

学位論文題名

Involvement of suppressor of
cytokine signaling-1-mediated degradation of
MyD88-adaptor-like protein in the suppression of
TLR2-mediated signaling by dendritic cell-specific
ICAM3 grabbing nonintegrin-mediated signaling

(Dendritic cell-specific ICAM3 grabbing nonintegrin による
TLR2のシグナルの抑制における suppressor of cytokine signaling-1を
介した MyD88-adaptor-like protein の分解の関与)

学位論文内容の要旨

自然免疫系では、マクロファージ、好中球そして樹状細胞(DC)が Toll-like receptor (TLRs)のようなパターン認識レセプターで微生物の侵入を感知した後、貪食し、細胞内小胞で破壊することによって排除されている。TLRs は、現在までに 10 種類以上同定されており、リボ多糖 (LPS)、ペプチドグリカン、リポタイコ酸、リポタンパク質、リポペプチドといった pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)を認識する。さらに、TLRs による認識シグナルが抗原特異的な獲得免疫の誘導に必須な抗原提示の際の補助刺激シグナル分子の発現も制御している。すなわち、TLRs は自然免疫と獲得免疫との橋渡しを媒介する重要なレセプターでもある。我々は、これまでに TLR2 シグナルが貪食受容体としての MSR1 (macrophage scavenger receptor)や CD36 などのスカベンジャー受容体や、DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM3 grabbing nonintegrin)や dectin-1 といった C-type lectin の発現を増強することにより貪食能を活性化することを報告している。今回は逆に、貪食レセプターの 1 つである DC-SIGN に注目し、DC-SIGN を介する貪食シグナルが TLR2 の認識シグナルにどのように影響するのか検証した。DC-SIGN は、主に DC に発現している約 44kDa のⅡ型の膜タンパク質でカルシウム依存的に糖と結合する C-type lectin である。DC-SIGN は接着分子としての役割を担っており、DC の血管外遊走の際の足がかりとなり、また、抗原提示の際に DC と T 細胞接着においても重要な役割を果たしている。

マウス DC として A/J mouse 由来の XS106 細胞を用いた。ヒト DC は、末梢血より単球を分離し、GM-CSF および IL-4 により分化させた樹状細胞 (MDDC)を用いた。TLR2 リガンドとしては、*Mycoplasma salivalium* 由来の合成ジアシルリポペプチド FSL-1、DC-SIGN または DC-SIGN のマウスホモログ SIGNR1 のリガンドとしては Mannonanose-di-(N-acetyl-D-glucosamine) (以下 Man9)および、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis* Aoyama-B)の細胞外壁の構成成分である

Lipoarabinomannan (以下 ManLAM) を用いた。XS106 細胞を FSL-1 で刺激した際のサイトカイン (TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-10) の産生はリアルタイム PCR 法ならびに ELISA 法にて評価した。

まず, XS106 細胞に機能的な TLR2 ならびに SIGNR1 を発現していることを確認した。XS106 細胞を FSL-1 で刺激したところ, TNF- α , IL-6, IFN- γ ならびに IL-10 産生は濃度依存的に増加したが, Man9 あるいは ManLAM との共刺激では, FSL-1 による TNF- α , IL-6 ならびに IFN- γ 誘導活性は有意に抑制された。しかしながら, 炎症抑制性のサイトカインである IL-10 誘導活性は抑制されなかった。

これらのサイトカインの産生は転写因子 NF- κ B で制御されているので, XS106 細胞に NF- κ B ルシフェラーゼレポーター遺伝子を導入し, FSL-1 単独あるいは FSL-1 と Man9 との共刺激による NF- κ B の活性化を調べた。NF- κ B は FSL-1 刺激で濃度依存的に活性化されたが, Man9 との同時刺激で活性化が抑制された。さらに, SIGNR1 を RNAi 法によりノックダウンしたところ, FSL-1 と ManLAM の共刺激による TNF- α と IL-6 産生抑制活性は有意に消失した。さらに, ヒトの DC である MDDC を用いて同様な実験を行ったところ, XS106 細胞と同様な結果が得られた。DC-SIGN と TLR2 の細胞表面での存在状態を調べるために, ヒト胎児腎臓由来の HEK293 細胞に FLAG タグをつけた TLR2 を安定発現させて, DC-SIGN 遺伝子を導入し, 免疫沈降法で確認した。その結果, DC-SIGN はテトラマーを形成した状態で TLR2 と会合していることが判明した。また, XS106 細胞においても TLR2 と SIGNR1 は会合し, MDDC においても TLR2 と DC-SIGN が会合していた。最近, 結核菌の感染において, サイトカインシグナルの調節因子である suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) が DC-SIGN による TLR2 シグナルの抑制に関与していることが報告された。そこで, 我々も DC-SIGN による TLR2 を介したサイトカイン産生の負の調節には SOCS-1 が関与しているのではないかと考え, まず, XS106 細胞を FSL-1 あるいは ManLAM の単独ならびに同時に刺激し, SOCS-1 の発現を調べた。その結果, 単独ならびに同時刺激共に時間依存的に SOCS-1 の発現が増強し, さらに, SIGNR1 は SOCS-1 と会合していることがわかった。次に, SOCS-1 を RNAi 法でノックダウンしたところ, ManLAM による FSL-1 刺激によるサイトカイン産生抑制活性が有意に減弱した。TLR4 の下流の MyD88 依存的な経路において SOCS-1 が TLR4 下流のアダプター分子である MyD88-adaptor-like protein (Mal) をユビキチン化し, プロテアゾームで分解することが報告されている。そこで, SIGNR1 による TLR2 シグナルの抑制にも同様なことが起こっているのではないかと推測し, FSL-1 と ManLAM の共刺激で TLR2 下流シグナル Mal の分解を調べた。その結果, FSL-1 と ManLAM の単独ならびに同時刺激で, SOCS-1 の発現が増強し, さらに, 同時刺激では明らかに Mal の分解が起こっていることが確認された。

