

学位論文題名

脊椎動物における自然免疫系の分子進化と 多様性に関する研究

学位論文内容の要旨

(背景と目的)

生物は病原微生物に対抗するために生体防御機構を備えている。この生体防御機構は、獲得免疫と自然免疫の2つに大別され、全ての生物には自然免疫が備わっているが、獲得免疫は魚類以上の高等動物のみ持っている機構である。近年、自然免疫は Toll-like receptor (TLR) の発見から、獲得免疫と密接に相互作用していることが明らかとなり、生体防御機構としての自然免疫の重要な役割が注目されている。生物の進化の過程で初めて獲得免疫を備えた動物は脊椎動物の魚類であると考えられるが、これまでの研究から魚類における獲得免疫は高等な哺乳類に比べ非常に未熟である。よって、魚類は未熟な獲得免疫を補うように強力な自然免疫機構を発達させたと考えられる。魚類の中でも硬骨魚類・フグのゲノムプロジェクトが早くに完了し、そのドラフト配列が公開され、当研究室においてフグにもヒトの TLR1~10 に相当する遺伝子が存在することがデータベース解析により予想された。しかし、ヒトの TLR ファミリーと比較して、TLR4 が存在しないこと、可溶型 TLR5 が存在すること、そしてヒトには存在しない TLR21 及び TLR22 が存在するという相違点が明らかになった。これら TLR21 と TLR22 のリガンドやその機能は不明である。そこで本研究では、何故ヒトには TLR21 と TLR22 が存在しないのかという疑問も含め、昆虫からヒトに至るまでの生物が持つ自然免疫機構の系統進化を考察する目的で TLR21 と TLR22 の機能解析を行った。

(方法と結果)

第一に、フグ TLR21 (fgTLR21) の解析を行った。fgTLR21 をクローニングし、ヒト CD4 とのキメラ体を作製した。ヒト培養細胞である HEK293 細胞に発現させ、TLR21 を介した細胞内シグナル伝達活性をルシフェラーゼアッセイにて解析したところ、fgTLR21 は NF- κ B を活性化し、IFN- β promoter も若干活性化した。これを指標としてリガンド探索を行ったところ、ヒトの細胞またはサカナの細胞において fgTLR21 は大腸菌を認識し、さらにグラム陰性菌由来ペプチドグリカン(PGN)を認識して主に NF- κ B を活性化することが明らかとなった。また、Yeast two-hybrid 法と免疫沈降法の結果から、fgTLR21 はアダプター分子として fgMyD88 と fgTICAM-1 と相互作用することが明らかとなった。さらに、免疫染色の結果から、fgTLR21 は細胞表面に局在しており、刺激が入ると細胞内へ移行してアダプター分子と会合することも明らかにした。

第二に、fgTLR22 の機能解析を行った。fgTLR22 をクローニングして CD4 とのキメラ体を HEK293 細胞へ発現させると、fgTLR22 を介して IFN- β promoter のみを活性化した。リガンド探索を行った結果、ヒトの細胞またはサカナの細胞において fgTLR22 はウイルス由来 dsRNA を認識して、type-I IFN を活性化することで抗ウイルス活性を示した。また、免疫沈降と免疫染色の結果から、fgTLR22 はアダプター分子として TICAM-1 依存的に type-I IFN

を活性化していることが明らかとなった。これまでの研究から、dsRNA を認識する TLR として、TLR3 が報告されている。そこで、次は fgTLR3 のクローニングをして同様の実験を行ったところ、fgTLR22 と同じ dsRNA 認識機能を持っていることが明らかとなった。しかし、免疫染色の結果から、fgTLR22 は細胞表面、fgTLR3 は細胞質内に局在しており、異なった場所で dsRNA を探索していることが明らかとなった。

