

博士論文

樹状細胞成熟化における BCG-CWS 作用機構の解析

上堀 淳二

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 細胞増殖学（大阪府立成人病センター）講座

目次

	頁
略語表	
序章	1
第1章 樹状細胞成熟化における BCG-CWS 活性部位の同定	5
1-1. 実験材料および試薬	6
1-2. 実験方法	8
1-3. 実験結果	12
1-4. 考察	25
第2章 Toll-like receptor による peptidoglycan 認識機構の解明	27
2-1. 実験材料および試薬	28
2-2. 実験方法	29
2-3. 実験結果	30
2-4. 考察	41
第3章 樹状細胞に対する BCG-CWS および BCG-PGN の結合および貪食	43
3-1. 実験材料および試薬	45
2-5. 実験方法	45
2-6. 実験結果	47
3-2. 考察	55
終章	
謝辞	
参考文献	

略語表

BCG	: Bacillus Calmette Guerin
BSA	: bovine serum albumin
CD	: cluster of differentiation
cDNA	: complementary DNA
CWS	: Cell-wall skeleton
Dec	: decanoyl
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
D-PBS	: Dulbecco phosphate buffered saline
ECL	: enhanced chemiluminescence
EDTA	: ethylenediaminetetraacetate
EGTA	: ethyleneglycol bis-(2-aminoethylether)tetraacetic acid
ELISA	: enzyme linked immuno salvent assay
F(ab') ₂	: F(ab') ₂ fragment of IgG
FACS	: fluorescence activated cell sorter
FCS	: fetal calf serum
FITC	: fluorescein isothiocyanate
GM-CSF	: granulocyte macrophage-colony stimulating factor
HEK	: human embryonic kidney
IFN	: interferon
IgG	: immunoglobulin G
IL	: interleukin
LPS	: lipopolysaccharide
LRR	: Leucine rich repeat
mAb	: monoclonal antibody
MALP-2	: macrophage-activating lipopeptide-2
MHC	: major histocompatibility complex
MyD88	: Myeloid differentiation primary response protein 88
N.D	: not determined
NP-40	: Nonidet P-40
mRNA	: messenger RNA
MDP	: muramyl-dipeptide
PAGE	: polyacrylamide gel electrophoresis
PAMPs	: pathogen-associated molecular patterns
PCR	: polymerase chain reaction
PGN	: peptidoglycan
PMSF	: phenylmethylsulfonyl fluoride

PVDF : polyvinylidene difluoride
rpm : rolling per minute
RT : reverse transcriptase
SDS : sodium dodecyl sulfate
Ste : Stearoyl
TBS : Tris buffer saline
TIR : Toll/IL-1 receptor homology
TLR : Toll-like receptor
Tris : tris (hydroxymethyl) aminomethane
UV : ultra violet

序論

生体内に異物が侵入すると、免疫システムが作動して異物を排除するための複雑な応答が起こる。この一連の過程は免疫応答と呼ばれ、さまざまな免疫担当細胞の間で繰り広げられる反応によるものである。免疫応答は、大きく分けて 2 つのタイプの免疫システムからなる。一つは自然免疫で、下等生物から高等生物まで共通に持つ基本的な免疫機構であり、マクロファージ(macrophage : Mφ)や樹状細胞(dendritic cell : DC)などの抗原提示細胞が担当し、体内に侵入してきた異物を自身の細胞内に取り込み分解することで感染の波及を防ぐ役割をもつ(1)。もう一方は、高等生物のみ発達させた獲得免疫で、主に T 細胞や B 細胞が DNA 再構成により無数の特異性をもつレセプターが作られ、様々な抗原を認識する(2)。高等生物においては、この両者の相互作用が機能することで異物排除が成立している。

全ての生物が持つ自然免疫において中心的役割を担うと考えられる DC は、長らくの間、調製が容易でなかったことから、機能だけでなく分化に関しても不明であった。しかし、近年 *in vitro* における前駆細胞からの分化誘導系が確立されたことにより研究が飛躍的に進められた(3-4)。その結果、DC は各組織や血中に存在し、異物排除における最初の段階で活躍することが明らかとなった。また、DC は分布や起源により様々なサブセットに分類されており、サブセットごとに発現分子や機能の相違もみられ、未だ解明されていない部分も多く残されている(5)。したがって、現時点では侵入異物の種類・場所の違いにより、DC の各サブセットが使い分けられ、役割を分担していると考えられている。

DC サブセットに共通してみられる特徴として、高い貪食能と強力な抗原提示能があげられる。なお、DC による貪食作用は自身の成熟過程と密接に相関しており、成熟 DC はほとんど貪食能をもたないのに対し、未成熟 DC は様々な機構により外来異物を取り込み、消化分解を行うことが判明している(6)。DC による T 細胞への抗原提示に至る過程は、i) 異物の認識と取り込み、ii) 細胞内における消化分解とそれによって生成された抗原ペプチドの MHC 分子への結合と、抗原ペプチド-MHC 分子複合体の細胞膜表面への輸送、iii) T 細胞への提示と細胞接着/共刺激分子(CD80, CD86)の発現上昇、の 3 つの過程からなる(図 1)。これら 3 つの過程すべてを満たした DC が T 細胞をより強力に活性化できる機能をもつことになる(4)。なお、i) の過程において DC より産生される炎症性サ

イトカインは、自身もしくは周囲の細胞に作用し、iii)の過程でのリンパ球を含めた液性因子のクロストークが可能となる(7)。

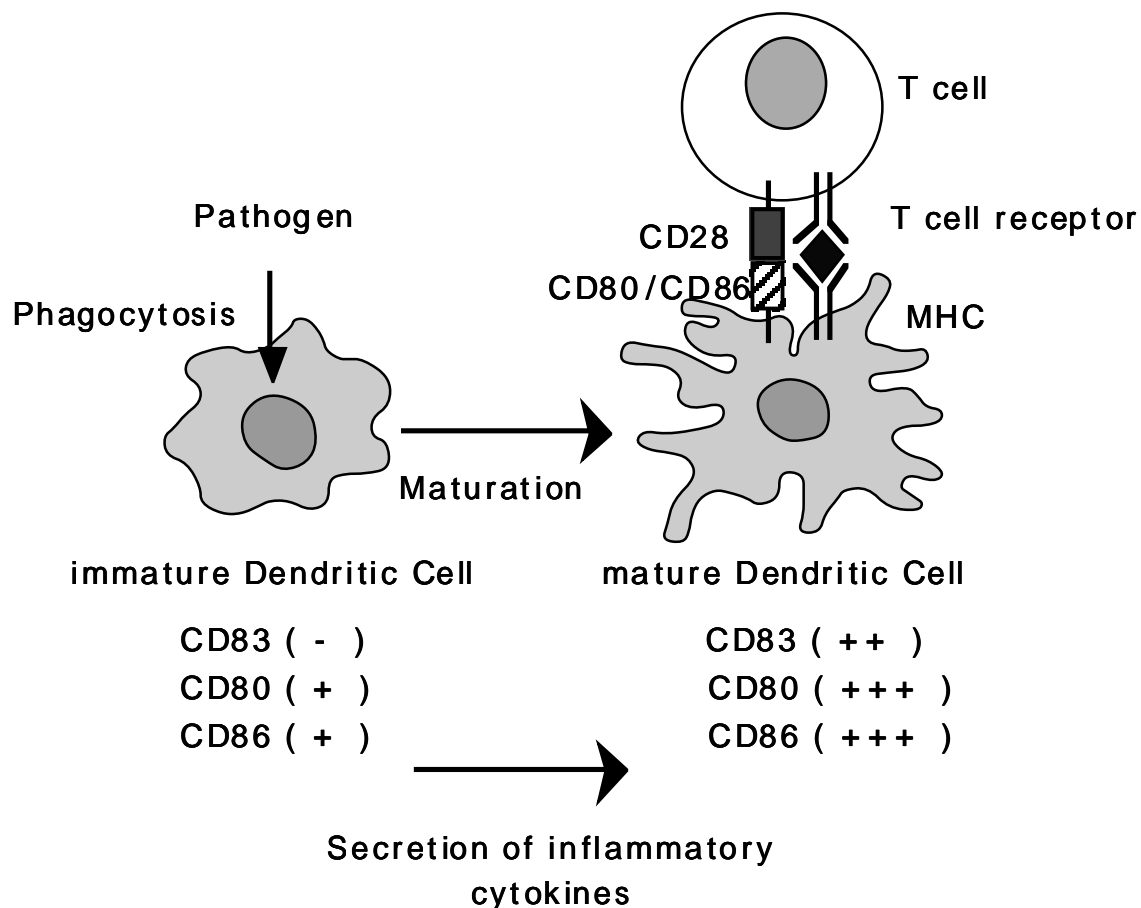


図1. DCの成熟化とT細胞への抗原提示

このDCの成熟化を促す成分として、免疫アジュバントがあげられる。免疫アジュバントは、免疫応答の調節活性を有する物質として定義されており、細菌菌体および菌体成分が広く用いられている。また、免疫アジュバントは古くからガンに対する非特異的な自然免疫療法として臨床応用されてきている。臨床応用された免疫アジュバントのなかでも、*Mycobacteria bovis*に属する *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) や BCG 細胞壁成分 (cell-wall skeleton : CWS) は初期の段階から使用され、ガン切除後に単独で用いる自然免疫療法においてガン再発率の低下と生存期間の延長等の好結果が得られている(8-9)。しかし、BCG や BCG-CWS を含め多くの免疫アジュバントは、長い間様々なガンに対して用い

られてきたにも関わらず、その抗ガン機構は全くの謎であった。

しかし、近年自然免疫のシグナル伝達レセプターとして同定された Toll-like receptor (TLR)が、免疫アジュバントによる DC 成熟化に関与していることが明らかとなった(10)。TLR はハエからヒトまで保存されており、多くの生物種で生体防御に関わる重要な分子であることが報告されている(11)。I 型 1 回膜貫通型の TLR は、細胞外領域の leucine-rich repeat (LRR)ドメインと細胞内領域の Toll/IL-1R homology (TIR)ドメインを持つことを特徴としている。LRR はタンパク質間の相互作用に関わるモチーフであり、TIR は IL-1 レセプターの構造および機能と類似しており TLR ファミリー間で高い相同性をとっている。また、TIR は下流の分子と相互作用してシグナルを伝え、最終的に転写因子を活性化し炎症性サイトカインの産生を促す。

図 II (左)に示したように、TIR に対するアダプター分子には、myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88)と TIR-containing adaptor molecule-1 (TICAM-1)の 2 つ分子が同定されており、それぞれ別のシグナル伝達経路が存在する(12-13)。MyD88 は全ての TLR の下流に位置するのに対し、TICAM-1 は TLR3、TLR4 の下流にのみ位置する。なお、MyD88 経路は、転写因子 nuclear factor- κ B (NF- κ B)を主に活性化し、interleukin (IL)-1、IL-6、IL-12、tumor necrosis factor (TNF)- α などの炎症性サイトカインの産生を促す。一方、TICAM 経路は、転写因子 NF- κ B、AP-1、IRF-3 を活性化し、interferon (IFN)- β の産生を誘導することが明らかとなっている。また、各 TLR に対するリガンドの同定も多数報告されており、代表的なリガンドを図 II (右)に示す(14-21)。なお、リガンドの種類により TLR を分類すると、TLR2 と TLR4 は主に糖脂質成分を、TLR3、TLR7、TLR8、TLR9 は核酸成分を、TLR5 は細菌鞭毛タンパク質を認識する。さらに、TLR2 や TLR4 は他の TLR (TLR1、TLR6)や TLR 以外の分子と相互作用し異物の認識を行うことも報告されている(22-25)。

このように、TLR の発見に伴い自然免疫の重要性が見直され、獲得免疫との密接な繋がりが証明されつつあるが、TLR だけでは説明できない部分も多く残されている。特に、免疫アジュバントによる抗ガン免疫機構に関しては、未だ分子レベルでの解明には至っておらず、自然免疫の基礎的な分子性状を明らかにすることが求められる。したがって、本研究では上記の理由から免疫アジュバントである BCG-CWS について TLR や抗原提示細胞との関係を明らかにすべく解析を試みた。以下に得られた知見を報告する。

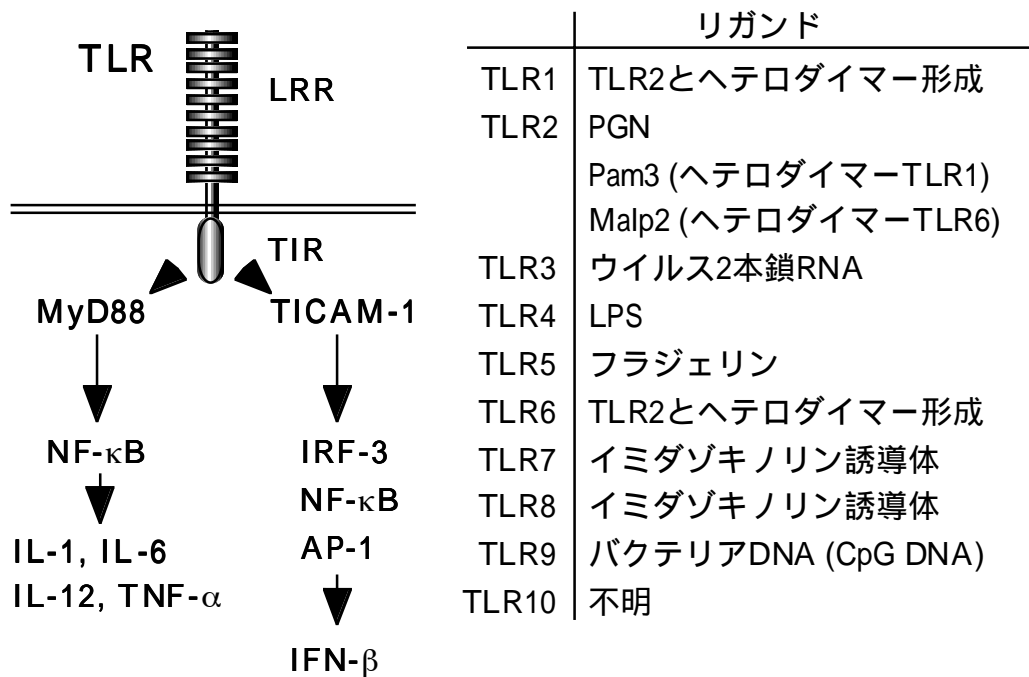


図 II. TLR を介したシグナル伝達機構(左)と TLR リガンド(右)

Pam-3 : tripalmitoyl-Cys-Ser-Lys4

Malp-2 : macrophage activated lipopeptide-2

LPS : lipopolysaccharide

第 1 章 樹状細胞成熟化における BCG-CWS 活性部位の同定

はじめに

ウシ型結核菌の細胞壁成分である BCG-CWS は、mycolic acid、arabinogalactan、peptidoglycan(PGN)を基本骨格として構成され、免疫アジュバントとして機能する(8-9)。なお、BCG-CWS は直接リンパ球に応答せず、自然免疫担当細胞による認識が免疫応答の出発点となる。したがって、本章では BCG-CWS による免疫応答の最初のターゲットになりうる樹状細胞 (dendritic cell : DC)に焦点を絞り、DC 成熟化における BCG-CWS 活性部位の同定を試みた。以下に得られた知見について報告する。

1-1 実験材料および試薬

1-1-1. 細胞、マウス

ヒト DC は、ボランティアより供与されたヒト末梢血の buffy coat (約 40 ml : 400 ml 全血由来)中に含まれる単球より調製した。Human embryonic kidney 293 (HEK293)の培養は 10%非働化 FCS、100 U/ml の penicillin G 及び streptomycin (pH7.2-7.4)を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) を用いた。細胞培養は常法に従い 37 °C、5% CO₂ 存在下で行った。マウス TLR2 およびマウス TLR4 ノックアウトマウス(C57BL/6)、MyD88 ノックアウトマウス(C57BL/6)は大阪大学微生物病研究所の審良静男教授より供与された(16, 26)。

1-1-2. cDNA

ヒト TLR2 (vector : pFLAG-CMV)、ヒト TLR1 (vector : pEFBOS)の cDNA は当研究室で単離した。ヒト TLR4 (vector : pEFBOS)およびヒト MD-2 (vector : pEFBOS)の cDNA は東京大学の三宅健介教授より、ヒト TLR6 (vector : pEFBOS)の cDNA は大阪大学の審良静男教授より、ヒト CD14 (vector : pME18s)の cDNA は北海道大学の西村仁博士よりそれぞれ供与された。

1-1-3. 抗体

マウス抗 FLAG モノクローナル抗体、抗ヒト IgG2b モノクローナル抗体、抗ヒト HLA-DR、抗ヒト CD80 モノクローナル抗体は IMMUNOTECH 社より、抗ヒト CD14 モノクローナル抗体は Sigma 社より、抗ヒト CD83 モノクローナル抗体は Cosmo Bio 社より、抗ヒト CD86 モノクローナル抗体は Ancell 社より、FITC-conjugated goat anti-mouse IgG 抗体は American Qualex Manufactures 社よりそれぞれ購入した。抗ヒト TLR2. 45 抗体は、当研究室により単離された(27)。単球の単離に用いた CD14 micro beads は Miltenyi-Biotec 社より購入した。

1-1-4. 細菌構成成分

E. coli 127 : B8 LPS は Difco 社から、macrophage activated lipopeptide-2 (MALP-2)は BIO·SYNTHESIS 社から、Pam3Cys-Ser-Lys4 (Pam3)は Boehringer Mannheim 社から、Staphylococcus PGN は FLUKA 社から、購入した。BCG-CWS および BCG-arabinogalactan、BCG-mycolic acid、BCG-arabinose-mycolic acid、ヒト型結

核菌(Mtb)-trehalose-dimycolic acid は北海道大学 免疫科学研究所 東市郎元副学長より供与された。LPS アンタゴニストである E5531 は、Eisai 社より供与された(28-29)。

1-1-5. 試薬その他

phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)、penicillin G、streptomycin、Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM)、RPMI-1640 は GIBCO 社より、Fetal calf serum (FCS) は Bio-WHITTAKER 社より購入した。Granulocyte macrophage-colony stimulating gactor (GM-CSF)、interleukin-4 (IL-4) は PeproTech 社より、Ficoll-Paque™PLUS は Amersham Pharmacia Biotech 社より購入した。その他はすべて一般に市販されている特級試薬を用いた。

細胞

D-PBS	137 mM NaCl, 8.10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2.68 mM KCl, 1.49 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7.4)
Saline	0.9% NaCl

Flow cytometry (FACS)

FACS buffer	0.1% BSA, 0.1% NaN ₃ , D-PBS
-------------	---

SDS-PAGE

Lysis buffer	1% (w/v) NP-40, 0.15 M NaCl, 10 mM EDTA, 1 mg/ml iodoacetamide, 1 mM PMSF, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4)
Running buffer	25 mM Tris, 190 mM glycine, 0.1% SDS
Sample buffer (4X)	0.2 M Tris-HCl (pH 6.8), 40% (v/v) glycerol, 8% SDS, BPB

Western blot

Anode 1 buffer	0.3 M Tris-HCl, 20% methanol (pH 10.4)
Anode 2 buffer	25 mM Tris-HCl, 20% methanol (pH 10.4)
Cathode buffer	25 mM Tris-HCl, 40 mM glycine, 20% methanol (pH 9.4)
Washing buffer	20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20 (pH7.4)
Blocking buffer	10% skimmed milk (雪印乳業), washing buffer

1-2 実験方法

1-2-1. ヒト単球細胞の分離

ヒト単球細胞の調製は以下のように行った。Buffy coat に methyl cellulose(和光純薬)を終濃度 0.2%になるように加え、saline で 200 ml にメスアップし 45 分間室温で反応させることにより大部分の赤血球を沈殿させた。このうち上層をコーニングチューブ (50 ml) 4 本に分注し、室温、1600 rpm で 10 分間遠心後、ペレットを saline で洗浄し、再度 1600 rpm で 10 分間遠心した。このペレットを saline 7 ml に懸濁し、別のチューブ (50 ml) に用意した 7 ml の Ficoll-Paque™PLUS に重層し、室温、1600 rpm、30 分間遠心することにより白血球画分(peripheral blood mononuclear cells : PBMC)を得た。4 本のチューブより得られた PBMC を saline で遠心洗浄した後、単球の分子マーカーである CD14 micro beads を用いた MACS 法(Miltenyi-Biotec 社)により単球を分離した。

1-2-2. 単球細胞から未成熟 DC への分化

未成熟 DC は単球細胞(5.0×10^6 個)を 100 U/ml penicillin G、100 mg/ml streptomycin、10%非働化 FCS を含む RPMI-1640 medium 10 ml に懸濁し、500 IU/ml GM-CSF、100 IU/ml IL-4 存在下で 3 日間培養後、培養液を交換し、再度同濃度の GM-CSF および IL-4 を加え 3 日間培養することで得た。

1-2-3. マウス腹腔 $M\phi$ の調製と培養

マウス腹腔 $M\phi$ の調製は、マウス腹腔内に 2 ml の 4% thioglycollate medium (DIFCO 社)投与し、3 日後に氷冷した Hank's buffered salt solution (HBSS)で腹腔内を洗浄し、浸潤した細胞を回収した。得られた細胞を 10% FCS を含む RPMI-1640 に懸濁し、37 °C、5% CO_2 存在下で 2 時間培養した。培養後、非付着細胞を HBSS で洗浄除去した後、付着性細胞を腹腔 $M\phi$ とした。なお、刺激を行う際には 30 U/ml IFN- γ 存在化で培養を行った(16)。

1-2-4. BCG-CWS からの PGN 精製

BCG-CWS からの PGN の分離は、Azuma らの方法を一部改変し以下のように行った(29)。乳鉢で BCG-CWS と 0.1 N HCl を混ぜた後、ビーカーに移し 60 °C、12 時間反応させた。反応後、 dH_2O 、Aceton、EtOH、Ether の順に不溶画分を遠

