

論文の内容の要旨

水圏生物学専攻
平成 23 年度博士課程入学
氏名 安田 恭子
指導教員 潮 秀樹

論文題目 水産無脊椎動物ヘモリンフによる炎症誘発機構に関する研究

日本や欧米をはじめとする先進国だけでなく、現在経済発展が目覚ましいアジア諸国においても、自然環境、衛生状態、個人の栄養摂取状態など、取り巻く環境が大きく変化しつつあり、これに伴って、癌、糖尿病、精神疾患およびアレルギーなど、複数の環境因子と遺伝因子が複雑に影響しあう多因子疾患を罹患する患者数が増加傾向にある。多因子疾患のうちアレルギー疾患に焦点を当てると、特に第二次世界大戦後、日本を含めた先進国において罹患率の増加が著しい。アレルギーの原因物質（アレルゲン）には、花粉、動物、真菌、ハウスダスト、ラテックスおよび低分子化学物質などが挙げられるが、食物もその1つである。アレルギーとはヒトや動物などが持つ体内に入り込んだ非自己の異物を排除する生体の恒常性維持機構の一つである免疫系が過剰に応答して、生体の正常組織の障害を引き起こすことである。

免疫系は自然免疫と獲得免疫に大別される。自然免疫システムは侵入してきた微生物病原体や宿主に対する他の潜在的な脅威に対して、初期防御として働く進化的に保存された機構で、単球、マクロファージ、樹状細胞などによって担われている。これらの細胞は、ウィルス、細菌、寄生虫や真菌のような病原体などが特異的に保有している特定の病原体関連分子パターンをパターン認識受容体（PRRs）によって認識する。その結果炎症反応が惹起され、サイトカインおよびケモカインの分泌をしたり、貪食によって病原体の排除を行ったり、T細胞に対して抗原提示などを行う。自然免疫システムの主な PRRs は、Toll-like receptors (TLRs)、NOD-like receptors (NLRs)、RIG-I like receptors (RLRs)、細胞質 DNA センサー (CDS)、C型レクチン受容体 (CLRs) であり、炎症やオートファジーで中心的な役割を担っている。

一方、獲得免疫システムは脊椎動物にのみ存在するもので、抗原提示細胞によって提示された個々の病原体が特定の型であり、かつ非自己であることを示す抗原によって判別し、免疫を記憶する機構である。食物アレルギーの発症機構も獲得免疫システムによるものとされている。食品中のアレルゲンのほとんどはタンパク質であり、経口摂取されたタンパク質は消化管内で分解され、アミノ酸もしくはペプチドの形で腸管より吸収される。異物として認識されたアミノ酸もしくはペプチドは、マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞に取りこまれ、断片化され、胸腺由来リンパ球（T細胞）に提示される。情報を受け取ったT細胞のうち、ヘルパーT細胞に分化した細胞が活性化した場合、様々なサイトカインを産生して骨髄由来リンパ球（B細胞）を刺激し、提示抗原（アレルゲン）に対する抗体を産生するように指示を与える。ヘルパーT細胞

には INF- γ や IL-2 など を産生する Th1 や IL-4、IL-5 および IL-13 など を産生する Th2 をはじめ Th17、Treg があり、互いに生理的統合性の上で拮抗している。このバランスが Th2 主導型に偏ると B 細胞の抗体遺伝子のクラススイッチが切り替わり、免疫グロブリン E (IgE) を主に分泌するようになる。分泌された IgE は、全身に存在する肥満細胞上や好塩基球の細胞膜上に存在する高親和性 IgE 受容体 Fc ϵ RI に結合する。この状態 (感作) が成立した状態で、同じアレルゲンが再度吸収されると、アレルゲンはこれらの細胞上の複数の抗原特異的 IgE に結合するため、結果として Fc ϵ RI がアレルゲンを介して架橋される。これによって肥満細胞や好塩基球細胞内に情報が伝達され、細胞内 Ca 濃度を上昇させ、細胞内に保有しているヒスタミンやロイコトリエンなどの化学伝達物質を含む顆粒を放出する。これらは血管物質透過性亢進や平滑筋収縮などのアレルギー症状を引き起こす。ただし IgE 抗体と結合する箇所が 1 つしかない物質では Fc ϵ RI の架橋が起こらず、この一連の反応は生じないことからアレルゲンとして働くことはない。近年では、皮膚を通じて感作 (経皮感作) されやすい物質による皮膚接触炎が契機となって、食物アレルギーを発症するという報告もある。経皮感作のメカニズムとして考えられているものは、乾燥や損傷など、バリア機能が低下した皮膚から抗原や微生物が侵入すると、樹状細胞、肥満細胞などを刺激する上皮細胞由来のサイトカイン TSLP の発現が増加し、Th2 反応を誘導するというものがある。

アレルギーの発症にはアレルゲンが抗原提示細胞により提示される必要があるとされているが、まだまだ未解明な部分が多い。近年の研究では TLR などの自然免疫システムの活性化がアレルギーの発症に重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。