第三に、fgTLR22 が抗ウイルス活性を持つことが明らかになったので、fgTLR22 が哺乳類において機能し得るかを検討するために fgTLR22 トランスジェニックマウス(fgTLR22tg)を作製し、生体内における fgTLR22 の機能解析を行った。Wild type (WT)と fgTLR22tg に poly(I:C)を腹腔内投与し、血清中の様々なサイトカイン産生量を ELISA にて測定したところ、WT に比べ fgTLR22tg の方が多く産生されていた。また、poly(I:C)刺激した骨髄樹状細胞(BMDC)や胎児繊維芽細胞 (MEF 細胞) においても fgTLR22tg の方が WT に比べて type-I IFN 産生が多かった。次に、増殖過程において dsRNA ができるポリオウイルスの受容体 (PVR)を発現させた huPVR トランスジェニックマウス(huPVRtg)と fgTLR22tg を交配させて、huPVR/fgTLR22tg を作製した。このマウスを用いてポリオウイルス感染実験を行った。その結果、huPVR/fgTLR22tg はコントロールのマウスに比べて、ポリオウイルス感染に対してのみ抵抗性を示した。また、BMDC や MEF 細胞にポリオウイルスを感染させると、fgTLR22 を介して type-I IFN をより活性化し、哺乳類の生体内においても fgTLR22 は機能し得ることが明らかとなった。

(考察)

本研究結果から、TLR21 は細胞表面でグラム陰性菌由来 PGN を認識して主に NF- κ B を活性化し、TLR22 は細胞表面でウイルス由来 dsRNA を認識して type-I IFN を活性化することが明らかとなった。ヒトでは、グラム陰性菌由来 PGN を認識する受容体として細胞質内に存在する NOD1 が報告されている。サカナのゲノム上にも NOD1-like protein は存在するが、その機能等はまだ不明である。また、ヒトでは、dsRNA を認識する受容体として、エンドソームに局在している TLR3 以外に RIG-I/MDA5 が細胞質内で dsRNA を認識することが明らかとなっている。さらに、腸管上皮細胞に発現している TLR3 はエンドソームではなく、細胞表面に局在して機能していることも報告されている。このことから、ヒトでは TLR3 が細胞質内と細胞表面に分担して dsRNA を認識していることが考えられ、ヒトにおいて細胞表面に局在している TLR3 は進化の過程で TLR22 の代わりを担っていることが示唆される。サカナには MDA5 は存在するが RIG-I は存在せず、サカナにおける MDA5 の機能はまだ不明である。これらのことから、サカナではヒトよりも獲得免疫が未熟なため、豊富な TLR を持つことで様々な病原体を認識することができ、サカナからヒトへと進化する過程で獲得免疫が発達していくと共に自然免疫もそれに対応する形で進化していったと考えられる。また、TLR22 をマウスに入れることで特定のウイルス感染に抵抗性が示されたことから、魚類の免疫系が哺乳類で劣っている免疫系をカバーできたことになり、ヒトの感染症に対する治療戦略に使えるかもしれない。

(結論)

昆虫からヒトに至る生物は生体防御として自然免疫機構を備えており、ヒトへの進化の過程でどのように発達させていったかを解明することは必要不可欠である。本研究から、哺乳類と魚類において異なった TLR 機構が存在することが浮き彫りとなり、免疫系の進化は環境微生物の進化と密接な関係を持っていることが考えられた。そして、これが感染の種間トロピズムを規定する一因である可能性が考えられるという結論に至った。

学位論文審査の要旨

主査	教授	岩永敏彦
副査	教授	小池隆夫
副査	教授	有川二郎
副査	教授	西村孝司
副査	教授	志田壽利

学位論文題名

脊椎動物における自然免疫系の分子進化と 多様性に関する研究

近年、自然免疫は Toll-like receptor (TLR) の発見から、獲得免疫と密接に相互作用していることが明らかとなり、生体防御機構としての自然免疫の重要な役割が注目されている。下等な脊椎動物では、未熟な獲得免疫を補うべく強力な自然免疫機構を発達させたと考えられる。申請者の研究室において行われたデータベース解析により、サカナにもヒトの TLR1~10 に相当する遺伝子が存在することが予想された。同時に、フグにはヒトには存在しないフグ TLR21 (fgTLR21) およびフグ TLR22 (fgTLR22) が存在することが明らかになった。そこで本研究では、これら未知の TLR21 と TLR22 の機能解析を行った。

