

学 位 論 文 題 名

The diacylated lipopeptide FSL-1 enhances phagocytosis
of bacteria by macrophages through
Toll-like receptor 2-mediated signaling pathway

（ジアシルリポペプチド FSL-1は TLR2 媒介伝達機構を通して
マクロファージにより細菌の貪食を増加させる）

学位論文内容の要旨

Toll-like receptor (TLR)はマクロファージや樹状細胞などの貪食細胞に発現し、微生物の侵入を感知するセンサーとして、また、自然免疫系と獲得免疫系を橋渡しする分子として注目されている。しかしながら、自然免疫系で重要な役割を果たしている貪食細胞による微生物の排除における役割については不明な点が多く残されている。

そこで、本研究の目的は微生物の排除における TLR の役割を明らかにする事を目的とした。

マクロファージとしてヒト単球系細胞株THP-1細胞を用い、 5×10^5 個の細胞を24 wellプレートの1 wellに播種し、種々のTLRのリガンドで刺激する。24時間経過後にRPMI 1640のbase mediumで3回洗浄した後、THP-1細胞数の 5×10^6 個のAlexa488で標識した*S. aureus* (Sa) あるいは*E. coli* (Ec)熱処理菌体を加え、37℃で1時間貪食させる。フローサイトメーター(FCM)で解析する場合には、FCM用のチューブに移して、冷PBSで1回洗浄する。共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 解析する場合は、最終濃度が $10 \mu\text{g/ml}$ のconcanavalin A-Rhodamineで15分、室温で染色する。その後、PBSにてよく洗浄し、細胞表面に付着している菌体由来の蛍光の影響を取り除くために最終濃度 0.02%トリパンブルーにてクエンチング処理を行う。1%パラホルムアルデヒドで固定した後、FCMあるいはCLSMで貪食能を測定する。

微生物由来ジアシルリポペプチド FSL-1 は THP-1 細胞の貪食活性を濃度依存的に促進し、その活性は黄色ブドウ球菌由来ペプチドグリカン (PGN) ならびに大腸菌由来リポ多糖 (LPS) より強いことがわかった。また、THP-1 細胞

はグラム陰性 *Ec* よりグラム陽性 *Sa* を強く貪食した。グラム陽性菌の認識には TLR2 が深く関わっていること、さらに、FSL-1 が TLR2 のリガンドであることから、THP-1 細胞の貪食には TLR2 が関与しているのではないかと考えた。そこで、まず THP-1 細胞における TLR2 の発現を調べた。その結果、THP-1 細胞は細胞表面に TLR2 を強く発現しており、さらに、その発現レベルは protein kinase C の activator である phorbol myristate acetate 処理で増強されることがわかった。したがって、我々は THP-1 細胞に対する FSL-1 の貪食促進活性において TLR2 が重要な役割を果たしていると考え、TLR2⁺マウスのマクロファージを用いて FSL-1 貪食促進活性を調べた。野生型の C57BL/6 マウスの腹腔浸出マクロファージ(PEM)の貪食能は FSL-1 刺激で増強されたが、TLR2⁺マウスの PEM の貪食能は増強されなかった。この結果は、FSL-1 による貪食促進活性には TLR2 が重要な役割を果たしていることを示唆している。次に、TLR2 自身が食作用受容体である可能性が考えられるので、そのことを明らかにするために、chinese hamster ovary (CHO) 細胞に TLR2 を遺伝子導入し、貪食活性を調べた。陽性コントロールとしては食作用受容体であることが明らかにされている CD14 を遺伝子導入したトランスフェクタントを用いた。その結果、TLR2 を発現させた CHO 細胞はこれらの細菌を貪食しなかったが、CD14 発現させた CHO-CD14 細胞は細菌を貪食した。したがって、TLR2 自身は貪食受容体としては機能しないものと推測された。FSL-1 の貪食促進活性はアクチンの重合阻害剤である cytochalasin-D、PI-3 kinase の阻害剤である wortmannin ならびに p38 MAPK の阻害剤である SB203580 で濃度依存的に阻害された。さらに、THP-1 細胞の FSL-1 刺激により、PI-3 kinase ならびにその下流にある AKT の活性化ならびに MAPK である p38 ならびに JNK の活性化が観察された。さらに、FSL-1 刺激により THP-1 細胞において macrophage scavenger receptor (MSR1), CD36, DC-SIGN、Dectin-1 等の食作用受容体の発現が増強された。また、DC-SIGN, MSR1 が遺伝子導入されたヒト胎児腎臓 293 細胞はこれらの細菌を貪食し、そして SB203580, wortmannin ならびに cytochalasin-D はこれらの貪食を阻害した。

以上の結果から、FSL-1 は TLR2 を介してマクロファージに MSR1、CD36、DC-SIGN、Dectin-1 等の食作用受容体の発現が増強し、その結果マクロファージの貪食能が増強されたものと推測された。さらに、本研究では微生物の侵入を感知する TLR2 はそれ自身では貪食受容体としては機能しないことが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則

副 査 教 授 柴 田 健一郎

副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

The diacylated lipopeptide FSL-1 enhances phagocytosis of bacteria by macrophages through Toll-like receptor 2-mediated signaling pathway

