

Title	Differential Roles of TLR2 and TLR4 in Recognition of Gram-Negative and Gram-positive Bacterial Cell Wall Components
Author(s)	竹内, 理
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/42647
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	たけうち おさむ 竹内 理
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16126 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Differential Roles of TLR 2 and TLR 4 in Recognition of Gram-Negative and Gram-positive Bacterial Cell Wall Components (TLR 2 及び TLR 4 のグラム陰性菌やグラム陽性菌細胞壁成分認識における役割)
論文審査委員	(主査) 教授 審良 静男 (副査) 教授 菊谷 仁 教授 木下タロウ

論文内容の要旨

【目的】

ショウジョウバエ Toll ファミリーは、真菌や細菌に対する感染防御に必須の分子である。近年、哺乳類における Toll ホモログ、Toll-like receptor (TLR) ファミリーが発見された。TLR は細胞外領域にロイシンリッチリピート、また細胞内領域に IL-1R の細胞内領域と相同性のある Toll/IL-1R homology (TIR) ドメインを持つ。TLR を介するシグナルは、転写因子 NF- κ B を活性化させ様々な炎症に関わる遺伝子を誘導する。現在までに我々の報告も含め9つの TLR がクローニングされている。このうち、*in vitro* の解析で TLR 2 がグラム陰性菌菌体成分であるリポポリサッカライド (LPS) を認識する受容体であると報告された。これに対し C3H/HeJ マウスは以前より LPS に対し不応答性であることが知られているが、この原因が TLR 4 分子の点突然変異にあることが明らかとなった。また、我々の作製した TLR 4 欠損マウスも LPS に不応答性であった。我々は TLR 2 の生体内における機能を明らかにするため、TLR 2 欠損マウスを作製し解析を行った。

【方法ならびに成績】

定法に従い TLR 2 欠損マウスを作製した。TLR 2 欠損マウスはメンデルの法則に従い出生し外見上明らかな異常を認めなかった。まず、このマウスの LPS に対する反応を検討した。野生型、TLR 2 及び TLR 4 欠損マウスに 1 mg の LPS を腹腔投与しその後の生存を検討した。野生型及び TLR 2 欠損マウスは投与 5 日以内に 80% 死亡したのに対し、TLR 4 欠損マウスは全例生存した。次にマクロファージ (M ϕ) の LPS に対する反応性を検討した。腹腔 M ϕ を LPS で刺激すると野生型及び TLR 2 欠損 M ϕ はほぼ同程度の TNF α を産生し、IFN γ との共刺激で IL-6、NO を産生したが TLR 4 欠損 M ϕ ではこれらの産生を認めなかった。次に脾細胞の LPS に対する反応性を検討した。野生型及び TLR 2 欠損脾細胞は LPS 存在下で培養すると濃度依存的に増殖したのに対し、TLR 4 欠損脾細胞は LPS に対する増殖反応を認めなかった。従って、LPS に対する反応には TLR 4 が必須であり TLR 2 は必要でないことが明らかとなった。

LPS 以外にも様々な細菌菌体成分がマクロファージを直接活性化させることが知られている。次にいくつかのグラム陽性菌由来細胞壁成分に対する反応性を検討した。野生型、TLR 2 及び TLR 4 欠損 M ϕ を *Staphylococcus aureus*、*Corynebacterium diphtheriae* などいくつかのグラム陽性菌細胞壁成分で刺激すると野生型 M ϕ は濃度依存性に TNF α を産生したのに対し、TLR 2 欠損 M ϕ では TNF α 産生の低下を認めた。TLR 4 欠損 M ϕ は *S. aureus* 由来細

胞壁に対する TNF α 産生の若干の低下を認めたが *C. diphtheriae* 細胞壁に対しては野生型と同様に反応した。

グラム陽性菌細胞壁に存在しM ϕ を活性化する成分としてはペプチドグリカン (PGN) やリポタイコ酸 (LTA) が知られている。次に *S. aureus* 由来 PGN 標品、LTA を用いて TLR 2、TLR 4 欠損M ϕ の反応性を検討した。*S. aureus* PGN に対し、野生型、TLR 4 欠損M ϕ はほぼ同程度に TNF α 、IL-6、NO を産生したのに対し、TLR 2 欠損マクロファージはほとんどこれらサイトカインを産生しなかった。また LTA を用いて細胞を刺激すると TLR 4 欠損M ϕ において反応性が欠如していた。

TLR はアダプター分子 MyD88、IRAK を介して NF- κ B を活性化することが知られている。次に LPS、PGN によるシグナル伝達系路の活性化を IRAK 活性化を in vitro kinase assay、NF- κ B 活性化を gel-shift assay を用いて検討した。LPS に反応して野生型、TLR 2 欠損M ϕ では IRAK、NF- κ B の活性化を認めたのに対し TLR 4 欠損M ϕ では反応を認めなかった。これに対し、PGN の刺激に対しは TLR 2 欠損M ϕ においてこれらシグナル分子の活性化が欠如していた。

【総括】

本研究により TLR 2 が LPS レセプターではなく、いくつかのグラム陽性菌細胞壁成分や *S. aureus* 由来 PGN 標品の認識に必須であることが明らかとなった。その後の解析により TLR 2 欠損マウスが実際に *S. aureus* 感染に対し易感受性であることや、TLR 2 が更に細菌由来リポプロテインの認識に必須であることが明らかとなっている。このように TLR 2 が PGN やリポプロテイン、TLR 4 が LPS というように、異なった TLR が異なった菌体成分を認識し自然免疫機構を活性化していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

Toll-like receptor (TLR) は、ショウジョウバエにおいて感染防御に関わる Toll 分子の哺乳類ホモログとしてクローニングされた。現在までに9種類のファミリーの存在が知られ、これまで TLR 2 及び TLR 4 が、グラム陰性菌菌体成分である LPS の認識に関与することが示唆されていた。本研究においてノックアウトマウスを用いた解析から、LPS は TLR 4 により認識され、TLR 2 は LPS ではなくいくつかのグラム陽性菌細胞壁成分、特にペプチドグリカンの認識に必須であることが明らかとなった。本研究は、マクロファージが異なった TLR を用いて異なった菌体成分を認識することを明らかにし、自然免疫が侵入する細菌を識別するメカニズムを解明する上で大きな貢献をした。また、TLR を介したシグナルは敗血症性ショックを引き起こすトリガーとしても重要である。従って TLR 2 や TLR 4 をターゲットにした薬剤の開発は敗血症性ショックの治療においても大きな意義を持つものと考えられる。よって本論文は博士 (医学) の学位授与に値する。