まず、fgTLR21 の機能解析を行った。fgTLR21 は大腸菌を認識し、さらにグラム陰性菌由来 PGN を認識して主に NF- κ B を活性化することが明らかとなった。また、fgTLR21 は、アダプター分子として fgMyD88 と fgTICAM-1 と相互作用することが示された。さらに、fgTLR21 は細胞表面に局在しており、刺激が入ると細胞内へ移行してアダプター分子と会合することも明らかにした。

つぎに、fgTLR22 の機能解析を行った。fgTLR22 はウイルス由来 dsRNA を認識して、TICAM-1 依存的に type-I IFN を活性化することで抗ウイルス活性を示した。TLR3 との違いを調べると、fgTLR22 は細胞表面、fgTLR3 は細胞質内に局在しており、異なった場所で機能していることが明らかとなった。

最後に、fgTLR22 が哺乳類において機能し得るかを検討するために、fgTLR22 トランスジェニックマウス (fgTLR22tg) の機能解析を行った。Poly(I:C) に対する反応を調べたところ、WT に比べ fgTLR22tg の方が type-I IFN 産生が多かった。次に、ポリオウイルスを用いて感染実験を行った結果、fgTLR22tg はコントロールのマウスに比べて、ポリオウイルス感染に対してのみ抵抗性を示した。

以上の研究結果から、サカナではヒトよりも獲得免疫が未熟なため、豊富な TLR を持つことで様々な病原体を認識することができ、サカナからヒトへと進化する過程で獲得免疫が発達していくと共に自然免疫もそれに対応する形で進化していったと思われる。また、哺乳類と魚類において異なった TLR 機構が存在することが浮き彫りとなり、免疫系の進

化は環境微生物の進化と密接な関係を持っていることが考えられた。

非公開の審査会は、平成21年2月9日午後4時00分より医学研究科組織細胞学分野図書室において、発表約30分、質疑応答が約30分間行われた。主な質問は以下の通りである。①ウイルスに対する反応性の違いの理由：ヒト由来ではなくマウス由来のウイルスに対してはもっと強い効果が現れるのでは？条件設定を変えたり（ウイルスの摂取量など）、評価法を変えることで（生死以外の評価）、より明瞭な効果が期待できないか。②TLR22によるウイルス由来 dsRNA 認識において、インフルエンザウイルスを感染させた場合とポリオウイルスを感染させた場合とで異なっていた。どちらのウイルスも増殖過程で dsRNA を作るはずだが、なぜウイルスの種によって反応性が違うのか？dsRNA の長さの違いによって TLR22 と TLR3 の認識の違いがなぜ起こるのか？TLR9 において CPG に見られるメチル化・非メチル化のわずかな違いをどうやって区別できるのか？③魚類から哺乳動物への進化につれ、自然免疫は縮小され、かわりに獲得免疫が充実することの背景にあるものは？TLR のリガンド認識においては、自然免疫はほどほどでよく、あとは獲得免疫にまかせればよいと考えられないか？④ポリオウイルス感染において TLR22 を介したウイルス抑制遺伝子が腎臓で増加するのはなぜか？⑤今後の発展性について：TLR のリガンドを利用して免疫系を活性化させることで養殖魚の感染防御などに応用できないか。

いずれの質問に対しても、申請者は自身の研究成果を元に、過去の文献および未発表所見を加えて、おおむね適切に回答した。この論文は、硬骨魚特有の TLR の存在意義を明らかにし、ひいては哺乳類における自然免疫の理解を推し進めた点で高く評価され、免疫学の発展に貢献するものとして期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。