審査の結果の要旨

氏名　　小林　真紀子

本研究は、①Toll-like receptor 4 (TLR4) / MD-2 複合体への LPS 結合および TLR4 クラスター形成における MD-2 の役割　②LPS 刺激による TLR4 クラスターの細胞内取り込み及びクラスター解離の 2 項について、それぞれ解析を試み下記の結果を得ている。

①-1　MD-2 は TLR4 の細胞表面への発現の調節と LPS 結合および応答性に重要であり、それぞれ MD-2 上の異なるアミノ酸が関与しているという報告はこれまでになされていたが、MD-2 が TLR4 のクラスター形成に関わるかは検討されたことがなかった。TLR4 の細胞表面の発現は異常がなく、LPS 応答性が減弱している MD-2 点変異体 12 個について、TLR4 のクラスター形成による構造変化を反映するとされる LPS 刺激後の抗 TLR4 抗体 MTS510 染色性の変化を検討した。このうち Gly59、Phe126 および Gly129 のアラニン変異体（以下 G59A、F126A および G129A と示す）は LPS 刺激後の MTS510 認識低下が不完全であった。この 3 変異体について検討を行った。

①-2　これら 3 つの点変異 MD-2 は、MD-2 変異体をトランスフェクションした HEK293/TLR4 細胞のリピド A 刺激による IL-8 産生、あるいは変異 MD-2 遺伝子の導入した MD-2 欠損マウスの骨髄由来樹状細胞のリピド A 刺激による TNF-α、IFN-β 産生がいずれも野生型 MD-2 に比し低下しており、LPS 応答性が減弱していることが示された。

①-3　TLR4/MD-2 変異体のリガンド結合能を、[^{3}H]標識リピド A またはリピド A 前駆体である[^{3}H]標識リピド IVa を用い測定した。これまで LPS 結合に重要と報告された部位とは異なる Gly59A 変異 MD-2 を発現する細胞で著しい結合能の低下が示された。

①-4　F126 および G129 は、MD-2 における LPS 結合に重要な部位に存在するが、F126A および G129AMD-2 変異体の LPS 結合は野生型 MD-2 と同程度であった。LPS 刺激による TLR4 のクラスター形成が著しくクラスター形成が低下していることが示された。

②-1　抗 TLR4 抗体の Sa15-21 は LPS 刺激後も TLR4 を認識することができる抗体である。しかし長時間の LPS 刺激により Sa15-21 は認識性を失う。共焦点顕微鏡を用いた画像解析で、LPS 刺激後に TLR4 が細胞内に凝集すること、TLR4 は取り込まれた脂質膜と共局在することが示された。抗 TLR4 抗体 Sa15-21 による LPS 刺激後の細胞表面の染色性低下は TLR4 の細胞内への取り込みを示すことを示唆した。LPS 応答性の低下している MD-2 変異体を発現した細胞で、LPS 刺激依存性 TLR4 細胞内移行が低下していることを示した。

②-2　LPS シグナル伝達の起こらない TLR4 変異体では、LPS 刺激において TLR4 クラスター形成は起こるが TLR4 の細胞内移行が起こらず、さらに一過性の現象である LPS 結合およびクラスター形成が持続していることを示した。シグナル非依存的に TLR4 クラスターは形成されるが、TLR4 クラスター解離はシグナル依存的な細胞内移行が必要であることが示された。

②-3　TLR4 の LPS 刺激後の画像解析では細胞膜と TLR4 がともに細胞内に取り込まれており、TLR4 のクラスター形成が一過性であるのはエンドソームに移行して分解されるこ

とによると推測された。細胞内移行後の LPS-TLR4 クラスター解離の条件を、酸性化抑制薬剤を用いて検討した。これらの薬剤は TLR4 の細胞内移行に影響しないが、LPS 刺激後の TLR4 のクラスター形成が持続していた。エンドソームの酸性化によって LPS/TLR4 クラスターが解離することが示された。

以上、本論文は、①LPS 結合と TLR4 クラスター形成は MD-2 の制御を受け、これらの現象は MD-2 上の異なるアミノ酸が重要であることが明らかにし、LPS 結合と TLR4 クラスター形成は異なる制御を受けていることを示した。②LPS 結合による TLR4 クラスター形成はシグナルに依存しないが、TLR4 クラスターの細胞内移行はシグナル依存性であり、細胞内に取り込まれた LPS-TLR4 クラスターはエンドソームで解離することを明らかにした。本研究は TLR4/MD-2 による LPS 認識機構の全体像を把握するのに重要な知見であり、エンドトキシンショックの予防・治療法確立にも重要な貢献をするものと考えられ、学位の授与に値すると考えられる