

審査の結果の要旨

氏名 山川奈津子

本研究は、自然免疫応答において病原体を認識する分子として知られる「病原体センサー」の非感染性炎症性疾患における役割を明らかにするため、内因性リガンドとの相互作用解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

第1章 TLR4 1 塩基多型とリガンドの相互作用

1. ヒト TLR4/MD-2 を過剰発現させた Ba/F3 細胞において、新規抗ヒト TLR4 モノクローナル抗体 (TF901) を用いて細胞表面における TLR4 の発現量を検討したところ、ヒト TLR4 (D299G/T399I) は野生型ヒト TLR4 と同程度に細胞表面へ発現していることが示された。
2. TLR4 と MD-2 の会合および MD-2 とリガンドの結合に TLR4 (D299G/T399I) は影響を与えないことが、精製 TLR4/MD-2 を用いた結合アッセイにより示された。
3. 精製 TLR4/MD-2 を用いて native-PAGE を行ったところ、リガンド刺激により誘導される TLR4/MD-2 の二量体が、ヒト TLR4 (D299G/T399I) は野生型ヒト TLR4 よりも減少することが示された。特に活性の弱いリガンドの Monophosphoryl lipid A (MPL) で刺激を加えた場合に、ヒト TLR4 (D299G/T399I) は野生型ヒト TLR4 と比較し、二量体形成能が大きく低下することが示された。
4. ヒト TLR4/MD-2 を過剰発現させた Ba/F3 細胞に、NF- κ B の活性を検出するために、NF- κ B 結合配列を有するプロモーターの下流にレポーター遺伝子 hrGFP を接続したプラスミドを遺伝子導入したところ、ヒト TLR4 (D299G/T399I) は野生型ヒト TLR4 よりも、リガンド刺激により誘導される NF- κ B の活性が低下することが示された。特に MPL で刺激を加えた場合、TLR4/MD-2 二量体化の結果と同様に、TLR4 (D299G/T399I) における NF- κ B の活性化は野生型 TLR4 よりも大きく

低下することが示された。

5. 飽和脂肪酸であるパルミチン酸，ミリスチン酸およびラウリル酸はヒト TLR4 (D299G/T399I) および野生型ヒト TLR4 のリガンド結合部位に結合できることが，native-PAGE により示された。

第2章 MD-1 と脂質の相互作用

1. RP105/MD-1 は TLR4/MD-2 に類似した分子であるが，そのリガンドや機能はこれまであまり報告されていなかった。自己免疫疾患様の症状が比較的軽い B6 lpr/lpr マウスにおいて，RP105 や MD-1 を欠損させたマウスの表現型解析や免疫グロブリン遺伝子のクローナリティー確認 PCR を行ったところ，B6 lpr/lpr MD-1^{-/-}マウスは B6 lpr/lpr マウスや B6 lpr/lpr RP105^{-/-}マウスと比較して，B 細胞リンパ腫を発症しやすい傾向が示された。
2. 精製 MD-1 を用いて native-PAGE を行ったところ，MD-1 はリゾリン脂質の1つであるスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) と結合することが示された。
3. N 末端に HA タグを付加した S1P 受容体過剰発現細胞を用いて，リガンド刺激による受容体の細胞内移行実験を行ったところ，MD-1 は S1P 受容体 1 を細胞内へ移行させることが示された。

以上，本論文は病原体センサーと内因性リガンドの相互作用解析を行うことにより，2つのことを明らかにした。1つはヒト TLR4 の 1 塩基多型が，特に活性の弱いリガンドで刺激した際の，TLR4 の二量体化形成に影響を与えていて，下流のシグナル伝達を低下させることを明示した。もう1つは TLR 関連分子である MD-1 を欠損させた B6 lpr/lpr マウスは，B 細胞リンパ腫を発症しやすくなる傾向が見られることを示した。本研究はこれまで未知に等しかった，非感染性炎症疾患における病原体センサーの役割の解明に重要な貢献をなすと考えられ，学位の授与に値するものと考えられる。