The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA
Author(s)	邊見, 弘明
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43832
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏　　名　邊　見　弘　明（へん　み　ひろ　あき）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）

学位記番号　第　17621　号

学位授与年月日　平成15年3月25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　A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA.
（細菌DNAを認識するToll-like receptor）

論文審査委員　（主査）
教　授　審良　静男
（副査）
教　授　菊谷　仁　教　授　宮坂　昌之

論文内容の要旨

【目　的】

Toll-like receptor（TLR）は、もともとショウジョウバエTollのヒトホモログとして同定された分子である。ショウジョウバエTollは、その初期発生において背腹軸の決定に関与し、また、成虫においては真菌感染時における抗真菌ペプチドの誘導にも関与している。これまでの研究によりTLRファミリーは微生物特異的な物質を認識し、マクロファージ（Mφ）や樹状細胞（DC）などの免疫細胞を活性化し、生体防御機構において重要な働きを担っていることが明らかにされている。ほ乳類免疫細胞を活性化する微生物菌体構成成分としてリポポリサッカライド（LPS）やペプチドグリカン（PGN）、細菌由来リポペプチド、細菌由来DNAなどが知られている。LPSはTLR4によって、また、PGNや細菌由来リポペプチドはTLR2を介して免疫細胞に認識され、それを活性していることが明らかにされている。しかしながら、免疫細胞による認識機構が不明な菌体構成成分もあり、また、その機能が不明なTLRファミリー分子も存在している。本研究では、新規に同定したTLRファミリー分子TLR9の機能を探ることを目的とし、そのノックアウトマウスの作成を通してその生理的機能の解析を行った。

【方法ならびに成績】

新規TLRファミリー分子を同定する目的でTLR4をqueryにしてBLASTサーチを行い、TLR9を同定した。Northern blotによりTLR9の発現分布を検討したところ脾臓での強い発現が認められた。TLR9の機能を明らかにするために常法にてTLR9ノックアウトマウス（TLR9-/-）を作成した。TLR9-/-マウスは、メンデルの法則に従って出生し、また、外見上の異常は認められなかった。TLR9-/-マウスより腹腔細胞を調整しTLR4のリガンドであるLPSやTLR2のリガンドであるPGNなどにより誘導される炎症性サイトカインの濃度を検討したが、正常マウスと同程度の産生が認められた。細菌由来DNAは、それに多く含まれる非メチル化CpGモチーフによりほ乳類免疫細胞を活性化する。TLRファミリー分子の活性化は、アダプター分子MyD88を介して細胞内へ伝えられることが知られており、また、MyD88-/-マウスはCpGモチーフを含むDNA（CpG DNA）に対する反応が消失していたことから、TLRファミリー分子の関与が推測されていた。そこで、CpG DNAによって誘導される脾細胞の増殖を検討したところ、TLR9-/-脾細胞はLPS刺激には反応して増殖するにも関わらずCpG DNA刺激による増殖は全く誘導されなかった。

また、チオグリコレートで誘導した腹腔細胞をCpG DNAで刺激したところ炎症性サイトカインの産生が全く認められず、さらにDCの細胞表面マーカーの発現増強もTLR9-/-マウスで全く認められなかった。次に、細胞内シグナル伝達分子の活性化を検討した。正常マウス細胞ではCpG DNA刺激により、NF-κBやc-Jun N-terminal kinase（JNK）、IL-1 receptor associated kinase（IRAK）の活性化が認められる。しかしながら、TLR9-/-細胞では、LPS刺激によるこれらシグナル伝達分子の活性化は認められるのに対し、CpG DNA刺激による活性は全く認められなかった。さらに、TLR9-/-マウスは、CpG DNAとD-ガラクトサミンとの同時投与によって誘導されるショックに耐性を示し、また、そのときの血中の炎症性サイトカインの上昇も認められなかった。さらに、CpG DNAによって誘導されるTh 1反応も誘導されなかった。

【総　括】

CpG DNAは、現在、その強いTh 1反応誘導能を利用したアレルギー・癌・感染症に対する治療薬への応用が期待され、実際、臨床試験もなされている。しかしながら、これまでCpG DNAがどのようにして宿主免疫細胞に認識され、それを活性化しているのは不明であった。本研究により、CpG DNAはTLR9を介して免疫細胞を活性化していることが明らかとなった。他のグループの研究によりCpG DNAが免疫細胞を活性化するには細胞内に取り込まれ、エンドゾームの成熟が必要であると報告されている。このことから、CpG DNAは、細胞に取り込まれた後にTLR9に認識され、シグナルを伝えるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

申請論文は、Toll-like receptor 9（TLR9）遺伝子を同定し、その遺伝子欠損マウスの作成・解析を行ったものである。その結果、TLR9欠損細胞およびマウスは、細菌由来DNAへの反応性が欠損していることが判明した。このことは、細菌DNAがTLR9を介して免疫細胞を活性化していることを示している。現在、細菌DNAのもつ免疫賦活作用を応用したアレルギー・感染症・がんなどに対する予防・治療薬が開発されつつありその作用機序の解明は重要である。細菌由来DNAによる免疫賦活作用の作用機序を明らかにしたこの成果は、学位の授与に値すると考えられる。