心洗淨後、吸引乾燥を行った。この操作により BCG-CWS に含まれる mycolic acid を除去した。

次に、乳鉢で不溶画分と 5% TCA を混ぜ、ビーカーで 60℃、24 時間反応させた。反応後、dH₂O、Aceton、EtOH、Ether で不溶画分を遠心洗淨後、吸引乾燥を行った。この不溶画分を再度、乳鉢で 0.05 M NaIO₄ と混ぜ、4℃ 遮光下で 14 日間反応させた。この操作により arabinogalactan を除去した。

最後に、不溶画分を dH₂O、Aceton、EtOH、Ether の順で遠心洗淨後、吸引乾燥を行い、乳鉢で粉碎して PGN とした。なお、上記の工程により得られた PGN は、化学分析の結果より mycolic acid、arabinogalactan の夾雑は認められず、アミノ酸、中性糖の含有率から PGN 構成物のみが含まれることが確認された。以上の操作により得られた画分を BCG-PGN として用いた。

1-2-5. BCG-PGN の化学分析

BCG-CWS より精製した BCG-PGN の化学分析は、住友製薬社に委託した。

1-2-6. 未成熟 DC およびマウス腹腔 Mφ の刺激

(1) BCG-CWS と BCG-PGN 構成成分の調製

BCG-CWS および BCG-PGN は Potter's homogenizer を用いて 1% drakeol と 1% Tween-80 を含む Saline (emulsion buffer) に 1 mg/ml となるように懸濁した。BCG-arabinogalactan、BCG-mycolic acid、BCG-arabinose-mycolic acid、Mtb-trehalose dimycolic acid は、Potter's homogenizer を用いて 1 mg/ml となるように saline に懸濁した。懸濁後、60℃、30 分間熱処理して滅菌したものを各刺激物として用いた。

(2) Polymyxin B 処理による endotoxin 阻害

粉末 polymyxin B を 1 mg/ml になるように D-PBS で懸濁し、処理するサンプルと等量の 1 mg/ml polymyxin B を加え、37℃ で 1 時間反応させ endotoxin の夾雑を排除した。

(3) 細胞への刺激

細胞の刺激は emulsion buffer に懸濁した BCG-CWS および BCG-PGN、と saline に懸濁した BCG-arabinogalactan、BCG-mycolic acid、BCG-arabinose-mycolic acid、

Mtb-trehalose dimycolic acid をそれぞれ終濃度 15 $\mu\text{g/ml}$ で加えた。

1-2-7. 細胞表面抗原の測定

DC(2.5×10^5 個)を 5 $\mu\text{g/ml}$ モノクローナル抗体(各種)を含む FACS buffer に懸濁し、4 で 30 分間反応させた。細胞を FACS buffer で 2 度遠心回洗浄後、25 $\mu\text{g/ml}$ FITC 標識ヤギ F(ab')抗マウス IgG を含む FACS buffer に懸濁し、4 で 30 分間反応させた。細胞を FACS buffer で 2 回遠心洗浄後、同緩衝液に懸濁し、フローサイトメーター(BECTON DICKINSON 社)で測定を行った。

1-2-8. プラスミドの精製

プラスミドの少量精製は PI-50a (KURABO 社)を使用した。またそれ以外では Wizard Plus SV Minipreps (PROMEGA 社)を使用し、ともにプロトコールは付属のマニュアルに従った。また、プラスミドの大量精製は Maxi-plasmid/cosmid kit endofree (QIAGEN 社)を使用し、プロトコールは付属のマニュアルに従った。

各種制限酵素、修飾酵素は TaKaRa 社、NEW ENGLAND BIOLABS 社、NIPPON GENE 社から、電気泳動用アガロースは TaKaRa 社から購入したものをを使用した。またアガロースゲルからの DNA 精製は QIAEX II (QIAGEN 社)を使用した。その他は全て一般に市販されている特級試薬を用いた。

1-2-9. Luciferase reporter gene assay

(1) 細胞への transfection

一過性の発現を目的とする細胞への transfection はリポソーム法を用いた。HEK293 細胞を 3×10^5 cells/2 ml/well で 6-well plate にまき、翌日に 1 well あたり発現プラスミド 3 μg (total)、NF- κ B レポータープラスミド(pNF κ B-Luc、Stratagen 社)もしくは E-selectin (ELAM)レポータープラスミド(pGV-E2、東洋インキ社) 0.5 μg 、pSV- β -Galactosidase コントロールベクター(PROMEGA 社) 25 ng を LipofectAMINE 2000 (GIBCO 社)を用いて transfection した。なお、ヒト TLR1、ヒト TLR4、ヒト TLR6、ヒト CD14、ヒト MD-2 を含む発現プラスミドはそれぞれ 0.5 $\mu\text{g/well}$ 用い、ヒト TLR2 を含む発現プラスミドは 0.1 $\mu\text{g/well}$ 用いた。それぞれの空ベクターで、transfection に用いる発現プラスミドの total DNA 量を 3 μg に調製した。プロトコールは付属のマニュアルに従った。

(2) Luciferase assay

Transfection 24 時間後の HEK293 細胞を 6-well plate 1well から 24-well plate 5well にまき直し、様々な刺激物を添加した後、37 °C、5% CO₂ 存在化で 6 時間培養した。培養後、細胞を回収し、D-PBS で 2 度遠心洗浄し、1 × lysis buffer (β-Galactosidase Enzyme Assay System、PROMEGA 社) 100 μl を加え溶解した。遠心操作により不溶画分を除去した後、PicaGene(東洋インキ)の luciferase 基質を用いて ALOKA ルミネッセンスリーダー(BLR-201)で測定した。また、インターナルコントロールとしてβ-Galactosidase の量を測定し、transfection 効率を求めた。

1-2-10. Sandwich ELISA 法によるサイトカインの定量

ヒト DC およびマウス腹腔 Mφにより産生されたサイトカインの定量は Sandwich ELISA 法により行った。なお、Sandwich ELISA 法には TNF-α human、ELISA system、TNF-α mouse、ELISA system (ともに Amersham LIFE SCIENCE 社)、human IL-12 p40 Immunoassay (genzyme/TECHNE 社)を使用し、マニュアルは付属のプロトコールに従った。

1-2-11. TLR2 および TLR4 の阻害

TLR2 の阻害には抗 TLR2 モノクローナル抗体(TLR2.45 : 10 μg/ml)、TLR4 の阻害には LPS アンタゴニストである E5531 (10 μM)を用いた。方法は、各 TLR 阻害剤を細胞に加え、37 °C、30 分間 CO₂ インキュベーターで培養した後に、刺激物の添加を行った。

1-2-12. Western blot 解析(1-1-5 参照)

10 mM EDTA を含む D-PBS で洗浄した細胞を、lysis buffer に懸濁し、4 °C で 1 時間処理して細胞の可溶化を行った。4 °C、10000 × g、10 分間遠心して上清を回収し、非還元型サンプルを SDS-PAGE で分離後、PVDF 膜に転写した。膜を blocking buffer でブロッキングを行った後、10 mg/ml 抗 FLAG モノクローナル抗体を含む blocking buffer と室温で 3 時間反応させた。膜を洗浄後、HRP 標識ヤギ抗マウス IgG を含む blocking buffer と室温で 3 時間反応させ、再び洗浄後、ECL (Amersham Pharmacia Biotech 社)で発色、検出を行った。

1-3 実験結果

1-3-1. BCG-peptidoglycan の分離

まず初めに、BCG-CWS より BCG-PGN 成分の分離を行った(1-2-4)。その後、BCG-PGN に BCG-mycolic acid や BCG-arabinogalactan の夾雑がないことを確認するため化学分析による解析を行った。

(表 1) に示したように BCG-PGN には BCG-mycolic acid の大部分を占める lipid と BCG-arabinogalactan の構成糖である arabinose と galactose の成分が欠如していることが明らかとなった。また、PGN の構成成分であるアミノ酸や糖は検出されていることから、BCG-CWS の BCG-PGN 部分のみ分離されていることが明らかとなった。

1-3-2. DC 成熟化における BCG-CWS 活性部位の同定

未成熟 DC を BCG-CWS と BCG-PGN、BCG-arabinogalactan、BCG-mycolic acid、BCG-arabinose-mycolic acid、Mtb-trehalose-dimycolic acid (各 15 $\mu\text{g/ml}$) で刺激した結果、BCG-CWS と BCG-PGN でのみ DC の成熟化マーカーである CD83 と共刺激分子 CD80、CD86 の発現増加が認められた(図 1-1)。また、BCG-PGN 以外の構成成分では成熟化マーカーの発現増加が全く認められなかった。したがって、DC 成熟化マーカーの発現上昇には BCG-CWS の PGN 部分の構造が重要であると示唆された。

次に、図 1-1 により明らかとなった BCG-CWS および BCG-PGN による DC 成熟化マーカーの発現上昇が、endotoxin の夾雑により起こる可能性を検討した。BCG-CWS と BCG-PGN を endotoxin 阻害剤である polymyxin B で処理後、図 1-1 と同様の解析を行った。なお、polymyxin B は、非タンパク性アミノ酸である L- α , γ -ジアミノ酪酸を多数含む 10 残基環状ペプチドで構成されており、endotoxin に作用すると、endotoxin のミセル構造を可逆的に解離させることにより、endotoxin の作用を中和させる。したがって、polymyxin B で処理することにより、endotoxin の夾雑を完全に排除することが可能であるとされている。また、コントロールには、polymyxin B 非処理の BCG-CWS および BCG-PGN を用いた。

その結果、polymyxin B 処理を行った BCG-CWS と BCG-PGN 刺激においても、非処理と同程度の CD83、CD86 の発現増加が認められた。これより、

BCG-CWS および BCG-PGN による DC 成熟化マーカーの発現上昇は、endotoxin の夾雑によるものではなく、BCG-CWS および BCG-PGN による活性であることが明らかとなった (図 1-2)。なお、endotoxin による影響を完全に排除するため、以下の実験で用いる様々な PAMPs は全て polymyxin B による処理を行い実験に使用した。

次に、DC 成熟化マーカーの発現上昇における BCG-CWS および BCG-PGN の濃度依存性を検討した(図 1-3)。ポジティブコントロールには、*Staphylococcus aureus* -PGN (Staph-PGN)を用いた。その結果、CD80、CD83、CD86 の発現上昇は、BCG-CWS および BCG-PGN 濃度依存的であることが明らかとなった。

1-3-3. BCG-CWS および BCG-PGN 刺激時におけるサイトカインの産生

図 1-1、1-3 より BCG-PGN 刺激時に DC の成熟化が示唆されたので、次に DC 成熟化の際に産生される炎症性サイトカイン TNF- α と IL-12p40 を ELISA 法で測定した(図 1-4)。その結果、BCG-CWS、BCG-PGN 以外の成分では、全く TNF- α と IL-12p40 の産生がほとんど確認できないのに対し、BCG-CWS、BCG-PGN においてのみ両者の産生が確認された。また、ここには示していないが、TNF- α と IL-12p40 の産生は、BCG-CWS、BCG-PGN 濃度依存的であった。

なお、この BCG-CWS および BCG-PGN 刺激時の DC 成熟化に伴う炎症性サイトカイン産生の結果から、図 1-1、図 1-3 の成熟化マーカーの発現上昇の結果と一致し、BCG-PGN が BCG-CWS の活性中心であると示唆された。

1-3-4. BCG-CWS および BCG-PGN 刺激時におけるマウス TLR を介した応答

BCG-PGN が DC を成熟化させることが明らかとなったが、どのような機構で DC を成熟化するかは明らかでない。近年同定され、細菌細胞壁成分のシグナル伝達レセプターである TLR は、DC 成熟化にも関与していると考えられている。したがって、BCG-CWS および BCG-PGN と TLR の関係を明らかにするため、TLR2(-/-)、TLR4(-/-)シングルおよび TLR2(-/-)、4(-/-)ダブルノックアウトマウス腹腔 M ϕ を用いて、BCG-PGN 刺激時における TNF- α の産生を測定した(図 1-5. A) (11)。

その結果、マウス TLR2、マウス TLR4 シングルノックアウトでは TNF- α の産生量が約 1/2 に減少し、ダブルノックアウトではほとんど産生されなかった。また、ここには示していないが IL-12p40 産生においても TNF- α と同じ傾向を示

した。なお、BCG-PGN 以外の構成成分では wild type においても TNF- α の産生は認められなかった。したがって、マウス腹腔 M ϕ においては、マウス TLR2 とマウス TLR4 両者が BCG-PGN 認識に関与していることが明らかとなった。

さらに、(図 1-5 B)では、TLR2 および TLR4 の下流に共通して存在するアダプター分子である MyD88 の関与を検討するため、MyD88 ノックアウトマウスを用いて(図 1-5. A)と同様の解析を行った(26)。その結果、MyD88 ノックアウトマウス腹腔 M ϕ では、BCG-CWS および BCG-PGN 共に TNF- α の産生が激減した。したがって、BCG-CWS、BCG-PGN 刺激時の TLR2、TLR4 を介したシグナルにより産生される TNF- α は、MyD88 を介したシグナルにより産生されると考えられる。

1-3-5. ヒト TLR 強制発現系における BCG-CWS および BCG-PGN の応答

1-3-4.の結果から、マウス M ϕ における BCG-CWS と BCG-PGN の認識は、マウス TLR2 およびマウス TLR4 の関与が明らかとなったが、TLR ファミリーは種特異的な働きをするという報告もされているため、次にヒト TLR の解析を行った。解析はヒト TLR の下流に存在する転写因子 NF- κ B の活性化を指標にした NF- κ B reporter gene assay で行った(1-2-9)。なお、発現細胞には mRNA レベルで TLR2 および TLR4 が発現していないヒト胎児腎細胞株(HEK293)を用いた(30)。

まず、ヒト TLR2 およびヒト TLR2 とヘテロダイマーを形成すると考えられているヒト TLR1、ヒト TLR6 について検討を行った。なお、ポジティブコントロールに用いた Pam-3 は TLR2+TLR1 を、Malp-2 は TLR2+TLR6 を発現させることにより、TLR2 単独よりも更に認識効率が上昇すると報告されている PAMPs である(24-25)。その結果、BCG-CWS はヒト TLR2 単独発現細胞(図 1-6 B)において NF- κ B 活性化が確認され、TLR1 および TLR6 との共発現細胞(図 1-6 C、D)における相乗効果は認められなかった。一方、BCG-PGN は全ての組み合わせ(図 1-6 B、C、D)に応答を示さなかった。

次に、CD14 の関与を検討した。膜型 CD14 は LPS や PGN に対する結合レセプターとして知られており、血清中に存在する可溶性 CD14 もその機能を補うと考えられている(31-34)。(図 1-6)の結果より、ヒト TLR2 強制発現系において BCG-PGN が全く応答を示さなかったことから、ヒト CD14 の関与を想定し、ヒト TLR2 と共発現させることにより検討した(図 1-7)。その結果、TLR2+CD14 共発現細胞では、BCG-CWS 刺激において NF- κ B 活性化の相乗効果は認められ

なかった(図 1-7 C)。これより、ヒト CD14 はヒト TLR2 による BCG-CWS 認識には関与していないことが示唆された。一方、BCG-PGN 刺激においては(図 1-6)の結果と同様、NF- κ B 活性化が認められなかった。

次に、ヒト TLR4 との関係を検討した。ヒト TLR4 は LPS を認識する際に、LPS レセプターとしても知られる CD14 とコファクターである MD-2 と複合体を形成することがこれまでに報告されている(32-33)。そこで、ヒト TLR4、ヒト CD14、ヒト MD-2 を共発現させた HEK293 における、BCG-CWS、BCG-PGN 刺激時の NF- κ B 活性化を同様の方法で測定した(図 1-8)。その結果、BCG-CWS 刺激は TLR4+MD-2 発現細胞に応答を示し、TLR4+CD14+MD-2 発現細胞では CD14 発現による若干の増強効果が認められた。しかし、BCG-PGN はいずれの場合も応答を示さなかった。

この HEK293 細胞を用いた TLR 強制発現系において、BCG-CWS 刺激時の NF- κ B 活性化が TLR を介して起こる応答であるのかを再度検証するため、TLR2、TLR4 阻害剤を用いて検討を行った(図 1-9) (27-28)。その結果、TLR2 阻害剤である TLR2 モノクローナル抗体(TLR2.45 : 10 μ g/ml)との共培養により、NF- κ B 活性化が抑制された(図 1-9 A)。また、TLR4 阻害剤として用いた E5531 は、LPS アンタゴニストであり、細胞外において LPS 認識を競合的に阻害するとされている(28, 35)。この E5531 (10 μ M)を用いた場合は、TLR4+CD14+MD-2 発現細胞における BCG-CWS 刺激時の NF- κ B 活性化が抑えられた(図 1-9 B)。したがって、HEK293 細胞を用いた TLR 強制発現系における BCG-CWS 刺激時の NF- κ B 活性化は、TLR2 および TLR4 を介して伝えられていることが証明された。

1-3-6. DC における BCG-CWS、BCG-PGN のヒト TLR を介した応答

1-3-5.で述べたように、HEK293 細胞を用いたヒト TLR 強制発現系における解析では、BCG-PGN は全ての発現細胞に一切応答を示さなかった。そこで、細胞種による違いを考慮し、DC を用いた際のヒト TLR と BCG-CWS および BCG-PGN の関係を検討した。なお、解析には(図 1-9)で使用した TLR2、TLR4 阻害剤を用い、各成分で DC を刺激した際の TNF- α 産生を指標に行った(図 1-10)。また、TLR2 および TLR4 それぞれのポジティブコントロールには Staph-PGN と LPS を用いた。

その結果、DC ではヒト TLR2、ヒト TLR4 を阻害することで、BCG-CWS および BCG-PGN による TNF- α 産生量の抑制が認められた。これより、DC にお

ける BCG-CWS および BCG-PGN 認識には、ヒト TLR2 およびヒト TLR4 が関与していることが明らかとなった。

		BCG-CWS	BCG-PGN
Amino acid Amino sugar (%)	Alanin	2.5	7.2
	Glutamic acid	6.0	10.4
	DAP	3.5	7.7
	Glucosamine	3.5	2.4
	Muramic acid	4.3	3.9
	Other	2.9	18.4
	Total	22.6	49.9
Neutral sugar (%)	Arabinose	16.2	<0.2
	Galactose	15.4	<0.2
	Other	0.0	<0.2
	Total	31.6	<0.2
Lipid(%)		36.0	0.0
Phosphoric acid (%)		0.1	0.0
H ₂ O (%)		9.7	49.5
Total (%)		100.0	100.0

Table 1. 化学分析による BCG-CWS と BCG-PGN の構成成分比較

BCG-CWS より精製した BCG-PGN の化学分析の結果を表す

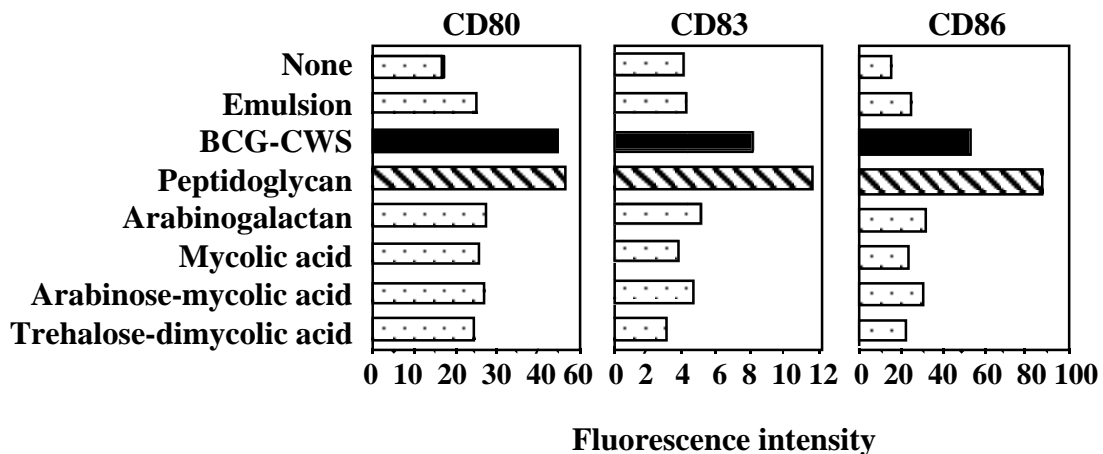


図 1-1. DC 活性化における BCG-CWS 活性部位の同定

1 点あたり 2.5×10^5 個の未成熟 DC を 10% FCS を含む RPMI-1640 に懸濁し、各成分を加え 37 で 24 時間培養した後、DC 成熟化マーカーである CD83 と共刺激分子である CD80、CD86 の発現変化をフローサイトメーターで測定した。なお、各成分とも 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で刺激を行った。また、横軸は FITC の蛍光強度(発現量)を示した。

