

## 論文の内容の要旨

論文題目 Toll-like receptor 4 の細胞内分布と機能の解析

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 柳元伸太郎

外来病原微生物や腫瘍細胞など、生体の恒常性の維持（生命の維持）の障害に対する生体防御機構として生物には免疫機構が備わっている。特に哺乳類などの高等生物では複雑かつ効率的な免疫系が存在するが、この免疫系は大別して生体防御の初期反応である自然免疫と、リンパ球系を中心とした抗原特異的な防御反応である獲得免疫とに分かれる。Toll-like receptor (TLR) は主として自然免疫に関与する重要な受容体であるが、近年の研究では獲得免疫も含めた免疫系全体での TLR の幅広い役割が解明されつつある。

病原微生物による感染が起こると、直ちに局所における炎症反応が生じる。この反応に引き続いて、病原微生物を広く認識する機構が働く。この一連の免疫反応が自然免疫と呼ばれる。自然免疫は、TLR のほか、補体系、NK 細胞などによる自己・非自己の認識、マクロファージによる貪食、細胞内受容体による認識機構などから構成されている。

TLR は病原微生物に特異的で、かつ共通の pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) を認識することで病原微生物の侵入を感知している。TLR ファミリーの一つである TLR4 はグラム陰性菌壁由来のリポポリサッカライド

(リポ多糖類, LPS) を認識する. LPS は微生物由来の物質の中で非常に強い炎症反応を惹起し, 感染症で宿主が曝される機会が最も多いものの一つである. TLR4 が LPS を認識するためには LPS binding protein (LBP), CD14, MD-2 (TLR4 に結合して細胞膜外に存在する糖蛋白) が重要な役割を果たしていることが知られている. しかし, 相互の結合様式や個別の作用など未だに不明な点も多い.

TLR4 のシグナル伝達経路はほとんどの TLR で共通の adaptor protein である MyD88 を介する MyD88 依存性経路と, MyD88 を介さない MyD88 非依存性経路に大別できる. TLR4 では, MyD88 依存性経路は各種 mitogen-activated protein kinase (MAPK) の活性化や TNF などの炎症性サイトカインの産生に関与している. MyD88 非依存性経路が活性化されると免疫担当細胞では I 型インターフェロンの産生が起こる.

TLR4 は免疫系の多くの細胞では細胞膜に発現しており, MD-2 がその細胞膜への発現には必要であること, MD-2 は TLR4 と結合して細胞膜外に存在し, この MD-2 と TLR4 の結合には TLR4 の細胞外ドメインのアミノ酸のいくつかの glycosylation が必要であることなどが明らかとなっている. 一方, TLR4 は LPS と細胞質内で共存することも観察されており, 細胞質内においても TLR4 に何らかの役割があることが予想される.

本研究では遺伝子操作により TLR4 変異株を作成し, ヒト由来の細胞株に一過性に強制発現させることで TLR4 の機能に関与する新たな部位を特定し, その部位に関連する現象を解明することを試みた. TLR4 の細胞内には TIR ドメインと呼ばれる部分があり, これがシグナル伝達に重要な役割を示すことがわかっている. しかし, TLR4 の細胞内の分布や細胞内物質輸送に対する細胞内ドメインの関与は明らかではない. シグナル伝達と細胞内分布の両方に関与する共通機構の解明は TLR4 の機能の理解に必要であり, TLR4 の細胞内の分布とシグナル伝達の双方に関連する機能性の構造の存在を探るべく, 遺伝子変異の標的を TLR4 の細胞内ドメインに絞って解析を行った.

はじめに, TLR4 の細胞質内に切断点をもつトランケーション変異体を 5 通り作成した. 切断点の決定に際しては TLR4 の細胞内のアミノ酸配列のうち, 既知の細胞内物質輸送に関連する sorting motif との相同性のある配列を参考に

した。TLR4 の遺伝子導入による実験では広く用いられているヒト胎児腎 (human embryonic kidney) 由来細胞 HEK293T に作成した遺伝子を一過性に導入して表現型を確認した。その結果、少なくとも 815 番目から 826 番目のアミノ酸が失われると、シグナル伝達と細胞内局在に異常が生じることが明らかとなった。引き続き、815~826 番目のアミノ酸配列を標的にして単アミノ酸変異体を複数作成した。これらを用いて同様の検討を行い、TLR4 の細胞質内のアミノ酸のうち、LPS に対する反応性と、細胞内分布に関与すると考えられるものを抽出した。TLR4 の細胞内分布の確認は TLR4 と蛍光蛋白 EGFP との融合蛋白を作成することでを行い、LPS に対する反応性は NF- $\kappa$ B の転写活性をデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイで行った。

