

## 論文の内容の要旨

論文題目 マクロファージにおける病原微生物構成成分による  
免疫学的不応答の分子生物学的機序

指導教官 小池 和彦 教授  
東京大学大学院医学系研究科  
平成 13 年 4 月入学  
医学博士課程  
内科学専攻  
学生番号 17388  
氏名 中山 久仁子

軽症の細菌感染症治療は新規抗菌薬の開発によって容易になってきているが、重症の細菌感染症とくに敗血症における死亡率は未だ高い。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、細菌側の要因と、生体における免疫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起こると推測される。

免疫は主に自然免疫と獲得免疫に分けられる。自然免疫は従来まで、外来異物や病原体の非特異的処理システムのみと考えられてきた。しかし自然免疫におけるマクロファージや樹上細胞のToll-like receptor (TLR) と呼ばれる受容体が、病原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、自然免疫を活性化し、さらに獲得免疫系の活性化の誘導にも必須であることが明らかになってきた。

敗血症患者の白血球は細菌刺激に対する応答性が悪く、マクロファージのサイトカイン

の産生が抑制されているという報告がある。この現象は「エンドトキシントレランス」と呼ばれ、グラム陰性杆菌の菌体成分である細菌リポ多糖(lipopolysaccharide;LPS) による現象として研究されてきたが、最近、LPS 以外の病原微生物構成成分によっても引き起こされることが明らかになり、この現象を総称して、免疫学的不応答(トレランス) と呼んでいる。免疫学的不応答は細菌感染に対して宿主が過剰反応をしないための調節機構と考えられている。その一方で、これにより新たな細菌感染が増悪する可能性も否定できず、敗血症患者において治療薬の効果が低いことの原因の一つであると考えられる。トレランスに関する分子生物学的機序に関してはほとんど解明されていない。従って、敗血症における免疫システムの分子生物学的機序を解明することは重要で、敗血症治療に光明をもたらすと考えられる。

これらの背景を踏まえ、敗血症時の免疫システムを解明する目的で、マクロファージをこれらの菌体成分である LPS, ペプチドグリカン(peptidoglycan;PGN), 非メチル化 CpG 配列(CpG DNA) で刺激し、細胞内シグナル伝達と TNF- $\alpha$  の産生について基礎的実験を行なった。次に LPS, PGN, CpG DNA で一次刺激した後、これらのリガンドで二次刺激を行ない、TNF- $\alpha$  の産生を指標として、トレランスが誘導されるかどうかを検討した。最後に、まだ解明されていない PGN によって引き起こされるトレランスの分子生物学的機序に関して、特に IRAK-M に焦点をあてて解析を行った。

まず LPS, PGN, CpG DNA でマクロファージの RAW 264.7 細胞を刺激し、TLR からの細胞内シグナル伝達において重要な MAPK(ERK, p38, JNK) のリン酸化を刺激 15-30 分後に確認した。次にトレランスの誘導の実験のために、各リガンドにより炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  が産生される条件を検証した。TNF- $\alpha$  産生量は LPS, PGN, CpG DNA 刺激後 8-12 時間でプラトーに達した。この結果から、後の実験では、2 回目の刺激を 16 時間以降に行なった。また TNF- $\alpha$  は、各リガンドの用量依存性に産生され、その産生量がプラトーに達した各リガンドの濃度、LPS(0.1  $\mu$ g/ml), PGN(30  $\mu$ g/ml), CpG DNA(0.1  $\mu$ g/ml)を、以降の実験のリガンドの最小濃度に設定した。

次に上記の条件の各リガンドで一次刺激をした後、16 時間後に同一のリガンドで二次

刺激をした場合の TNF- $\alpha$  産生量を検出した。LPS または PGN で一次刺激を行なった後に同一のリガンドで二次刺激を行なうと、単独刺激よりも TNF- $\alpha$  産生量が顕著に抑制された。CpG DNA でも TNF- $\alpha$  の産生量は抑制されたがその程度は小さかった。さらに一次刺激と二次刺激で異なったリガンドを使用すると、いずれの場合でも単独刺激と比較して TNF- $\alpha$  の産生量は低下した。この結果より、LPS, PGN, CpG DNA によってホモトレランス、ヘテロトレランスが誘導されることが確認された。