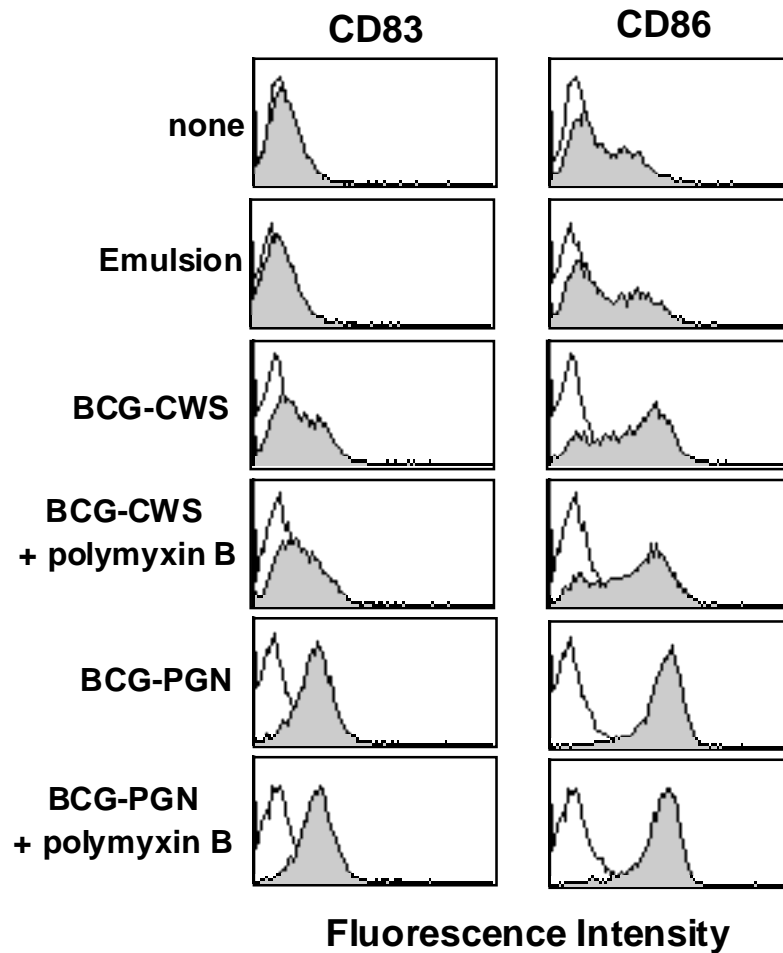


図 1-2. Polymyxin B 処理による endotoxin 阻害

1 点あたり 2.5×10^5 個の未成熟 DC を 10% FCS を含む RPMI-1640 に懸濁し、各成分 (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を加え 37 °C で 24 時間培養後、CD83 と CD86 の発現変化をフローサイトメーターで測定した。なお、BCG-CWS と BCG-PGN は 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で刺激を行った。また、縦軸は細胞数、横軸は FITC の蛍光強度(発現量)を示した。

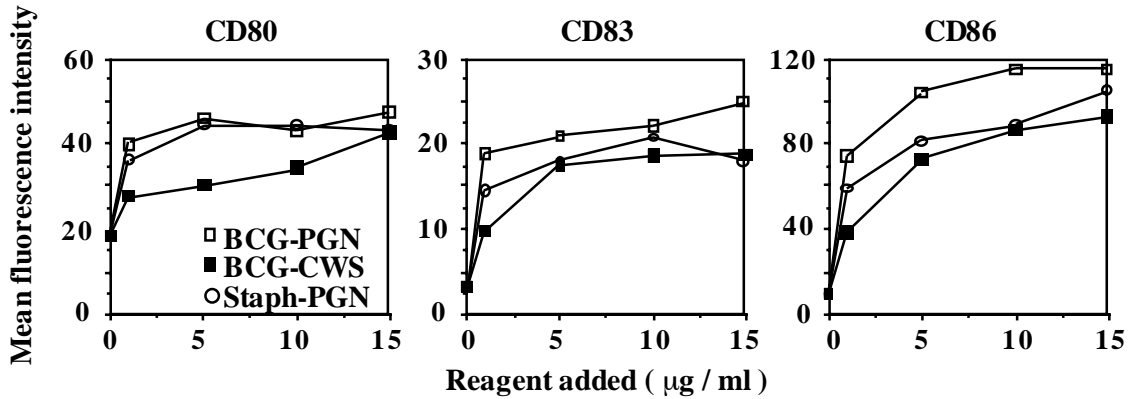


図 1-3. BCG-CWS、-PGN の濃度依存的活性

1点あたり 2.5×10^5 個の未成熟 DC を 10% FCS を含む RPMI-1640 に懸濁し、各成分 (15 µg/ml) を加え 37 °C で 24 時間培養後、CD80、CD83、CD86 の発現変化をフローサイトメーターで測定した。なお、ポジティブコントロールとして *Staphylococcus aureus* -PGN (Staph-PGN) を用いた。縦軸は CD80、CD83、CD86 の発現量を、横軸は刺激に用いた各成分の濃度を表している。

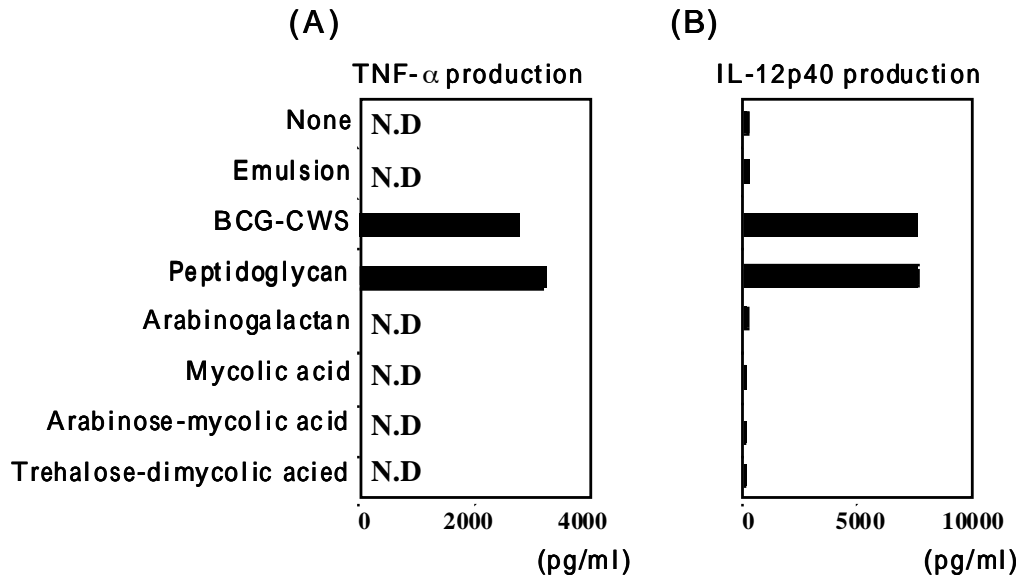


図 1-4. DC 刺激時における TNF-α と IL-12p40 の産生

未成熟 DC を BCG-CWS とその構成成分 15 µg/ml を加え、37 °C で 24 時間培養した際に培養上清中に産生された TNF-α (A) と IL-12p40 (B) の量を ELISA 法により定量した。横軸は培養上清中の TNF-α と IL-12 p40 の産生量を表している。また、BCG-CWS および BCG-PGN 以外の成分での TNF-α 産生量は N.D (not determined) であった。

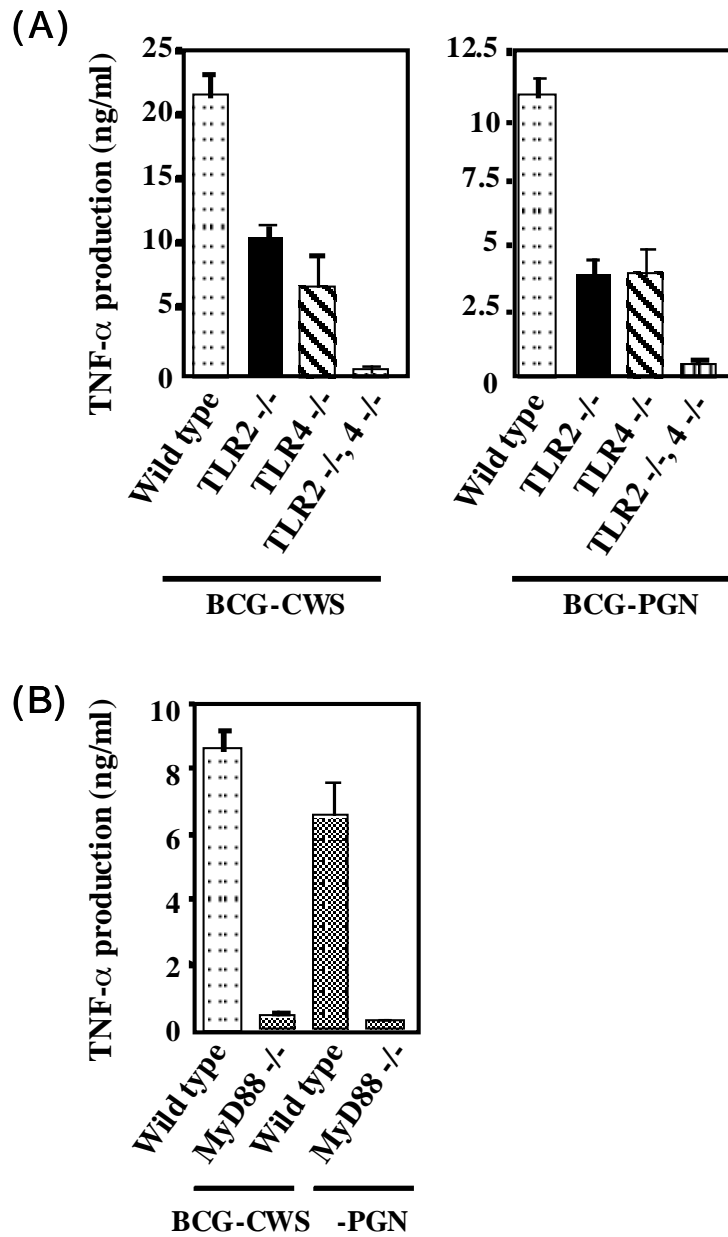


図 1-5. TLR 欠損マウス腹腔 M ϕ における TNF- α 産生

(A) Wild type、マウス TLR2 (-/-)、マウス TLR4 (-/-)、マウス TLR2 (-/-)、4 (-/-)の腹腔 M ϕ を 15 μ g/ml BCG-CWS と BCG-PGN 存在化で 37、24 時間培養後、培養上清中の TNF- α 量を ELISA により測定した。

(B) TLR2およびTLR4の下流に位置するアダプター分子である MyD88(-/-)の腹腔 M ϕ を用いて(A)と同様の解析を行った。

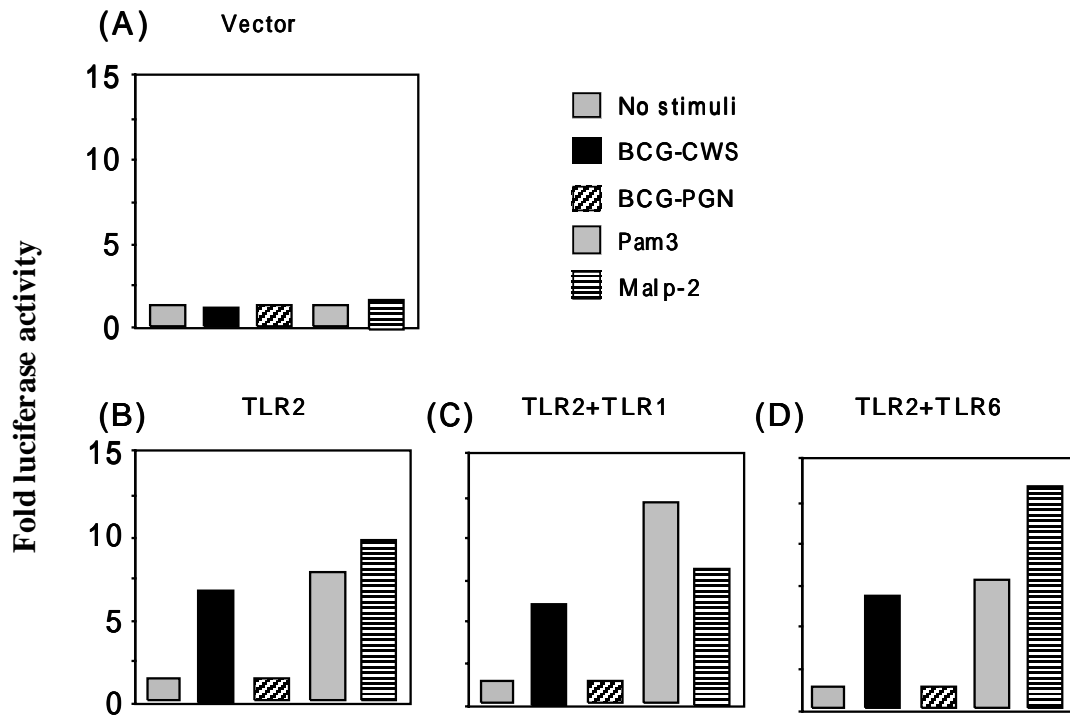


図 1-6. ヒト TLR2 を発現させた HEK293 細胞における NF- κ B の活性化

Vector (A)、ヒト TLR2 (B)、TLR2+TLR1 (C)、TLR2+TLR6 (D)を発現させた HEK293 細胞を、BCG-CWS (15 μ g/ml)、BCG-PGN (15 μ g/ml)、Pam3 (100 ng/ml)、Malp2 (0.8 μ M)で 6 時間刺激し、NF- κ B の活性化を測定した。なお、TLR2+TLR1 および TLR2+TLR6 のポジティブコントロールには、Pam3 と Malp2 をそれぞれ用いた。縦軸の NF- κ B の活性化は、コントロール（未刺激時における luciferase 量）に対する比活性値で示した。なお、3 回行った実験のうち、1 回の結果を代表して示している。

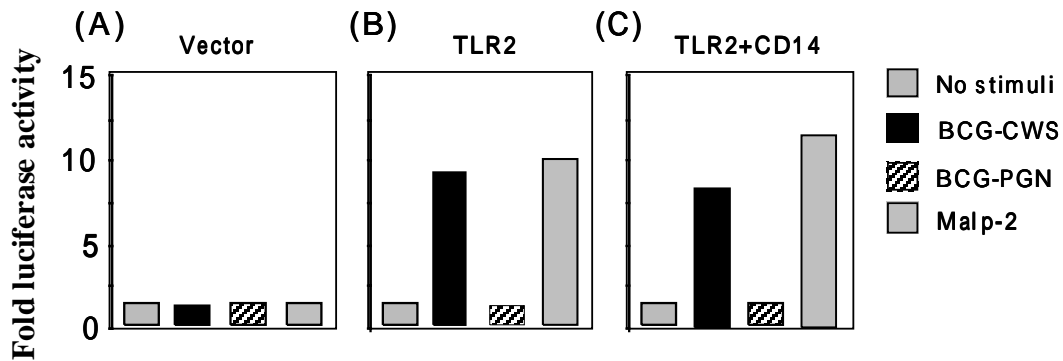


図 1-7. ヒト CD14 を発現させた細胞におけるヒト TLR2 を介した NF- κ B 活性化

Vector (A)、ヒト TLR2 (B)、TLR2+ヒト CD14 (C)を発現させた HEK293 細胞を、BCG-CWS (15 μ g/ml)、BCG-PGN (15 μ g/ml)、Malp2 (0.8 μ M)で刺激し、NF- κ B の活性化を測定した。縦軸に示した NF- κ B の活性化は、コントロール（未刺激時における luciferase 量）に対する比活性値で示した。

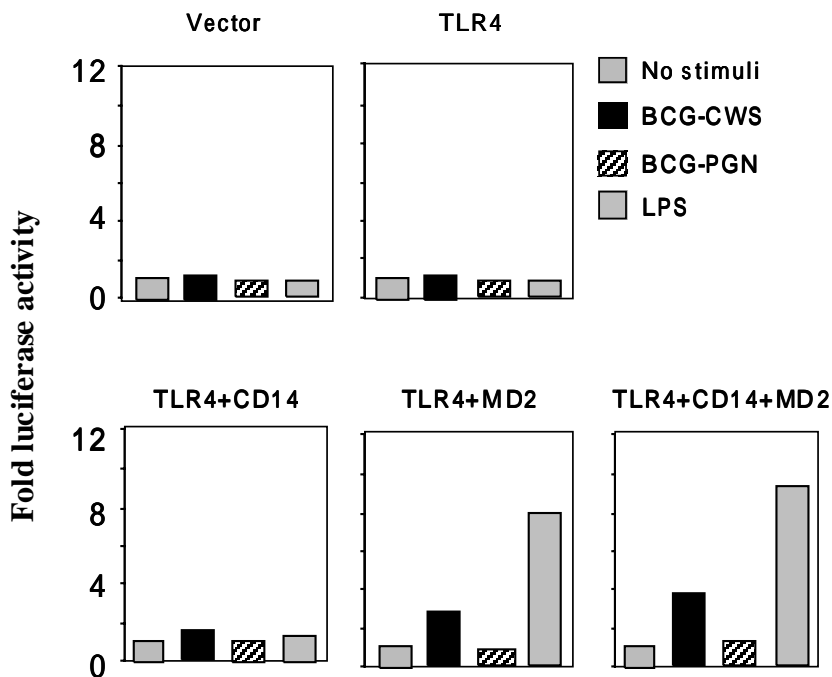


図 1-8. ヒト TLR4 を発現させた HEK293 細胞における NF- κ B の活性化

Vector (A)、ヒト TLR4、ヒト CD14、ヒト MD-2 を発現させた HEK293 細胞を、BCG-CWS (15 μ g/ml)、BCG-PGN (15 μ g/ml)、LPS (100 ng/ml)で 6 時間刺激し、NF- κ B の活性化を測定した。なお、TLR4 のポジティブコントロールには LPS 用いた。縦軸の NF- κ B の活性化は、コントロール（未刺激時における luciferase 量）に対する比活性値で示した。なお、3 回行った実験のうち、1 回の結果を代表して示している。

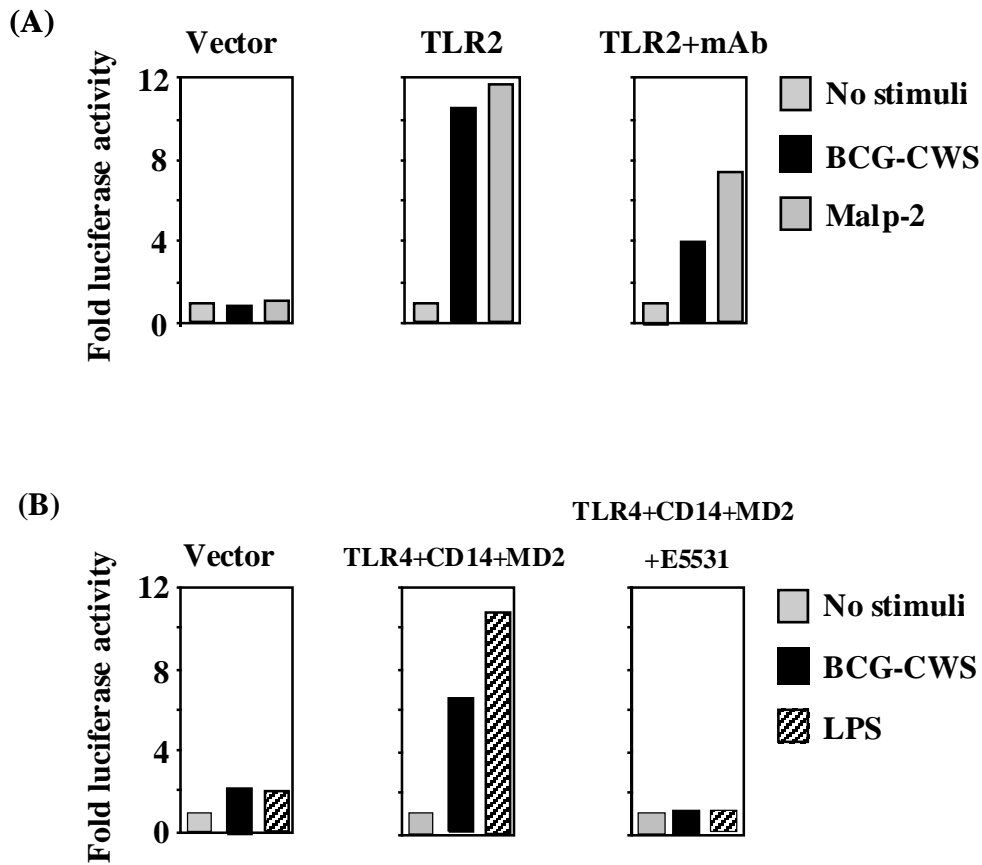


図 1-9. TLR 阻害剤存在化における NF- κ B 活性化の抑制

ヒト TLR2 (A)およびヒト TLR4+CD14+MD-2 (B)を発現させた HEK293 細胞を(A) BCG-CWS (15 μ g/ml)、Malp2 (0.8 μ M)、(B) BCG-CWS (15 μ g/ml)、LPS (100 ng/ml)で刺激し、NF- κ B の活性化を測定した。なお、TLR2 阻害剤には TLR2 モノクローナル抗体 (TLR2.45 : 10 μ g/ml)を、TLR4 阻害剤には LPS アンタゴニストである E5531 (10 μ M)を用いた。縦軸の NF- κ B の活性化は、コントロール (未刺激時における luciferase 量) に対する比活性値で示した。なお、3 回行った実験のうち、全て同じ傾向が得られたので 1 回の結果を代表して示している。

