

【総説】

第六回 高安賞最優秀賞受賞論文

論文 「TLR2-mediated survival of *Staphylococcus aureus* in macrophages:
A novel bacterial strategy against host innate immunity」

Journal of Immunology 誌

第178巻第8号 4917頁～4925頁 2007年4月掲載

渡邊郁子、一木万奈美、白土明子、中西義信 共著

マクロファージにおけるTLR2を介した黄色ブドウ球菌の生存：宿主自然免疫に対抗する新奇な細菌の戦略

渡邊 郁子 (わたなべ いくこ)

はじめに

細菌やウイルス、寄生虫などの病原体が生体に侵入すると、免疫系はそれらを感じ排除しようとする。哺乳類では免疫系は大きく自然免疫と獲得免疫とに分けられ、このうち自然免疫は侵入してきた病原体の排除に最初にはたらく反応であり、液性応答と細胞性応答とからなる。自然免疫に関わる細胞は、パターン認識受容体と呼ばれる特異的な受容体を使って、病原体の共通分子パターンを認識し、免疫応答を導く。¹⁾ このような受容体としてToll様受容体ファミリー (TLRs) があり、細菌の分子パターンを認識して液性の応答を引き起こすことが知られている。²⁾

細胞性の応答については、細菌がマクロファージや好中球などの食細胞により貪食排除されることが知られている。しかし、その受容体など詳しいことはわかっていない。また、液性の自然免疫応答を引き起こすような細菌分子パターンが細胞性の応答に関与するかどうかについてもまだまだよくわかっていない。TLRsについて、私たちはそのひとつのTLR4が貪食反応後の貪食胞の成熟に関わることを見だしており³⁾、細胞性応答に役割を果たすと考えられる。

TLR2については、グラム陽性菌を認識して免疫反応を導くと知られている⁴⁾ が、ある環境での免疫応答に抑制的にはたらく場合のあることも報告されてきた。⁵⁾ そこで私たちは、TLR2が細菌に対する細胞性自然免疫応答への役割を持つと予想して、マクロファージによる細菌の貪食反応および貪食後の殺菌に着目した解析を行った。

方法

野生型とTLR2欠損マウスの腹腔より、チオグリコレートで誘導したマクロファージを調製し、食細胞として用いた。貪食の解析は以下のように行った。FITCにて標識した黄色ブドウ球菌とマクロファージとを共培養した後、ピペッティングにて

貪食されていない黄色ブドウ球菌を取り除いてから固定し、蛍光顕微鏡での観察により貪食程度を数値化した。

貪食後の生存率の解析は以下のように行った。黄色ブドウ球菌とマクロファージとを共培養した後、ピペッティングにて貪食されていない菌を除いた後、さらに培養した。その後、マクロファージを溶解し、細胞内の菌を回収し、アガープレートにまいて、形成されたコロニー数を貪食直後のコロニー数に対する割合で示し、生存率として算定した。

JNK経路活性化の解析は以下のように行った。黄色ブドウ球菌を貪食したマクロファージを、SDSと脱リン酸化酵素阻害剤を含むバッファーで溶解し、抗リン酸化JNK抗体および抗JNK抗体を用いたウエスタンブロッティングにてマクロファージ内のリン酸化JNKの割合の増減を解析した。

マクロファージが産生する活性酸素量の解析は以下のように行った。黄色ブドウ球菌とマクロファージとを共培養した後の培養上清を回収し、化学発光剤と混ぜた後、ルミノメーターにて発光量を測定し、産生された活性酸素量を数値化した。

結 果

TLR2が細胞性自然免疫応答に関与するかどうか調べるために、野生型とTLR2欠損マクロファージの黄色ブドウ球菌貪食能を比較した。その結果、それぞれのマクロファージによる黄色ブドウ球菌の取り込み程度に差は見られなかったが、取り込まれた菌の生存程度は、TLR2欠損型のほうが低いことがわかった。(図1) これより、TLR2は、黄色ブドウ球菌貪食後のマクロファージ内での殺菌に抑制的にはたらくと考えられた。

TLR2による殺菌抑制の仕組みを知るために、この反応に必要なTLR下流の情報伝達経路を調べた。黄色ブドウ球菌を貪食させたマクロファージ内での各種MAPキナーゼ経路の活性化程度を調べた結果、野生型マクロファージでは3つのMAPキナーゼ経路JNK, ERK, p38の全てに入力された。しかし、TLR2欠損マクロファージではJNK経路への入力が高いことが

