サイトカイン IL-1 β 産生に関与している。

次に、最近、T 細胞において TLR5 が発現していることが報告されたので、T 細胞性白血病株 Jurakt T 細胞を用いて、TLR5 のシグナル伝達の実験を行った。T 細胞は T 細胞受容体 (TCR) を介した獲得免疫としての役割が主に議論されてきたが、TLR5 を介した自然免疫と獲得免疫との関連についてはまだ解明されていないため、TLR5 の細胞内シグナル伝達と T 細胞受容体の活性化との関連について主に実験を行った。

フラジェリン刺激により、TLR5 自身のチロシンリン酸化、MAPK の p38、JNK の活性化、NF- κ B の活性化を確認した。TCR 刺激により活性化され、IL-2 の産生に参与する NF-AT 転写因子は、TLR5 刺激では活性化されなかった。

さらに、フラジェリンによる TLR5 先行刺激が及ぼす TCR のシグナル伝達への影響を NF-AT 活性を指標に検討したところ、TLR5 先行刺激により TCR 刺激からの NF-AT 活性化がフラジェリン用量依存性に抑制された。

TLR5 先行刺激によって TCR 表面発現に変化は見られなかったが、TCR からのシグナル伝達に重要な役割を果たす PTK の一つ Zap-70 のチロシンリン酸化低下が見られ、細胞内にシグナル伝達抑制の要因があると考えられた。

TLR4 からのシグナル伝達により、サイトカインや成長ホルモンからのシグナルの抑制に働く SOCS-1 が誘導されること、SOCS-1 が欠損した T 細胞では TCR 刺激への反応性が亢進することが既に報告されている。このことは SOCS-1 が TCR シグナル伝達を抑制している可能性を示唆しているため、まず TLR5 刺激における SOCS-1 の誘導を検討したところ、フラジェリン刺激後 SOCS-1 の mRNA の発現の亢進を確認した。次に、SOCS-1 発現ベクターを細胞内遺伝子導入したところ、TCR 刺激による NF-AT 活性化が抑制された。以上より、TLR5 先行刺激による TCR からのシグナル伝達抑制の要因の一つに、SOCS-1 の誘導が考えられた。

以上、本研究において、TLR4 の細胞内シグナル伝達における Jak2 の機能の解明と TLR5 が TCR を介する活性化に及ぼす影響について検討した。

敗血症時の過剰な免疫反応によりショック状態が引き起こされることがあり、その際に免疫抑制剤である副腎皮質ステロイド投与が行われることもある。しかし、臨床上、副腎皮質ステロイド投与は広汎な薬理作用により、過剰に免疫反応を抑制し、感染症を増悪させる危険性がある。そのため、今後はより特異的な作用を有し、過剰な免疫反応のみを抑制する薬剤の開発が期待される。その開発の際、私が証明した Jak2 を介した一連の細胞内シグナル伝達系をターゲットとすることも可能かもしれない。

フラジェリン先行刺激による T 細胞活性化の抑制は、T 細胞の獲得免疫を抑制し、免疫の過剰反応を抑え敗血症の重篤化を防いでいる可能性がある一方で、その抑制が過剰であると免疫機能低下から敗血症を重篤化させている可能性もあり、TLR5 先行刺激による TCR を介する T 細胞活性化の抑制の生理的役割について詳細な検討が今後必要である。

本研究は、以上の点で敗血症の病態解明と治療の開発の一助となると確信している。