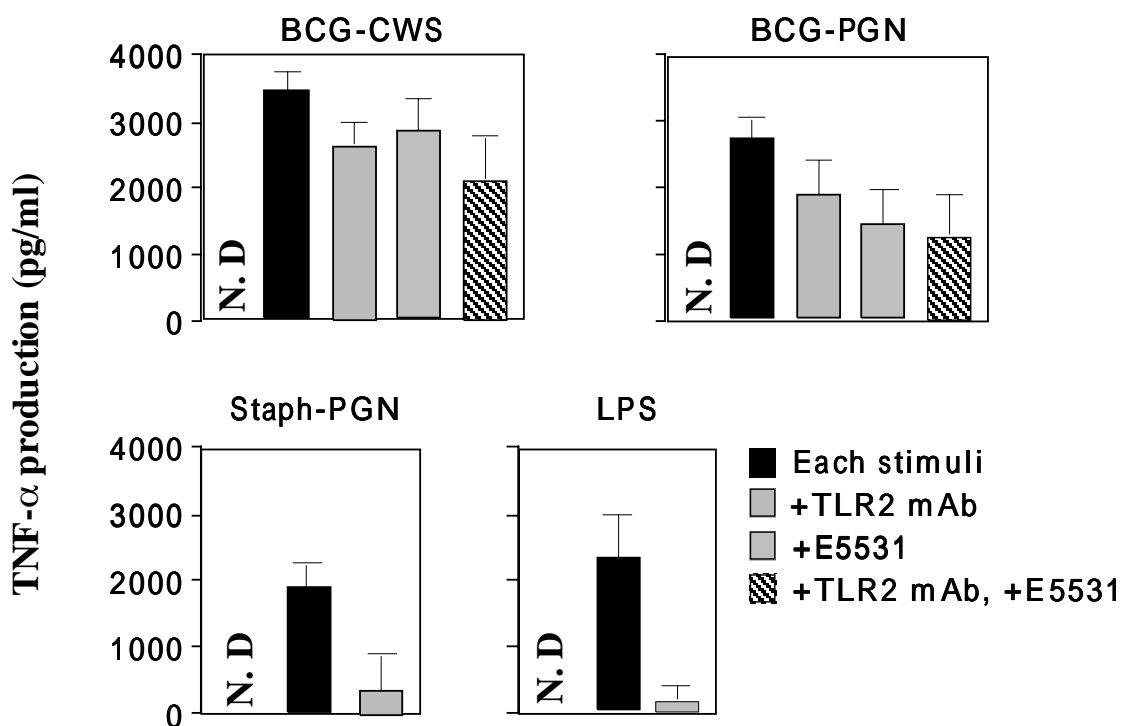


図 1-10. TLR 阻害剤存在化における DC 刺激時の TNF- α 産生

未成熟 DC を TLR2、TLR4 阻害剤である TLR2 モノクローナル抗体(TLR2.45 : 10 μ g/ml)および E5531 (10 μ M)存在化で 37 $^{\circ}$ C 30 分間前処理した後、BCG-CWS (15 μ g/ml)、BCG-PGN (15 μ g/ml)、Staph-PGN (15 μ g/ml)、LPS (100 ng/ml)を加え、37 $^{\circ}$ C で 24 時間培養した。培養後、培養上清中に産生された TNF- α の量を ELISA 法により定量した結果を示した。縦軸は培養上清中の TNF- α の産生量を表している。また、未刺激時の TNF- α 産生量は N.D (not determined)であった。

1-4 考察

本章では DC 成熟化における BCG-CWS の活性部位が BCG-PGN であることを明らかにした。これは、BCG-CWS 構成成分のうち BCG-PGN のみが DC の成熟マーカーである CD83、共刺激分子である CD80、CD86 を発現増加させること(図 1-1, 1-2, 1-3)と、DC 成熟化の際に産生される TNF- α 、IL-12p40 を産生することから示唆された(図 1-4)。さらに、TLR2、TLR4 および MyD88 ノックアウトマウス M ϕ の解析において、BCG-CWS および BCG-PGN はマウス TLR2/4 両方を介し、MyD88 依存的に TNF- α の産生を誘導することが明らかとなった(図 1-5)。なお、Staph-PGN が TLR2 依存的な応答を示したのに対し、BCG-PGN は TLR2 と TLR4 両方に応答を示した違いについては、PGN 構造の違いが考えられる。BCG-PGN の構造と修飾に関しては第 2 章で詳しく述べるが、一般的に PGN はアミノ酸組成の菌種間でのバリエーションが大きく、糖鎖や脂肪酸などの修飾が菌体により異なるとされている(36-38)。したがって、抗酸菌である BCG とグラム陽性菌である *Staphylococcus aureus* 間での構造および修飾の違いにより、BCG-PGN は TLR4 においても認識されると考えられる。理由として、これまでに報告されている TLR2 および TLR4 リガンドの多くは、糖脂質を有している菌体成分が多いことがあげられる。なかでも、菌体成分を元にした合成物による解析では、TLR2、TLR4 共通して、脂質成分の構造が認識に重要であることが証明されている。しかし、TLR2 および TLR4 に対する天然リガンドは多種多様であり、“ある共通のパターン”といったリガンドの同定には至っていない。したがって、今後の解析が待たれる。

次に、ヒト TLR 強制発現系による解析を行った結果、BCG-CWS はヒト TLR2 ヒト TLR4 に応答を示し、BCG-PGN は両者に応答を示さなかった(図 1-6, 1-7, 1-8)。この結果は、DC 成熟化およびマウス M ϕ の結果と矛盾する(図 1-1, 1-3, 1-4, 1-5)。しかし、DC を用いたヒト TLR 阻害実験(図 1-10)の結果では、BCG-CWS と BCG-PGN がヒト TLR2 および TLR4 を介して TNF- α の産生を誘導するという結果が得られ、BCG-PGN が TLR2、TLR4 を介していること示唆された。このヒト DC の結果は、マウス M ϕ と一致する。それぞれの実験系で結果が矛盾する理由として、1)細胞種の違い、2)TLR 以外の分子の関与が考えられる。

1)の理由として、強制発現系で用いた HEK293 は本来異物を認識し免疫応答に関わる細胞ではないのに対し、DC および M ϕ は抗原提示細胞であるという点

が HEK293 と大きく異なる。抗原提示細胞は異物を積極的に認識するため、TLR 以外にも様々な異物認識レセプターが細胞膜上に発現し、異物認識の際には分子複合体を形成する可能性が示唆されている(25, 32-34)。この分子複合体形成が、異物認識さらには TLR を介したシグナル伝達に繋がると考えられる。

2)の理由として、1)でも述べたように、抗原提示細胞上での分子複合体形成における他の分子が重要となる。これまでに TLR リガンドは多数報告されているものの、TLR5-フラジェリン(タンパク質)以外は TLR-PAMPs 間の直接結合は証明されていない。したがって、TLR による PAMPs 認識には別の結合レセプターによる補助的な助けが必要であると考えられている。実際、酵母の細胞壁中に存在する zymosan の場合、C-type lectin ファミリーに属する DC-associated C-type lectin (dectin-1)が結合レセプターとして機能し、TLR2 と相互作用することで dectin-1 依存的に TLR2 を介した応答を示すことが報告されている(34)。また、LPS の場合も同様に MD-2 依存的に TLR シグナルを伝える。これらと似た機能を有する分子が、HEK293 に発現していない場合、DC や Mφに発現する TLR とは異なる応答を示すと考えられる。したがって、BCG-PGN の場合は DC に発現し、HEK293 には発現していない結合レセプターが BCG-PGN 認識後、TLR に受け渡しているかと推測される。一方、BCG-CWS の場合、BCG-PGN とは異なり HEK293 を用いた TLR 強制発現系においても応答を示した。これは、BCG-CWS の糖鎖部分である BCG-arabinogalactan に対する結合レセプターが HEK293 に発現し、TLR による認識を補助しているためではないかと推測された。(詳しくは第3章で述べる)。

以上の結果より、BCG-CWS 構成成分のなかでも BCG-PGN が DC 成熟化における活性部位であると考えられる。また、DC 上に発現している未知の BCG-PGN 結合レセプターが、TLR2 および TLR4 による認識の補助をし、DC による異物認識の効率を高め、さらに高い免疫応答を可能にしていると示唆された。

第 2 章 Toll-like receptor による peptidoglycan 認識機構の解明

はじめに

細菌は、自身の細胞壁構造を維持するため、独自の酵素反応により活発に細胞壁生合成を行っている。なかでも、細菌細胞表層の PGN 層は、細菌が強い浸透圧に耐え、細菌独特の形を維持する上で不可欠な成分である。PGN の構造は主に、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)と N-アセチルムラミン酸(MurNAc)の繰り返し構造を基本骨格として構成されていることが知られている。図 III に PGN の一般的な 模式図を示す。なお、MurNAc に付加している 4 つのペプチドが架橋構造を形成し、巨大分子の形成に非常に重要な役割を果たす。また、PGN には様々な細菌独自の修飾が施されていることが報告されている(36-38)。この修飾に関しては未だ完全に明らかにされていないが、特徴的な修飾として、1) 菌種間でのアミノ酸組成と架橋構造の相違、2) 糖鎖構造の付加、3) 脂肪酸とのエステル結合などがあげられる。これらの修飾が施された巨大分子(PGN)が TLR により認識され、宿主側の免疫応答が開始される。

しかし、TLR が PGN のどのような構造を認識しているかについては全く不明である。したがって、本章では TLR による PGN 認識機構を検討したので以下に示す。

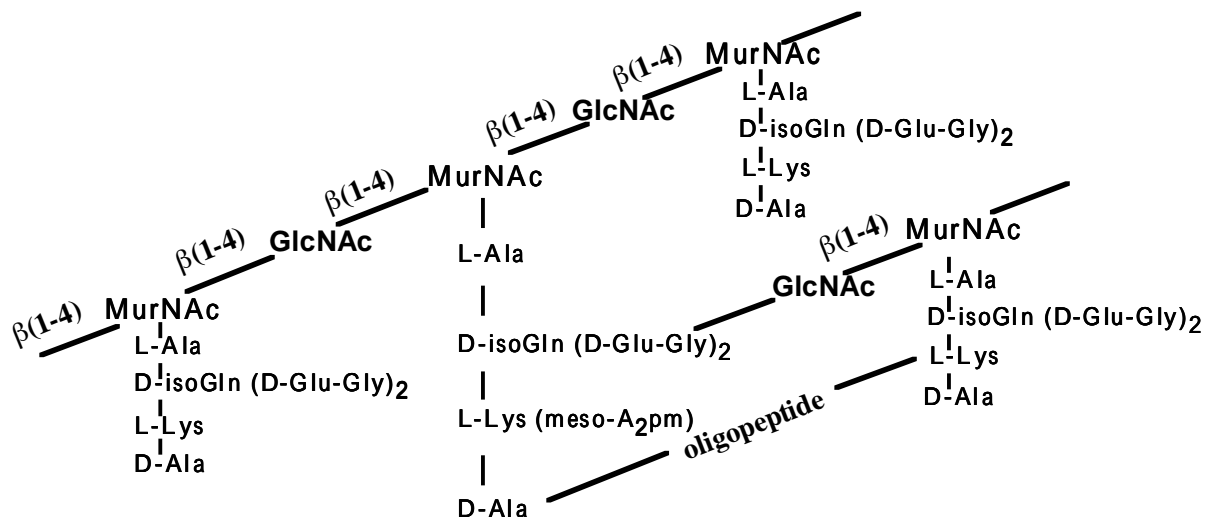


図 III. Peptidoglycan の構造

2-1. 実験材料および試薬

2-1-1. MDP およびアシル化 MDP

Muramyl-dipeptide (MDP)は CALBIOCHEM 社より購入した。アシル化 MDP は、大阪大学理学部深瀬浩一助教授に合成を依頼した(39-41)。

2-1-2. その他の材料および試薬

使用したその他の材料および試薬は、1-1 に記した。

2-2. 実験方法

2-2-1. 未成熟 DC およびマクロファージの刺激

(1) 各 MDP の調製

MDP、6Dec-MDP、4,6Dec-MDP、6Ste-MDP、4,6Ste-MDP は D-PBS に懸濁した。

(2) 細胞への刺激

D-PBS に懸濁した各 MDP は、polymyxin B で処理後、終濃度 15 μg MDP eq/ml となるよう細胞に加えた。

2-2-2. RT-PCR

未成熟 DC (5.0×10^6 個)を各種成分で 4 時間刺激した DC の total RNA を鋳型とし、様々なサイトカインに対するプライマーを用いて RT-PCR を行った。Total-RNA の回収は RNeasy mini kit (Qiagen 社)を使用した。RT 反応には、Superscript II reverse transferase (Gibco 社)を用い、42 で 60 分間反応させた。得られた 1st strand cDNA は rTaq (TAKARA 社)を用いて 94°C 20 秒、55°C 30 秒、72°C 30 秒で 30 サイクル行った。なお、コントロールとして、 β -actin に対するプライマーを用いて同様の条件で反応を行った。下に用いた primer set を示す。

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • TNF-α 5'-GGGGCCACCACGCTCTTCTG-3' 5'-GGCAGGGGCTCTTGACGGC-3' | <ul style="list-style-type: none"> • IL-12p19 5'-GTTCCCCATATCCAGTGTGG-3' 5'-GACTGAGGCTTGGAATCTGC-3' |
| <ul style="list-style-type: none"> • IL-12p40 5'-AAGGAGGCGAGGTTCTAAGC-3' 5'-GAACGCAGAATGTCAGGGAG-3' | <ul style="list-style-type: none"> • IL-6 5'-ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC-3' 5'-GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG-3' |
| <ul style="list-style-type: none"> • IL-12p35 5'-AAGGAGGCGAGGTTCTAAGC-3' 5'-GAACGCAGAATGTCAGGGAG-3' | <ul style="list-style-type: none"> • IP10 5'-CCACGTGTTGAGATCATTGC-3' 5'-GCAGGGTCAGAAACATCCAC-3' |

2-2-3. allogenic-mix lymphocyte reaction (allo-MLR)

polymyxin B 処理を施した各成分で未成熟 DC を刺激し、37 °C で 24 時間培養した後、DC を回収し、2 回 D-PBS で遠心洗浄を行った。同時に、allogenic-PBMC の調製を行った。調製した allogenic-PBMC を 96-well plate (1.0×10^5 /well : 100 μ l) に用意し、そこに刺激後の DC を $0.5-2.0 \times 10^5$ 個加えた。その後、37 °C で 48 時間培養した後、CellTiter 96^R Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (PROMEGA 社)を用いて PBMC の増殖活性を測定した。

2-3. 実験結果

2-3-1. MDP の構造と作用機構

グラム陰性菌とグラム陽性菌の PGN に共通してみられる構造として、MurNAc に L-アラニン(L-Ala)と D-イソグルタミン(D-isoGln)の二つのペプチドが付加した muramyl-dipeptide (MDP)があげられる。MDP はアジュバント活性を含む PGN の最小構造単位であり、単球系細胞の細胞質に存在する NOD2 を介して NF- κ B を活性化することが明らかとなっている(図 2-1) (38, 42-44)。しかし、NOD2 を介したシグナルは TLR を介したシグナルとは異なり、DC 成熟化マーカーの発現上昇やタンパクレベルでのサイトカイン産生は認められない(45-46)。この相違に関しては現在のところ不明であるが、PGN による DC 成熟化には TLR による認識が必須であると考えられる。

PGN が MDP と構造的に異なる点は、架橋されたポリマーであること、様々な修飾を受けていることがあげられる。この修飾のなかでも TLR2 および TLR4 のリガンドに多くみられる脂肪酸の付加という修飾に着目した。なかでも、BCG-PGN における脂肪酸修飾の知見を参考にし、MDP の 4 位と 6 位それぞれに脂肪酸を付加したアシル化 MDP を合成した(図 2-2) (37, 39-41)。Decanoyl 基を 6 位に付加した 6Dec-MDP、4 位と 6 位に付加した 4,6Dec-MDP、stearoyl 基を 6 位に付加した 6Ste-MDP、4 位と 6 位に付加した 4,6Ste-MDP を用いて解析を行った。

2-3-2. アシル化 MDP 刺激における DC 成熟化

未成熟 DC を各 MDP 誘導体で刺激した結果、6Dec-MDP、6Ste-MDP でのみポジティブコントロールである Staph-PGN、LPS と同等の DC 成熟化マーカー CD83、CD80、CD86 の発現増加が認められた(図 2-3. A)。また、MDP、4,6Dec-MDP、4,6Ste-MDP では無刺激時と同様、成熟化マーカーの発現増加が認められなかった。さらに、各種 MDP で刺激した DC を用いて allo-MLR を行ったところ、(図 2-3. A)の結果と同様に 6Dec-MDP、6Ste-MDP においてのみ PBMC の増殖活性が認められた(図 2-3. B)。

次に、DC を MDP、6Ste-MDP で 4 時間刺激した total RNA をテンプレートに RT-PCR を行った。その結果、6Ste-MDP 刺激では NF- κ B 活性化による TNF- α 、IL-12p40、IL-23p19、IL-6 の mRNA 発現上昇が確認されたが、IP10、IL-12p35

の発現上昇は認められなかった。一方、MDP 刺激においては、全てにおいて発現上昇が認められなかった(図 2-4. B)。なお、NOD2 を介した NF- κ B 活性化による各分子の発現上昇は、刺激に用いた MDP 濃度が薄いため確認できていないと考えられる。したがって、6Ste-MDP 刺激時の TNF- α 、IL-12p40、IL-23p19、IL-6 mRNA 発現上昇は、NOD2 からのシグナルに対する応答ではなく、TLR からのシグナルによる応答であると示唆された。

さらに、タンパクレベルでのサイトカインの産生を TNF- α を指標とし、ELISA 法により定量した。その結果、未成熟 DC を 6Dec-MDP、6Ste-MDP で刺激することにより、TNF- α の産生が認められた(図 2-5 A)。また、6Dec-MDP、6Ste-MDP の濃度依存性を検討したところ、両者とも濃度依存的に TNF- α を産生させることが明らかとなった(図 2-5 B)。

2-3-3. アシル化 MDP 認識における TLR の関与

2-3-2.で示された、6Dec-MDP と 6Ste-MDP による DC 成熟化マーカーの発現上昇とサイトカインの産生が、TLR を介した応答であるのかを検討するため、MyD88 ノックアウトマウス腹腔 M ϕ を用いて TNF- α の産生を指標に解析を行った。その結果、6Dec-MDP、6Ste-MDP 刺激時の wild type M ϕ では TNF- α の産生が認められるのに対し、MyD88 ノックアウト M ϕ では、TNF- α 産生量がほとんど認められなくなった(図 2-6)。これより、6Dec-MDP と 6Ste-MDP の認識には、MyD88 の上流に位置する TLR の関与が示唆された。

次に、6Dec-MDP、6Ste-MDP と TLR との関係を検証すべく、ヒト DC における TLR2、TLR4 阻害実験を TNF- α の産生を指標に解析を行った。TLR 阻害剤には、1 章で用いた TLR2 モノクローナル抗体(TLR2. 45)と LPS アンタゴニストである E5531 を用いた(27-28)。また、NOD2 を介した応答を完全に排除するために、NOD2 の MDP 認識部位となる L-Ala-D-isoGln を L-Ala-L-isoGln に置換した誘導体 6Ste(LL)-MDP を合成し、6Dec-MDP、6Ste-MDP と同様に用いた(図 2-7 A) (42)。その結果、TLR2、TLR4 阻害剤の添加により TNF- α の産生が抑制された。したがって、6Dec-MDP、6Ste-MDP による TNF- α 産生は、TLR2、TLR4 を介した応答であることが明らかとなった。また、データには示していないが、(図 1-6, 図 1-8)と同様に、HEK293 における NF- κ B reporter gene assay も行った。その結果、アシル化 MDP は BCG-PGN の結果同様、全ての TLR 発現細胞に応答を示さなかった。

さらに、TLR 阻害剤存在化における 6Ste-MDP、6Ste(LL)-MDP による DC 成熟化マーカー CD80、CD83、CD86 の発現変化を測定した。その結果、TLR2 および TLR4 阻害剤の添加により、6Ste-MDP、6Ste(LL)-MDP 刺激時の CD80、CD83、CD86 の発現上昇が抑制された(図 2-8)。これより、6Ste-MDP、6Ste(LL)-MDP 刺激時の DC 成熟化マーカーの発現上昇は、TLR2、TLR4 を介して起きることが明らかとなった。

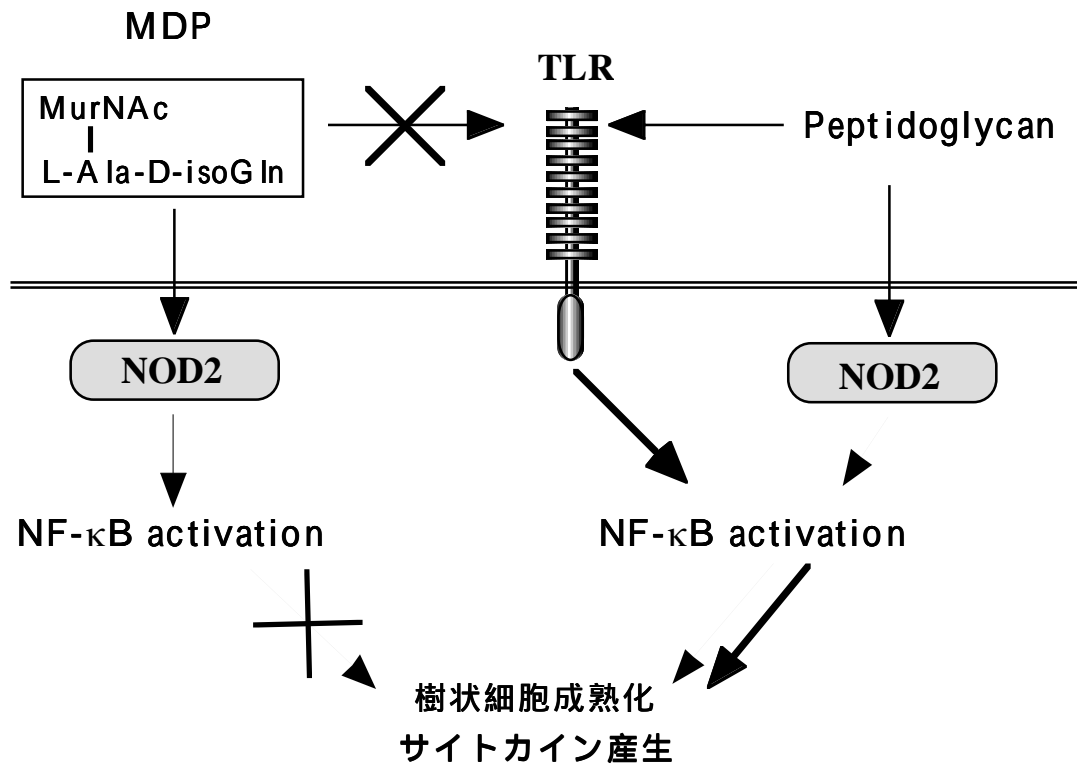
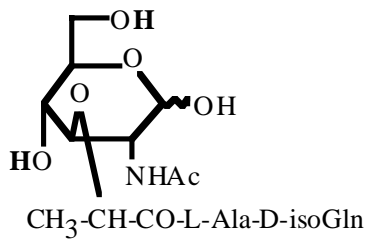


