

論文内容の要旨

論文題目

Toll-like receptor (TLR)会合分子であるPRotein Associated with Tlr4 (PRAT4A)の
免疫応答制御における役割

指導教官： 三宅 健介 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成17年 4月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名： 柴田 ・ 磨

免疫システムは自己から非自己を見分けて排除する役割を担っており、多細胞生物が生命を維持する為に必須のシステムである。全ての多細胞生物は免疫システムを有し、脊椎動物では獲得免疫と自然免疫の両輪により免疫システムが構成される。自然免疫応答は病原体レセプターを用いて侵入抗原を認識し、サイトカイン (IL6、IL-12p40、TNF- α など) やケモカイン (RANTES など) の産生、および補助刺激分子リガンド (CD86) の発現上昇を引き起こす。その結果、適切な自然免疫応答および獲得免疫応答が誘導され、侵入病原体は排除されることとなる。

細胞膜に分布する Toll Like Receptor (TLR)ファミリーは最初に発見された病原体レセプターであり、細胞外の様々な病原体構造や自己因子 (TLR リガンド) を各々の TLR が特異的に認識している。これまでに TLR は様々な病原体に対する感染防御において必須であることが判明している。更に、TLR が自己免疫疾患の発症、創傷治癒、腫瘍の転移などの生体内における広範な免疫現象に関与していることも判明してきている。これらの知見は、多くの疾患における TLR をターゲットとした治療の可能性を示唆している。しかし、TLR のリガンド認識機構には未だ不明な点が多く、TLR を介した免疫応答を正確に制御する為にも TLR のリガンド認識を制御する機構を正確に理解していくことが求められる。

最近の研究より、TLR のリガンド認識には様々なアクセサリー分子 (MD-2, CD14, UNC93B, HMGB-1, gp96 など) が必要であることが判明してきた。アクセサリー分子は様々な機能により TLR を制御しており、これら分子の解析および機能同定が TLR を介した免疫応答に対する理解を飛躍的に進展させると考えられる。

本論文において、私は TLR4 のアクセサリ分子として発見された PRotein Associated with Tlr4 (PRAT4A)が複数の TLR の免疫応答を統合的に制御する分子であることを PRAT4A ノックアウトマウスの解析を通じて明らかにする。

PRAT4A ノックアウト(PRAT4A KO) マウスより得られた骨髄由来樹状細胞(BM-DC)、骨髄由来マクロファージ(BM-M ϕ)、脾臓 B 細胞、マウス胚線維芽細胞(MEF)では、細胞表面に分布する TLR4、TLR1、TLR2 および TLR 関連分子である RP105 の細胞表面発現が消失または減少していた。TLR ファミリー以外の分子の細胞表面発現には全く影響が認められなかった。一部の PRAT4A KO 細胞では、TLR2、TLR4、および RP105 の細胞表面分布が残存することより、TLR の細胞表面への移行は PRAT4A を含めた複数の分子により制御されていると考えられる。

これらの現象に伴い、PRAT4A KO BM-DC、BM-M ϕ および MEF では、細胞表面 TLR (TLR1/2, TLR2/6, TLR4) のリガンド刺激に伴うサイトカイン産生などが消失、もしくは顕著に低下していた。また、PRAT4A KO 脾臓B細胞においても、それらリガンド刺激により誘導されるB細胞増殖や CD86 の発現上昇が顕著に抑制されていた。この事実は、細胞表面 TLR の細胞表面における分布がリガンド認識において重要であることを示している。

一方、TLR1 や TLR4 の細胞表面発現が完全に消失している PRAT4A KO 細胞において、これらの TLR リガンドに対する一部の免疫応答が残存もしくは全く影響を受けないという現象が認められた。この事実は、細胞表面がリガンド認識の場であると考えられている細胞表面 TLR が細胞内でもリガンドを認識し得ることを強く示唆するものである。特に細胞表面における TLR4 の分布が消失している PRAT4A KO BM-M ϕ の解析より、マクロファージの細胞内 TLR4 は特に TRIF 依存的な免疫応答を選択的に活性化することが強く示唆された。

細胞表面 TLR の免疫応答に加え、全ての PRAT4A KO 細胞では細胞内 TLR (TLR7, TLR9) の免疫応答も完全に消失していた。細胞内に分布する TLR9 も小胞体からリソソームへ移行することが知られており、この細胞内移行がリガンド認識に必須である。RAW 細胞を用いて PRAT4A 欠損が TLR9 の細胞内移行に与える影響を解析したところ、PRAT4A ノックダウンにより GFP 標識 TLR9 (TLR9GFP) の小胞体からリガンド認識の場であるリソソームへの移行が消失し、TLR9GFP がリガンドと出会うことが出来なくなっていた。この結果は、細胞表面 TLR に加えて細胞内 TLR の細胞内移行にも PRAT4A が必須であることを示している。一方、BM-DC や BM-M ϕ において、TLR3 リガンドに対する免疫応答は PRAT4A 欠損による影響を受けていなかった。

以上の *in vitro* の結果より、複数の TLR における免疫応答が PRAT4A により統合的に制御されていることが示された。実際の病原体は複数の TLR リガンドを有しており、PRAT4A の欠損は病原体に対する免疫応答を顕著に消失させることが予測された。Heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* や Heat-killed *Escherichia coli* に対する PRAT4A KO BM-DC の応答性を解析した結果、全てのサイトカイン産生は有意に低下していた。一方、これら細菌により誘導される共刺激分子リガンドの誘導、即ち樹状細胞の成熟は全く影響を受けていなかった。また OVA を *M.tuberculosis* 含有フロイント完全アジュバントと共に PRAT4A KO 骨髄キメラマウスの皮下に接種したところ、OVA に対する免疫応答は認められたものの、TLR を介し

で誘導される Th1 偏向の免疫応答が選択的に消失していた。これらの結果は、PRAT4A が主にサイトカイン産生のバランスを制御することで獲得免疫応答の質を変化させていることを示唆している。

更に、PRAT4A の mRNA レベルでの発現量は、様々な TLR リガンド刺激に伴って顕著に減少していた。この事実は、TLR の免疫応答が PRAT4A の発現量の変化により制御されている可能性を強く示唆するものである。実際、PRAT4A KO キメラマウスは LPS で誘導されるエンドトキシンショックに対して完全に抵抗性であり、PRAT4A の消失が生体内における過剰な免疫応答を抑制し得ることが示された。

以上の結果より、PRAT4A は TLR の細胞内分布を制御する分子であり、TLR3 を除く複数の TLR(TLR1/2、2/6、4、5、7、9)の免疫応答に必須の分子であることが判明した。また PRAT4A の欠損に伴う TLR 応答の変化は生体内における自然免疫応答および獲得免疫応答に多大な影響を与えることが示され、TLR を介した免疫応答における PRAT4A の重要性が明らかとなった。