

The role of Toll-like receptor 2 in bacterial phagocytosis

(細菌貪食における Toll 様受容体 2 の役割)

学位論文内容の要旨

微生物感染時において、免疫細胞による細菌侵入の感知ならびに貪食による微生物の排除は免疫応答を行う上で重要な機能である。貪食細胞であるマクロファージ (MØ) や樹状細胞 (DC) は病原因子の特異的な分子パターン (PAMPs) を認識するパターン認識受容体として主に Toll 様受容体 (TLR) ファミリーを、また微生物貪食を媒介する食作用受容体として C-タイプレクチン受容体やスカベンジャー受容体などの一群のタンパク質を発現している。TLR はウイルス、細菌ならびに真菌由来の様々な PAMPs を感知しシグナル伝達の媒体となっており、TLR に媒介される自然免疫応答の賦活化は抗原特異的な獲得免疫応答につながる。したがって、TLR は自然免疫応答ならびに獲得免疫応答の樹立において非常に重要な受容体である。一方、微生物貪食機構もまた自然免疫応答ならびに獲得免疫系への抗原情報の受け渡しに不可欠である。なぜならば、侵入した微生物は貪食細胞に結合し取り込まれ、分解されることで排除され、また一部は抗原プロセッシングを受け T 細胞へ提示されるからである。このように、微生物の感知ならびに貪食は免疫応答の中心的な役割を担うにも関わらず、両者のクロストークに関する報告はわずかであり、MØ や DC による微生物貪食における TLR の役割に関しては不明な点が多く残されている。最近、我々は *Mycoplasma salivarium* 由来ジアシルリポペプチドである FSL-1 が TLR2 媒介性シグナル伝達経路を介して MØ による細菌貪食活性を促進することを明らかにしている (M. Mae *et al.*, FEMS Immunol Med Microbiol 49, 398, 2007)。本知見から、MØ による細菌貪食活性には TLR2 媒介性シグナル伝達経路を介するスカベンジャー受容体ならびに C タイプレクチン受容体の発現増強が部分的に関与する一方で、TLR2 そのものは食作用受容体としては機能しないということが推測されている。

スカベンジャー受容体や C タイプレクチン受容体などの食作用受容体は、細胞接着、抗原認識や細菌貪食、あるいは抗原提示に至るまで、様々な細胞性機能に関与していることがよく知られている。特に、DC-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) はよく研究されており、ウイルス、細菌ならびに真菌などの微生物の受容体として機能している。しかしながら、DC-SIGN に媒介される細菌貪食機構

の詳細は不明である。本研究では細菌貪食における DC-SIGN の役割を研究することを目的とした。非貪食細胞である HEK293 細胞に DC-SIGN 遺伝子を安定的に発現させた細胞株を樹立し、*Escherichia coli* に対する貪食活性を検証した。本貪食活性には Raf-1 キナーゼ、Syk キナーゼならびに転写因子である NF- κ B などのシグナル伝達分子が必要であることが示唆された。また、DC-SIGN の糖質認識ドメインにおける Ca^{2+} イオン結合部位が DC-SIGN 媒介性細菌貪食ならびに DC-SIGN の重合に関与していることが示唆された。

抗菌薬はウイルス、細菌ならびに真菌などの微生物に対する化学療法に対し革新的な貢献をもたらしたが、一方で、抗菌薬の濫用は薬剤耐性菌の感染を増加するリスクを孕んでいる。そのため、抗菌薬療法に加え、新規の抗微生物療法が必要とされている。Resveratrol (*trans*-3, 4', -5-trihydroxystilbene) は赤ブドウ、ベリー類ならびにピーナッツなどの様々な植物に含まれるフィトアレキシン／ポリフェノール複合体である。Resveratrol の有する薬理的効果には抗ガン作用、抗炎症作用ならびにストレス抵抗性の増強などの様々な作用が含まれていることが多くの研究で明らかとなっている。しかしながら、Resveratrol の及ぼす細菌貪食ならびに TLR 媒介性シグナル伝達への影響に関してはほとんど報告がない。そこで、本研究では Resveratrol が M ϕ による細菌貪食に影響を与えるか、また、TLR2 下流で活性化される転写因子 NF- κ B 活性に影響を与えるかを検証した。Resveratrol は TLR2 リガンドである FSL-1 の刺激の有無に関わらず、M ϕ による細菌貪食活性を濃度依存的に阻害した。Resveratrol はまた、TLR2 下流で活性化される NF- κ B の核移行ならびに活性化を阻害した一方、M ϕ による炎症亢進性サイトカインである TNF- α の産生も阻害した。さらに、M ϕ において TLR2 媒介性シグナル伝達下流で増強したスカベンジャー受容体ならびに C タイプレクチン受容体の発現もまた、Resveratrol の処理によって減少した。以上から、Resveratrol は食作用受容体の発現ならびに NF- κ B 活性を阻害することにより M ϕ による細菌貪食活性を阻害することが示唆された。