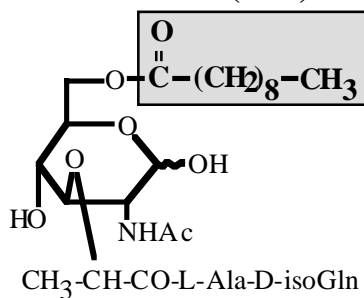
図 2-1. DC における MDP の作用機構

アジュバント活性を有する PGN の最小構造単位 Muramyl-dipeptide (MDP)は、TLR に認識されない。しかし、MDP は単球系細胞の細胞質に存在する LRR タンパクである NOD2 により認識されることが報告されている(45)。NOD2 は MurNAc に付加されている L-Ala-D-isoGln の 2 つのペプチド部分を認識し、最終的に NF-κB 活性化を引き起こす(42)。NOD2 を介した NF-κB 活性化による応答では、炎症性サイトカインの mRNA 発現上昇は認められるものの、タンパク質レベルでのサイトカイン産生や DC 成熟化マーカーの発現上昇は認められない(45)。これには、サイトカイン翻訳時に何らかの阻害機構が働いていると推測されているが現在のところ不明である。しかし、TLR シグナルと同時に伝達される際には、翻訳阻害機構が解除され、両者からのシグナルにより相加的なサイトカイン産生が起こるとされている。したがって、PGN による応答は TLR と NOD2 を介した結果であると示唆されている(45)。

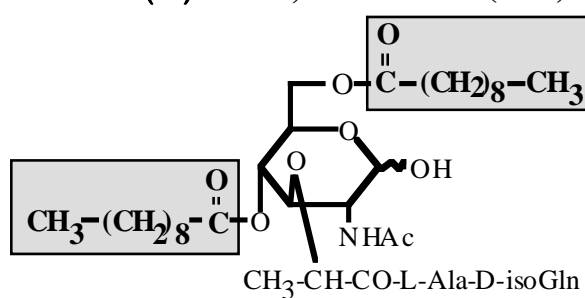
(A) MDP



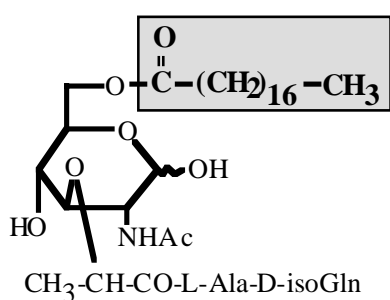
(B) 6Dec-MDP (C10)



(C) 4, 6Dec-MDP (C10)



(D) 6Ste-MDP(C18)



(E) 4, 6Ste-MDP(C18)

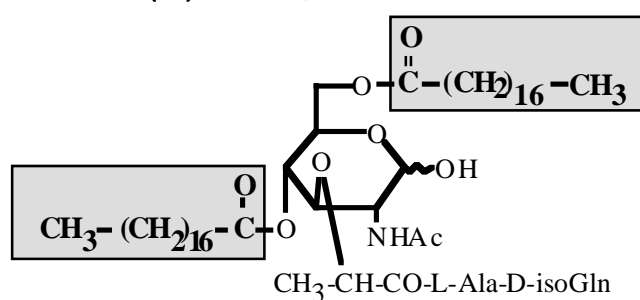


図 2-2 アシル化 MDP の構造

合成したアシル化 MDP の構造を記す(B-E)。 (A) MDP、 (B) MDP の 6 位に decanoyl 基 (C10) を付加した 6Dec-MDP、 (C) MDP の 4 位と 6 位に decanoyl 基を付加した 4,6Dec-MDP、 (D) MDP の 6 位に stearyl 基 (C18)を付加した 6Ste-MDP、 (E) MDP の 4 位と 6 位に stearyl 基を付加した 4,6Ste-MDP

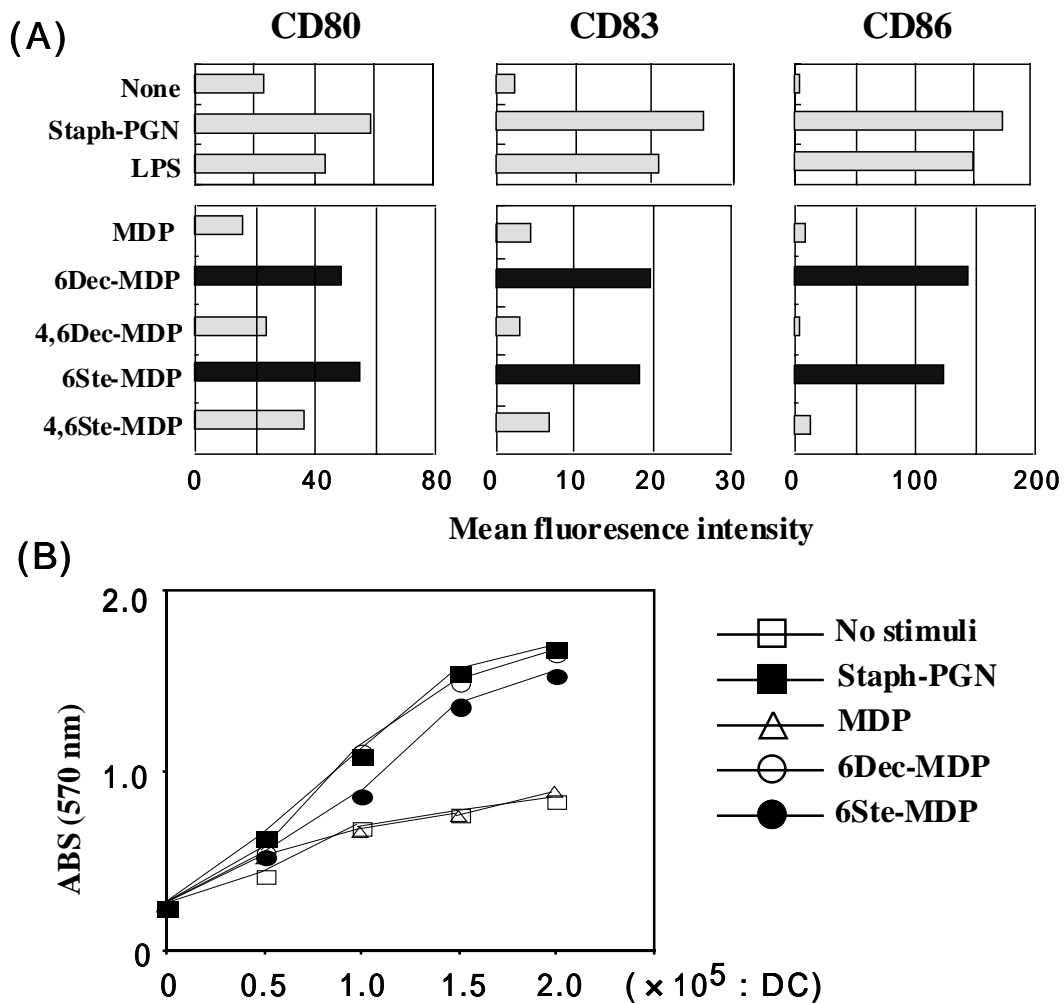


図 2-3. アシル化 MDP 刺激時における DC 成熟化

(A) 1点あたり 2.5×10^5 個の未成熟 DC に各成分を加え 37 で 24 時間培養した後、DC 成熟化マーカーである CD80、CD83、CD86 発現変化をフローサイトメーターで測定した。上段) ポジティブコントロールには、Staph-PGN (15 $\mu\text{g/ml}$)、LPS (100 ng/ml)を用い、下段) MDP およびアシル化 MDP は各 15 $\mu\text{g MDP eq/ml}$ となるように加えた。また、横軸は FITC の蛍光強度(発現量)を示す。

(B) 各成分で 24 時間刺激後の DC を用いた allogenetic-MLR の結果を示す。刺激後回収した DC を 1.0×10^5 個の allogenetic-PBMC と混合培養し、48 時間後の PBMC 増殖活性を測定した。なお、各成分は(A)と同様の条件で刺激を行った。グラフ縦軸の吸光度(570 nm)は細胞の増殖度を示し、横軸は培養に用いた DC の個数を示す。

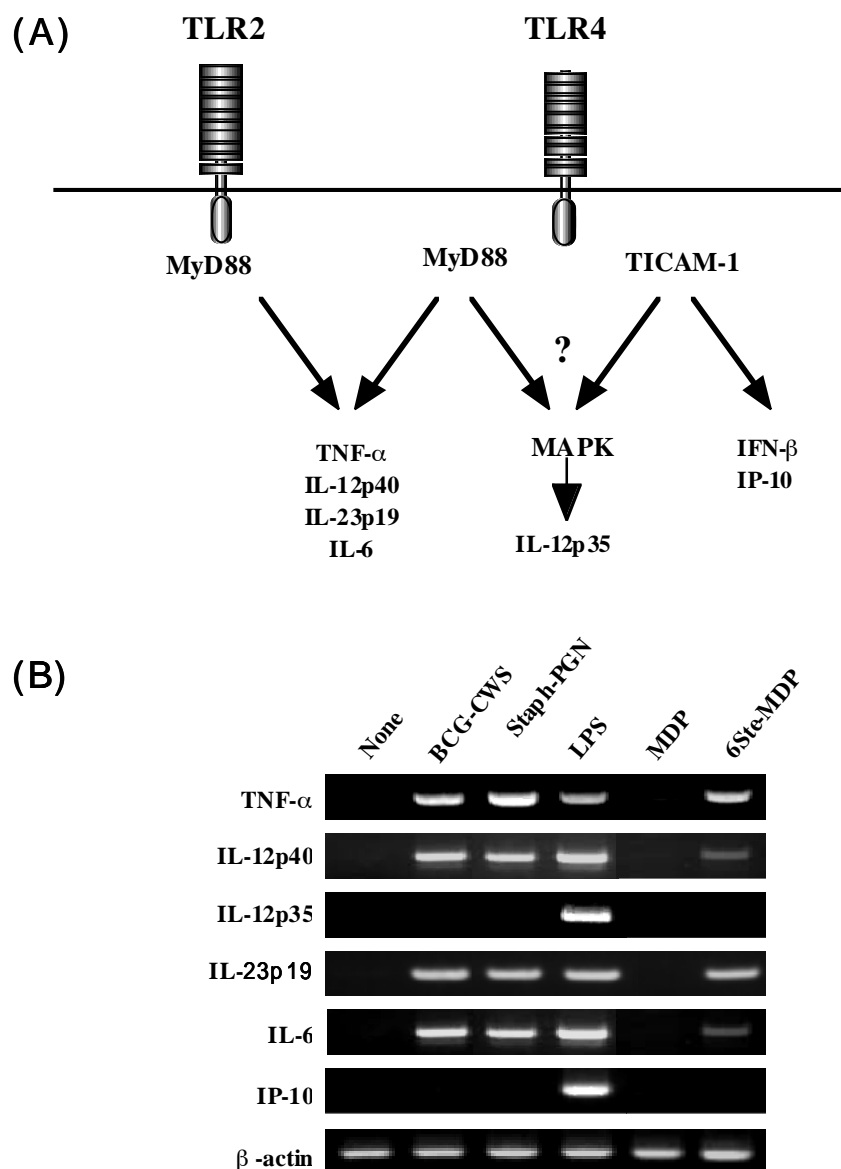
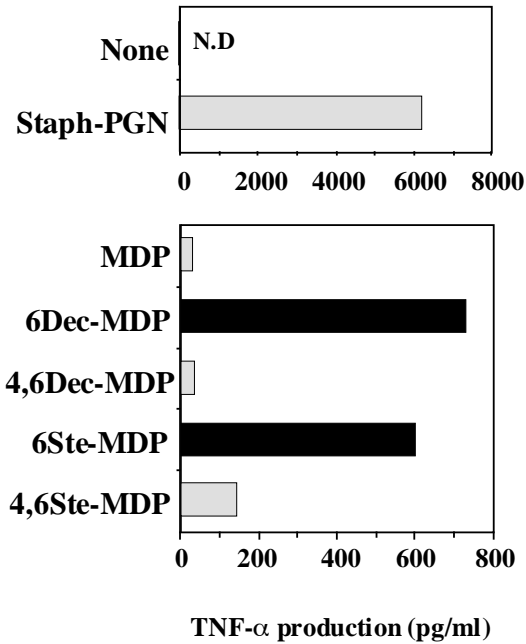


図 2-4. アシル化 MDP 刺激時の DC におけるサイトカインの発現変化(RT-PCR)

(A) TLR2 および TLR4 を介したシグナルにより発現上昇するサイトカインを示した。TLR2 と TLR4 共通のアダプター分子である MyD88 からのシグナルは、TNF- α 、IL-12p40、IL-23p19、IL-6、IL-12p35 などの mRNA 発現を誘導する。なお、IL-12p35 については TLR4 からのシグナルが MAP キナーゼ(MAPK)を介して発現誘導されることが明らかとなっている。一方、TLR4 の下流に位置する TICAM からシグナルは、IFN- β 、IP10 を誘導する。

(B) 未成熟 DC を各成分で 4 時間刺激した後、回収した total RNA を鋳型とし RT-PCR を行った。なお、PCR に用いた各 primer は、(2-2-2)に記した。刺激に用いた各成分は、BCG-CWS (15 μ g/ml)、Staph-PGN (15 μ g/ml)、LPS (100 ng/ml)、MDP (15 μ g/ml)、Ste-MDP (15 μ g MDP eq/ml)の濃度で用いた。

(A)



(B)

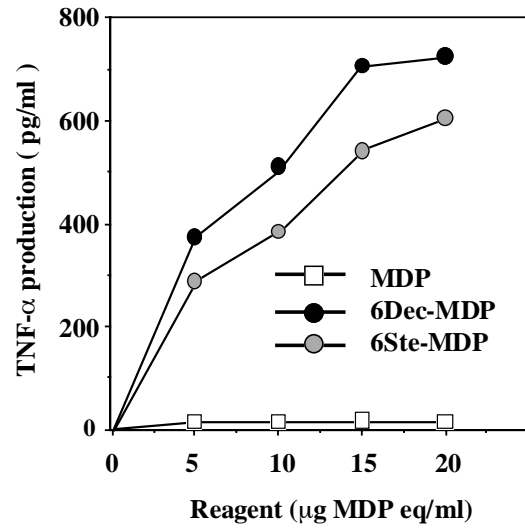


図 2-5. アシル化 MDP 刺激を行った DC における TNF- α 産生

(A) 未成熟 DC を各成分で 37、24 時間培養した際に培養上清中に産生された TNF- α 量を ELISA 法により定量した。各成分の刺激濃度は、Staph-PGN (15 $\mu\text{g/ml}$)、LPS (100 ng/ml)、MDP (15 $\mu\text{g/ml}$)、6Dec-MDP (15 $\mu\text{g MDP eq/ml}$)、4,6Dec-MDP (15 $\mu\text{g MDP eq/ml}$)、6Ste-MDP (15 $\mu\text{g MDP eq/ml}$)、4, 6Ste-MDP (15 $\mu\text{g MDP eq/ml}$)で行った。横軸は培養上清中の TNF- α 産生量を表している。なお、数回行った実験のうち、全て同じ傾向が得られたので 1 回の結果を代表して示した。

(B) (A)において TNF- α の産生が認められた 6Dec-MDP と 6Ste-MDP の濃度依存性を測定した。方法は(A)と同様である。なお、縦軸は TNF- α の産生量を、横軸は刺激に用いた各成分の濃度を表す。

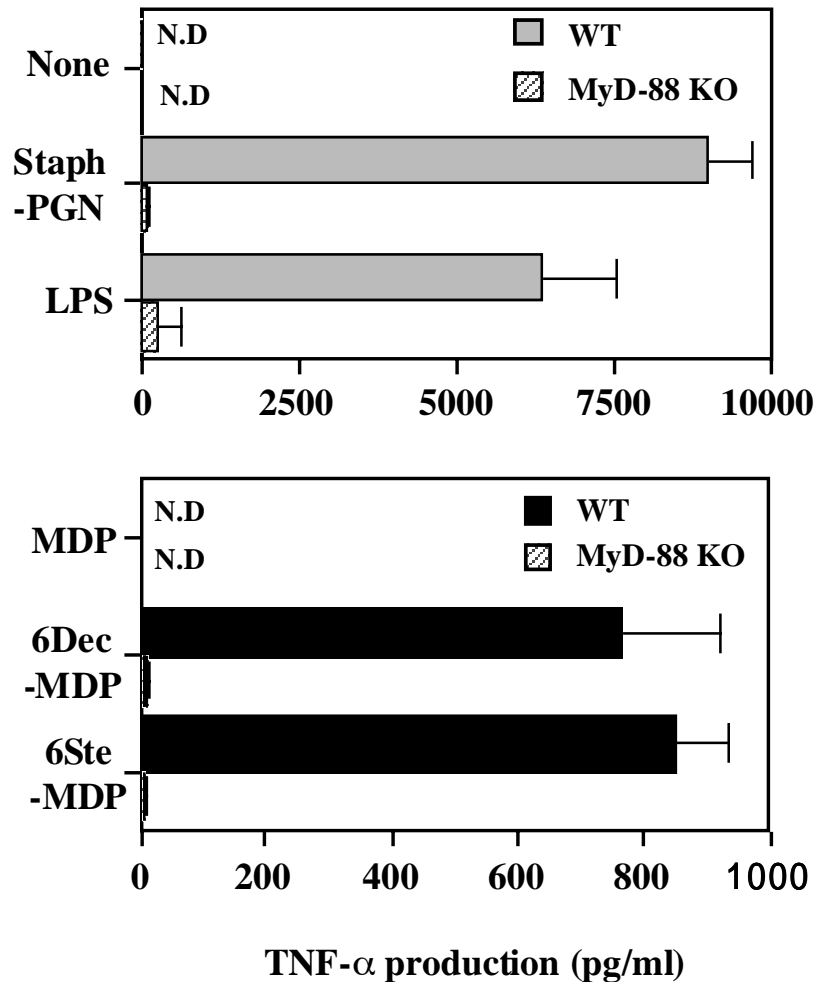


図 2-6. アシル化 MDP 刺激時のマウス腹腔 Mφにおける TNF-αの産生

Wild type、MyD88 ノックアウトマウス腹腔 Mφを各成分で 37、24 時間培養後、培養上清中の TNF-α量を ELISA により定量した。各成分の刺激濃度は、Staph-PGN (15 μg/ml)、LPS (100 ng/ml)、MDP (15 μg/ml)、6Ste-MDP (15 μg MDP eq/ml)で行った。横軸は培養上清中の TNF-α産生量を表している。

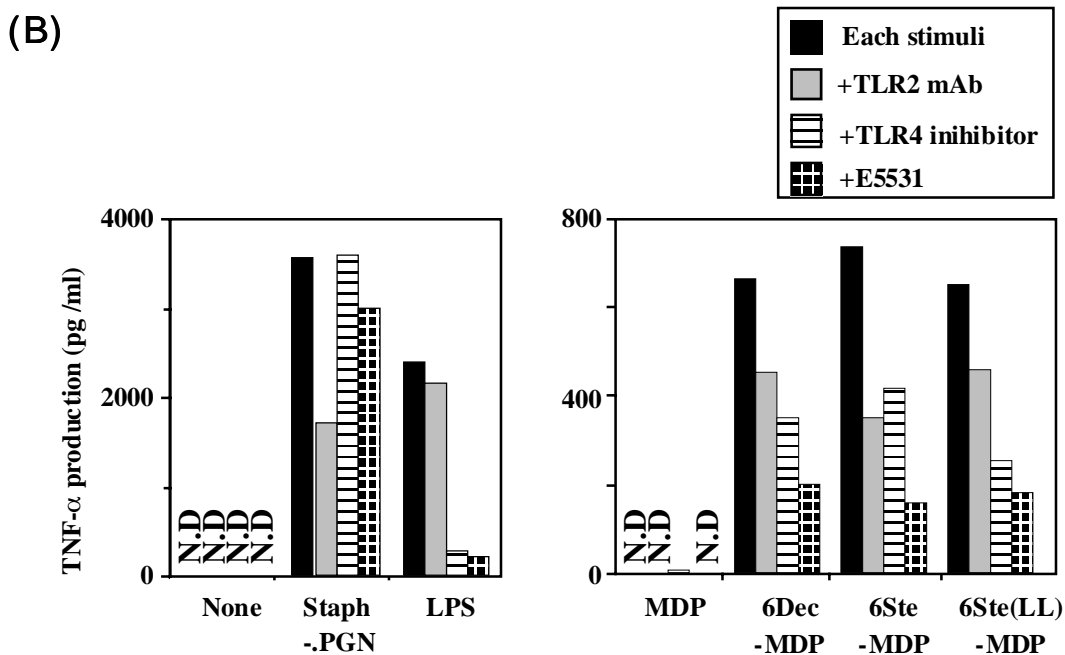
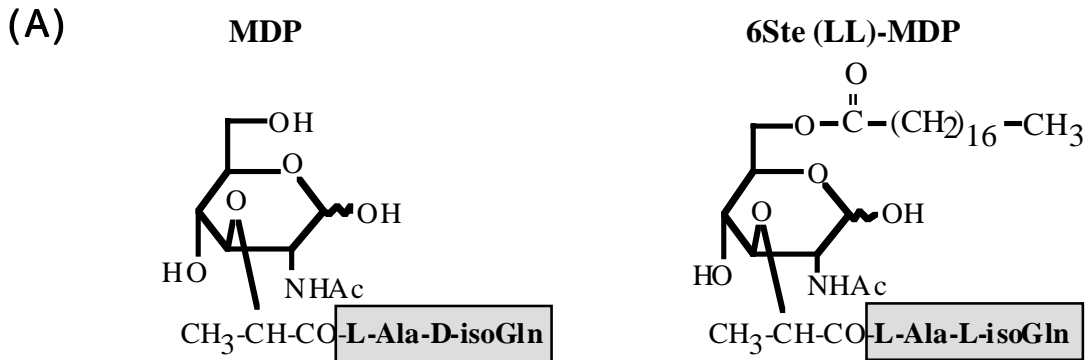


