

学 位 論 文 題 名

The synthetic analogue of mycoplasmal lipoprotein
FSL-1 induces dendritic cell maturation
through Toll-like receptor 2.

(マイコプラズマ由来ジアシルリポペプチド FSL-1は
TLR2を介して樹状細胞の成熟を誘導する)

学位論文内容の要旨

[目的] *Mycoplasma salivarium* はヒト正常歯肉線維芽細胞、マクロファージ等を活性化し、interleukin-6 (IL-6)、IL-8 などの炎症性サイトカインの産生ならびに接着分子 intercellular adhesion molecule-1 の発現を誘導することが報告されており、その活性物質は細胞膜に結合しているリポタンパク質 (LP) であることが明らかとなっている。細胞膜から精製した分子量 44kDa の LP の活性部位は N 末端リポペプチド部分であり、その構造は S-(2,3-bispalmitoyloxypropyl)CGDPKHPKSFTEWVD であった。この構造を元に合成した FSL-1 [S-(2,3-bispalmitoyloxypropyl) CGDPKHPKSF] は Toll-like receptor2 (TLR2) で認識され、LP と同様に単球、マクロファージ、歯肉線維芽細胞などを活性化し、種々の炎症性サイトカインの産生を誘導する。TLR2 は微生物の持つ様々な分子パターンを認識する受容体であり、また、種々の免疫反応を増強するアジュバントレセプターとしても機能することが示唆されている。そこで、本研究では FSL-1 がアジュバント活性を有しているかを検討するために、自然免疫と獲得免疫を橋渡しする重要な抗原提示細胞の 1 つである樹状細胞 (DC) の FSL-1 による活性化機構を検討した。

[方法] 骨髄由来樹状細胞 (BMDC) は C57BL/6 (TLR2^{+/+}) および TLR2 ノックアウト (TLR2^{-/-}) マウス由来の骨髄細胞を granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) で分化させた。この BMDC を FSL-1 および *E. coli* LPS で刺激した後、経時的に CD80、CD86、MHC class II (MHC II) および CD11c の発現をフローサイトメーターで測定した。また、刺激後 12 時間ならびに 12 時間～36 時間刺激後の細胞培養上清中の IL-12、IL-10 および TNF- α 量を ELISA により定量した。

[結果・考察] DC は様々サブセットが存在し、特徴的細胞表面マーカー CD11c、CD11b、CD8 α 、B220 等によって分類されている。例えば、ランゲルハンス細胞の表現型は

CD11c⁺/CD11b⁺/CD8α⁻/B220⁻であり、plasmacytoid DCの表現型はCD11c[±]/CD11b⁻/CD8α[±]/B220⁺であることが知られている。GM-CSFで誘導したBMDCではTLR2^{+/+}およびTLR2^{-/-}マウスの骨髄細胞と比較してCD11cおよびCD11bの発現は増強されていたが、CD8αおよびB220は発現していなかった。このことから、骨髄細胞がGM-CSF刺激によってCD11c⁺/CD11b⁺/CD8α⁻/B220⁻のBMDCに分化したことが確認できた。

DCはナイーブCD4⁺T細胞を強力に活性化することが知られている。CD4⁺T細胞はDCのMHCIIを介した抗原提示のみでは活性化されず、その活性化にはCD80あるいはCD86といった補助刺激シグナルが必須である。そこで、BMDCをFSL-1およびLPSで12、36時間刺激し、CD80、CD86ならびにMHCIIの細胞表面での発現を調べた。TLR2^{+/+}由来BMDCでは、FSL-1およびLPS刺激によりCD80、CD86ならびにMHCIIの細胞表面での発現は濃度依存的および経時的に上昇しており、また、CD11cの発現は12時間刺激の時点では上昇していたが、36時間では低下していた。しかしながら、TLR2^{-/-}マウス由来のBMDCの、LPS刺激では同様な変化が見られたが、FSL-1刺激では見られなかった。CD11cはDCの貪食能に関っているという報告があり、DCは活性化の初期の段階では貪食細胞として機能するが、活性化の後期では貪食能は失われ、抗原提示細胞として機能することが知られている。したがって、FSL-1およびLPS刺激によるBMDC表面でのCD11cの変化は貪食細胞から抗原提示細胞に変化していることを示唆しているのかもしれない。

