

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 奥 川 周

本研究は、近年自然免疫応答に重要な役割を演じていると考えられる Toll 様受容体(TLR)の細胞内シグナル伝達とその機能を明らかにするため以下の 2 つの研究を行った。第一にマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞を用い LPS をリガンドとする TLR4 の細胞内シグナル伝達における Jak2 の役割について解析を試みた。第二にヒト T 細胞性白血病細胞株 Jurkat T 細胞を用い、フラジェリンによる TLR5 を介する先行刺激と T 細胞受容体を介する T 細胞活性化に及ぼす影響についての解析を試み、下記の結果を得ている。

TLR4 細胞内シグナル伝達における Jak2 に関する解析

1. RAW264.7 細胞を用い、LPS 刺激で Jak Family のうち Jak2 のみ刺激後 1 分よりチロシンリン酸化することを Western blotting 法で示した。この Jak2 のチロシンリン酸化は抗 TLR4 中和抗体により抑制され、TLR4 を介して起こることが示された。
2. 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 の活性化を抑制すると、LPS 刺激による免疫応答に重要であることが報告されている主要な 3 つの主要な MAPK、ERK、JNK、p38 のうち、JNK と p38 のリン酸化は抑制され、ERK のリン酸化は影響を受けないことを Western blotting 法で示した。このことは Jak2 が JNK および p38 の上流に位置することを示していた。
3. LPS 刺激による免疫応答に、重要なシグナル伝達因子であることが報告されている PI3-K についても、LPS 刺激後 1 分を最強とするチロシンリン酸化を認めることを Western blotting 法で示した。PI3-K の活性化を PI3-K 阻害薬 LY294002 で抑制すると、Jak2 を抑制した際と同様に、3 つの MAPK のうち JNK と p38 のリン酸化は抑制されたが、ERK のリン酸化は影響を受けなかった。
4. Jak2 阻害薬およびキナーゼ欠損 Jak2 の遺伝子導入により、Jak2 活性を抑制すると、LPS 刺激による PI3-K のチロシンリン酸化が抑制された。一方、PI3-K 阻害薬で PI3-K の活性を抑制しても、LPS 刺激による Jak2 のチロシンリン酸化は抑制されなかった。このことは Jak2 が PI3-K の上流に存在し、MAPK の JNK、p38 のリン酸化を制御していることを示していた。
5. Jak2 を介したシグナル伝達に関与することが判明した因子を、それぞれ PI3-K 阻害薬 LY294002、JNK 阻害薬 SP600125、p38 阻害薬 SB203580、Jak2 阻害薬 AG490 を用い活性化を抑制、さらに Jak2 については、キナーゼ欠損 Jak2 および野生型 Jak2 の遺伝子導入を行い、LPS 刺激免疫応答に重要な炎症性サイトカイン IL-1 β について、LPS 刺激 24 時間後の産生量を ELISA 法を用い比較した。いずれの経路を阻害しても、IL-1 β 産生は抑制され、野生型 Jak2 を遺伝子導入した細胞は産生が亢進した。以上より、Jak2 から PI3-K、MAPK

の JNK、p38 を制御する経路は IL-1 β 産生に関与することが示された。

TLR5 刺激と T 細胞受容体による T 細胞活性化に関する解析

1. Jurkat T 細胞において、フラジェリン刺激により、MAPK の p38、JNK のリン酸化が刺激後 15 分を最強として起きることを Western blotting 法で、NF- κ B の活性化がフラジェリン濃度依存性に起こることをルシフェレースアッセイ法で、さらに TLR5 受容体自身のチロシンリン酸化が、刺激後 1 分より起こることを Western blotting 法で示した。T 細胞受容体刺激から IL-2 産生への重要なシグナル伝達因子である NF-AT の活性化についても、ルシフェレースアッセイ法を用いて検討したが、その活性化は認めなかった。即ち、TLR5 からのシグナル伝達に、NF-AT が関与しないことが示された。
2. フラジェリン先行刺激が、その後の抗 CD3 抗体刺激による NF-AT の活性化を抑制することを、ルシフェレースアッセイ法を用いて示した。NF-AT 活性化の抑制は、フラジェリン先行刺激 3 時間後より認め、6 時間後で最大となり 18 時間後でも同程度であった。また、フラジェリン濃度依存性に抑制された。
3. フラジェリン刺激による T 細胞受容体表面発現の変化を FACS 解析で検討したが、NF-AT 活性化抑制の最大となった 6 時間で変化を認めなかった。しかし、T 細胞受容体直下に存在し、NF-AT 活性化に関与する Zap-70 チロシンキナーゼの抗 CD3 抗体刺激によるチロシンリン酸化が、フラジェリン先行刺激により抑制された。このことより、フラジェリン先行刺激による T 細胞受容体からの NF-AT 活性化抑制は、T 細胞受容体直下の細胞内レベルで起こっていることが示された。
4. フラジェリンによる細胞内レベルでの抑制の機序を解明するため、T 細胞受容体からのシグナル伝達を抑制する可能性が報告されている SOCS-1 について検討した。その結果、SOCS-1 の発現がフラジェリン刺激 2 時間後より認められることを、RT-PCR 法を用いて示した。
5. SOCS-1 を遺伝子導入した Jurkat T 細胞に、抗 CD3 抗体刺激を加えると NF-AT 活性化が抑制されることが示された。以上より、Jurkat T 細胞において、フラジェリン先行刺激が T 細胞受容体からの NF-AT 活性化を抑制する機序に、SOCS-1 が関与することが示された。

以上、本論文は、第一にマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞における TLR4 からの細胞内シグナル伝達に、Jak2 が PI3-K および MAPK のうち JNK、p38 を制御し、IL-1 β 産生に関与すること、第二にヒト T 細胞性白血病株 Jurkat T 細胞を用い、TLR5 先行刺激が T 細胞受容体からの細胞活性化を SOCS-1 を介して抑制することを明らかにした。本研究では、未知に等しかった TLR4 を介するマクロファージ活性化における Jak2 の役割およびフラジェリン先行刺激による T 細胞活性化抑制の分子生物学的機序について解明し、今後の敗血症の病態解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位授与に値するものと考えられる。