

論文内容の要旨

申請者氏名 村瀬 本弥

自然免疫細胞は、Toll-Like Receptors (TLRs) などのパターン認識受容体を介して病原体成分を認識し、I 型インターフェロン (IFN) や炎症性サイトカインの産生を誘導する。TLR はエンドソームに局在しウイルス核酸認識を行う TLR3、TLR7、TLR9 や、細胞膜に局在し主に細菌成分の認識に関わる TLR2、TLR4、TLR5 に大別される。本研究では、エンドソーム内 pH 制御を担う V 型 ATPase の ATP6V0D2 又は ATP6V1B2 サブユニットを欠損するマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞 (以下 V0D2 KO、V1B2 KO) を樹立し、解析を行った。その結果、これら KO 細胞では、TLR3、TLR7、TLR9 刺激後の I 型 IFN や炎症性サイトカイン産生量が減少しており、エンドソームの pH 制御がこれら TLR の機能発揮に重要であることが示された。興味深いことに、V0D2 KO 細胞では、TLR4 の合成リガンドであるリポ多糖 (LPS) 刺激後の炎症性サイトカイン量が増加し I 型 IFN 発現が減少していた。TLR4 は細胞膜上で LPS を認識後、転写因子 NF- κ B を介した炎症応答を誘導すると同時にエンドサイトーシスされ別の転写因子 IRF3 を介した I 型 IFN の産生を誘導する。実際、V0D2 KO 細胞では LPS 刺激後の NF- κ B のリン酸化量が増加し、IRF3 のリン酸化量が減少していた。また、V0D2 KO 細胞では TLR4 の細胞膜上での発現が増加していた。次に、LPS の内在化を指標とした発現スクリーニングにより、細胞内小胞輸送を担う ARF ファミリー ARF6 を同定した。ARF6 欠損 RAW264.7 細胞 (以下 ARF6 KO) を樹立し解析を行ったところ、ARF6 KO 細胞では TLR4 の発現が強く維持されていた。また、ARF6 と V 型 ATPase の相互作用を見だし、ARF6 がエンドソーム内 pH 環境を介した TLR4 の内在化の制御に関与することが示唆された。TLR4 の内在化は、細胞膜上で継続的に LPS を認識し過剰な炎症応答が誘導されるのを防ぐ「LPS トレランス」として定義付けられている。そこで、V0D2 KO 細胞に 2 度の LPS 刺激を施し LPS トレランスを誘導したところ、炎症性サイトカインの産生能が依然保持され LPS トレランスが破綻していることが明らかとなった。

以上のことから、V 型 ATPase は核酸認識型 TLR を介する自然免疫応答に加え、TLR4 を介した炎症制御機構に重要な役割を果たすことが明らかとなった。また、その欠損は LPS トレランスの破綻に繋がることから、LPS による敗血症の発症機序の理解や V 型 ATPase が敗血症治療標的になりうることを示唆している。

論文審査結果の要旨

申請者氏名

村瀬 本弥

Toll-like receptors (TLRs)は細菌やウイルス等の構成成分である分子パターンを認識し、炎症といった自然免疫応答誘導の起点となる受容体ファミリーである。TLRファミリーは細胞表面に発現し主として細菌の細胞壁成分の認識に関わるものと、エンドソーム等の細胞内小胞に発現しウイルスの核酸成分を認識するものに大別することができるが、それらの細胞内局在制御機構や生理的意義については不明な点が多い。申請者はエンドソーム内 pH 制御の中心的役割を担う V 型 ATPase に着目し、TLR を介する自然免疫応答に関する解析を行った。

申請者は、V 型 ATPase のサブユニットである ATP6V0D2 又は ATP6V1B2 を欠損するマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞（以下 V0D2 KO、V1B2 KO）をゲノム編集技術により樹立し、TLR リガンドに対する自然免疫応答を検討した。その結果、欠損細胞では、エンドソーム局在する核酸認識型 TLR を介する自然免疫応答が減弱している一方、グラム陰性細菌構成成分の一つであり敗血症の原因となるリポ多糖 (LPS) で刺激後の炎症性サイトカイン量が顕著に増加することを新たに見いだした。興味深いことに、V0D2 KO 細胞では、野生型細胞で見られる LPS 刺激後の TLR4 の内在化が障害されており、刺激後も細胞表面に持続的に発現し下流シグナル経路を強く活性化していたことから、これが過剰な炎症応答の要因の一つであると考えられた。この内在化は、LPS により過剰に産生された炎症性サイトカインが原因となる敗血症を抑制する機構の一つとして注目されている。実際に、LPS でプライミングしたマクロファージは、二度目の LPS に不応答を示すことが知られており、この現象は LPS トレランスと呼ばれる。V0D2 欠損細胞では二度目の LPS 刺激時においても炎症性サイトカインの産生が認められ、LPS トレランスが破綻していた。このことは、V0D2 依存的な TLR4 の内在化が LPS トレランスの誘導に重要な役割を果たしていることを強く示唆するものである。さらに、TLR4 内在化を制御する分子機構についての解析を深め、細胞内小胞輸送を担う ARF ファミリーの一つ ARF6 を同定した。ARF6 欠損細胞では、TLR4 の細胞表面発現が亢進しており、LPS 刺激後の内在化も認められなかった。また、ARF6 が V 型 ATPase と相互作用する可能性を示す結果も得られ、V 型 ATPase 依存的な TLR4 の内在化に ARF6 が関与していることが示唆された。

以上のように、本論文は V 型 ATPase が TLR4 の細胞内局在を制御することで敗血症の抑制や LPS トレランスの維持において中心的な役割を果たしていることを強く示唆するもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。