本研究では、特に成人になってから発症し、免疫寛容がおきにくいとされる水生無脊椎動物に対するアレルギーに注目した。エビやカニなどの甲殻類、貝類などの水産無脊椎動物は食物アレルギーとしての報告も多い上、接触性の炎症を誘発するなどの報告も見られることから、無脊椎動物のヘモリンフに焦点をあてることとした。本論文は、序章、4 章による本文、総括的考察で構成されている。以下に本論文の内容を要約して述べる。

1. 水産無脊椎動物ヘモリンフとスカシ貝ヘモシアニン (KLH) による NF- κ B の活性化

エビのヘモリンフがアナフィラキシーショックを誘発するといった報告があることから、水産無脊椎動物のヘモリンフと自然免疫システムとの関わりを調べるため、白血病由来ヒト単球株 THP-1 を用いて炎症関連の転写因子である NF- κ B の活性化を確認した。

クルマエビ、ケガニ、ウバガイ、クロアワビのヘモリンフと、ヘモリンフ中に高濃度に存在するヘモシアニンとして KLH、及び水産脊椎動物としてギンザケの血清を NF- κ B のレポーター細胞に投与したところ、各種ヘモリンフ及び KLH 刺激に対して NF- κ B の活性化が確認された。特に KLH 刺激に対して NF- κ B が著しく活性化した。一方、ギンザケの血清刺激に対しては NF- κ B の活性化は全く確認されなかった。これらの結果から水産無脊椎動物ヘモリンフは NF- κ B を介した経路で炎症を誘発する可能性が示唆され、ヘモリンフ中に高濃度に存在するヘモシアニンがその活性化成分であるものと推定した。

2. KLH による脾臓チロシンキナーゼ (Syk)、細胞外シグナル調節キナーゼ (Erk) の活性化

既報で KLH が樹状細胞上の自然免疫系 CLR を活性化することから、単球細胞における KLH 刺激に対する NF- κ B の著しい活性化にも CLR が関わっている可能性があると考えられた。そこで数種の CLR の受容体で確認されている Syk と KLH との関わりを調べることにした。KLH 刺激によって Syk のキナーゼ活性で特に重要とされるチロシン残基 (Tyr525/526) とセリン残基 (Ser297) についてはリン酸化が亢進し、Syk のキナーゼ活性の負の調節に関与するチロシン残基 (Tyr323) についてはリン酸化が確認できなかった。さらにプロテインキナーゼ C (PKC) 阻害剤存在下では Syk (Ser297) のリン酸化が抑制されたことから、Syk (Ser297) のリン酸化は PKC の影響を受けることが確認された。しかし、PKC 阻害剤存在下で NF- κ B のレポーター細胞に KLH を投与したところ NF- κ B の転写活性の活性化は抑制されなかったことから、KLH によって誘導される NF- κ B の活性化に Syk は影響を与えるが、PKC によるリン酸化の影響はほとんどないものと推察された。さらに、Syk は細胞がファゴサイトーシスを行う際のシグナル伝達に分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) の一種である Erk と共に関与するとされることから、エンドサイトーシス阻害剤、Syk 阻害剤、あるいは Erk 阻害剤存在下において KLH 刺激を行ったところ、NF- κ B の活性化が抑制された。これらの結果から、KLH はエンドサイトーシスを引き起こし、Syk や Erk が関わる経路を介して NF- κ B の活性化が誘導されたと推察した。次いで、Syk と Erk の関与を確認するため、Syk 阻害剤存在下においてヒト単球細胞 (THP-1) に対して KLH 刺激を行い、Erk の活性化についてウェスタンブロッティングにて評価した。その結果、Syk 阻害剤存在下では Erk の活性化が Syk 阻害剤非存在下に比べて抑制された。このことから、KLH によって誘導される NF- κ B の活性化には Erk の活性化が関与し、Syk は KLH による NF- κ B の活性化経路に関わる Erk の上流に位置すると推察された。ただし、Syk 阻害剤の効果が部分的なものであったことから、KLH 誘導性 NF- κ B の活性化には Syk 以外の分子も関わる複数の経路の存在が予想された。

3. KLH 相互作用タンパク質の同定

THP-1 において KLH と相互作用し、NF- κ B の活性化を誘導するタンパク質を探索するために、光架橋法を用いたりガンド・受容体相互作用解析法と高分解質量分析法を組み合わせ、KLH 相互作用タンパク質の同定を試みた。その結果、KLH によって引き起こされるファゴサイトーシスおよびこれに伴う Erk/MAPK などのシグナル伝達経路、ならびに自然免疫系の細胞応答に関与する性質を持つタンパク質が同定された。同定された膜局在性 KLH 相互作用タンパク質のうち、integrin alpha-4 \cdot beta-1 複合体、integrin alpha-5 \cdot beta-1 複合体および plexin-A2 が KLH の受容体として機能し、Erk/MAPK を介して KLH が NF- κ B を活性化するものと予想された。さらに、GPCR ファミリーメンバーでオーファン受容体である GPR98 も KLH の受容体である可能性が示唆された。またその近傍に存在すると推察される Adenylate cyclase type 5 (AC5) は Syk のリン酸化に関わる PKC のリン酸化に関わるとされ、KLH による Syk のリン酸化に関わる可能性が推察された。同定された非膜局在性 KLH 相互作用タンパク質の中で、14-3-3 sigma は Erk を介した KLH 誘導性 NF- κ B 活性化との関連が推察された。さらに、自然免疫系の受容体 NLRs の 1 つである NLRC4 の