(ジアシルリポペプチド FSL-1は TLR2 媒介伝達機構を通して
マクロファージにより細菌の貪食を増加させる)

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。

審査論文の概要は、以下の通りである。

本研究は、マクロファージや樹状細胞などの貪食細胞に発現し、微生物の侵入を感知するセンサーとして、また自然免疫系と獲得免疫系を橋渡しする分子として注目されている Toll-like receptor (TLR) の微生物の排除における役割について検討したものである。

マクロファージとしてヒト単球系細胞株 THP-1 細胞を用いた 5×10^5 個の細胞を 24 well プレートの 1 well に播種し、種々の TLR のリガンドで刺激し、24 時間経過後に RPMI 1640 の base medium で 3 回洗浄した後、THP-1 細胞数の 5×10^6 個の Alexa488 で標識した *S. aureus* (*Sa*) あるいは *E. coli* (*Ec*) 熱処理菌体を加え、37°C で 1 時間貪食させた。フローサイトメーター (FCM) で解析する場合には、FCM 用のチューブに移して、冷 PBS で 1 回洗浄した。共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 解析の場合は、最終濃度が $10 \mu\text{g/ml}$ の concanavalin A-Rhodamine を用いて 15 分、室温で染色した。その後、PBS にてよく洗浄し、さらに細胞表面に付着している菌体由来の蛍光の影響を取り除くために、最終濃度が 0.02% のトリパンブルーを含む 1% パラホルムアルデヒド溶液で固定した後、FCM あるいは CLSM で貪食能を測定した。

最初に、THP-1 細胞の貪食活性に対する TLR のリガンドの効果を調べ、微生物由来ジアシルリポペプチド FSL-1 は THP-1 細胞の貪食活性を濃度依存的に促進し、その活性は黄色ブドウ球菌由来ペプチドグリカン (PGN) ならびに大腸菌由来リポ多糖 (LPS) より強いこと、ならびに THP-1 細胞はグラム陰性 *Ec* よりグラム陽性 *Sa* を強く貪食するこ

とを明らかにした。グラム陽性菌の認識には TLR2 が深く関わっていることが知られており、さらに FSL-1 が TLR2 のリガンドであることから、THP-1 細胞の食食には TLR2 が関与していると仮定し、THP-1 細胞における TLR2 の発現を調べた。その結果、THP-1 細胞は細胞表面に TLR2 を強く発現しており、その発現レベルは protein kinase C の activator である phorbol myristate acetate 処理で増強されることを明らかにした。さらに、THP-1 細胞に対する FSL-1 の食食活性の促進における TLR2 の役割を知るため、TLR2⁺マウスのマクロファージを用いて FSL-1 食食活性促進効果を調べた。野生型の C57BL/6 マウスの腹腔浸出マクロファージ (PEM) の食食能は FSL-1 刺激で増強されたが、TLR2⁺マウスの PEM の食食能は増強されないことを確認し、FSL-1 による食食活性の促進には TLR2 が重要な役割を果たしていることを明らかにした。次に、TLR2 自身が食作用受容体であるか否かを知るため、chinese hamster ovary (CHO) 細胞に TLR2 を遺伝子導入し、食食活性を調べた。食作用受容体であることが明らかにされている CD14 を遺伝子導入した CHO-CD14 細胞は細菌を食食したが、TLR2 を発現させた CHO 細胞はこれらの細菌を食食しないことを確認し、TLR2 自身は食食受容体としては機能しないことを明らかにした。

FSL-1 の食食活性の促進はアクチンの重合阻害剤である cytochalasin-D、PI-3 kinase の阻害剤である wortmannin ならびに p38 MAPK の阻害剤である SB203580 で濃度依存的に阻害された。一方、THP-1 細胞の FSL-1 刺激により、PI-3 kinase やその下流にある AKT の活性化、ならびに MAPK である p38 や JNK の活性化が観察され、さらに FSL-1 刺激により THP-1 細胞において macrophage scavenger receptor (MSR1)、CD36、DC-SIGN、Dectin-1 等の食作用受容体の発現が増強された。また、DC-SIGN、MSR1 が遺伝子導入されたヒト胎児腎臓 293 細胞はこれらの細菌を食食した。

以上の結果から、FSL-1 は TLR2 を介してマクロファージに MSR1、CD36、DC-SIGN、Dectin-1 等の食作用受容体の発現を増強させることにより、マクロファージの食食能を増強させるものと結論した。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。

主な質問事項は、1) オプソニン化による食食はどのように排除したか、2) マクロファージの採取法、3) TLR2 が食食レセプターに与える影響、4) phagocytosis と phagocytic activity の違い、5) MSR1 や DC-SIGN を増強させたマクロファージにおいて *Sa* と *Ec* の食食能が大きく異なるのは何故か、等であった。いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、FSL-1 によるマクロファージの食食能の増強は TLR のリガンドである FSL-1 が TLR2 を介してマクロファージに MSR1、CD36、DC-SIGN、Dectin-1 等の食作用受容体の発現を増強させることによるものであることを明らかにし、また TLR2 それ自身は食食受容体として機能していないことを確認した点が高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた。