

審査結果の要旨

氏名 中山 久仁子

敗血症においては、細菌刺激に対する血球細胞の応答性が悪い、即ちトレランスと呼ばれる免疫学的不応答が認められることが以前より知られているが、この分子生物学的機序はほとんど解明されていない。本研究は、病原微生物構成成分によって誘導されるトレランスの分子生物学的機序を明らかにするため、特に PGN により誘導されるマクロファージのトレランスの機序について IRAK-M に焦点をあてて解析したものであり、下記の結果を得ている

1. RAW 264.7 細胞を用い、LPS, PGN, CpG DNA 刺激により TNF- $\alpha$  が産生される条件を検証した。TNF- $\alpha$  産生量は、各リガンド用量依存性に産生されプラトーに達し、そのプラトーに達した濃度を以降の実験で用いた。TNF- $\alpha$  産生量の経時的变化は、それぞれ各リガンドとも刺激後 8-12 時間でプラトーに達したため、以降の実験の 2 回目の刺激を 16 時間以降に行なった。さらに TLR からの細胞内のシグナル伝達において重要な MAPK (ERK, p38, JNK) のリン酸化を確認した。
2. LPS, PGN, CpG DNA で細胞を一次刺激した後、16 時間後に上清を wash out し、各々同一のリガンドまたは異なったリガンドで二次刺激を行ない TNF- $\alpha$  産生量を比較検討した。結果、いずれのリガンドの場合でも一次刺激を行なった後に二次刺激を行なうと、単独刺激よりも TNF- $\alpha$  産生が顕著に抑制され、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。
3. 低濃度 PGN の一次刺激後 16 時間後に PGN で二次刺激した場合には、TNF- $\alpha$  産生量は抑制されなかったが、一次刺激を高濃度にすると抑制された。この結果は高濃度 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、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を示唆した。
4. PGN によってトレランスが誘導された細胞と誘導されていない細胞で、MAPK と I $\kappa$ B- $\alpha$  のリン酸化を比較すると、トレランスの誘導された細胞ではこれらのリン酸化が抑制されていた。
5. 細胞表面の TLR2 発現レベルを、トレランスが誘導された細胞と誘導されていない細胞でウェスタンブロット法にて経時的比較したところ、トレランスが誘導された細胞も誘導されていない細胞と同じように

TLR2は細胞膜表面に発現しているが示唆された。これは、トレランスがTLR2の細胞表面発現量の変化によるものではなく、TLR2の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ことを示唆した。

6. PGN 刺激後の IRAK-1 の活性を *in vitro* キナーゼアッセイを用いて検討したところ、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おり、IRAK-1 タンパク量はほぼ同じであった。これは、トレランスが誘導された細胞において、IRAK-1 キナーゼ活性が抑制される理由が、IRAK-1 タンパク量の減少によるものではないことを示していた。
7. 無刺激または低濃度 PGN で刺激した細胞では IRAK-M の発現は検出されなかったが、高濃度 PGN で刺激した細胞では IRAK-M の発現量は亢進し、IRAK-M の誘導が PGN によるトレランスに関与している可能性を示唆した。
8. MyD88 と IRAK-1 の会合は、トレランスの誘導されていない細胞では顕著に認められ、トレランスの誘導された細胞においてはほとんど認めなかった。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示唆された。
9. IRAK-M 特異的 siRNA で IRAK-M の発現を抑制した細胞では、IRAK-M 特異的 siRNA 用量依存性に TNF- $\alpha$  の産生が増加し、産生量は元のレベルに戻った。これは、IRAK-M の発現を抑制することでトレランスが認められなくなったことを示しており、IRAK-M は PGN によるトレランスの誘導に重要な働きをしていると考えられた。

以上の結果から本論文は、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 が直接または間接的に 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ことを明らかにした。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。