図 2-7. TLR 阻害剤存在化における DC 刺激時の TNF- α 産生

(A) NOD2 の関与を完全に除くために、NOD2 の MDP 認識部位となる L-Ala-D-isoGln を L-Ala-L-isoGln に置換した誘導体 6Ste(LL)-MDP を合成した。その構造を示す。

(B) 未成熟 DC を TLR2 モノクローナル抗体(TLR2.45 : 10 μ g/ml)および TLR4 阻害剤である TLR4 inhibitor (0.1 nM)、E5531(10 μ M)存在化で、4、30 分前処理した後、各種成分を加え、37 で 24 時間培養した。培養後、培養上清中に産生された TNF- α の量を ELISA 法により定量した。各成分の刺激濃度は、Staph-PGN (15 μ g/ml)、LPS (100 ng/ml)、MDP (15 μ g/ml)、6Ste-MDP (15 μ g MDP eq/ml)、6Ste(LL)-MDP (15 μ g MDP eq/ml)で行った。縦軸は培養上清中の TNF- α の産生量を表している。なお、これらの結果は、なお、数回行った実験のうち、全て同じ傾向が得られたので 1 回の結果を代表して示した。

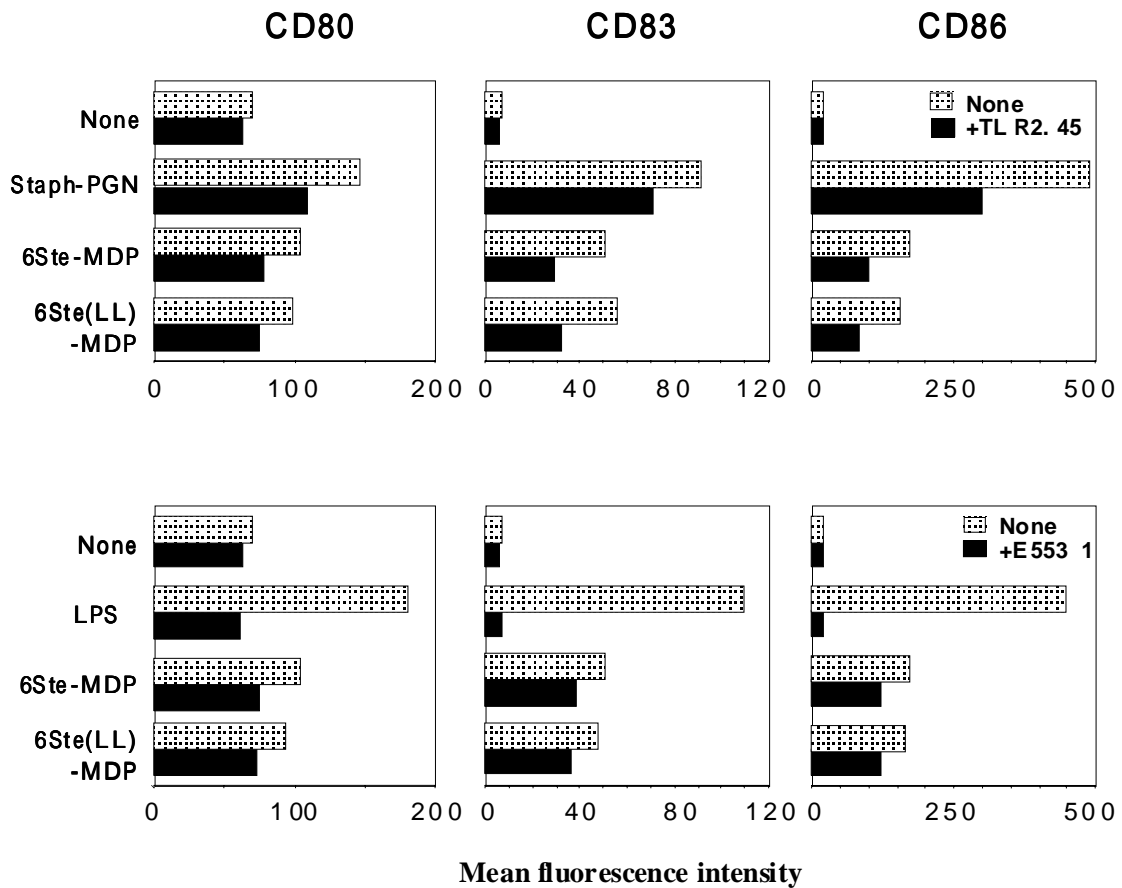


図 2-8. TLR 阻害剤存在化における DC 刺激時の TNF- α 産生

未成熟 DC を TLR2 モノクローナル抗体 (TLR2.45 : 10 μ g/ml) および TLR4 阻害剤である E5531 (10 μ M) 存在化で 4 30 分間処理した後、各種成分を加え、37 で 24 時間培養した。培養後、DC 成熟化マーカーである CD80、CD83、CD86 発現変化をフローサイトメーターで測定した。各成分の刺激濃度は、Staph-PGN (15 μ g/ml)、LPS (100 ng/ml)、6Ste-MDP (15 μ g MDP eq/ml)、6Ste(LL)-MDP (15 μ g MDP eq/ml) で行った。横軸は、FITC の蛍光強度 (発現量) を示している。なお、数回行った実験のうち、全て同じ傾向が得られたので 1 回の結果を代表して示した。

2-4. 考察

本章では、アシル化 MDP を用いた実験の結果から、TLR による PGN を認識には、PGN 修飾の際に付加される脂肪酸をリガンドにする可能性が示唆された。MDP の 6 位にアシル基を付加した 6-O-アシル化 MDP(6Dec-MDP、6Ste-MDP) は、DC 成熟化マーカーの発現を増加させ(図 2-3)、TNF- α 、IL-12p40、IL-23p19、IL-6 mRNA の発現増加を促した(図 2-4)。また、MyD88 ノックアウトマウス M ϕ (図 2-5)、ヒト DC (図 2-6)、さらには、TLR 阻害剤 (図 2-7)を用いた TNF- α 産生の結果から、6-O-アシル化 MDP は TLR2 および TLR4 を介し MyD88 依存的にシグナルを伝えることが明らかとなった。また、今回使用した、各 MDP 濃度では、NOD2 を介した NF- κ B の活性化は認められなかった(図 2-4) (45)。したがって、6-O-アシル化 MDP による DC 成熟化および TNF- α 産生は、TLR 依存的な応答であることも明らかとなった。

しかし、第 1 章および第 2 章の結果を合わせて考えると、幾つかの疑問点があげられる。

1). 4,6-O-アシル MDP は、6 位にアシル基が付加されているにも拘わらず、DC に対し全く活性を示さなかった。この理由として、脂肪酸を含む分子構造の重要性が考えられる。例えば、脂肪酸が TLR による認識において重要な役割を担う PAMPs に LPS、Malp-2、Pam3 などがあげられる。LPS は C10-16 を 6-7 分子、Malp-2 はパルミチン酸(C18)を 2 分子、Pam3 はパルミチン酸(C18)を 3 分子含む構造をとっている。これらの PAMPs は、脂肪酸の数と位置(向き)により活性強度が決定している。実際に、TLR4 阻害剤として用いた E5531 は、LPS の活性中心である Lipid A と天然に存在する無毒化 LPS の Lipid A 構造をもとに開発されている。無毒化 Lipid A や E5531 は脂肪酸の数が少ないだけでなく、脂肪酸の長さや化学的・構造的安定性によりアンタゴニスト作用を発揮する(28)。また、Malp-2 や Pam3 も同様に糖の置換や脂肪酸の変化により活性が大きく異なる。したがって、6-O-アシル MDP および 4,6-O-アシル MDP の活性の相違も脂肪酸の数と構造の違いによることが要因になっていると推測される。

2). 6-O-アシル化 MDP による TLR を介したシグナルは、BCG-PGN、Staph-PGN のシグナルと比較して非常に弱いことが RT-PCR と TNF- α 産生量の結果から確認された。この理由として、PGN は側鎖ペプチド同士の架橋構造形成により構

造的安定性を増し、TLR によるリガンド認識効率が上昇している可能性も考えられる。これまでに PGN 構造を軸とした TLR による認識機構の解析は進んでいないため、PGN に対する他の修飾によるものか、架橋構造形成による影響なのかは不明である。現在までの知見では、PGN の基本骨格を形成している (MurNAc-GlcNAc) の 4 量体および 8 量体では、TLR により認識されないと報告されている(43)。したがって、今後 PGN だけに限らず、TLR のリガンド認識機構の解明を行うには、さらに複雑な合成リガンドの解析が必要になると考えられる。

3). BCG-CWS、BCG-PGN および 6-O-アシル化 MDP は、DC 上の TLR2 と TLR4 の両者を介するにも拘わらず、TLR4 シグナル (LPS シグナル) による IL-12p35 や IFN- β 、IP-10 の発現誘導が認められない。RT-PCR の結果(図 2-4)でも示されているように、LPS では TLR4 を介した IL-12p35、TLR4-TICAM-1 を介した IP-10 が誘導されている。一方、BCG-CWS、BCG-PGN および 6-O-アシル化 MDP の場合、TLR2 のみを介する Staph-PGN の発現パターンと同じ傾向を示している。BCG-CWS や 6-O-アシル MDP は TLR2 と TLR4 の両方に認識されるが、TICAM よりも MyD88 を優先的に動員させてシグナルを伝えていると推測される。また、最近の知見によると、TLR シグナルにより活性化される MAP kinase (MAPK) が IL-12p35 の発現調節に重要な働きを行っていることが報告されている(47)。TLR シグナルにより活性化される MAPK のなかでも JNK と p38 経路は、IL-12p35 の発現を増加させるのに対し、ERK 経路は転写因子 c-fos の発現上昇により IL-12p35 の発現を抑制するとされている。しかし、これらの応答は TLR リガンドにより異なるため一概に当てはめることは出来ない。したがって、今後は各 TLR リガンドに対する応答、TLR とアダプター分子の関係、シグナル伝達経路により活性化される転写因子との関係を明確にする必要がある。

最後に、今回用いたアシル化 MDP を含めた MDP 誘導体によるアジュバント活性の測定は、古くから行われており、*in vivo* での抗ウイルス作用や抗菌作用、さらには抗腫瘍作用などの報告がされている(48-52)。しかし、それらの作用に対する分子レベルでの証明は一切なされていなかった。そのため、本研究においてアシル化 MDP と TLR および MyD88 との関係を明らかにしたことは、大変興味深いと思われる。

第3章 ヒト樹状細胞による BCG-CWS および BCG-PGN の結合と貪食

はじめに

1章より TLR を介した BCG-CWS、BCG-PGN による DC 成熟化は確認されたが、異物として細胞内に取り込まれなければ、MHC 提示によるリンパ球活性化などの免疫応答は起こらないと考えられる。一般に TLR はリガンドに対する親和性が弱く、PAMPs との直接結合に関しても僅かしか報告されていない。そのため、TLR は異物を細胞内に取り込むレセプターには成り得ないと考えられており、結合および貪食には別のレセプターによる補助的な機構の存在が示唆されている。実際、PAMPs 結合レセプターとして CD14 (LPS) や C-type lectin ファミリーの dectin-1 (zymosan)、DC-SING (BCG-lipoarabinomannan) などの分子が報告されている(32, 34, 53-54)。

本章では、BCG-CWS の DC 内への取り込み機構を明らかにする目的で、DC に対する BCG-CWS および BCG-PGN の結合と貪食を解析した。なお、リガンドの同定および解析を行う際に必要と考えられた BCG-CWS の構造を図 IV に示す。図 IV は、現在までに報告されているヒト結核菌の構造から予想された BCG-CWS の構造を示した図である(55-56)。以下に得られた知見について示す。

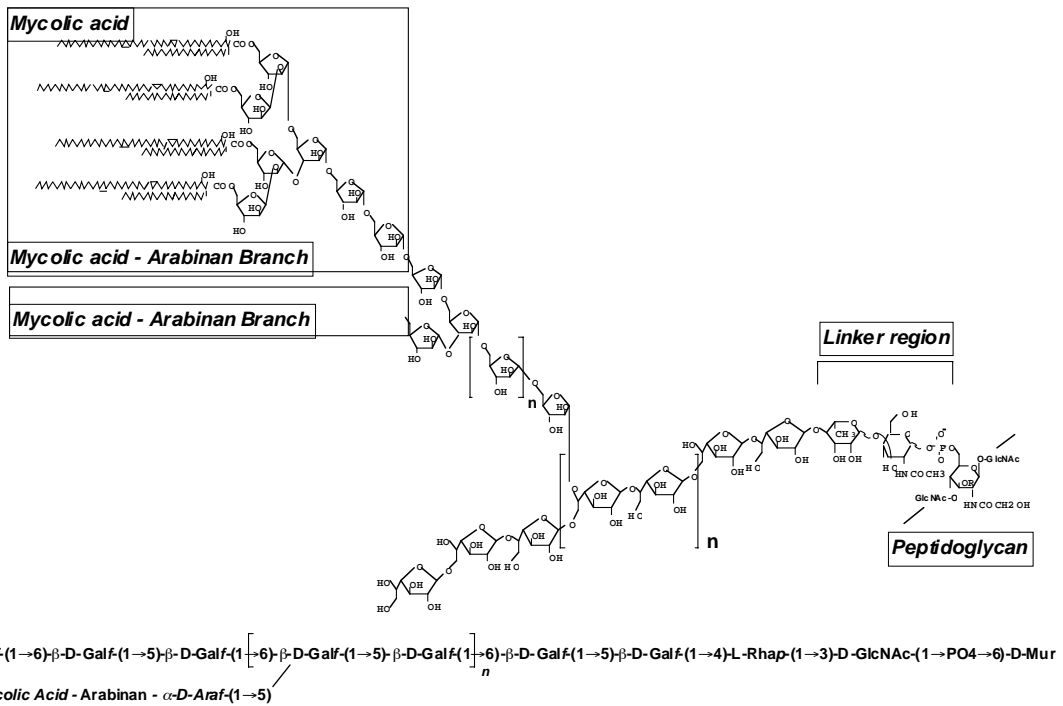


図 IV. ヒト結核菌の構造より予想される BCG-CWS の構造

3-1. 実験材料および試薬

3-1-1. 試薬

D-fucose、N-acetyl-D-glucosamine、N-acetyl-D-galactosamine は SIGMA 社より、N-acetyl-D-mannosamine はナカライテスク社より購入した。D-arabinose、L-arabinose、D-galactose、D-mannose、lactose、D-glucose、cellobiose、D-raffinose、L-rhamnose、maltose、sucrose、melibiose、L-sorbose、trehalose、D-xylose、L-xylose、L-fucose、D-fructose、D-lyxose、D-ribose、2-deoxy-D-ribose、2-deoxy-D-glucose はフナコシ社より購入した。EDTA・3Na は和光純薬社より購入した。

3-2. 実験方法

3-2-1. FITC 標識 BCG-CWS および BCG-PGN の調製

BCG-CWS および BCG-PGN の FITC 標識は以下のように行った。粉末の BCG-CWS および BCG-PGN を Potter's homogenizer を用いて 50 mM N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES)-buffered saline (pH 8.5) に 1 mg/ml の濃度で懸濁した。次に、10 μ g/ml になるように DMSO に溶解した FITC を加え、遮光下で 37 $^{\circ}$ C、30 分間反応させた。反応後、4 $^{\circ}$ C、15000 rpm、5 分間遠心し、ペレットを 50mM HEPES-burrered saline (pH 7.0) で洗浄した。洗浄後、1 mg/ml になるように emulsion buffer に懸濁し、再度 Potter's homogenizer を用いて懸濁した。最後に 60 $^{\circ}$ C、30 分間熱処理し滅菌したものを FITC 標識 BCG-CWS、FITC 標識 BCG-PGN として用いた。

3-2-2. DC による BCG-CWS および BCG-PGN の貪食の測定

未成熟 DC を 500 IU/ml GM-CSF と 10%非働化 FCS を含む RPMI-1640 medium に懸濁して 2.5×10^5 個/ well になるように 24 穴プレート(Corning 社)に細胞をまき、FITC 標識した BCG-CWS と BCG-PGN を 15 μ g/ml で加え、37 $^{\circ}$ C で各時間培養を行った。培養後、細胞を 0.9 mM CaCl₂、0.5 mM MgCl₂ を含む FACS buffer でピペティングにより回収した。遠心洗浄後、フローサイトメーターで蛍光強度の測定を行った。DC 内に貪食された FITC 標識 BCG-CWS および FITC 標識 BCG-PGN の測定は、2 mg/ml trypan blue を含む 50 mM acetate buffered saline (pH 4.5) により細胞外の蛍光を消光し、細胞内に取り込まれた蛍光だけを測定す

ることによって行った。

3-2-3.その他の実験方法

その他の試薬および実験方法はすべて第 1 章の方法に準じた。

3-3 実験結果

3-3-1. DC に対する BCG-CWS、BCG-PGN の結合と貪食

図 3-1 に示した BCG-CWS と BCG-PGN の結合と貪食の結果より、BCG-CWS は 30 分および 7 時間ともに DC に強く結合した(図 3-1. a, b)。一方、BCG-PGN の結合は両時間とも BCG-CWS の結合と比較し、弱かった(図 3-1. e, f)。また、トリパンプルーにより細胞外蛍光を消光した細胞内蛍光の測定から、BCG-CWS は BCG-PGN より多く細胞内に貪食されることが明らかとなった(図 3-1. c, d, g, h)。これより、DC に対する BCG-CWS と BCG-PGN の結合および貪食には、BCG-CWS に含まれ、BCG-PGN には含まれない成分の関与が示唆された。

3-3-2. リガンドの同定

図 3-1 において、DC に対する BCG-CWS と BCG-PGN の結合および貪食が異なる結果を示したことから、BCG-PGN には含まれない BCG-CWS の糖鎖が結合および貪食に重要であると予想された。そこで、各種単糖を阻害剤として用いて BCG-CWS の結合について検討を行った。

図 3-2 に示した BCG-CWS の単糖阻害の結果より、単糖では D-galactose および L-rhamnose で顕著な阻害効果が認められた。しかし、D-galactose を含む他の多糖(lactose, melibiose, raffinose)では阻害効果がみられなかった。EDTA においても D-galactose および L-rhamnose と同様の阻害が認められた。また、図 IV に示したように BCG-CWS の構造には、arabinogalactan 内に D-galactose が、linker region 内に L-rhamnose が含まれている(55-56)。

これらのことから、BCG-CWS の結合には BCG-CWS の糖鎖構造、特に D-galactose と L-rhamnose が重要と考えられた。また、2 価イオンのキレート剤である EDTA でも同様の阻害が確認され、今回は示していないが Ca^{2+} のキレート剤である EGTA においても EDTA 同様の阻害効果が認められた。これより、BCG-CWS の DC に対する結合は Ca^{2+} 依存性であることが示唆された。以上の結果から、DC と BCG-CWS の結合は Ca^{2+} 依存性であり、D-galactose および L-rhamnose を認識する分子の関与が示唆された。

3-3-3. 濃度依存性とタイムコース

D-galactose および L-rhamnose の濃度依存性を検討した(図 3-3)。その結果、

D-galactose および L-rhamnose の阻害効果は量依存性であることが明らかとなった。なお、それぞれの 50% 阻害濃度 (IC50) は D-galactose : 0.7 mM、L-rhamnose : 4 mM であった。

次に、D-galactose、L-rhamnose および EDTA 存在下における DC の BCG-CWS 結合と貪食のタイムコースを測定した(図 3-4)。その結果、BCG-CWS の結合および貪食は時間に比例して増加することが明らかとなった。さらに、D-galactose および L-rhamnose 存在下では結合および貪食量が各時間で阻害されており、L-rhamnose より D-galactose の方が強く阻害効果を示した。また、EDTA においては、各時間とも D-galactose、L-rhamnose より更に強い阻害効果が認められた。

以上の結果より、DC に対する BCG-CWS の結合および貪食は、時間に比例して増加し、D-galactose および L-rhamnose の濃度に比例して阻害されることが明らかとなった。

3-3-4. DC に対する BCG-PGN の結合

図 3-5 では、糖鎖部分を含んでいる BCG-CWS と糖鎖部分を含んでいない BCG-PGN の結合量を比較した。その結果、DC に対する BCG-PGN の結合量は、BCG-CWS 結合量の約 1/2 であった。また、BCG-CWS において阻害効果がみられた D-galactose および L-rhamnose 存在下においても、BCG-PGN の結合量に変化はみられず、D-galactose、L-rhamnose 存在下の BCG-CWS 結合量とほぼ同じ値を示した。これより、BCG-PGN の DC に対する結合は、糖鎖を介さないことで起こることが示唆された。