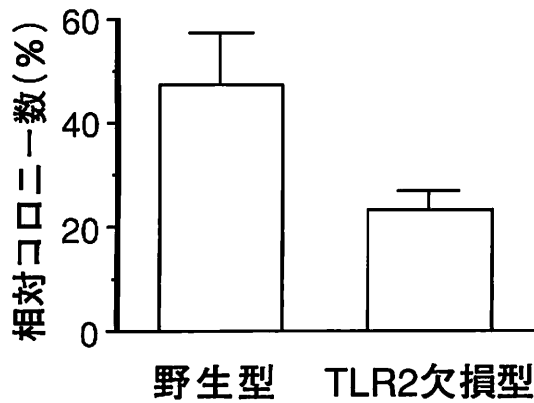


図1. TLR2欠損マクロファージにおける貪食された黄色ブドウ球菌の殺菌促進 (*J. Immunol.* 178: 4917-4925, 2007より改変) それぞれのマクロファージに取り込まれた黄色ブドウ球菌のコロニー形成能を解析した。コロニー形成能の有無を生死の指標とした。貪食直後の値を100とし、貪食後2時間後の相対コロニー数を示す。

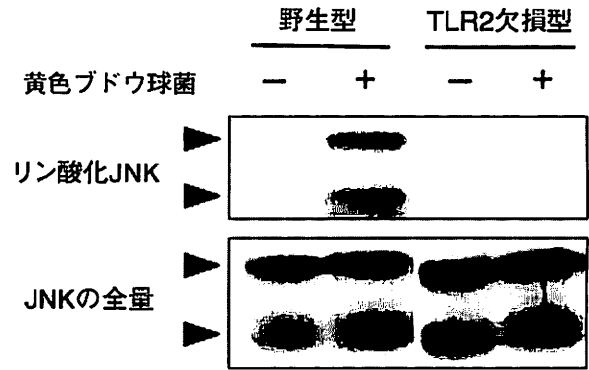


図2. 黄色ブドウ球菌貪食時のTLR2を介したJNKのリン酸化 (*J. Immunol.* 178: 4917-4925, 2007より改変) それぞれのマクロファージの黄色ブドウ球菌貪食前後でのJNK全量およびリン酸化JNK量を解析した。JNKはリン酸化することで活性化型となる。JNK全量がほぼ同じとき、リン酸化JNK量は野生型マクロファージでは黄色ブドウ球菌貪食後に増加したが、TLR2欠損マクロファージでは増加しなかった。

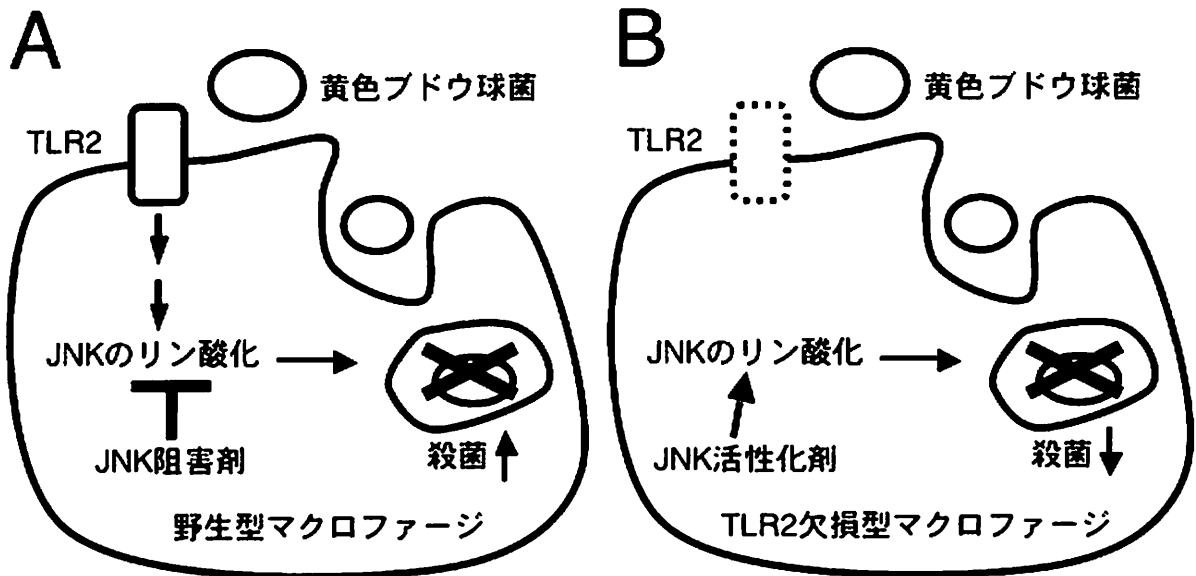


図3. JNKを介した黄色ブドウ球菌殺菌抑制
 A) 野生型マクロファージをあらかじめJNK阻害剤存在下で培養した後、黄色ブドウ球菌を貪食させ貪食後の生存率を解析した。
 B) TLR2欠損マクロファージをあらかじめJNK活性化剤存在下で培養した後、黄色ブドウ球菌を貪食させ貪食後の生存率を解析した。