CD4⁺T細胞の活性化様式には、マクロファージなどを活性化することで細胞性免疫応答を引き起こすTh1応答とB細胞を活性化し抗体産生を促すことで体液性免疫応答を引き起こすTh2応答の2種類が知られている。DCがTh1ならびにTh2応答を誘導するためにはそれぞれIL-12ならびにIL-10の産生が必要である。そこで、TLR2^{+/+}およびTLR2^{-/-}由来BMDCをFSL-1およびLPSで刺激したときのTNF-α、IL-12ならびにIL-10の産生量を測定した。その結果、TLR2^{+/+}由来BMDCでは、FSL-1およびLPS刺激でIL-12及びTNF-αの産生が誘導された。一方、TLR2^{-/-}マウス由来BMDCのFSL-1刺激では、IL-12およびTNF-αの産生も誘導されなかったが、LPS刺激では誘導された。これらのことから、LPSおよびFSL-1はBMDCを活性化し、Th1応答を誘導するのではないかとということが示唆された。さらに、FSL-1はTLR2依存的にBMDCを活性化することがわかった。

このように、FSL-1がDCを活性化する能力が有していることから、FSL-1が*in vivo*においてもアジュバント活性を有しているのではないかと考えた。そこで、TLR2^{+/+}およびTLR2^{-/-}マウスを用いて、FSL-1ならびにLPSの共存下で、抗原として卵白リゾチーム(HEL)を腹腔内あるいは鼻腔内に投与し、HELに対する抗体の産生が増強されるかどうか

を調べた。TLR2^{+/+}では、抗 HEL IgG 抗体価は FSL-1 および LPS 共存下で HEL 単独投与に比べて有意に増強した。TLR2^{-/-}では FSL-1 による増強効果は見られなかったが、LPS による増強効果は見られた。さらに、抗 HEL IgG 抗体のサブタイプを調べたところ、Th2 型の IgG1 抗体が Th1 型の IgG2a 抗体よりも強く産生されていた。このように、FSL-1 は TLR2 依存的なアジュバント活性を有しており、さらに、Th2 応答を優位に誘導していることが示唆された。

このように、BMDC を *in vitro* で FSL-1 および LPS で刺激すると Th1 サイトカインが誘導されたが、*in vivo* では Th2 応答を引き起こすという正反対の結果が得られた。免疫応答は細胞だけではなく抗原の質・量、抗原の進入部位、生体内環境など多くの因子が複合的に作用することで引き起こされる。したがって、どのようなメカニズムで FSL-1 刺激により Th1 ならびに Th2 応答が誘導されるかについて現在検討している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 井 上 農夫男

副 査 教 授 柴 田 健一郎

副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

The synthetic analogue of mycoplasmal lipoprotein FSL-1 induces dendritic cell maturation through Toll-like receptor 2.

(マイコプラズマ由来ジアシルリポペプチド FSL-1は
TLR2を介して樹状細胞の成熟を誘導する)

審査は、審査担当者全員の出席の下に行われた。最初に申請者より提出論文の概要が説明され、その後、申請者に対し提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問が行われた。以下に、論文の要旨と審査の内容を述べる。

Mycoplasma salivarium はヒト正常歯肉線維芽細胞、マクロファージ等を活性化し、interleukin (IL)-6、IL-8 などの炎症性サイトカインの産生ならびに接着分子 intercellular adhesion molecule-1 の発現を誘導することが報告されており、その活性物質は細胞膜に結合しているリポタンパク質 (LP) であることが明らかとなっている。細胞膜から精製した分子量 44kDa の LP の活性部位は N 末端リポペプチド部分であり、その構造は S-(2, 3-bispalmitoyloxypropyl) CGDPKHPKSFTIEWD-であった。この構造を元に合成した FSL-1 [S-(2, 3-bispalmitoyloxypropyl) CGDPKHPKSF] は Toll-like-receptor 2 (TLR2) で認識され、LP と同様に単球、マクロファージ、歯肉線維芽細胞などを活性化し、種々の炎症性サイトカインの産生を誘導する。TLR2 は微生物の持つ様々な分子パターンを認識する受容体であり、また、種々の免疫反応を増強するアジュバントレセプターとしても機能することが示唆されている。そこで、本研究では FSL-1 がアジュバント活性を有しているかを検討するために、自然免疫と獲得免疫を橋渡しする重要な抗原提示細胞の 1 つである樹状細胞 (DC) の FSL-1 による活性化機構を検討した。