以上の結果より、BCG-CWS の結合には BCG-PGN に含まれない糖鎖部分が DC との結合に重要であることが示唆された。

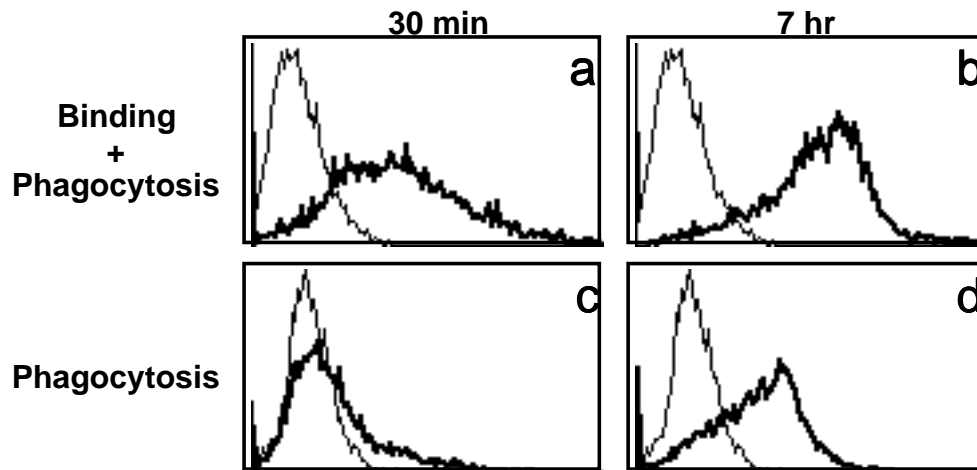
3-3-5. 血清の影響

DC と BCG-CWS の結合に血清中の成分が関与している可能性を考え、血清非存在下での測定を行った(図 3-6)。その結果、血清非存在化では BCG-CWS の結合量が BCG-PGN 結合量と同程度まで減少することが明らかとなった。一方、BCG-PGN の結合は血清の存在に影響されないことが明らかとなった。

以上の結果より、血清中に存在し、BCG-CWS の糖鎖部分を認識する可溶性因子が BCG-CWS の結合に関与していることが示唆された。

BCG - CWS

Incubation Time



Peptidoglycan

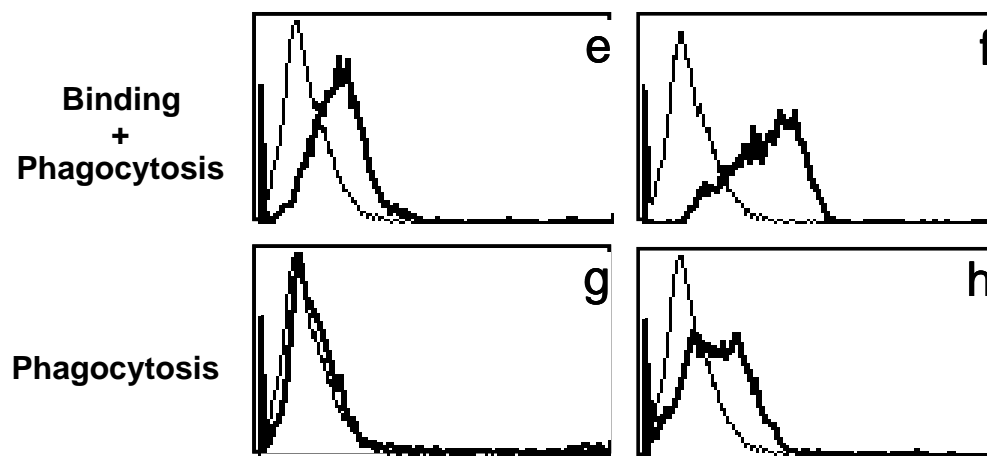


図 3-1. DC に対する BCG-CWS および BCG-PGN の結合と貪食

FITC 標識した BCG-CWS と BCG-PGN を $15 \mu\text{g/ml}$ で DC に加え、結合と貪食を測定した。DC は 1 点あたり 2.5×10^5 個を用い、1 ml の培養液中で 37°C 、30 分および 7 時間 10%FCS を含む RPMI-1640 medium で培養した後、結合量と貪食量をフローサイトメーターで測定した。また、貪食の測定はトリパンブルーで細胞外の蛍光を消光し、細胞内に取り込まれたものだけを測定した。なお、縦軸には細胞数を、横軸には蛍光強度 (BCG-CWS と BCG-PGN の結合量) を示した。

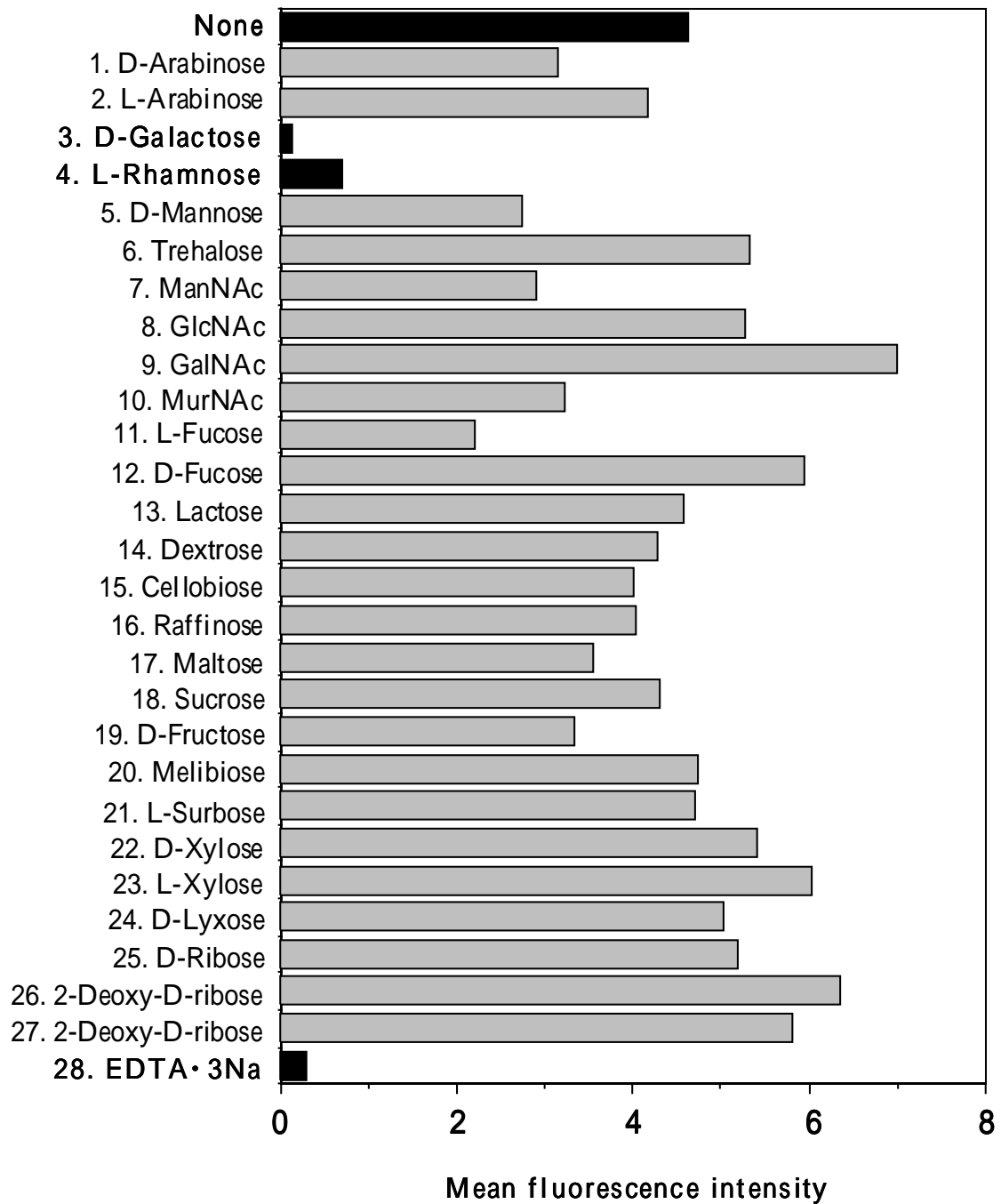


図 3-2. 糖阻害によるリガンドの同定

FITC 標識した BCG-CWS(15 $\mu\text{g} / \text{ml}$)と各種単糖および EDTA を 10 mM 加え、結合阻害効果を測定した。DC は 1 点あたり 2.5×10^5 個を用い、1 ml の培養液中で 37 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間培養した後、結合量をフローサイトメーターで測定した。なお、横軸には蛍光強度 (BCG-CWS の結合量) を示した。

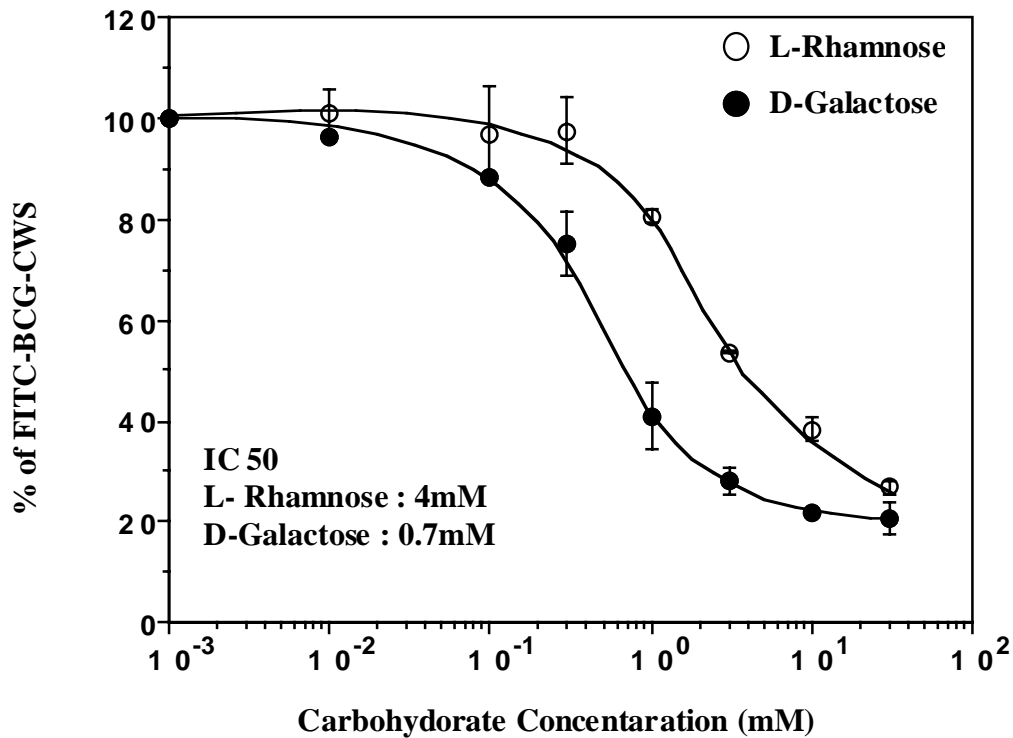


図 3-3. D-galactose と L-rhamnose 阻害による濃度依存性

図 2-2 で顕著な結合阻害効果がみられた D-galactose と L-rhamnose の濃度依存性を測定した。DC は 1 点あたり 2.5×10^5 個を用い、各濃度の D-galactose、L-rhamnose を含む 1 ml の培養液中で 37、30 分間培養した後、結合量をフローサイトメーターで測定した。○ は L-rhamnose を、● は D-galactose を示している。なお、縦軸には蛍光強度 (BCG-CWS の結合量) を、横軸には糖阻害濃度を示した。また、値は 3 点の結果の平均値 \pm 標準偏差で示した。

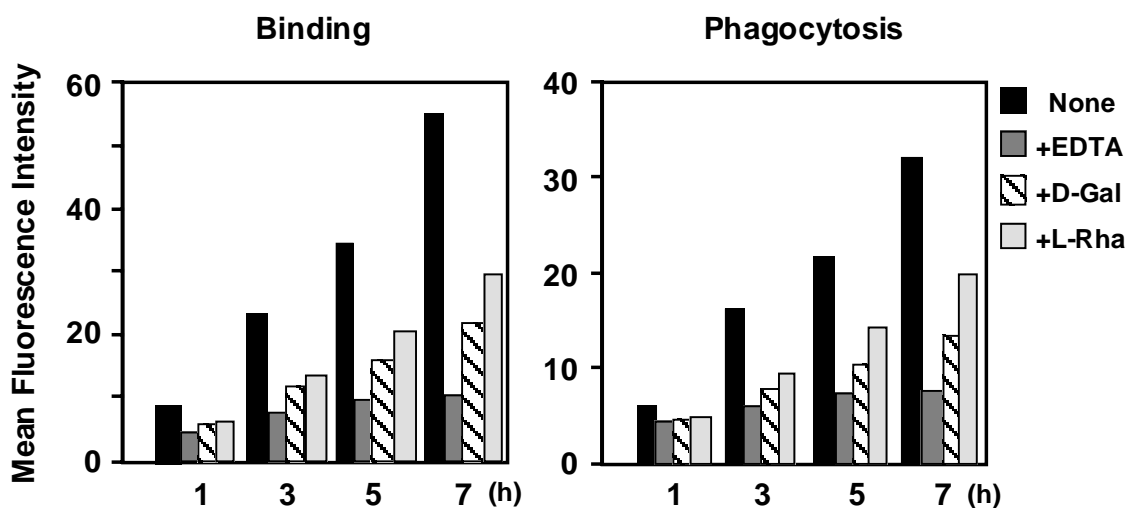


図 3-4 DC に対する BCG-CWS 結合および貪食のタイムコース

DC は 1 点あたり 2.5×10^5 個を用い、1 ml の培養液中で 37 °C、各時間培養した後、FITC 標識 BCG-CWS 結合量をフローサイトメーターで測定した。なお、糖阻害濃度は D-galactose (D-Gal), L-rhamnose (L-Rha) とともに 120 mM、EDTA は 30 mM で行った。また、縦軸は蛍光強度 (BCG-CWS の結合量および貪食量) を、横軸には培養時間を示した。

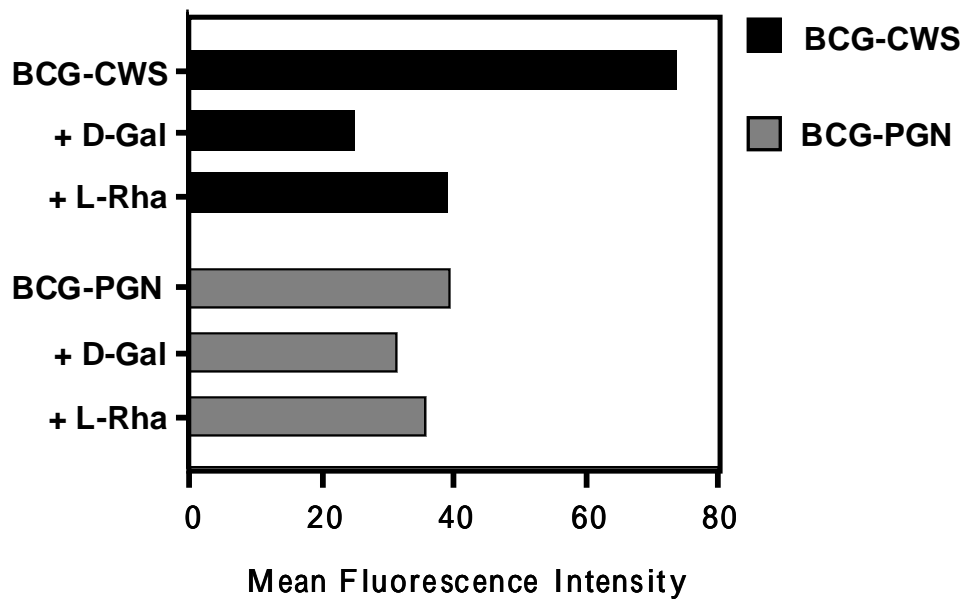


図 3-5. BCG-PGN の D-galactose および L-rhamnose 存在下における結合

DC は 1 点あたり 2.5×10^5 個を用い、1ml の培養液中で 37、7 時間培養した後、FITC 標識 BCG-CWS および FITC 標識 BCG-PGN 結合量をフローサイトメーターで測定した。なお、糖阻害濃度は D-galactose (D-Gal)、L-rhamnose (L-Rha) とともに 120mM で行った。また、横軸は蛍光強度(結合量)を示した。

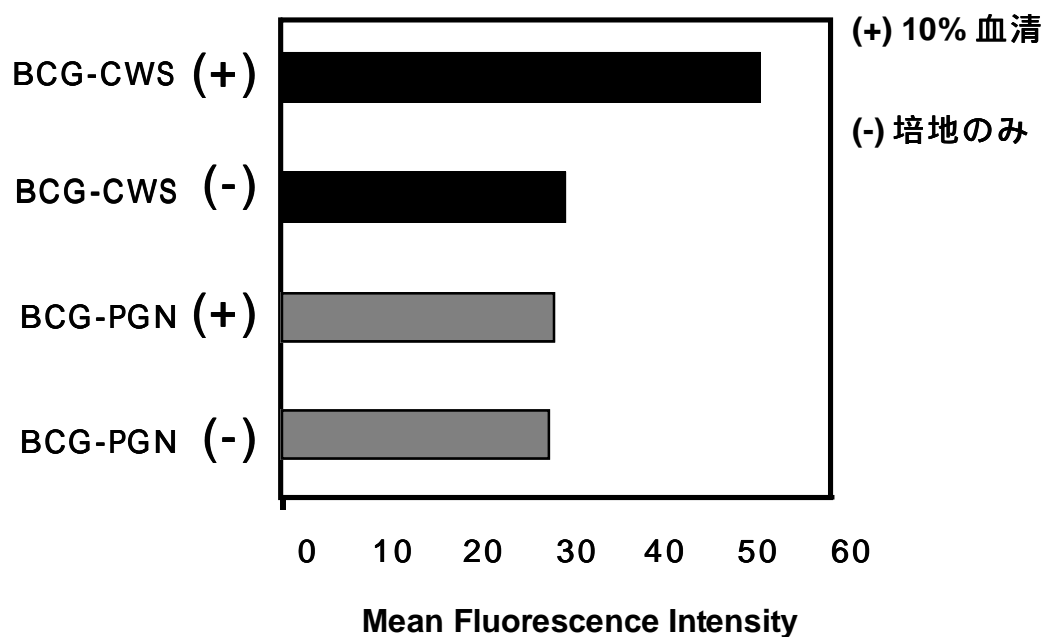


図 3-6. 血清非存在下における BCG-CWS および BCG-PGN の結合

DC は 1 点あたり 2.5×10^5 個を用い、1 ml の培養液中で FITC 標識 BCG-CWS、FITC 標識 BCG-PGN (15 $\mu\text{g/ml}$) と 37 で 7 時間培養した後、FITC 標識 BCG-CWS および FITC 標識 BCG-PGN 結合量をフローサイトメーターで測定した。その際の培養液は、RPMI-1640 medium に 10% の血清を含むものを (+)、培地のみを (-) で示した。また、横軸は蛍光強度(結合量)を示した。

3-4. 考察

本章では、DC に対する BCG-CWS の結合および貪食が、 Ca^{2+} 依存性であり、D-galactose および L-rhamnose により阻害されることを明らかにした。なお、図 2-4 で示した D-galactose と L-rhamnose の阻害効率の違いは、それぞれに対する親和性の違いによると考えられる。BCG-CWS の結合および貪食は、糖により阻害されること、 Ca^{2+} 依存性であることから C-type lectin の関与が示唆された。また、血清非存在下においても結合量が減少することから、血清中に存在する可溶性因子が結合および貪食に影響を与えることも示唆された。得られた結果から予想される概念図を図 V に示した。

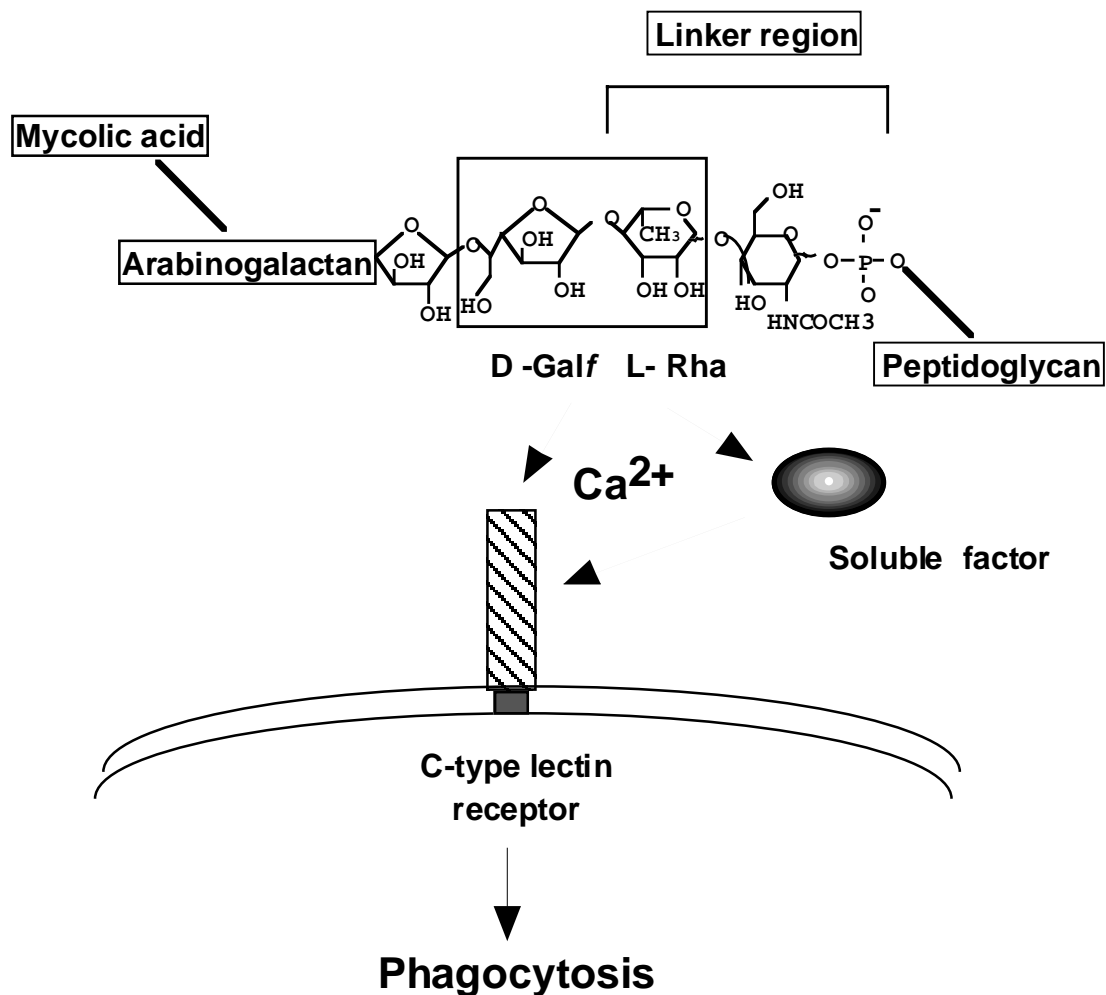


図 V. 結果より予想された BCG-CWS の貪食機構

図 V に示したように、BCG-CWS に含まれる D-galactose と L-rhamnose は、arabinogalactan の末端と linker region に連続して存在しており、この配列が結合および貪食に非常に重要な部分であると考えられた(55-56)。なお、この配列に含まれる D-galactose は、フラノース型で存在することが特徴的である。一般に、水溶液中に存在する D-galactose はピラノース型、直鎖型、フラノース型で存在すると考えられている(図 VI)。図 3-2 の結合阻害で用いた lactose、melibiose、raffinose は、ピラノース型に固定された D-galactose を含んでいるが、これらの糖では阻害効果を示されなかった。したがって、フラノース型の D-galactose に対し親和性を有する lectin が BCG-CWS と DC の結合および貪食に関与していると示唆された。