判明した。(図2) これより、TLR2を介してJNK経路が活性化することが殺菌抑制に必要だと考えられた。

JNK経路が殺菌抑制に必要なかどうかを知るために、JNK阻害剤またはJNK活性化剤存在下で黄色ブドウ球菌の貪食後の生存率を解析した。JNK阻害剤存在下では、野生型マクロファージに取り込まれた黄色ブドウ球菌の生存率は低下した。(図3A) 一方JNK活性化剤存在下では、TLR2欠損マクロファージに取り込まれた黄色ブドウ球菌の生存率は増加した。(図3B) 以上の結果から、JNKが活性化されると、マクロファージ内での黄色ブドウ球菌の殺菌が抑制されると考えられた。

次に、TLR2-JNK経路の下流について知るために、殺菌物質

のひとつである活性酸素に着目し、黄色ブドウ球菌を貪食したときに産生される活性酸素量を測定した。その結果、TLR2欠損マクロファージのほうが野生型マクロファージより産生する活性酸素量は多かった。また、JNK阻害剤存在下で野生型マクロファージに黄色ブドウ球菌を貪食させると、産生する活性酸素量は増加した。JNK活性化剤存在下でTLR2欠損マクロファージに黄色ブドウ球菌を貪食させると、産生する活性酸素量は減少した。以上の結果から、TLR2-JNKを介して活性酸素の産生が阻害されているため、貪食された黄色ブドウ球菌の殺菌が抑制されていると考えられた。(図4)

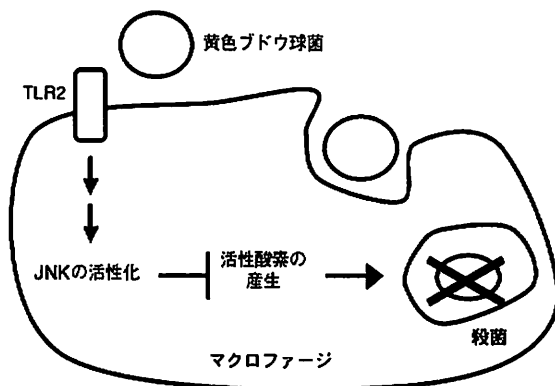


図4. TLR2-JNK経路を介する黄色ブドウ球菌の殺菌抑制

考 察

今回示した結果から、TLR2が細胞性の自然免疫応答に関与するとわかった。しかしその結果は、TLR2を介して取り込まれた黄色ブドウ球菌の殺菌が阻害されているというものであった。そしてその仕組みとして、TLR2を介してJNKが活性化することによりマクロファージ内での活性酸素産生が低下することが考えられた。これは細菌が自然免疫応答を逃れて生き延びるための戦略のひとつと考えることができる。

謝 辞

本研究を行うにあたり、多大なご指導とご助言を頂き、また、快適な研究の場を提供して下さいました中西義信教授ならびに白土明子准教授に心から感謝の意を表します。また、共に研究を行った一木万奈美さんにも心から感謝の意を表します。

最後に、日頃さまざまなご協力とご支援、ご助言を頂きました生体防御応答学研究室の皆様へ心から感謝いたします。

文 献

- 1) Janeway, Jr., C. A., and R. Medzhitov. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 197-216, 2002
- 2) Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783-801, 2006
- 3) Shiratsuchi, A., I. Watanabe, O. Takeuchi, S. Akira, and Y. Nakanishi. Inhibitory effect of Toll-like receptor 4 on fusion between phagosomes and endosomes/lysosomes in macrophages. *J. Immunol.* 172: 2039-2047, 2004
- 4) Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11: 443-451, 1999
- 5) Burns, E., G. Bachrach, L. Shapira, and G. Nussbaum. Cutting edge: TLR2 is required for the innate response to *Porphyromonas gingivalis*: activation leads to bacterial persistence and TLR2 deficiency attenuates induced alveolar bone resorption. *J. Immunol.* 177: 8296-8300, 2006



Profile

所 属：有人宇宙システム株式会社

2002年 金沢大学薬学部卒業

2004年 金沢大学大学院自然科学研究科修了

2008年 金沢大学大学院医学系研究科修了

抱 負：宇宙開発を通じて自然科学の発展に貢献すること