

論文の内容の要旨

論文題目 病原体センサーと内因性リガンドの相互作用解明

The interactions of pathogen sensors with endogenous ligands

氏名 山川奈津子

【序文】

哺乳類をはじめとする多細胞生物は、日常的に様々な病原体にさらされている。そのため、外界から侵入してくる病原体に対して選択的に応答し、最前線で防御反応を誘導する「病原体センサー」は、生物の生存において重要な役割を担っている。複数のファミリーが報告されている病原体センサーのうち、本研究では Toll 様受容体 (Toll-like receptor, TLR) に着目した。近年、TLR は感染症への関与に加え、肥満、自己免疫疾患などの非感染性炎症性疾患などの病態にも関わっていることが明らかになり始めている。TLR は病原体由来の分子だけではなく、核酸、脂肪酸などの代謝産物も内因性リガンドとして恒常的に認識している。ところが、代謝異常による内因性リガンドの増加など、何らかの原因により過剰な炎症反応が誘導され、それが不可逆的になると自己免疫疾患などの非感染性炎症性疾患へと導かれてしまう。これまで、内因性リガンドと TLR の相互作用や、非感染性炎症性疾患が誘導される詳細なメカニズムはあまり報告されていなかった。そこで本研究では 2 つの病原体センサーおよび関連分子と内因性リガンドの相互作用に着目した。第 1 章 **TLR4 1 塩基多型とリガンドの相互作用**では、ヒト TLR4 1 塩基多型がリガンドに対する TLR4 の応答にどのような影響を与えるのか検討を行った。第 2 章 **MD-1 と脂質の相互作用**では、B 細胞において TLR4 の LPS 応答に関与することが知られている RP105/MD-1 に着目し、これまでその機能やリガンドがほとんど報告されていなかった RP105/MD-1 の機能解明に向けた研究を行った。特に、RP105/MD-1 が内因性リガンドと会合し、B 細胞リンパ腫の誘導に関わっている可能性について検討を行った。

第1章 ヒト TLR4 1 塩基多型とリガンドの相互作用

【背景】TLR4/MD-2 は、大腸菌をはじめとするグラム陰性菌の細胞膜の構成成分であるリポ多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) を認識する。TLR4 が MD-2 を介してリガンドの LPS と結合すると、リガンド依存的な TLR4/MD-2 の二量体化を誘導し、TLR4/MD-2 二量体が細胞内へ移行することでシグナルが伝達される。ヒト TLR4 は複数の一塩基多型が報告されているが、特に D299G および T399I に関する研究報告は多い。しかし、TLR4 の細胞表面における発現やリガンド刺激に対する応答などに関して、異なる結論を主張している報告が混在しており、一塩基多型が TLR4 の応答へ与える影響の詳細はこれまでわかっていなかった。そこで本研究では、ヒト TLR4 の 2 つの一塩基多型が TLR4 を介する応答へ与える影響を調べるために、細胞表面での発現、リガンドとの結合、TLR4/MD-2 二量体の形成、NF- κ B の活性化について検討を行った。

【方法】NF- κ B の活性を検証するために、レポーター遺伝子を含んだプラスミド pNF κ B-hrGFP を Ba/F3 細胞へ遺伝子導入し、ヒト TLR4 (野生型, D299G, T399I および D299G/T399I)、ヒト MD-2 およびヒト CD14 を過剰発現させた。これらの細胞を用いて TLR4 の細胞表面における発現や、複数のリガンド刺激に対する TLR4 の応答を比較した。また、精製 TLR4/MD-2 を用いて、TLR4 と MD-2 およびリガンドとの結合、リガンド刺激による TLR4/MD-2 の二量体化について、TLR4 野生型と多型の比較を行った。

【結果】2 種類の抗ヒト TLR4 モノクローナル抗体を用いて、Ba/F3 細胞表面における TLR4 の発現量を比較したところ、既存の抗体 (HTA125) では TLR4 (D299G/T399I) の発現をほぼ確認できなかった (図 1)。しかし、当研究室で新たに樹立した抗体 (TF901) を用いたところ、TLR4

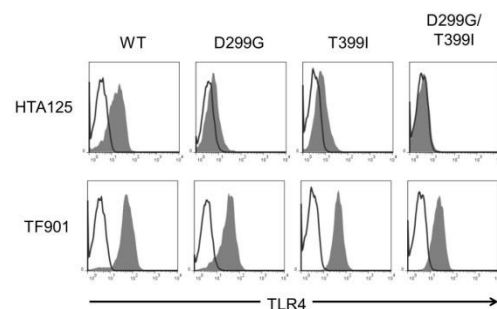


図1. 細胞表面におけるTLR4の発現

(D299G/T399I) も野生型 TLR4 と同程度に細胞表面に発現していることがわかった (図 1)。また、精製 TLR4/MD-2 を用いて TLR4 と MD-2、リガンドとの結合アッセイを行ったとこ

