

論文の内容の要旨

論文題目 病原微生物分子に対する気道上皮細胞の Pattern Recognition Receptors の役割

氏名 鈴木智史

<背景>

肺炎は発展途上国を中心として世界中で多数の死者を数え、我が国でも高齢者を中心に高い死亡率を示し、2011年以降は日本人の死因の第3位を占めている。慢性閉塞性肺疾患(COPD)や免疫低下状態の患者では、一般的な市中肺炎の起因为菌に加えて、緑膿菌などの関与も大きくなり、治療に難渋することも多い。気道は外部環境と直接接し、絶えず微生物との接触にも曝されているため、各種の防御機構を備えている。その中で病原微生物を認識し、サイトカインなどの産生など免疫反応を誘導する働きを持つのが Pattern Recognition Receptors(PRRs)である。PRRsには Toll-like receptors(TLRs)、NOD-like receptors(NLRs)などのファミリーがあり、様々な ligand に対応している。

TLRsの中でTLR5は細菌の鞭毛を構成するタンパクである flagellin を認識する。そしてNF- κ Bの活性化、および Mitogen Activated Protein Kinase(MAPK)のリン酸化という二つの経路を介して interleukin(IL)-8などのサイトカイン産生を促すことがマクロファージや腸管上皮細胞では示されている。

一方、NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2) はNLRsファミリーに属する PRRs で、細胞質内に存在する。細菌のペプチドグリカン中の muramyl dipeptide (MDP)を認識してサイトカイン産生を促すのだが、単独での応答はTLRsなどに比べ微弱である。しかし、MDPの併存がTLR2やTLR4によるサイトカイン産生を増強することがマクロファージなどで確認されている。しかし気道上皮細胞を用いた報告は乏しく、またMDPと flagellin の相互作用は知られていない。そこで今回、flagellin 刺激により気道上皮細胞から産生されるサイトカインを測定し、それがMDPの併存によりどのように変化するかを検証することで、COPDなどの慢性呼吸器疾患の患者において、菌定着の見られる気道に新たな病原微生物が侵入した場合の PRRs の役割について考察することとした。

<方法>

ヒト気管支由来の細胞株(BEAS-2B)を使用した。同細胞を100ng/mLの濃度の flagellin で刺激し、培養液中の各種サイトカイン(IL-8、IL-6、IL-1 β)をELISA法で測定した。また flagellin 刺激前に抗TLR5中和抗体を加え、サイトカイン産生量の変化を確認した。次に flagellin/TLR5のシグナル伝達経路として、NF- κ Bの活性化およびMAPKのリン酸化を検証した。NF- κ B

の活性は flagellin 刺激後の細胞を溶解し、Dual luciferase assay 法により計測した。また MAPK のリン酸化は細胞溶解液を用いて、SDS-PAGE および Western Blotting 法により確認した。さらに MAPK の阻害薬で前処置を行った場合の、flagellin 刺激後のサイトカイン産生も測定した。続いて MDP 併存の影響を検証するために、MDP(10 μ g/mL)と flagellin の同時刺激した場合、および flagellin 刺激を行う前に MDP で処置を行った場合のサイトカイン産生をそれぞれ測定した。またこれに際して、MDP 処置による細胞障害性の有無を、細胞から培養液への LDH 放出量から検証した。そして MDP 処置に続いて flagellin 刺激を行った際の、NF- κ B の活性化および MAPK のリン酸化への影響を前述の方法で確認した。

<結果>

flagellin で刺激を行った BEAS-2B からは、IL-8 の産生が確認されたが、IL-6 および IL-1 β の産生は微量であり、以後の実験では IL-8 の産生に焦点を絞り検証することとした。刺激に用いる flagellin 濃度は 30ng/mL 以上で、また flagellin による刺激時間は 4 時間以上で IL-8 の産生量はそれぞれプラトーに達していた。

次に flagellin 刺激から IL-8 産生に至るシグナル伝達経路を検証した。まず flagellin 刺激を行う前に抗 TLR5 中和抗体を加えることで、IL-8 の産生が抑制されたことから、flagellin による IL-8 産生は TLR5 依存性であることが示された。次に flagellin 刺激後の NF- κ B 活性の測定では、Dual luciferase assay 法により NF- κ B の活性化が示された。一方 MAPK については Western Blotting(WB)法で、ERK(Extracellular Signal-Regulated Kinase)や p38 といった MAPK のリン酸化が認められた。また flagellin 刺激前に ERK や p38 の阻害薬で処理を行うと、IL-8 産生の抑制が確認された。これらから気道上皮細胞においても、flagellin/TLR5 のシグナルは NF- κ B 活性化および MAPK リン酸化の二経路を介することが示された。

続いて flagellin に加えて MDP を用いて細胞を刺激した。MDP 単独での刺激では IL-8 産生は殆ど見られなかった。また flagellin との同時刺激でも flagellin 単独時と IL-8 産生量に変化は認めなかった。なお IL-8 産生量がプラトーに達しない低濃度の flagellin(1、10ng/mL)との同時刺激でも同様の結果であった。一方で、flagellin 刺激の前に MDP で処置を行った場合には、flagellin 単独刺激時と比べて有意に IL-8 の産生低下が認められた。なおこの現象は MDP による前処置を 16 時間あるいは 24 時間行った場合に見られた。MDP 前処置を行ったことによる有意な cell viability の低下は認められず、MDP 前処置が flagellin 刺激後の IL-8 産生に抑制的に作用したと考えられた。

