

学 位 論 文 題 名

Involvement of extracellular ATP  
in mycoplasmal membrane-bound lipoproteins-induced  
cellular responses in leukocytes

(マイコプラズマの細胞膜リポタンパク質が誘導する  
白血球の細胞応答における細胞外 ATP の関与について)

学位論文内容の要旨

マイコプラズマは細胞壁を欠く微生物であり、肺炎、尿路感染症、関節炎等、ヒトの炎症性疾患に広く関与している。近年、マイコプラズマの細胞膜リポタンパク質 (LP) がマクロファージや線維芽細胞を活性化して炎症性サイトカインの産生を誘導することが報告され、LP がマイコプラズマ感染症においてなんらかの病因的役割を果たしていることが指摘されている。微生物感染症においては、微生物が宿主細胞に誘導する細胞死がその病態において重要となる。本研究では LP が細胞毒性を有しているかどうかを調べた。

ヒト由来のマイコプラズマである *Mycoplasma fermentans* ならびに *M. salivarium* から Triton-X114 二相分離法により調製した LP (LPfer ならびに LPsal) は、様々なヒト白血球細胞株に対して濃度依存的に細胞死を誘導した。LPfer は LPsal よりも数倍強い細胞死誘導活性を有していた。フローサイトメーターによる解析により、LP 刺激によってリンパ球では主にネクロシス、単球では主にアポトーシスが誘導されていることが明らかとなった。電子顕微鏡像やゲノム DNA の電気泳動像でも同様の所見が得られた。さらに、LPfer ならびに LPsal の細胞死誘導活性は種々の caspase の阻害剤によって阻害され、また LP 処理細胞では caspase-3 の基質である poly(ADP-ribose) polymerase の分解がみられることから、LP が誘導する細胞死では caspase が重要な役割を果たしていることが示唆された。LP は炎症性サイトカイン誘導活性を有していることから、LP の細胞死誘導活性は TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 等により間接的に誘導されることが推測された。しかしながら、これらのサイトカインに対する抗体はほとんど細胞死には影響しなかった。一方、LP の受容体である Toll-like receptor (TLR) 2 に対する抗体は LP が誘導する細胞死を部分的に阻害した。このことから、LP が誘導する細胞死には TLR2 が惹起するシグナル伝達経路が部分的に関与している可能性が示唆された。LP の細胞死誘導活性部位を調べるため、LPfer と LPsal を proteinase K または lipoproteinlipase で処理したところ、LPfer の細胞死誘導活性は lipoproteinlipase 処理で顕著な減少がみられた。

のに対し、LPsal の細胞死誘導活性は proteinase K 処理で顕著な減少がみられた。この結果から、LPfer の細胞死誘導は主にリピド部分が、また LPsal の細胞死誘導には主にタンパク質部分が関与していることが示唆された。ヒト由来マイコプラズマ *M. hominis*、*M. penetrans*、*M. pneumoniae* から同様に LP を調製し、細胞死誘導活性を検討したところ、*M. pneumoniae* の LP は LPfer と同等に強い細胞死誘導活性を有しており、また *M. penetrans* の LP も強い細胞死誘導活性を有していた。このことから、糖発酵性マイコプラズマが非発酵性のものよりも強い細胞死誘導活性を有している傾向が得られた。以上の結果から、ヒト由来マイコプラズマの LP は細胞死誘導活性を有しており、マイコプラズマ感染症において LP が重要な役割を果たしていることが示唆された。

細胞外 ATP は P2X 受容体によって認識され、短時間で強力にアポトーシスやネクローシスを誘導することが報告されている。そこで、LPfer や LPsal の誘導する細胞死における細胞外 ATP ならびに P2X 受容体の関与について調べた。まず、LP 刺激による細胞外液の ATP 濃度の変化について調べたところ、LP 刺激後、時間経過に伴って細胞外 ATP 濃度が上昇した。また、LP 刺激により細胞膜透過性の亢進がみられることから、ATP 放出が LP による細胞膜透過性の変化に伴って誘導されることが示唆された。さらに、LP による細胞死は細胞外に添加した ATP の濃度に依存的に増強されることがわかった。細胞外 ATP 受容体である P2X7 受容体のアンタゴニストである periodate-oxidized ATP によって LP によって誘導されるネクローシス、caspase-3 の活性化、さらには poly(ADP-ribose) polymerase の分解が阻害された。このことから、P2X7 受容体はネクローシスとアポトーシスの両者を誘導しうることが示された。以上の結果から、LP は細胞からの ATP 放出を誘導し、細胞外 ATP が P2X7 受容体を介して細胞死を誘導することが示された。

マイコプラズマの細胞膜リポタンパク質の構造を基に合成されたりポペプチド FSL-1 や MALP-2 はマクロファージの活性化を誘導することが報告されている。最近、これらのリポペプチドが TLR2 ならびに TLR6 によって認識され種々の細胞応答を誘導することが示されている。そこでマイコプラズマ由来リポペプチドが誘導するマクロファージ活性化において細胞外 ATP がどのような効果を示すかを調べた。ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞に対して FSL-1 や MALP-2 は濃度依存的に TNF- $\alpha$  産生を誘導したが、ATP を添加すると TNF- $\alpha$  産生誘導活性は増強され、500  $\mu$ M の ATP を添加した場合には約 2 倍に増加した。また、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 の mRNA レベルは FSL-1 や ATP 単独刺激の場合よりも増加していることが明らかとなった。また、IL-10 ではこのような効果はみられなかった。THP-1 細胞では細胞外 ATP 受容体、P2X1、P2X7、P2Y2、P2Y11 の mRNA 発現が確認されたが、これらの発現レベルは FSL-1 や ATP の影響を受けなかった。P2 受容体のアンタゴニスト PPADS ならびに periodate-oxidized ATP の影響を調べたところ、この両者は FSL-1 と ATP によって誘導された TNF- $\alpha$  産生を濃度依存的に阻害することがわかった。また、転写因子 NF- $\kappa$ B や AP-1 の阻害剤であるデキサメタゾン は FSL-1 と ATP によって誘導された TNF- $\alpha$  産生をほぼ完全に阻害