結果をまとめると次のようになる。まず、野生型 TLR4 を蛍光蛋白である EGFP と融合させて発現させると、HEK293T 細胞においては細胞内の局在及びシグナル伝達に関する特徴は既知の知見と一致する結果が得られた。すなわち、TLR4-EGFP は MD-2 とともに発現させることで細胞表面に発現し、血清存在下で LPS 刺激によって NF- $\kappa$ B の転写活性の亢進がみられた。一方、815 番目のアミノ酸のロイシンをアラニンに変異させた変異型 TLR4 (L815A) -EGFP では、MD-2 の発現の有無にかかわらず、TLR4 は細胞表面に発現することなく細胞内にとどまった。また、LPS 刺激にも反応を示さなかった。しかし、CD14 を MD-2 とともに、同時に遺伝子導入してやることで、LPS に対する反応性を再獲得した。この場合であっても、TLR4 (L815A) の細胞表面での発現は認められなかった。野生型および変異型 TLR4 の細胞膜表面への発現は TLR4-EGFP 融合蛋白を共焦点レーザー顕微鏡により観察したほか、ビオチン化により精製した細胞表面蛋白のウェスタンブロットでも確認した。

CD14 の遺伝子導入により膜結合型 CD14 が発現するようになった HEK293T では TLR4 の LPS に対する感受性が亢進している可能性が考えられた。そこで膜結合型 CD14 が発現しない (CD14 の遺伝子導入をしない) 条件で想定される LPS に対する低感受性を補うべく LPS 濃度を通常の実験濃度よりも高くして刺激実験を行った。つまり、HEK293T に TLR4 (L815A) -EGFP と MD-2 を一過性に強制発現させて刺激する際の LPS 濃度を 10 ng/ml から 1,000 ng/ml

まで上昇させて LPS 刺激実験を行った。しかし、いずれの濃度でも NF- $\kappa$ B の転写活性の亢進は認められなかった。これは、膜結合型 CD14 の役割が単に TLR4 の LPS 感受性亢進にあるわけではないことを示唆すると考えられる。

本研究における一連の実験の結果、TLR4 の主要な細胞内ドメインである TIR ドメインの C 末端近傍の 815 番目のロイシンの一アミノ酸変異が TLR4 の細胞膜への発現と NF- $\kappa$ B の活性化を著しく障害することが明らかとなった。TLR4 の変異体でシグナル伝達が障害されるものがこれまでも報告されているが、今回のように条件によってシグナル伝達が起こる場合と起こらない場合がある変異体は他に類を見ないものである。また、TLR4 の細胞膜への発現に関しては、これまで MD-2 と TLR4 の共発現が必要であることや細胞外ドメインの特定部位のアミノ酸の glycosylation が必要とされるなど、いくつかの条件が明らかになっている。今回の発見により、これら以外にも、細胞膜発現に関与する機構の存在が示唆された。今後は TLR4 (L815A) が関与する細胞内輸送およびシグナル伝達のメカニズムの分子レベルでの具体的説明が望まれる。また、膜結合型 CD14 の有無による TLR4 (L815) のシグナル伝達における差異は膜結合型 CD14 の未知の機能の存在をうかがわせる。これまで TLR4 のシグナル伝達において膜結合型の CD14 と血清中の可溶性 CD14 の差はあまり注目されてこなかった。今回の結果はこの点でも新たな研究の方向性を示していると考えられる。

TLR4 は、そもそも、エンドトキシンへの感受性が異なるマウスの系統の存在が発見のきっかけとなった。そのマウスにおいては TLR4 の一アミノ酸変異が認められ LPS によるシグナルの活性化の低下が認められる。ヒトにおいても TLR4 の多型が知られており、これらの多型と、感染症、特に敗血症などの重症感染症における臨床経過との関連は大いに注目されている。本研究で明らかとなった変異体の自然界での存在は明らかにはなっていないが、さらに解析が進むと、TLR4 の構造と機能の関連や関係する蛋白質などが解明されることで、感染症における宿主側の免疫反応の理解が進み、病態のコントロールにつながる新たな治療戦略の一端となることが期待される。