

[別紙1]

論文の内容の要旨

論文題目 Toll-like Receptor 7 を介したマクロファージの活性化の制御

指導教員 小池 和彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 塚田 訓久

免疫とは、生体が「異物」を排除するために備えるシステムである。哺乳類における免疫は、自然免疫と獲得免疫に大別される。かつて自然免疫は、病原体を特異的に認識して排除する獲得免疫システムが活性化するまでの間非特異的に病原体を排除する役割を果たすものと考えられていたが、近年になり、自然免疫においても病原体の構成成分を特異的に認識するシステムが存在することが明らかとなってきた。この病原体認識において重要な役割を担うのが Toll-like Receptor (TLR) である。すでに 10 種類以上の TLR が知られており、その多くの生理的リガンドが明らかとなっている。TLR7 のリガンドは長らく不明であったが、Imidazoquinoline 誘導体である R848 がマウスの TLR7 およびヒトの TLR7/8 を刺激することが示され、2004 年にはマウスの TLR7 およびヒトの TLR8 の生理的リガンドが single-strand RNA であることが示された。

TLR からのシグナル伝達経路に関しても研究が進んでおり、その代表的なものとして MyD88、IRAK、TRAF6、NF- κ B、MAPK などを経る経路が知られているが、現時点でその全てが解明されている訳ではない。TLR の活性化はこれらのシグナル伝達経路を介して各種炎症性サイトカインの産生を誘導し、結果的に T 細胞や B 細胞の活性化につながることから、TLR は自然免疫と獲得免疫の仲介役としても重要な役割を果たしていると考えられている。

生体に繰り返し刺激を加えることにより徐々に反応が低下する、いわゆる不応答 (トレランス) という現象が古くから知られている。この機序については LPS の繰り返し刺激によるマクロファージのトレランスを中心に広く研究されており、炎症性サイトカインの産生低下、細胞内シグナル伝達経路の変化などが報告されていたが、TLR の発見後は TLR を介する経路がトレランスに関与していることが明らかになった。トレランスは LPS のみならずペプチドグリカンなど様々な病原微生物構成成分による刺激でも引き起こされることが報告されているが、ウイルス感染時のトレランスの分子機序に関してはほとんど理解されていない。そこで、ウイルス感染時の自然免疫システムの機能、特にマクロファージトレランスの分子機序を解明する目的で以下の研究を行った。

実験には、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞を用いた。まずこの細胞の R848 刺激に対する 2 種のケモカイン、MIP-1 β および SDF-1 α の産生を検討したところ、前者では R848 の濃度依存性の産生が確認されたが、後者の産生は確認できなかった。このため、以後の実験では MIP-1 β の産生を指標として研究を進めた。次に R848 の刺激により ERK/p38/JNK の 3 種の MAPK が活性化されることを Western Blot 法により確認した。これら MAPK の阻害剤の存在下では R848 刺激による MIP-1 β の産生が抑制され、MIP-1 β の産生にはこれら 3 種の MAPK すべてが関与していることが確認された。また、R848 刺激により NF- κ B が活性化されることをデュアルルシフェラーゼアッセイにより確認した。

RAW264.7 細胞に R848 による 1 次刺激を加え、その 18 時間後に同じ細胞に 2 次刺激を行ったところ、2 次刺激後の MIP-1 β の産生の低下、すなわちトレランスが確認された。この現象の分子機序を解明するため、R848 の 1 次刺激の有無による R848 の 2

次刺激後の細胞内シグナル伝達分子の活性化の変化を検討した。ERK/p38/JNKの3種類のMAPKのリン酸化、およびNF- κ B経路活性化の指標としてのI κ B- α のリン酸化をまず検討したが、1次刺激を行った場合において2次刺激後の細胞内MAPKs、I κ B- α の活性化が抑制されていた。次に、MAPKs、NF- κ B経路の共通の上流としてIRAK-1のリン酸化を同様に検討したところ、これも抑制されていることが確認され、このトレランスには細胞内シグナル伝達経路のうちIRAK-1あるいはそれより上位のレベルが関与していることが明らかになった。

次に、マウスTLR7の人工的リガンドR848で認められたこのトレランスが、生理的リガンドであるsingle-strand RNAによる繰り返し刺激によっても生じるのかを検討した。過去にマウスTLR7のリガンドであることが文献で報告されているHIV-1 RNAのU5領域中の20塩基の配列(以下HIV ss-RNA)を合成し、実験に用いた。まずこのHIV ss-RNAでRAW264.7細胞を刺激した際にR848の場合と同様にMIP-1 β の産生が見られることを確認した。次にHIV ss-RNAによる繰り返し刺激を行ったところ、R848の場合と同様に繰り返し刺激によるMIP-1 β の産生低下が生じた。

R848の1次刺激後にLPSなど他のTLRリガンドへの反応が低下する、いわゆるクロストレランスの報告は過去になされているが、TLR7のリガンドの繰り返し投与によるトレランスの報告はなされていない。前者がウイルス感染後の他種の病原体に対する易感染性のモデルとすれば、今回確認されたトレランスは、持続性のウイルス感染症の良いモデルになると考えられる。持続感染するタイプのウイルス感染症においては宿主の抗原認識細胞は常にウイルス抗原刺激にさらされており、細菌感染時と同様に過剰な生体反応を防ぐ意味でトレランスは有効に機能していると考えられるが、その一方で感染自体をコントロールする上では悪影響を及ぼしている可能性がある。トレランスの機序を解明し、マクロファージ活性化の程度を制御することが可能となれば、新たな治療法の開発につながる可能性がある。また、TLR7の生理的リガンドであるss-RNAの繰り返し投与によるトレランスの誘導は新しい知見であり、C型肝炎などHIV感染症と並存するウイルス性疾患における病勢の進行や、HIV感染症治療中の免疫再構築症候群の発症に影響を及ぼしている可能性を考える上で興味深い知見である。

トレランスの持続時間を検討する目的で、R848による1時間の1次刺激を行った後一旦R848を取り除き一定時間経過後に2次刺激を行ったところ、トレランスは1次刺激の48時間後まで持続することが確認された。R848の類似化合物であるImiquimodは既に海外で抗ウイルス・腫瘍効果を有する薬剤として皮膚科領域で臨床応用されているが、連続使用におけるトレランスの誘導はこの治療効果の減少につながる可能性がある。今回、短時間のR848投与によってもトレランスが長時間持続することが確認されたが、これは臨床領域におけるR848のより有効な投与方法を考える上で重要な知見であると考えられる。