

TLRの局在破綻による炎症性疾患発症のメカニズムの解明

大阪大学微生物病研究所感染病態分野 助教 笹井 美和



【研究背景】

チェディアック・東症候群（Chediak-Higashi Syndrome）は常染色体変異によって引き起こされる遺伝性疾患の一つであり、その臨床所見として眼皮膚白皮症や穏やかな出血性素因などがあるが、最も重篤な症状として種々の感染症に対して易罹患性を示す。チェディアック・東症候群の原因遺伝子として細胞内の膜小胞輸送に関与する分子の一つであるLysosomal trafficking regulator（Lyst）が1996年に同定されており、欠損細胞では膜輸送機能の低下から巨大な細胞内小胞が形成される。チェディアック・東症候群患者は免疫細胞のナチュラルキラー細胞や細胞障害性T細胞の数の減少を伴う血球貪食症候群の発症、好中球では遊走能の低下や巨大リソソーム顆粒が生じてリソソーム内の顆粒が病原体を含むファゴソームと融合できないために引き起こされる病原体の消化能の低下など、種々の免疫細胞の機能欠損が報告されている。チェディアック・東症候群の患者は様々な病原体に易感染性を示すが、中でもヘルペスウイルス科に属するEpstein-Barr virus（EBV）に対して非常に高い抗体価を示した患者は肝脾肥大とリンパ節腫脹が認められ、肝脾腫大症により死亡した事が報告されており、ウイルス感染を起因とする慢性炎症が原因で患者が死に至った可能性が考えられるが、この遺伝疾患の分子レベルでの十分な病理学的原因究明は行われていない。

近年、病原体の構成成分を認識する生体防御機構として自然免疫が発見され、自然免疫の活性化がその後の病原体の排除や生体の恒常性維持に密接に関与している事が報告されつつある。自然免疫を担う受容体の一つであるToll様受容体（Toll-like receptors, TLRs）はI型の膜貫通受容体であり、活性化されると様々なサイトカイン産生を誘導する事が知られているが、膜受容体である事から細胞膜上での局在を制御する事ができ、TLRの細胞膜上での局在と活性化からのサイトカイン産生が密接に関与している事が報告されている。細胞内小胞膜上に局在するTLRであるTLR7ならびにTLR9は核酸を認識するTLRであり、その活性化機構の恒常性が破綻すると自己核抗原を認識する自己免疫疾患を誘発する事が知られており、TLR7ならびにTLR9の活性化機構は慢性炎症疾患を理解する上でも非常に重要である。TLR9の細胞内局在に関与する分子を同定する事を目的として、リガンド刺激後のTLR9に相互作用を示す分子群を、質量分析装置を用いて網羅的に同定した所、Lystが相互作用分子として単離された。

【研究目的】

本研究は、チェディアック・東症候群の原因遺伝子であるLystによるTLRを介した炎症の制御メカニズムの解析を通じて、チェディアック・東症候群の新たな疾患原因の解明と効果的な治療戦略の確立を目指すと共に、Lystによるサイトカイン産生制御機構を応用したTLR依存的自己免疫疾患の新規治療法の確立を目指す。

【方法と結果】

TLR familyの中でもTLR7とTLR9は形質様樹状細胞 (Plasmacytoid dendritic cells, pDCs) に非常に高く発現しており、そのリガンドを認識すると、炎症性サイトカインと共に非常に高濃度のI型インターフェロン (IFN- α) の産生が誘導される事が知られているが、血液中に存在するpDCsは非常に数が少なく、解析には適していない細胞である。pDCsの細胞生物学的な解析を行う場合、骨髄細胞をFlt3Lと呼ばれるサイトカインを細胞培養液に添加し、分化を誘導したFlt3LpDCsを使用するのが一般的である。

TLR7またはTLR9のリガンドを認識した際に誘導されるpDCsからのサイトカイン産生へのLystの関与を明らかにする目的で、野生型またはLyst変異マウス由来のFlt3LpDCsをTLR9のリガンドであるCpG-Aで24時間刺激した際に産生されるIFN- α とIL-12p40について検討した所、Lyst変異マウス由来の細胞群でこれらのサイトカイン産生は顕著に増加が認められた (図1)。