することが明らかになった。以上の結果から、細胞外 ATP はマイコプラズマの LP により誘導される炎症性サイトカイン産生を増強し、この増強効果は P2X7 受容体を介する転写因子 NF- $\kappa$ B や AP-1 活性化によるものであることが示唆された。

以上のように、マイコプラズマの LP は細胞死ならびにマクロファージ活性化誘導活性を有しているが、これらの活性には細胞外 ATP が密接に関わっている。よって、マイコプラズマ感染症においてこれらの因子が重要な役割を担っていることが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 柴 田 健一郎

副 査 教 授 中 村 太 保

副 査 教 授 田 村 正 人

## 学 位 論 文 題 名

### Involvement of extracellular ATP in mycoplasmal membrane-bound lipoproteins-induced cellular responses in leukocytes

(マイコプラズマの細胞膜リポタンパク質が誘導する  
白血球の細胞応答における細胞外 ATP の関与について)

申請者は既に出版された3筆頭論文 (impact factor 1.07 の2論文および4.20 の1論文) からなる原著引用論文を提出している。審査は柴田、中村、田村審査員出席のもとに、申請者に対し提出論文の内容と、それに関する口頭試問が行われた。

マイコプラズマは細胞壁を欠く微生物であり、肺炎、尿路感染症、関節炎等、ヒトの炎症性疾患に広く関与している。近年、マイコプラズマの細胞膜リポタンパク質がマクロファージや線維芽細胞を活性化して炎症性サイトカインの産生を誘導することが報告され、リポタンパク質がマイコプラズマ感染症において何らかの病因的役割を果たしていることが指摘されている。微生物感染症においては、微生物が宿主細胞に誘導する細胞死がその病態形成において重要な役割を果たす場合がある。本論文ではリポタンパク質のヒト白血球に対する細胞毒性について調べ、以下のことを明らかにした。

1. ヒト由来のマイコプラズマである *Mycoplasma fermentans* ならびに *M. salivarium* から調製したリポタンパク質は様々なヒト白血球細胞株に対してカスパーゼ依存性の細胞死を誘導した。また、本活性はリポタンパク質の受容体である Toll-like receptor (TLR) 2 に対する抗体により部分的に阻害されたことから、TLR2 が惹起するシグナル伝達経路が本活性発現に部分的に関与していることが示唆された。(Microbiol. Immunol. 46(4):265-276, 2002)
2. リポタンパク質の細胞死誘導活性は細胞外 ATP により増強され、また、ATP 受容体である P2X<sub>7</sub> アンタゴニストである periodate-oxidized ATP で阻害された。リポタンパク質はヒト白血球細胞株に対して細胞膜透過性を増強させ、細胞外への ATP の放出を誘導した。以上のことから、リポタンパク質の細胞死誘導活性には ATP の受容体である

P2X<sub>7</sub>受容体の関与が示唆された。微生物由来リポタンパク質の細胞死誘導活性に ATP が関与することを明らかにした最初の論文である。(Microbiol. Immunol. 46(10):667-675, 2002)

3. 細胞外 ATP はリポタンパク質の細胞死誘導活性だけでなく、リポタンパク質の N 末端領域の構造を基に合成したリポペプチドのマクロファージ活性化能も促進した。本研究は、炎症における微生物由来リポタンパク質の病因的役割を示唆しただけでなく、生物のエネルギー源である ATP が微生物感染を modify する可能性を示唆した点で高く評価されている。(Infect. Immun. 70(7):3586-3591, 2002)

以上のように、申請者はマイコプラズマのリポタンパク質が細胞死ならびにマクロファージ活性化能を有しており、また、これらの活性に細胞外 ATP と受容体 P2X<sub>7</sub> で誘導されるシグナル伝達経路が密接に関わっていることを明らかにした。リポタンパク質は微生物全般に存在することから、本研究成果はマイコプラズマ感染症だけでなく、微生物感染症全般におけるリポタンパク質の病因的役割を示唆している点で高く評価できる。

続いて、審査担当者から本研究およびその関連事項について下記のような種々の質問がなされた。

1. リポタンパク質の細胞死誘導活性とサイトカイン誘導活性はどのようにコントロールされているのか。
2. ATP 受容体の下流で caspase8 が動くシグナルがあるのか
3. ネクローシスがおきて、ATP が放出され、細胞死が誘導されたと考えられるのか
4. リンパ球や単球以外には細胞死を誘導しないのか
5. Toll-like receptor の細胞毒性との関与について
6. マイコプラズマの種類はどれぐらいあるのか

申請者はこれらの質問に対して適切に、しかも論理的に答えていた。

以上より、本論文内容が高く評価されるとともに、申請者は広い知識を有し、博士（歯学）を授与するのに値するものと判定された。