ろ、野生型 TLR4 と一塩基多型の間には大きな違いは見られなかった。しかし、TLR4/MD-2 過剰発現細胞に lipid A で刺激を加えたところ、TLR4 (D299G/T399I) の方が野生型よりも NF- κ B の活性が若干低下した。lipid A よりも活性の弱いリガンドである monophosphoryl lipid A (MPL) で細胞を刺激したところ、TLR4 (D299G/T399I) の活性化はさらに弱くなり、野生型との違いがより大きくなった。また精製 TLR4/MD-2 を用いて native-PAGE を行い、リガンド刺激により誘導される TLR4/MD-2 の二量体化を比較したところ、lipid A で刺激した場合に TLR4 (D299G/T399I) の二量体化誘導は野生型よりも低下していた。そして、MPL で刺激を行った場合には TLR4 (D299G/T399I) の二量体をほとんど確認できなかった。

同様に、TLR4 に対して活性の弱いリガンドと考えられている飽和脂肪酸を用いて検討を行ったが、野生型 TLR4 と TLR4 (D299G/T399I) の間で、TLR4/MD-2 と脂肪酸との結合や NF- κ B の活性化における大きな違いは見られなかった。

【考察・結論】 ヒト TLR4/MD-2 (D299G/T399I) は細胞表面における発現量、また TLR4 と MD-2 およびリガンドとの結合について、野生型と大きな違いは見られなかった。2 種類の抗ヒト TLR4 抗体により細胞表面 TLR4 の染色結果が異なった点、結晶構造解析の報告と合わせて、TLR4/MD-2 (D299G/T399I) は MD-2 やリガンドとの結合に直接の影響は与えないが、局所的な構造変化が起こっていると推察される。それにより TLR4/MD-2 多型では二量体誘導効率が低下し、シグナル伝達も弱くなったと考えられる。今後、TLR4 の活性化を検証するための新たな実験系を構築し、内因性リガンドの探索および検証を行う必要がある。

第 2 章 MD-1 と脂質の相互作用

【背景】 当研究室では TLR4 に類似した構造を持つ RP105 および RP105 に会合する MD-1 を同定した。B 細胞において、抗 RP105 抗体が RP105/MD-1 へ結合するとその細胞増殖を強く誘導する。また B 細胞における TLR4/MD-2 の LPS への応答に、RP15/MD-1 が関与することも報告されていた。よってこれまで、RP105/MD-1 は TLR4/MD-2 と同様、自然免疫における機能を持つと考えられてきたが、RP105/MD-1 を介したシグナル伝達の詳細な機構

や RP105/MD-1 の具体的なリガンドなどはわかっていなかった。そこで本研究では RP105/MD-1 が内因性リガンドを認識し、非感染性炎症性疾患の誘導に関与している可能性に着目し、モデルマウスを作製して解析を行った。

【方法】 自己免疫疾患様の症状が比較的軽いモデルマウス、B6 lpr/lpr (B6-lpr) マウスをバックグラウンドとして、MD-1 もしくは RP105 欠損マウスと交配させた。生後半年から 1 年ほど表現型を観察し、解析を行った。また、マウスに見られた表現型の原因を追究するため、native-PAGE により精製 MD-1 と結合するリガンド候補分子の探索および機能解析も行った。リガンド候補分子の既知受容体を細胞表面に発現させた M12 細胞を構築し、MD-1 による受容体の細胞内移行について検証を行った。

【結果】 B6-lpr MD-1^{-/-}マウスおよび B6-lpr RP105^{-/-}マウスは B6-lpr マウスよりも死亡率が高く、脾臓やリンパ節の腫大も見られた(図 2)。また、特に B6-lpr MD-1^{-/-}マウスは肝臓への B 細胞の浸潤や、モノクローナルな B 細胞の増殖などが確認されたことより、B6-lpr マウスや B6-lpr RP105^{-/-}マウスよりも B 細胞リンパ腫を発症しやすい傾向にあることがわかった。そこで、B 細胞リンパ腫発症の詳細なメカニズ

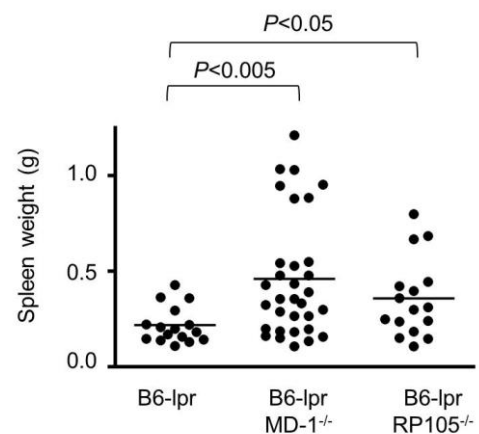


図2. 各マウスの脾臓の重量

ムを知るために、MD-1 と結合するリン脂質を native-PAGE により探索したところ、リン脂質の 1 つであるスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) と MD-1 が会合することがわかった。

【考察】 B6 MD-1^{-/-}マウスではリンパ腫が誘導される傾向は見られていないことから、Fas を介したアポトーシスが誘導されない状況下 (B6-lpr マウス) で MD-1 を欠損させると、リンパ腫が誘導されやすくなることが示唆された。また S1P の受容体である S1P1 や S1P2 は、それぞれ細胞増殖およびアポトーシスに関与することがわかっている。S1P, MD-1 が S1P1 や S1P2 および RP105 を介して B 細胞リンパ腫を抑制するメカニズムについて、現在検討を続けている。