次に MDP 前処置時の flagellin/TLR5 のシグナル伝達への影響を検証した。NF- κ B 活性については前処置の有無によって変化は認められなかったが、ERK や p38 といった MAPK のリン酸化については MDP 前処置により抑制されることが WB 法によって確認された。このことから、MDP 前処置による IL-8 産生抑制には、MAPK のリン酸化が抑制されることが大きく関与している可能性が示された。

<考察>

本研究ではヒト気道上皮由来細胞株(BEAS-2B)を用いて、細菌の鞭毛の構成成分である flagellin に対する応答を、IL-8 の産生を中心として検証した。この免疫応答には、細胞膜上の TLR5 による認識、および細胞内での NF- κ B 活性化および MAPK のリン酸化がそれぞれ関与していることを確認した。またこの IL-8 産生が、別の PRRs である NOD2 の ligand である MDP の前処置で抑制されることを明らかとした。

flagellin 刺激による IL-8 産生は、BEAS-2B 細胞では *P.aeruginosa* の flagellin での報告がされていたが、マクロファージ等で示されているのと同様の経路をとることが今回確認できた。IL-8 は好中球の活性化・遊走を促進する代表的な炎症性サイトカインであり、直接外界と接する気道上皮細胞にとって、緑膿菌などの病原微生物が有する flagellin を認識し炎症を惹起することは、病原微生物の速やかな排除にも寄与しうると考えられた。

一方で今回、IL-6 や IL-1 β の産生は殆ど認められなかった。IL-1 β は初期免疫応答において中心的な役割を持つ炎症性サイトカインであり、マクロファージでは NLRs ファミリーである細胞質内の NLRC4 が flagellin を認識することで、inflammasome の活性化を経て分泌が促進されることが知られている。しかし気道上皮細胞では NLRC4 の発現が示されておらず、IL-1 β 産生に至らなかったと考えられた。

MDP の併存が TLR のシグナル伝達に影響を与えることは、マクロファージ系細胞や腸管上皮細胞で既に報告があり、MDP と TLR の ligand との同時刺激でサイトカインの産生増強が示されている。しかし flagellin と MDP を用いた研究は、腸管上皮細胞で同時刺激による IL-8 産生増強を示した一篇のみであり、気道上皮細胞では全く報告がなかった。今回の一連の実験では、気道上皮細胞において flagellin および MDP の同時刺激による IL-8 産生増強は確認されなかったが、一方で MDP 前処置により flagellin 刺激後の IL-8 産生が逆に抑制されることが見いだされた。またこの過程では flagellin/TLR5 のシグナル伝達のうち、特に MAPK のリン酸化が阻害されている可能性が示唆された。今回の一連の実験は MDP 前処置による TLR 刺激への応答抑制を、上皮細胞において初めて、また flagellin を用いて初めて示すことができたという点で意義があるものと考えられた。

MDP 前処置による IL-8 産生抑制のメカニズムは明らかでないが、MDP による細胞膜上の TLR 発現低下誘導、細胞質内の TLR シグナル伝達阻害が可能性として考えられる。マクロファージを用いた研究では、TLR シグナルの比較的上流に位置する IRAK(IL-1 receptor-associated kinase)の活性低下や、IRAK の阻害物質である IRAK-M の発現増加が示されている。一方で MDP が NLRP3 など他の NLRs にも ligand として働き影響を与えた可能性もあり、さらなる検証が必要と考えられる。

今回得られた知見は COPD や嚢胞性線維症(CF)、びまん性汎細気管支炎(DPB)など慢性的に細菌が定着しうる慢性呼吸器疾患患者において、flagellin 分子をもつ緑膿菌などの細菌の侵入時の免疫応答を考える一助となる可能性がある。通常 IL-8 は、好中球の活性化・遊走を促進し炎症を惹起することで病原微生物の排除に働くが、過剰な産生はむしろ組織の損傷を招き予後

悪化させることもある。実際、上記慢性呼吸器疾患の患者の気道では健常人と比べ IL-8 量の増加を認め、重症度や呼吸機能低下、急性増悪の頻度との相関も示されている。加えて COPD や CF の急性増悪時には、気道内の IL-8 量がさらに増加し、その増加幅が大きいほど急性増悪からの回復が遅いことも示されている。

このように上記慢性呼吸器疾患では、気道内の IL-8 をコントロールすることが重要と考えられる。このような観点から本実験の結果をしてみると、単独では明らかな細胞障害性を持たず、前処置による IL-8 産生抑制効果を示した MDP は、緑膿菌など flagellin を有する細菌の侵入時に気道組織に対して保護的に働く可能性が示唆される。本実験はあくまで flagellin との関係に焦点を当てたものであり、今後さらに他の PRRs ligand と MDP との関係を含めて動物実験などでの検証が必要であるが、慢性の呼吸器疾患の病勢コントロールに病原微生物由来分子の MDP が寄与する可能性が考えられた。

<結論>

ヒト気道上皮由来細胞株(BEAS-2B)において、細菌の鞭毛の構成成分である flagellin は TLR5 に認識され、NF- κ B 活性化および MAPK のリン酸化を経て IL-8 産生が促進されること、及び様々な細菌のペプチドグリカンに含まれる MDP で前処置を行うとこの応答が抑制されることが示された。

これらの知見は、緑膿菌などが有する flagellin が病原性を有すること、および COPD など慢性的に細菌が定着しうる呼吸器疾患患者において MDP の存在が気道組織に対して保護的に働く可能性を示すものと考えられた。