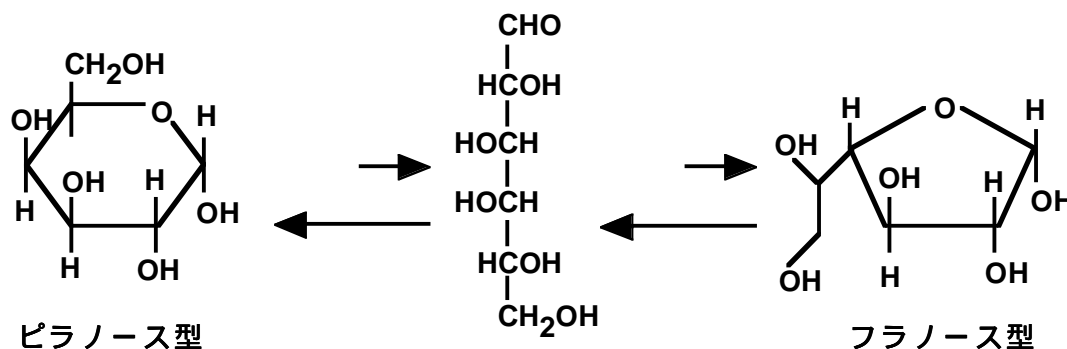


図 VI. 水溶液中における D-galactose の構造

図 3-6 の結果より、血清中に存在する可溶性因子が、D-galactose、L-rhamnose の認識に関与し、細胞側のレセプターに結合することで貪食されると示唆された。この可溶性因子として、可溶型 C-type lectin の可能性も考えられる。実際に、血清中には様々な可溶型 lectin が存在している。これらはオプソニンとして機能し、貪食細胞が異物を貪食する働きを助けると考えられている。血清中に存在する生体防御 lectin として、collectin ファミリーや ficoline ファミリーなどが挙げられる。まず、collectin ファミリーには、mannan-binding lectin、bovine conglutinin、collectin-43 などがあり、これらの分子は異物糖鎖に結合した後 collectin レセプターや補体レセプターを介して貪食細胞に取り込まれる(57-62)。しかし、これらの可溶型 lectin は mannose と N-acetylglucosamine にしか高い親和性を示さないことから、BCG-CWS のレセプターには成り得ないと考えられ

る。次に、ficolin ファミリーの ficolin/P35 も同様の機構で働くが、N-acetylgalactosamine にしか親和性を示さないことから、BCG-CWS 認識には機能していないと考えられる(63)。したがって、既知の可溶性 lectin には BCG-CWS の結合および貪食に関与しているものは存在しないと考えられた。

そこで、arabinogalactan に結合する lectin の探索を当研究室の Tsuji らが行ったところ、human intelectin が同定された(64)。この human intelectin は、可溶性の C-type lectin であり、フラノース型とピラノース型の D-galactose に特異性を示した。実際に、human intelectin はフラノース型 D-galactose から構成される arabinogalactan を含む細菌との直接結合が確認されたが、DC による貪食能の亢進は起こらなかった。したがって、human intelectin は異物認識に関与しているものの、未だ機能は未知である。

一方、膜型のレセプターには L-rhamnose を認識し、異物認識に関わる lectin は報告されていないが、D-galactose を認識する lectin は微生物から高等動、植物まで非常に広範囲に存在している。C-type lectin に限定すると、asialoglycoprotein レセプター、macrophage lectin などが報告されている(65-66)。しかし、これらの lectin は D-galactose の他に N-acetylgalactosamine も認識することが明らかとなっている。BCG-CWS の結合阻害実験において、N-acetylgalactosamine の阻害効果は全く認められなかったことから、BCG-CWS の結合および貪食は asialoglycoprotein レセプター、macrophage lectin を介していないと考えられた。その他は、主に mannose を認識するレセプターが多く、D-galactose を認識する貪食レセプターは報告されていない。

また、リガンドが同定されていない C-type lectin の関与も考えられる。DC 上に発現している C-type lectin に、DCIR (DC immunoreceptor)、dectin-2、DEC-205、CLEC-1(C-type receptor 1)などが近年報告されている(67-70)。これらの C-type lectin は、単球系細胞特異的に発現していることや、細胞内領域に ITIM(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif)、ITAM(immunoreceptor tyrosine-based activation motif)を含むことから、リガンド認識時のシグナル伝達にも関与している可能性も示唆されている。これらの中にも、dectin-1 のように TLR リガンドを認識する際に TLR と相互作用を示すレセプターが存在する可能性も考えられる(34)。

図 3-1, 3-5 の結果より、糖鎖構造をもたない BCG-PGN が DC に結合し、少量ながらも貪食される結果が得られた。現在までに、PGN に結合する分子とし

て4種のヒトPGRP (PGN recognition protein)とCD14が報告されている(31, 71)。実際に、PGRPとBCG-CWSの結合は確認できたが、PGRPはDCに発現せず、主に好中球に発現しPGNのプロテアーゼとして機能する(72)。一方、CD14は単球およびMφにおいて発現が確認されているものの、単球からDCへの分化過程において発現が消失する。したがって、これらの分子はDCでのPGNレセプターにはなり得ないと考えられる。また、これらと同様の機能を有する未知のPGNレセプターがDC上に存在する可能性も考えられる。

本章では、単糖による阻害実験の結果をもとに様々な分子について考察したが、単糖による解析では不十分な点も含まれている。つまり、糖を有する複合糖質は単糖ではなく、多糖でかつ3次元構造をとりながら、その集合体(いくつかの糖タンパク質や糖脂質)として認識されるので、実際の両者の相互認識は複雑であると考えられる。したがって、現在arabinogalactanに結合する分子の同定を生化学的手法により試みている。同定後、再度D-galactose / L-rhanoseの単糖や複合糖を用いた解析を行うことで、BCG-CWSに対する貪食レセプターとの相互認識を証明できると考えている。

終章

筆者は、本研究において以下のことを明らかにした。

1. 樹状細胞成熟化における BCG-CWS の活性部位の同定を、TLR による認識機構を中心に解析を行い、BCG-PGN が活性中心であることを明らかにした。
2. TLR による BCG-PGN 認識機構においてリガンドの検討を行い、PGN 内での脂肪酸修飾がターゲットとなることを明らかにした。
3. 樹状細胞における BCG-CWS の結合・貪食作用について解析を行い、BCG-arabinogalactan に含まれる D-galactofuranose と Linker region に含まれる L-rhamnose が樹状細胞による結合および貪食のターゲットとなっていることを明らかにした。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始適切な御指導、御討論を賜りました北海道大学医学部、大阪府立成人病センター研究所 瀬谷司元所長に深く感謝致します。終始適切な御助言、御討論を賜りました大阪府立成人病センター研究所免疫学部門 松本美佐子博士、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞増殖学講座 竹家達夫教授に深く感謝致します。

適切な御指導、御助言を賜りました北海道大学 東市郎元副学長、薬学部 西村仁博士、大阪大学理学部 楠本正一教授、深瀬浩一助教授に深く感謝いたします。

また、研究の進め方や考え方などを教えて頂き、終始有意義な御討論を賜りました大阪府立成人病センター免疫学部門 辻祥太郎博士、赤澤隆博士には感謝の意に堪えません。

数々の研究に対する有意義な御指導や御討論、御協力を賜りました大阪府立成人病センター研究所、免疫学部門の皆様にも深く感謝します。

本論文を審査して下さいました奈良先端大学バイオサイエンス研究科竹家達夫教授、川市正史教授、伊藤広教授、石田教弘助教授に深く感謝します。

2004年3月 上堀 淳二

参考文献

1. Medzhitov R, Janeway C. A. Jr. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**, 295-298
2. Thompson C. B. (1995). New insights into V(D)J recombination and its role in the evolution of the immune system. *Immunity* **3**, 531-539
3. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman R. M. (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* **176**, 1693-702.
4. Pickl W. F, Majdic O, Kohl P, Stockl J, Riedl E, Scheinecker C, Bello-Fernandez C, Knapp W. (1996). Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14⁺ peripheral blood monocytes. *J Immunol.* **157**, 3850-9.
5. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefy R. W, Kastelein R. A, Bazan F, Liu Y. J. (2001). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* **194**, 863-869
6. Banchereau J, Steinman R. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* **392**, 245-52.
7. Fearon D. T, Locksley R. M. (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* **272**, 50-53
8. Hayashi A. (1994). Interferon- γ as a marker for the effective cancer immunotherapy with BCG-cell wall skeleton. *Proc. Jpn. Acad.* **70**, 205-209.
9. Hayashi A, Doi o, Azuma I, Toyoshima K. (1998). Immuno-friendly use of BCG-cell wall skeleton remarkably improves the survival rate of various cancer patients. *Proc. Jpn. Acad.* **74**, 50-55.
10. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway C. A. Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* **388**, 394-397
11. Medzhitov R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 135-145.
12. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway C. A. Jr. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family

- signaling pathways. *Mol Cell* **2**, 253-258
13. Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T. (2003). TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol.* **4**, 161-167.
 14. Chow J. C, Young D. W, Golenbock D. T, Christ W. J, Gusovsky, F. (1999). Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J. Biol. Chem.* **274**, 10689-10692
 15. Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning C. J. (1999). Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* **274**, 17406-17409
 16. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11**, 443-451
 17. Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, Muhlradt P. F, Akira S. (2000). Preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J. Immunol.* **164**, 554-557
 18. Alexopoulou L, Holt A. C, Medzhitov R, Flavell R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-738
 19. Hayashi F, Smith K. D, Ozinsky A, Hawn T. R, Yi E. C, Goodlett D. R, Eng J. K, Akira S, Underhill D. M, Aderem A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**, 1099-1103
 20. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S. (2002). Small-anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nature immunol.* **3**, 196-200
 21. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-745
 22. Bulut, Y., Faure, E., Thomas, L., Equils, O. Ardit, M. (2001). Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting

- protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling. *J. Immunol.* **167**, 987-994
23. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* **189**, 1777-1782
24. Hajjar A. M, O'Mahony D. S, Ozinsky A, Underhill D. M, Aderem A, Klebanoff S. J, Wilson C. B. (2001). Functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J. Immunol.* **166**, 15-19
25. Ozinsky A, Underhill D.M, Fontenot J.D, Hajjar A.M, Smith K.D, Wilson C.B, Schroeder L, Aderem A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13766-71.
26. Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, Nakanishi K, Akira S. (1998). Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* **9**, 143-50.
27. Matsumoto M, Kikkawa S, Kohase M, Miyake K, Seya T. (2002). Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **293**, 1364-9.
28. Christ W. J, Asano O, Robidoux A. L, Perez M, Wang Y, Dubuc G. R, Gavin W. E, Hawkins L. D, McGuinness P. D, Mullarkey M. A. (1995). E5531, a pure endotoxin antagonist of high potency. *Science* **268**: 80-3.
29. Azuma I, Ribi E. E, Meyer T. J, Zbar B. (1974). Biologically active components from mycobacterial cell walls. I. Isolation and composition of cell wall skeleton and component P3. *J Natl Cancer Inst.* **52**: 95-101.
30. Muta T, Takeshige K. (2001). Essential roles of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein for activation of toll-like receptor (TLR)2 as well as TLR4 Reconstitution of TLR2- and TLR4-activation by distinguishable ligands in LPS preparations. *Eur. J. Biochem.* **268**, 4580-4589
31. Weidemann B, Schletter J, Dziarski R, Kusumoto S, Stelter F, Rietschel E. T, Flad H. D, Ulmer A. J. (1997). Specific binding of soluble peptidoglycan and muramyl dipeptide to CD14 on human monocytes. *Infect Immun.* **65**, 858-64.
32. Wright S. D, Ramos R. A, Tobias P. S, Ulevitch R. J, Mathison J. C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein.

Science **249**, 1431-1433

33. Triantafilou K, Triantafilou M, Dedrick R. L. (2001). A CD14-independent LPS receptor cluster. *Nat. Immunol.* **2**, 338-345
34. Gantner B. N, Simmons R. M, Canavera S. J, Akira S, Underhill D. M. (2003). Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med.* **197**, 1107-17.
35. Means T.K, Jones B.W, Schromm A.B, Shurtleff B.A, Smith J.A, Keane J, Golenbock D.T, Vogel S.N, Fenton M.J. (2001). Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage responses. *J Immunol* **166**, 4074-82.
36. Thomashow M. F, Rittenberg S. C. (1978). Intraperiplasmic growth of Bdellovibrio bacteriovorus 109J: attachment of long-chain fatty acids to escherichia coli peptidoglycan. *J Bacteriol.* **135**, 1015-23
37. Fabre I, L'Homme O, Bruneteau M, Michel G, Cocito C. (1986). Chemical composition of antigen 60 from Mycobacterium bovis BCG. *Scand J Immunol.* **24**, 591-602
38. Adam A, Ciorbaru R, Ellouz F, Petit JF, Lederer E. (1974). Adjuvant activity of monomeric bacterial cell wall peptidoglycans. *Biochem Biophys Res Commun.* **56**, 561-7.
39. Kusumoto S, Inage M, Shiba T, Azuma I, Yamamura Y. (1978). Synthesis of long chain fatty acid esters of N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine in relation to antitumor activity. *Tetrahedron Lett.* **49**, 4899-902.
40. Kusumoto S, Okada S, Azuma I, Yamamura Y. (1976). Synthesis of 6-O-acyl derivatives of immunoadjuvant active N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine with immunoadjuvant activity. *Tetrahedron Lett,* **47**, 4287-90.
41. Kusumoto S, Okada S, Yamamoto K, Shiba T. (1978). Synthesis of 6-O-acyl derivatives of immunoadjuvant active N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **51**, 2122-6.
42. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster S. J, Moran A. P, Fernandez-Luna J. L, Nunez G. (2003). Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem.* **278**, 5509-12.
43. Inohara N, Nunez G. (2003). NODs: intracellular proteins involved in inflammation

- and apoptosis. *Nat Rev Immunol.* **3**, 371-82. Review.
44. Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, Ogura Y, Kawasaki A, Fukase K, Kusumoto S, Valvano M. A, Foster S. J, Mak T. W, Nunez G, Inohara N. (2003). An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol.* **4**, 702-7.
 45. Wolfert M. A, Murray T. F, Boons G. J, Moore J. N. (2002). The origin of the synergistic effect of muramyl dipeptide with endotoxin and peptidoglycan. *J Biol Chem.* **277**, 39179-86.
 46. Todate A, Suda T, Kuwata H, Chida K, Nakamura H. (2001). Muramyl dipeptide-Lys stimulates the function of human dendritic cells. *J Leukoc Biol.* **70**, 723-9.
 47. Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, Gerwitz A, Blenis J, Van Dyke T, Pulendran B. (2003). Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol.* **171**, 4984-9.
 48. Saiki I, Tanio Y, Yamamoto K.I, Yamamura Y, Azuma I. (1983). Effect of quinonyl-N-acetyl muramyl dipeptide on immune responses in tumor-bearing mice. *Infect Immun* **39**, 137-41.
 49. Saiki I, Tanio Y, Yamawaki M, Uemiya M, Kobayashi S, Fukuda T, Yukimasa H, Yamamura Y, Azuma I. (1981). Adjuvant activities of quinonyl-N-acetyl muramyl dipeptides in mice and guinea pigs. *Infect Immun* **31**, 114-21.
 50. Ishihara C, Hamada N, Yamamoto K, Iida J, Azuma I, Yamamura Y. (1985). Effect of muramyl dipeptide and its stearyl derivatives on resistance to Sendai virus infection in mice. *Vaccine* **3**, 370-37
 51. Osada Y, Mitsuyama M, Matsumoto K, Une T, Otani T, Satoh M, Ogawa H, Nomoto K. (1982). Stimulation of resistance of immunocompromised mice by a muramyl dipeptide analog. *Infect. Immun.* **37**, 1285-1288
 52. Osada Y, Mitsuyama M, Une T, Matsumoto K, Otani T, Satoh M, Ogawa H, Nomoto K. (1982). Effect of L18-MDP(Ala), a synthetic derivative of muramyl dipeptide, on nonspecific resistance of mice to microbial infections. *Infect. Immun.* **37**, 292-300
 53. van Kooyk Y, Geijtenbeek T. B. (2003). DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol.* **3**, 697-709. Review.

54. Geijtenbeek T. B, Van Vliet S. J, Koppel E. A, Sanchez-Hernandez M, Vandembroucke-Grauls C. M, Appelmelk B, Van Kooyk Y. (2003). Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med.* **197**, 7-17
55. Besra G. S, Chatterjee D. (1994). Lipids and carbohydrates of *Mycobacterium tuberculosis*, p. 296-297. In B. R. Bloom (ed.), Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
56. Brennan P. J, Draper P. (1994). Ultrastructure of *Mycobacterium tuberculosis*, p. 271-284. In B. R. Bloom (ed.), Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
57. Kozutsumi Y, Kawasaki T, Yamashina I. (1980). Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rabbit serum. *Biochem Biophys Res Commun.* **95**, 658-64.
58. Sheriff S, Chang C. Y, Ezekowitz R. A. (1994). Human mannose-binding protein carbohydrate recognition domain trimerizes through a triple alpha-helical coiled-coil. *Nat Struct Biol.* **1**, 789-94.
59. Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, They C, Rescigno M, Saito T, Verbeek S, Bonnerot C, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S. (1999). Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med.* **189**, 371-80.
60. Davis A. E, Lachmann P. J. (1984). Bovine conglutinin is a collagen-like protein. *Biochemistry.* **23**, 2139-44
61. Holmskov U, Teisner B, Willis A. C, Reid K. B, Jensenius J. C. (1993). Purification and characterization of a bovine serum lectin (CL-43) with structural homology to conglutinin and SP-D and carbohydrate specificity similar to mannan-binding protein. *J Biol Chem.* **268**, 10120-5.
62. Ohtani K, Suzuki Y, Eda S, Kawai T, Kase T, Yamazaki H, Shimada T, Keshi H, Sakai Y, Fukuhara A, Sakamoto T, Wakamiya N. (1999). Molecular cloning of a novel human collectin from liver (CL-L1). *J Biol Chem.* **274**, 13681-9.
63. Lu J, Le Y. (1998). Ficolins and the fibrinogen-like domain. *Immunobiology.* **199**, 190-9. Review
64. Tsuji S, Uehori J, Matsumoto M, Suzuki Y, Matsushima A, Toyoshima K, Seya T. (2001). Human intelectin is a novel soluble lectin that recognizes galactofuranose in

- carbohydrate chains of bacterial cell wall. *J Biol Chem.* **276**, 23456-23463
65. Bischoff J, Lodish HF. (1987). Two asialoglycoprotein receptor polypeptides in human hepatoma cells. *J Biol Chem.* **262**, 11825-32.
66. Suzuki N, Yamamoto K, Toyoshima S, Osawa T, Irimura T (1996). Molecular cloning and expression of cDNA encoding human macrophage C-type lectin. Its unique carbohydrate binding specificity for Tn antigen. *J Immunol.* **56**, 128-35.
67. Ariizumi K, Shen G. L, Shikano S, Ritter R 3rd, Zukas P, Edelbaum D, Morita A, Takashima A. (2000). Cloning of a second dendritic cell-associated C-type lectin (dectin-2) and its alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem.* **275**, 11957-63.
68. Bates E. E, Fournier N, Garcia E, Valladeau J, Durand I, Pin J. J, Zurawski S. M, Patel S, Abrams J. S, Lebecque S, Garrone P, Saeland S. (1999). APCs express DCIR, a novel C-type lectin surface receptor containing an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *J Immunol.* **163**, 1973-83.
69. Jiang W, Swiggard W. J, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman R. M, Nussenzweig M. C. (1995). The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature.* **375**, 151-5.
70. Colonna M, Samaridis J, Angman L. (2000). Molecular characterization of two novel C-typelectin-like receptors, one of which is selectively expressed in human dendritic cells. *Eur J Immunol.* **30**, 697-704.
71. Liu C, Xu Z, Gupta D, Dziarski R. (2001). Peptidoglycan recognition proteins: a novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules. *J Biol Chem.* **276**, 34686-94.
72. Wang ZM, Li X, Cocklin RR, Wang M, Wang M, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Gupta D, Dziarski R. (2003). Human peptidoglycan recognition protein-L is an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. *J Biol Chem.* **278**, 49044-52.