また、実際の病原体として単純ヘルペスウイルスII型 (TLR9により認識) または水疱性口内炎ウイルス (TLR7により認識される) 感染に対するサイトカイン産生へのLyst関与についても同様に検討した所、どちらのウイルス感染に対するサイトカイン産生も顕著にその産生の亢進が認められた (図2)。

【まとめと今後の展望】

Lyst変異マウスより単離・分化させた骨髄由来Flt3LpDCsでは、野生型由来のFlt3LpDCsよりもTLR7またはTLR9リガンド刺激によるサイトカイン産生が顕著に亢進する結果が得られた。この結果は、様々な病原体に対して易感染性を示すチェディアック・東症候群の患者において、TLR依存的なサイトカイン産生が増幅し、慢性炎症が引き起されている可能性を強く暗示している。同疾患の重篤者に高頻度に感染が確認されているEBVはTLR9を活性化する事が知られている事からも、TLRを介したサイトカインストームが同疾患の肝腎肥大からの死因となっている可能性が高い。今後、Lyst遺伝子欠損マウスに反復感染させる事による慢性炎症の誘導と、TLRシグナルを阻害する事によるその慢性炎症の制御について検討していきたい。

最後になりましたが、本研究を遂行するにあたり多大なご支援を賜りました公益財団法人 難病医学研究財団の関係者の方々に深く御礼申し上げます。

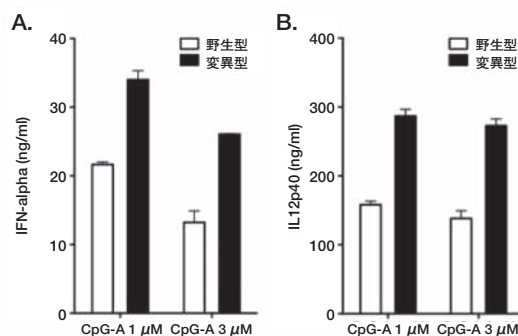


図1 TLR9リガンドによるサイトカイン産生はLyst変異マウス由来Flt3LpDCsで亢進するマウス骨髄由来Flt3LpDCをTLR9のリガンドであるCpG-Aで24時間刺激した際の、I型インターフェロン (IFN- α , A) と炎症性サイトカイン (IL-12p40, B) の産生量についてELISA法を用いて解析を行った。それぞれの実験は少なくとも三回以上の独立した実験を行い、代表例を示している。

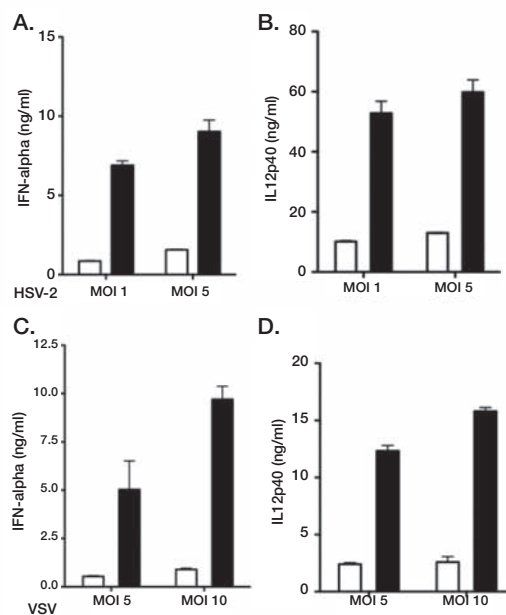


図2 ウイルスによるサイトカイン産生はLyst変異マウス由来Flt3LpDCsで亢進するマウス骨髄由来Flt3LpDC (白:野生型,黒:Lyst変異型)をII型単純ヘルペスウイルス (Herpes simplex virus, HSV-2) (A, B) または水疱性口内炎ウイルス (Vesicular stomatitis virus, VSV) (C, D) で感染させた際の、I型インターフェロン (IFN- α , AとC) と炎症性サイトカイン (IL-12p40, BとD) の産生量についてELISA法を用いて解析を行った。それぞれの実験は少なくとも三回以上の独立した実験を行い、代表例を示している。