

学位論文題名

Relationship of expression and function of
Toll-like receptor2 and 4 with aging in human and mouse

(ヒトとマウスにおける TLR2と TLR4の発現ならびに
機能と加齢との関連性)

学位論文内容の要旨

免疫応答の減弱は加齢の一つの大きな特徴である。加齢による獲得免疫の変動に関してはよく研究されているが、自然免疫の加齢による変動についてはいくつかの報告はあるものの、未だ不明な点が多い。

そこで、本研究ではマウスならびにヒトの加齢と、自然免疫ならびに自然免疫と獲得免疫の橋渡しで重要な働きをしている Toll-like receptor (TLR), 特に TLR2 と TLR4 の発現ならびに機能との関連性について調べた。

マウス脾臓細胞 (SP) に対するマイトゲン活性は、種々の週齢の C57BL/6 (B6) マウスから調製した SP を種々の濃度の TLR2 リガンドであるジアシルリポペプチド FSL-1 あるいは TLR4 リガンドである *E. coli* 由来リポ多糖 (LPS) で 48 時間刺激した後、1 ウェル当たり 0.2 μ Ci の [3 H]-thymidine を加え、16 時間後にセルハーベスターで細胞を回収し、放射能を液体シンチレーターで測定し、評価した。SP における TLR2 ならびに TLR4 の発現は、蛍光色素で標識された特異抗体ならびにイソタイプコントロールを用いて、フローサイトメーター (FACS Calibur) で測定し、評価した。これらの TLR の機能は、SP を FSL-1 あるいは *E. coli* LPS で刺激し、産生された IL-6 と TNF- α を ELISA 法で測定し、評価した。

ヒト末梢血単核球 (PBMC) は、北海道大学歯学部学生 (20~30 才) ならびに教員 50~60 才) のそれぞれ 5 名のボランティアからヘパリン血を採取し、フィコール・バック密度勾配法で分離・調製した。

それぞれ 1 匹の 8 週齢と 20 月齢の B6 マウスから SP を調製し、種々の濃度の FSL-1 あるいは *E. coli* LPS で刺激し、増殖活性を調べたところ、8 週齢の SP に比べて 20 月齢の SP が有意に弱いことがわかった。次に、これらの SP の TLR2 ならびに TLR4 の発現を調べたところ、両 TLR とも、20 月齢の SP での発現レベルは 8 週齢に比べて有意に低いことがわかった。さらに、それぞれ 9 匹の 8 週齢と 60 週齢 (20 月齢は入手不可能なため) B6 マウスで TLR2 ならびに TLR4 の発現を調べた。その結果、60 週齢の SP での TLR2 の発現が 8 週齢の SP に比べて有意に高かったが、TLR4 の発現では逆に 60 週齢の SP での発現が 8 週齢に比べて有意に低いことがわかった。さらに、SP を FSL-1 あるいは *E. coli* LPS で刺激し、IL-6 と TNF- α の産生量を調べたところ、両サイトカインとも、60 週齢の SP が 8 週齢に比べて有意に低いことがわかった。

次に、それぞれ 5 人の若年者 (20~30 才) ならびに高齢者 (50~60 才) の PBMC で、同様に TLR2 ならびに TLR4 の発現と、FSL-1 あるいは *E. coli* LPS で刺激後の IL-6 と TNF- α の産生量を調べた。そ

の結果, 50~60 才のヒトでの TLR2 ならびに TLR4 の発現が 20~30 才のヒトに比べて低い傾向を示しが, 統計学的に有意差はみられなかった。また, 50~60 才のヒトの IL-6 と TNF- α の産生量が 20~30 才のヒトに比べて有意に低いことがわかった。

このように, マウスならびにヒトにおいても加齢と共に TLR2 ならびに TLR4 の機能が減弱することがわかった。しかしながら, マウスにおいては TLR2 の発現は必ずしも加齢とともに減弱するという結果は得られなかった。これはジアシルリポペプチド FSL-1 の認識では TLR2 が重要な役割を果たしているが, 補助レセプターとして TLR6 を要求することが関係しているのではないかと推測された。

TLR は自然免疫で微生物の認識において重要な役割を果たしているだけでなく, マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞の補助刺激シグナル分子の発現を制御し, 自然免疫と獲得免疫の橋渡しで重要な働きをしている。このことから考えると, 加齢に伴って, 自然免疫に関わる細胞の微生物認識能力や抗原提示細胞の抗原提示能力も低下しているのではないかと推測された。