これらの知見から、M ϕ における細菌貪食活性では TLR2 シグナル伝達経路に媒介される食作用受容体の発現調節と個々の受容体下流における貪食活性化シグナル、ならびに細胞表面における受容体の発現様式が重要な役割を担っていることが示唆された。さらに、Resveratrol は TLR2 媒介性シグナル伝達ならびに食作用受容体の発現を阻害することによって、M ϕ における細菌貪食を阻害する薬理学的効果を有することが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 柴 田 健一郎

副 査 教 授 進 藤 正 信

副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

The role of Toll-like receptor 2 in bacterial phagocytosis

(細菌貪食における Toll 様受容体 2 の役割)

申請者は既に出版された 2 筆頭論文 (impact factor 4.390 および 2.749 の論文) からなる原著引用論文を提出している。審査は柴田、進藤ならびに田村審査員出席のもとに、申請者に対し提出論文の内容に関する口頭試問が行われた。

自然免疫応答ならびに獲得免疫応答の樹立において、Toll 様受容体 (TLR) による微生物侵入の感知ならびに貪食による微生物の排除は重要な役割を担うが、両者のクロストークについては不明な点が多い。最近、我々は *Mycoplasma salivarium* 由来ジアシルリポペプチドである FSL-1 が TLR2 シグナル伝達経路を介してマクロファージ (M ϕ) による細菌貪食活性を増強することを明らかにした (FEMS Immunol Med Microbiol 49(3):398-409)。同貪食増強活性には TLR2 シグナル伝達を介するスカベンジャー受容体 (SR) ならびに C タイプレクチン受容体 (CLR) の発現増強の関与が示唆された。本論文では、赤ワインポリフェノールである Resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene; RESV) が TLR2 シグナル伝達ならびに細菌貪食に与える影響、ならびに CLR である dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) に媒介される細菌貪食について調べ、以下のことを明らかにした。

1. RESV は、FSL-1 刺激の有無に関わらず、M ϕ による細菌貪食活性を濃度依存的に阻害した。RESV はまた、TLR2 下流で活性化される NF- κ B 活性を阻害した一方、M ϕ による炎症亢進性サイトカインである TNF- α の産生を阻害した。M ϕ において TLR2 シグナル下流で増強した SR ならびに CLR の発現もまた、RESV の処理によって減少した。本研究は既存の抗炎症薬に変わる新規薬剤としての可能性を示唆した点で高く評価される。(Antimicrob Agents Chemother 52(1): 121-7, 2008)

2. DC-SIGN安定的発現型HEK293細胞の*Escherichia coli*に対する貪食活性はRaf-1、SykならびにNF- κ Bなどのシグナル伝達分子の阻害剤での処理により濃度依存的に阻害された。また、DC-SIGNの糖質認識ドメイン、Neck領域ならびにLLモチーフの変異体を作製し野生型DC-SIGNと比較したところ、これらの部位がDC-SIGN媒介性細菌貪食ならびにDC-SIGNの四量体化に関与していることが示唆された。(Biochem Biophys Res Commun 377(2): 367-72, 2008)

以上のように、申請者はRESVがTLR2シグナル伝達ならびにM ϕ における細菌貪食を阻害することを明らかにし、また、DC-SIGN媒介性細菌貪食においては種々のシグナル伝達分子が関与し、かつ同受容体の発現様式が重要であることを明らかにした。TLRシグナル伝達ならびに貪食作用を含む自然免疫応答の調節作用に注目している点で、新規の抗菌薬ならびに抗炎症薬の開発の可能性を示唆しているため、本論文は高く評価できる。

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質問がなされた。

1. TLR2ノックアウトマウス由来腹腔滲出M ϕ で貪食活性が低下した理由は何か。
2. M ϕ においてFSL-1刺激でDectin-1のmRNAの発現が顕著に増加した一方で、非貪食細胞に遺伝子導入しても貪食活性が生じないのはなぜか。
3. p38 MAPKならびにSykなどのシグナル伝達物質について調査した理由と貪食における役割は何か。
4. 数ある転写因子の中でなぜNF- κ Bが貪食活性制御の中心的役割を担うと考えられるか。
5. DC-SIGNのCa²⁺イオン結合部位の欠失変異体は、野生型DC-SIGN発現株に対してドミナント・ネガティブ現象を起こさせ得るか。同変異体の細胞表面での発現状態について。

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、申請者は研究遂行に十分な能力を有しており、博士（歯学）を授与するのに値するものと判定された。