PGN によるトレランスについてはあまり明らかにされていないので、PGN によるトレランスの誘導の分子機序を解明する目的でさらに研究を進めた。まず種々の濃度の PGN で細胞を一次刺激した後、16 時間後に 30  $\mu\text{g/ml}$  の PGN で再刺激を行ない TNF- $\alpha$  の産生量を比較検討した。その結果 3  $\mu\text{g/ml}$  以下の濃度の PGN で一次刺激をした細胞では、TNF- $\alpha$  の産生量の低下は認めなかったが、30  $\mu\text{g/ml}$  以上の PGN で一次刺激した細胞ではその産生は抑制された。このことから、30  $\mu\text{g/ml}$  以上の高濃度 PGN で前処置を行なうと、16 時間後には細胞にトレランスが誘導されるが、3  $\mu\text{g/ml}$  以下の低濃度 PGN ではトレランスは誘導されなかったということが示唆された。さらにこのトレランスが誘導された細胞では、MAPK と I $\kappa$ B $\alpha$ リン酸化が抑制されており、PGN による一次刺激後にトレランスの誘導された細胞も誘導されなかった細胞でも、細胞表面の TLR2 受容体発現量は、刺激後 16 時間までおおむね変化はなかった。この結果から、トレランス誘導がその受容体の発現量の変化ではなく、TLR 下流の細胞内シグナル伝達機構の変化によるものであるということが確認された。

IRAK-1 は TLR 受容体直下に位置し、PGN 刺激後に速やかに活性化されることが知られており、本実験では PGN でトレランスの誘導された細胞では IRAK-1 キナーゼ活性は抑制されていたが、PGN 一次刺激後の IRAK-1 タンパク量はほぼ同じであった。その結果、トレランスが誘導された細胞において、IRAK-1 キナーゼ活性の抑制が、IRAK-1 タンパク量の減少によるものではないことが示された。

さらに PGN のトレランスを誘導した細胞において、無刺激または低濃度 PGN で二次刺激した場合、IRAK-M は刺激後 24 時間まで検出されなかったが、高濃度 PGN で 4-24 時

間一次刺激した細胞では、IRAK-M の発現量は亢進した。その上 IRAK-M に特異的な siRNA で IRAK-M の発現を抑制すると、TNF- $\alpha$  産生は元のレベルに戻った。これらの結果は、IRAK-M はマクロファージにおける PGN によるトレランス誘導において、重要な働きをしていることを示している。

またトレランスの誘導された細胞において、PGN の二次刺激のあとで MyD88 と IRAK-1 の会合はわずかに検出されたが、トレランスの誘導されていない細胞では MyD88 と IRAK-1 の会合は顕著に認められた。このことは、トレランスの誘導された細胞において、IRAK-1 と MyD88 の会合が抑制されることが、トレランス誘導の一つの分子機序であることを示していた。

以上の結果から本研究では、30  $\mu\text{g/ml}$  以上の高濃度の PGN によってトレランスの誘導された RAW264.7 細胞では、IRAK-M が誘導され、その IRAK-M が IRAK-1 活性を抑制し、IRAK-1 と MyD88 の会合の抑制がおこり、TLR からのシグナル伝達が抑制されると考えられた。

敗血症における免疫の過剰反応は、生理学的に微小循環の変化をきたし、最終的に多臓器不全をもたらす生命を脅かしている。そのため全身感染症の継続によって自己破壊に至らないように、初期の炎症反応の後に炎症機序が抑制され、制御されている。一方で、その制御は細菌感染に対する応答性を悪くし、敗血症患者の予後を悪化させている可能性がある。本研究の IRAK-M が PGN によるトレランス誘導に関与しているという発見は、トレランスの分子生物学的機序を理解するうえで非常に重要と思われる。今後、このトレランスの分子生物学的機序の理解は、敗血症を引き起こす炎症反応の進歩した治療の発展の一助となるかもしれない。