以上の結果から, TLR2 シグナルの DC-SIGN シグナルによる抑制活性では, SOCS-1 による TLR2 下流のアダプター分子である Mal の分解が重要な役割を果たしていることが示唆された。

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

Involvement of suppressor of cytokine signaling-1-mediated degradation of MyD88-adaptor-like protein in the suppression of TLR2-mediated signaling by dendritic cell-specific ICAM3 grabbing nonintegrin-mediated signaling

(Dendritic cell-specific ICAM3 grabbing nonintegrin による
TLR2のシグナルの抑制における suppressor of cytokine signaling-1を
介した MyD88-adaptor-like protein の分解の関与)

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。

FSL-1 刺激で惹起された TLR2 シグナルは、食食受容体である MSR1 や DC-SIGN の発現を増強し、樹状細胞(DC)の食食能を活性化することが知られている。逆に、DC-SIGN を介する食食シグナルは TLR2 の認識シグナルにどのような影響を与えるのか、本研究はその点について検討したものである。マウス DC として A/J mouse 由来の XS106 細胞、ヒト DC として末梢血より単球を分離し、GM-CSF および IL-4 により分化させた樹状細胞(MDDC)を用いた。

実験に先立ち、XS106 細胞が機能的に TLR2 ならびに SIGNR1 を発現していることを確認した。FSL-1 単独刺激では、TNF- α , IL-6, IFN- γ および IL-10 の産生は濃度依存的に増加したが、Man9 あるいは ManLAM との共刺激では、FSL-1 による TNF- α , IL-6, IFN- γ の誘導活性は有意に抑制された。ただし IL-10 の誘導活性は抑制されなかった。次に、XS106 細胞に NF- κ B ルシフェラーゼレポーター遺伝子を導入してその活性化を調べると、NF- κ B 活性は、FSL-1 単独刺激では濃度依存的に活性化されたが、Man9 との共刺激では活性化は抑制された。さらに、SIGNR1 を siRNA 法でノックダウンすると、FSL-1 と ManLAM の共刺激による TNF- α , IL-6, IFN- γ の産生抑制活性は有意に減弱した。ヒト DC である MDDC で

も同様な結果であった。

ヒト胎児腎臓由来の HEK293 細胞に TLR2 と DC-SIGN の遺伝子を導入し、免疫沈降法で DC-SIGN と TLR2 との細胞表面での存在状態を調べると、DC-SIGN はリガンドを認識する際にオリゴマーを形成し、TLR2 と会合していることが判明した。同様に XS106 細胞では TLR2 と SIGNR1, MDDC で fTLR2 と DC-SIGN が会合していることが確認された。

次に、suppressor of cytokine signaling (SOCS-1) に着目し、XS106 細胞でその動きをみると、SOCS-1 の発現は FSL-1 と ManLAM の共刺激で時間依存的に増強し、また SOCS-1 は SIGNR1 と会合していた。さらに SOCS-1 を siRNA 法でノックダウンすると、ManLAM による TNF- α , IL-6, IFN- γ の産生抑制は有意に減弱した。次いで、TLR2 下流シグナルの MyD88-adaptor-like protein (Mal)に着目し、その動きを見ると、FSL-1 と ManLAM の共刺激で Mal の分解が起こっていることが確認された。これらの結果は、DC-SIGN シグナルによる TLR2 シグナルの活性抑制においては SOCS-1 が重要な役割を演じており、SOCS-1 が TLR2 下流のアダプター分子である Mal を分解することにより TLR2 シグナルの活性が抑制されることを示している。また、樹状細胞においては、一旦貪食が開始されると TLR2 による認識は抑制されることを示している。

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、以下の通りである。

- 1) 共刺激で、FSL-1 による TNF- α , IL-6, IFN- γ の誘導活性が抑制されたのに、IL-10 の誘導活性は抑制されなかったのは何故か、
- 2) MSR1 や DC-SIGN の発現増強による樹状細胞の貪食能の活性化とは、
- 3) SIGNR1 をノックダウンしても、FSL-1 と ManLAM の共刺激による TNF- α 等の産生活性の抑制が完全に取り除かれないのはなぜか、
- 4) 細胞膜における会合とは何か、
- 5) このような貪食と TLR とのクロストークは好中球などでも起こるのか、
- 6) FSL-1 以外の TLR2 リガンドでも同様なクロストークがみられるか、
- 7) SOCS-1 は E3 リガーゼとして働き、Mal をユビキチン化することだが、ユビキチン化を確認したか、

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な回答が得られた。本研究は、樹状細胞においては、一旦貪食が開始されると貪食シグナルを介して TLR2 による認識が抑制されることを明らかにし、さらにその機序として SOCS-1 による TLR2 下流のアダプター分子 Mal の分解の可能性が高いことを示したことが高く評価された。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。