分解断片が検出された。KLH 受容に伴う NLRC4 の発現量変化についてウェスタンブロッティングによって評価したところ、NLRC4 は恒常的に一定量発現し、KLH 受容に伴って発現量が増加するものの、発現量増加と同時に分解系が作動して適切な時点で活性化を収束させるなどの情報伝達制御機構が存在するものと推察された。

以上をまとめると、以下のような経路が考えられる。KLH は、integrin $\alpha 4\beta 1$ 複合体、integrin $\alpha 5\beta 1$ 複合体、plexin-A2、GPR98 などの膜タンパク質に認識され、それらの近傍に存在する AC5 や 14-3-3 sigma などのタンパク質によるシグナル伝達が行われると同時に(Fig. 1)、Syk を介したエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる(Fig. 2)。細胞表面での KLH 受容および KLH のエンドサイトーシスの下流では、Erk を介して多くのシグナル伝達分子がリン酸化され、最終的に NF- κ B を活性化させる。活性化した NF- κ B は、炎症性サイトカインの TNF α の発現や、炎症性サイトカインの IL-1 β や IL-18 の前駆体の発現を誘導する。一方、エンドサイトーシスされた KLH の分解物は NAIP と会合し複合体を形成することによって NLRC4 に認識され、NLRC4 が活性化する。また、NLRC4 の活性化によって遊離した Beclin-1 がオートファゴソーム形成を誘導し、NLRC4 を分解することによって炎症応答を制御する。活性化した NLRC4 はインフラマソームを形成して caspase-1 を活性化させる。活性化型 caspase-1 は、NF- κ B の活性化に伴って産生された IL-1 β や IL-18 の前駆体を成熟型にして細胞外への分泌を誘導し、これらの分泌された炎症性サイトカインが様々な炎症反応を引き起こす。

以上、本論文では、水産無脊椎動物ヘモリンフは、自然免疫系に関わる CLR の情報伝達主要分子 Syk 及び Erk を介して炎症関連転写因子 NF- κ B を活性化させると共に、NLRs インフラマソーム系を活性化させ、炎症反応を誘発する可能性があり、これらの機構によって食物アレルギー反応を増悪するといった、従来の獲得免疫システムとは異なる新規の食物アレルギー発症機構が存在するものと推察される。このような水産無脊椎動物による新たな炎症誘発機構の解明が、食物アレルギーに対する治療法や予防法の開発につながることを期待される。

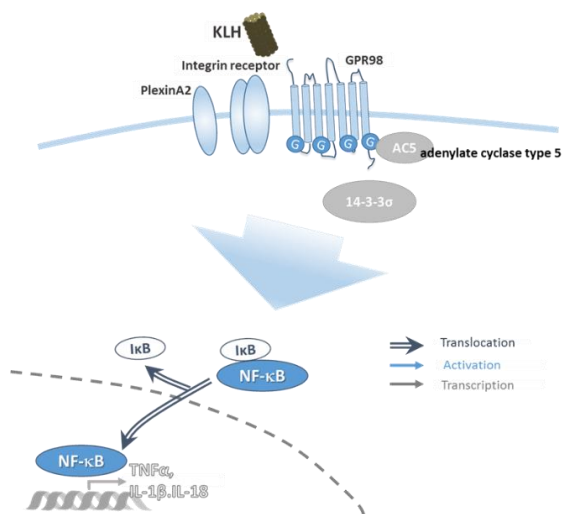


Fig. 1 KLH is recognized and interact with the integrin receptors, plexin-A2, GPR98, AC5 and 14-3-3. The interaction may lead the NF- κ B activation.

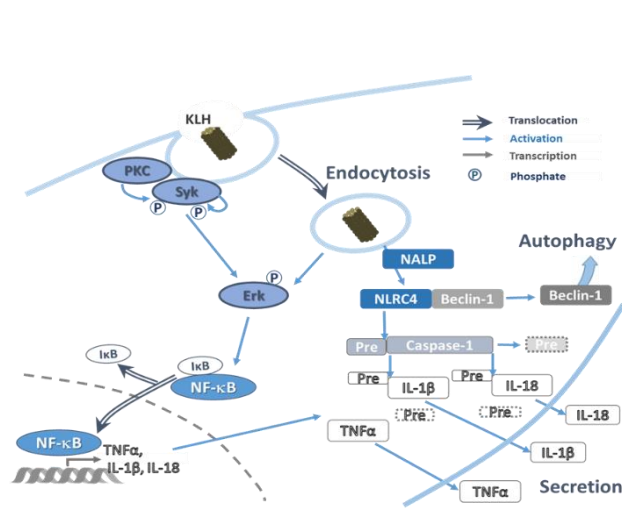


Fig. 2 The pass way of the KLH induced NF- κ B and NLRC4 activation.