

審査の結果の要旨

氏名 松本 文

本研究は、病原微生物の構成成分を認識してシグナル伝達を開始し免疫系を活性化するセンサー機能により宿主生体防御反応に寄与している Toll-like receptor (TLR) ファミリーのうち、TLR9 のリガンド認識機構の解明を目的としている。TLR9 は病原微生物が有する核酸 DNA の非メチル化 CpG モチーフを認識しているが、この CpG 認識機構に重要な分子を Functional cloning 法により同定し、この分子を中心として TLR9 リガンド認識における新規分子メカニズムの解析を試みたことにより、下記の結果を得ている。

1. TLR9 関連分子を探索するために Functional Cloning を実施するにあたって、CpG 刺激に対して NF- κ B 活性反応を示さない細胞としてマウスプロ B 細胞株である Ba/F3 細胞を見出した。この Ba/F3 細胞に、TLR9 と同じシグナル伝達経路を使用している TLR2 のリガンド刺激を加えたときには NF- κ B 活性が確認されたことより、Ba/F3 細胞は TLR9 のシグナル伝達段階ではなくリガンド認識段階において重要な分子が欠損していることが示された。

2. CpG 刺激に対して NF- κ B 活性化反応を示さない Ba/F3 細胞に、CpG 刺激に対して NF- κ B 活性反応を示す細胞由来の cDNA ライブラリを遺伝子導入して Functional cloning を実施した結果、TLR9 の CpG 認識に重要な分子としてシステインプロテアーゼであるカテプシン B とカテプシン L を同定した。野生型のカテプシン B/L をそれぞれ遺伝子導入した Ba/F3 細胞においては CpG 刺激依存的な NF- κ B 活性反応が増強されたが、カテプシンの酵素活性を失活させる変異体を導入した場合にはこの増強効果は認められなかった。また、カテプシンの酵素活性阻害剤を用いた実験により B 細胞の TLR リガンド刺激依存的な活性反応を測定したところ、阻害剤によって CpG 刺激により誘導される細胞活性反応が抑制された。これよりカテプシンの酵素活性が TLR9 のリガンド認識に重要であることが示された。

3. カテプシンの酵素活性阻害剤は CpG 刺激依存的な B 細胞活性反応のみならず、TLR3/7 リガンド刺激に対する細胞活性反応をも抑制したことより、カテプシンの酵素活性は核酸認識 TLR に影響を与えていることが示された。

4. カテプシン B/L 以外のカテプシンファミリーメンバーをそれぞれ Ba/F3 細胞に強制発現させて CpG 刺激依存的 NF- κ B 活性反応を確認した結果、カテプシン S/F もカテプシン B/L と同様に TLR9 活性の増強効果を示し、カテプシン H に関しては無効であった。これより TLR9 の CpG 認識におけるカテプシンの作用はファミリー間において代替されることが示された。

5. カテプシン B/L の酵素活性阻害剤は、CpG の細胞内取り込みや細胞内分布に影響しないが、CpG 刺激時に誘導されるシグナル伝達のごく初期イベントである IRAK-1 分子の分解現象は抑制していたことより、カテプシンは TLR9 が CpG を認識する場であるエンドリソソームにおいて機能している可能性が示された。またカテプシン B の酵素活性阻害剤は TLR9 とリガンドの結合を抑制したが、カテプシン L 阻害剤は影響しなかったことより、カテプシンの作用点は少なくとも二つあることが示された。

6. カテプシンの基質と推測される TLR9 を各種細胞株に強制発現させてそのフォームを確認したところ、TLR9 が切断されていることが示された。また、TLR9 の細胞内移動を制御している PRAT4A 分子と Unc93-B 分子それぞれの機能欠損細胞においては TLR9 が切断されていないことより、TLR9 の切断には両分子によるエンドリソソームへの細胞内移動が重要であることが示された。

7. TLR9 cleaved form の N 末端配列分析結果より、TLR9 分子の外部ドメインにある二つのロイシンリッチリピートをつなぐヒンジ領域が切断されていることが示された。これに加え TLR9 の欠損変異体を作成することで、TLR9 がヒンジ領域内の 13 アミノ酸の間において複数箇所切断されることが示された。

8. TLR9 ノックアウトマウス由来骨髓細胞に TLR9 の non-cleaved 変異体を遺伝子導入して樹状細胞に誘導した後、CpG 刺激を加えてサイトカインを測定したところ、産生量が著しく抑制されていたことから、切断された TLR9 はその機能に必要であることが示された。

以上、本論文においては Functional cloning 法により TLR9 のリガンド認識に関わる分子としてカテプシンを同定し、変異体や阻害剤を用いた実験によりカテプシンのプロテアーゼ機能が重要であることを明らかにした。また、TLR9 の cleaved form が機能的である可能性を見出した。現在 TLR9 は、微生物感染防御における働きのみならず核酸を認識するという機能から自己免疫疾患などの病態との関わりが注目されているが、その基盤となるリガンド認識の分子メカニズムについては大部分が未知である。それゆえに、本研究により明らかとなった分子レベルでの情報は今後の基礎研究及び疾患予防や治療戦略の手がかりとして貢献していくと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。