[材料と方法]

骨髄由来樹状細胞 (BMDC) は C57BL/6 (TLR2^{+/+}) および TLR2 ノックアウト (TLR2^{-/-}) マウス由来の骨髄細胞を granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) で分化させた。この BMDC を FSL-1 および *E. coli* 由来のリポポリサッカライド (LPS) で刺激した後、経時的に CD80、CD86、MHC class II (MHC II) および CD11c の発現をフローサイトメーターで測定した。また、刺激後 12 時間ならびに 12 時間～36 時間刺激後の細胞培養上清中

の IL-12、IL-10 および TNF- α を ELISA により定量した。

[結果と考察]

DC には種々のサブセットが存在し、特徴的細胞表面マーカー CD11c、CD11b、CD8 α 、B220 等によって分類されている。GM-CSF で誘導した BMDC では TLR2^{+/+} および TLR2^{-/-} マウスの骨髓細胞と比較して CD11c および CD11b の発現は増強されていたが、CD8 α および B220 は発現していなかった。このことから、骨髓細胞が GM-CSF 刺激によって CD11c⁺/CD11b⁺/CD8 α ⁻/B220⁻ の BMDC に分化したことが確認できた。

DC はナイーブ CD4⁺T 細胞を強力に活性化することが知られている。CD4⁺T 細胞は DC の MHC II を介した抗原提示のみでは活性化されず、その活性化には CD80 あるいは CD86 といった補助刺激シグナルが必須である。そこで、BMDC を FSL-1 および LPS で 12、36 時間刺激し、CD80、CD86 ならびに MHC II の細胞表面での発現を調べた。TLR2^{+/+} 由来 BMDC では、FSL-1 および LPS 刺激により CD80、CD86 ならびに MHC II の細胞表面での発現は濃度依存的および経時的に上昇しており、また、CD11c の発現は 12 時間刺激の時点では上昇していたが、36 時間では低下していた。しかしながら、TLR2^{-/-} マウス由来の BMDC の、LPS 刺激では同様な変化が見られたが、FSL-1 刺激では見られなかった。CD11c は DC の貪食能に関わっているという報告があり、DC は活性化の初期の段階では貪食細胞として機能するが、活性化の後期では貪食能は失われ、抗原提示細胞として機能することが知られている。したがって、FSL-1 および LPS 刺激による BMDC 表面での CD11c の変化は貪食細胞から抗原提示細胞に変化している可能性を示唆している。

CD4⁺T 細胞の活性化様式には、マクロファージなどを活性化することで細胞性免疫応答を引き起こす Th1 応答と B 細胞を活性化し抗体産生を促すことで体液性免疫応答を引き起こす Th2 応答の 2 種類が知られている。DC が Th1 ならびに Th2 応答を誘導するためにはそれぞれ IL-12 ならびに IL-10 の産生が必要である。そこで、TLR2^{+/+} および TLR2^{-/-} 由来 BMDC を FSL-1 および LPS で刺激したときの TNF- α 、IL-12 ならびに IL-10 の産生量を測定した。その結果、TLR2^{+/+} 由来 BMDC では、FSL-1 および LPS 刺激で IL-12 および TNF- α の産生が誘導された。一方、TLR2^{-/-} マウス由来 BMDC の FSL-1 刺激では、IL-12 および TNF- α の産生はともに誘導されなかったが、LPS 刺激では誘導された。

以上のことから、FSL-1 は TLR2 依存的に BMDC を活性化することが明らかになった。さらに、FSL-1 は BMDC を活性化し、Th1 応答を誘導する可能性が示唆された。

論文について概要が説明された後、各審査員より、本研究の背景、方法、結果、考察および関連の研究について質問がなされた。論文提出者はいずれの質問に対しても明確で的確な回答し、さらに今後の研究についても発展的な将来展望を示した。

試問の結果、本論文は口腔常在菌である *Mycoplasma salivarium* 由来のリポペプチド (FSL-1) が樹状細胞を活性化していることをはじめて明らかにした点において新規性が高く、今後の歯科医学の発展にも大きく貢献するものと評価した。さらに、学位申請者は、本研究を中心とした専門分野はもとより、関連分野についても十分な学識を有していることを審査員一同が認めた。

よって、学位申請者は博士(歯学)の学位を授与される資格を有するものと認めた。