

審査の結果の要旨

氏名 : 柴田 ・ 磨

本研究は、Toll Like Receptor (TLR)ファミリーによる病原体因子の認識において TLR アクセサリー分子である PRotein Associated with Tlr4 (PRAT4A)が果たす役割を解析したものである。PRAT4A 遺伝子欠損マウスの解析を通じ、下記に示すような結果を得ている。

1. PRAT4A を欠損し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、およびマウス胚線維芽細胞 (MEF) では、細胞表面における複数の TLR (TLR1, TLR2, TLR4, RP105) の発現量が消失または減少していた。この結果は、PRAT4A が TLR の細胞表面への分布を制御する分子であることを示している。一方、PRAT4A の欠損細胞でも TLR の細胞表面分布が残存するという現象が認められ、PRAT4A と同様に TLR の細胞表面への移行を制御する分子機構の存在が示唆された。
2. PRAT4A を欠損した BM-M ϕ 、BM-DC および MEF では、細胞表面に分布する TLR (TLR4, TLR1/2, TLR2.6) のリガンド刺激に伴うサイトカイン産生が消失または顕著に減少していた。この現象は、PRAT4A の欠損によりこれら TLR の細胞表面への分布が障害されたことに起因すると考えられ、細胞表面がリガンド認識および応答の場として重要であることが示している。一方、一部の PRAT4A 欠損細胞においては TLR1 や TLR4 の細胞表面分布が消失していたにもかかわらず、CD40 や CD86 の発現上昇などはほとんど影響を受けていなかった。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認識を行っていることを強く示唆するものである。
3. Balb/c バックグラウンドの BM-M ϕ では、PRAT4A の欠損により TLR4 の細胞表面分布がほとんど消失していた。同細胞では、細胞表面に分布する TLR4 により誘導されることが知られる MyD88 経路依存的なサイトカイン産生 (TNF- α 、IL-6) および TRIF 経路依存的な IFN- β 産生の誘導が消失もしくは顕著に減少していた。一方、TRIF 経路依存的な RANTES の産生や CD40 の発現上昇の誘導はコントロール細胞と同様に誘導された。この結果は、細胞内に分布する TLR4 がリガンドを認識する機能を有すること、および細胞内 TLR4 が TRIF 依存的経路を選択的に活性化し得ることを強く示唆するものである。
4. PRAT4A を欠損した全ての細胞では、細胞内に分布する TLR7 および TLR9 のリガ

ンド刺激に伴う免疫応答が完全に消失していた。PRAT4A をノックダウンした RAW 細胞を用いた解析より、PRAT4A は TLR9 の小胞体からリガンド認識・応答の場であるリソソームへの移行を制御する分子であることが示された。一方、PRAT4A を欠損した BM-DC および BM-Mφにおいて、同じく細胞内に分布する TLR3 のリガンド認識は全く影響を受けなかった。

5. 実際の免疫応答は複数の TLR リガンドを有する病原体に対するものである。PRAT4A を欠損した BM-DC の Heat-killed *Escherichia coli* や Heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* に対する免疫応答を解析した結果、サイトカイン産生は顕著に減弱していた。一方、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 PRAT4A ノックアウトマウスより作製した骨髄キメラマウスに OVA をフロイント完全アジュバントと共に免疫したところ、TLR を介して誘導される Th1 偏向の免疫応答のみが選択的に消失していた。これらの結果は、PRAT4A の欠損により獲得免疫応答自体が消失するのではなく、PRAT4A の欠損に伴うサイトカイン産生の障害が獲得免疫応答の質を変化させ得ることを示している。
6. 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低下する。この事実は、TLR による免疫応答が 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、本研究は複数の TLR の細胞内分布が TLR アクセサリー分子である PRAT4A により統合的に制御されること、またその結果として認められた TLR の細胞内分布の変化が TLR 応答に与える影響を示したものであり、リガンド認識における TLR の細胞内分布の重要性を明らかにしている。また PRAT4A の欠損に伴う TLR 応答の変化が生体内の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を示し、TLR を介した免疫応答における TLR アクセサリー分子の重要性を明確に示している。本研究は TLR のリガンド認識機構の理解に重要な貢献をなすものであり、学位の授与に値すると考えられる。