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 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

Relationship of expression and function of Toll-like receptor2 and 4 with aging in human and mouse

(ヒトとマウスにおける TLR2と TLR4の発現ならびに
機能と加齢との関連性)

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。

免疫応答の減弱は加齢の特徴の1つである。加齢による自然免疫の変動については未だ不明な点が多い。本研究は、マウスならびにヒトの加齢と Toll-like receptor (TLR) の発現ならびに機能との関連を調べたものである。

最初にマウス脾臓細胞 (SP) に対する増殖活性を調べた。C57BL/6 (B6)マウスから調製した SP を TLR2 リガンドであるジアシルリポペプチド FSL-1 あるいは TLR4 リガンドである *E.coli* 由来リポ多糖 (LPS) で刺激した後に培養し、さらに [³H]-thymidine を加えて培養し、回収後に液体シンチレーターで測定した。SP における TLR2 ならびに TLR4 の発現は、蛍光色素で標識された特異抗体を用いて、フローサイトメーター(FACS Calibur)で測定した。これらの TLR の機能は、FSL-1 あるいは *E.coli* LPS 刺激により産生された IL-6 と TNF- α を ELISA 法で測定した。ヒト末梢血単核球(PBMC)は、20~30 才ならびに 50~60 才のそれぞれ 5 名のボランティアからヘパリン血を採取し、フィコール・パック密度勾配法で分離・調製した。

まず、8 週齢と 20 月齢の B6 マウス各 1 匹から SP を調製し、種々の濃度の FSL-1 あるいは *E.coli* LPS で刺激して増殖活性を調べ、20 月齢 SP の増殖活性は 8 週齢 SP に比べて有意に弱いことを示した。TLR の発現についても、TLR2, TLR4 とともに、20 月齢 SP の発現レベルは 8 週齢 SP に比べて有意に低いことを明らかにした。次に、8 週齢と 60 週齢の B6 マウス各 9 匹について TLR2 および TLR4 の発現を調べ、TLR4 の発現は、8 週齢 SP 比べて、60 週齢 SP で有意に低く、TLR2 の発現は逆に 60 週齢 SP で有意に高いことを示した。さらに、SP を FSL-1 あるいは *E.coli* LPS で刺激して IL-6 と TNF- α の産生量を調べ、両サ

イトカインとも、8 週齢 SP に比べ、60 週齢 SP で有意に低いことを明らかにした。

次に、ボランティア PBMC を用いて、同様に TLR2 と TLR4 の発現、FSL-1 あるいは *E.coli* LPS 刺激後の IL-6 と TNF- α の産生量を調べた。TLR2 と TLR4 の発現については、20～30 才のヒトに比べて、50～60 才のヒトで低い傾向はみられたが、統計学的有意差はないことを示した。また、IL-6 と TNF- α の産生量は、20～30 才のヒトに比べて、50～60 才のヒトで有意に低いことを明らかにした。

これらの結果は、マウスならびにヒトにおいて、加齢と共に TLR2 ならびに TLR4 の機能が減弱することを示している。TLR は自然免疫で微生物の認識において重要な役割を果たしているだけでなく、マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞の補助刺激シグナル分子の発現を制御し、自然免疫と獲得免疫の橋渡しにおいて重要な働きをしている。それ故、本研究でえられた結果は、自然免疫に関わる細胞の微生物認識能力ならびに抗原提示細胞の抗原提示能力は加齢に伴って低下することを示唆している。

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) 自然免疫と獲得免疫との違いについて、
- 2) 細胞の増殖活性の測定に [^3H]-thymidine を用いたのは何故か、
- 3) Pattern 認識とは何か、
- 4) Fig.2 の FSC,SCC および Fig.4 の FSC-H,SSC-H とは何か、
- 5) サイトカイン産生と細胞の増殖促進（マイトゲン）活性の関連性は、
- 6) 何故マウスの脾臓細胞を実験に供したのか、
- 7) 外傷性炎症と感染性炎症の違いは何か、

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、加齢と共に TLR2 ならびに TLR4 の機能が減弱することを明らかにし、それ故、加齢は自然免疫に関わる細胞の微生物認識能力の減弱のみならず、抗原提示細胞の抗原提示能力の減弱により獲得免疫も減弱させる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。