The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Analysis of lipopolysaccharide (LPS)tolerance induced by variety bacterial components via Toll-like receptor (TLR) family
Author(s)	佐藤, 慎太郎
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43961
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	佐　藤　慎太郎（さとう　しんたろう）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　17619　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	Analysis of lipopolysaccharide (LPS) tolerance induced by variety bacterial components via Toll-like receptor (TLR) family. (TLRファミリーを介して種々の菌体成分が誘導するLPSトレランスの解析)
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　審良　静男 （副査） 教　授　菊谷　仁　　教　授　平野　俊夫

論　文　内　容　の　要　旨

［目的］

Lipopolysaccharide（LPS）はグラム陰性菌外膜の主要構成成分で、マクロファージなどに作用して TNF-αなどの炎症性物質を強く誘発する物質である。過剰な LPS にさらされた生体はエンドトキシンショック*を起こし、時にそれは致死的であるが、その一方で、致死量以下の LPS の前投与により、LPS に対する感受性が低下する、いわゆる LPS トレランスと呼ばれる現象も知られている。LPS トレランスは細胞レベルでも認められ、また、LPS 以外の菌体成分によっても誘導されることが知られている。近年、種々の菌体成分の認識に関わる分子として、Toll-like receptor (TLR) ファミリーが注目されている。TLR ファミリーのシグナル伝達経路はアダプター分子である MyD88 を中心としており、ほぼ同一のものと考えられていたが、最近になって異なる TLR がそれぞれに異なる遺伝子発現や生理活性を有していることが明らかになってきた。LPS トレランスにおいても、異なる TLR シグナルでは異なる機構によって成立していることが考えられる。LPS が誘導する LPS トレランスではそのレセプターである TLR4 のダウンレギュレーションが深く関わっていることが示唆されているが、他の菌体成分が誘導するクロストレランスについてはほとんど解明されていない。本研究では、TLR2 シグナルが誘導する LPS トレランスの成立機構の解明を主目的とし、さらに、最近になってそのリガンドが明らかになった TLR3 シグナルによる LPS トレランスについても比較、検討を行い、種々の菌体成分がいかにして LPS トレランスを成立させているかを明らかにしようと試みた。

［方法ならびに成績］

マウス腹腔内マクロファージ（Mφ）を用いて TNF-α産生における LPS（TLR4 リガンド）、MALP-2（TLR2 リガンド）のトレランス誘導能について検討した。LPS の前処置と同様に、MALP-2 前処置によって、2回目の MALP-2 自身の刺激のみならず LPS 刺激によっても TNF-α産生は認められなかった。先に述べたように、LPS 前処置により TLR4 はダウンレギュレーションを起こす。そこで、MALP-2前処置後 24 時間における細胞表面上の TLR4 と、その直下で働いているシグナル伝達分子の発現量を観察したところ、TLR4、MyD88、IRAK-1、TRAF6 の発現量に変化は認められなかった。IRAK-1 は TLR の刺激に依存して活性化して自己リン酸化を起こし、次いで

TRAF6と会合することでシグナルを伝えていると考えられている。そこで次に、LPS、MALP-2前処置Mφを再度LPSで刺激した場合のIRAK-1の自己リン酸化活性、およびTRAF6との会合について比較した。その結果、どちらの細胞においてもLPS刺激によるIRAK-1の活性化は認められず、TRAF6との会合も認められなかった。さらに、MALP-2での前処置時にタンパク合成阻害剤のシクロヘキシミドを加えると、MALP-2が誘導するLPSトレランスが解除されることから、このクロストレランスはMALP-2前処置で誘導される何らかの分子が、IRAK-1周辺でLPSのシグナル伝達経路を抑制することで成立していると考えられた。

次に、新たにリガンドが判明したTLR3シグナルによるLPSトレランス誘導能について、TNF-α産生を指標に検討した。poly（I：C）（TLR3リガンド）前処置Mφでは、LPS刺激によりnative Mφと同程度のTNF-α産生が認められ、IRAK-1の活性化も認められた。したがって、MyD88を介した炎症性サイトカイン産生にいたるシグナル伝達経路においては、TLR3リガンドはLPSクロストレランスを誘導しないことが明らかになった。

TLR4とTLR3はMyD88に依存しないシグナル伝達経路を有しており、最近、この経路によってIP-10などのIFN誘導性遺伝子群の発現が誘導されていることが明らかになった。この経路には少なくともIRF-3のdimer形成と核移行が関わっていることが報告されている。そこで、この経路におけるLPSトレランスについても比較した。MyD88依存的経路の場合とは異なり、MALP-2前処置Mφではlps刺激によりnative Mφと同程度のIP-10の誘導やIRF-3のdimer形成が認められたが、LPS、poly（I：C）前処置Mφではこれらの現象が認められず、TLR3リガンドはこのMyD88非依存的経路においてトレランスを誘導しうることが明らかになった。

［総括］

LPS前処置細胞では、TLR4のダウンレギュレーションが起こるために、TLR4が有する2つのシグナル伝達経路の両方が阻害されるが、TLR2シグナルはそのうちのMyD88依存的経路について、TLR3シグナルはMyD88非依存的経路についてのみトレランスを誘導していることが明らかになった。このように、その機構や作用点は異なるものの、種々の菌体成分はTLRファミリーを介してLPSに対する低応答性を誘導することが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

高度に医療技術が進化した現在においても、なお感染症や敗血症性ショックは高い致死率を示している。申請論文は、菌体成分の中でも最も強力に敗血症を誘導する物質であるLipopolysaccharide（LPS）の作用が、LPS自身はもとより、他の菌体成分によっても抑制されることを示し、さらにその作用点や作用機序を分子レベルで明らかにしたものである。菌体成分が誘導するこれらの抑制性効果（トレランス）は、生体が本来から有している感染防御機構の一つとしてとらえることができるため、申請論文は感染症や敗血症性ショックに対する新たなアプローチ法や薬剤の開発に大きく貢献するものと考えられる。したがって、この成果は学位の授与に値すると考えられる。