

PAMPs(Pathogen-associated molecular patterns)刺激がマクロファージにFasL感受性を誘導する分子機構とその生理学的意義の検討

| | |
|-------|---|
| メタデータ | 言語: eng 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/2297/16594 |

| | |
|------------|--|
| 氏名 | 福井雅之 |
| 生年月日 | |
| 本籍 | 香川県 |
| 学位の種類 | 博士(理学) |
| 学位記番号 | 博甲第585号 |
| 学位授与の日付 | 平成15年3月31日 |
| 学位授与の要件 | 課程博士(学位規則第4条第1項) |
| 学位授与の題目 | PAMPs(Pathogen-associated molecular patterns)刺激がマクロファージにFasL感受性を誘導する分子機構とその生理学的意義の検討 |
| 論文審査委員(主査) | 大熊 勝治(薬学部・教授) |
| 論文審査委員(副査) | 須田 貴司(がん研究所・教授) 中西 義信(医学系研究科・教授) 向田 直史(がん研究所・教授) 大野 博司(がん研究所・教授) |

学位論文要旨

Abstract

Antigenic stimulation activates T cells and simultaneously destines them to die by Fas-mediated apoptosis. Here, we demonstrated that various pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) upregulated Fas expression in macrophages, and sensitized them specifically to Fas ligand (FasL). Toll-like receptor and NF- κ B mediate these responses. However, the kinetics of disappearance of E. coli-induced peritoneal exudate macrophages was similar between wild-type and Fas-deficient mice, suggesting that Fas is not essential for the turnover of activated macrophages in T cell-independent inflammation. On the other hand, LPS-activated macrophages produced a large amount of IL-1 β upon FasL stimulation. Thus, unlike activation-induced cell death of T cells, sensitization of macrophages to FasL by PAMPs seems to be a pro-inflammatory rather than an anti-inflammatory event.

細胞の自殺で知られるアポトーシスは、生体の発生や恒常性の維持に必須の機構であることが明らかとなってきた。細胞にアポトーシスを誘導する受容体ファミリーはTNF/NGF-レセプタースーパーファミリーに属し、Fasがもっともよく特徴づけられたデスレセプターである。FasはそのリガンドであるFas ligand(FasL)と結合することにより三量体を形成し、カスパーゼの活性化を経てアポトーシスを誘導する。

全身性の自己免疫疾患を発症する*lpr*マウスの変異遺伝子がFas遺伝子であること、また

同じく自己免疫疾患を発症する *gld* マウスの変異遺伝子が Fas ligand 遺伝子であることが明らかにされたことにより、Fas/FasL システムを用いたアポトーシスは、免疫系において重要な役割を担っていることが示唆された。その後の解析の結果、*lpr* マウスや Fas ノックアウトマウスにおいては、胸腺での自己抗原反応性 T 細胞クローンの除去機構は正常に保たれているのに対し、末梢での成熟 T 細胞クローン除去機構に異常が認められることから、Fas/FasL システムが末梢の活性化 T 細胞の除去に関与していることが明らかとなった。また、T 細胞が抗原刺激を受けて活性化すると細胞表層に FasL を発現し、Fas を発現している活性化 T 細胞や B 細胞にアポトーシスを誘導する。細胞障害性 T 細胞や NK (natural killer) 細胞がガン細胞あるいはウイルス感染細胞を除去するときにも FasL が関与することも示されている。更に、FasL は眼や精巣、子宮胎盤などにも発現し、これら組織に侵入した免疫担当細胞にアポトーシスを誘導することで、免疫の監視機構から免れる免疫特権 (immune privilege) の獲得にも関与することが示されている。このように、Fas/FasL システムは免疫系において極めて重要な役割を果たしていると考えられる。

病原体が体内に侵入したとき、生体がどのようにそれを認識、排除するかは、主に T 細胞や B 細胞によって担われる獲得免疫において詳細に研究されてきた。しかしながら、病原体の侵入に対して最初に反応し、その排除を行うのは獲得免疫ではなく主にマクロファージによって担われる自然免疫である。マクロファージは細菌を認識、貪食し TNF- α 、IL-1、IL-6、IFN- γ などの炎症性サイトカインを産生することにより獲得免疫に細菌の侵入を伝える。マクロファージは、T 細胞や B 細胞のように細かな自己非自己の区別はできないが、細菌特有の分子構造、例えばグラム陰性菌細胞膜成分の lipopolisaccharide (LPS) や、細菌細胞壁の主成分である peptidoglycane などに対する大まかなパターン認識レセプターを持ち、これにより細菌を認識することが明らかになってきた。最近このマクロファージの細菌菌体成分に対するパターン認識レセプターとして Toll-like Receptor (TLR) ファミリーが同定され、現在までに 10 種類の TLR が報告されている。これまでに様々な細菌菌体構成成分がマクロファージを活性化させることが明らかとなっている。なかでも LPS は TLR4 によって認識され、転写因子 NF- κ B の活性化をもたらすことが知られている。また、TLR2、3、5、9 についても、それぞれ細菌特異的な peptidoglycane、dsRNA、flagellin、CpG DNA を認識し、TLR4 と同じく NF- κ B の活性化を誘導することが知られている。

ヒトの末梢血中のモノサイトはLPS刺激によりFasが誘導するアポトーシスに対して抵抗を示すことが報告された。また他に、LPSはマウス腹腔浸潤マクロファージにFasの発現は上昇させるが、Fasが介するアポトーシスに対する感受性には影響を与えないという報告がある。しかし、今回我々は、マウスマクロファージがLPSや他のPAMPs刺激によって誘導される活性化後に、FasLが誘導するアポトーシスに対する感受性が上昇することを見いだした。そこで我々はこの現象の分子機構と生理学的意義について検討を行った。

マウスマクロファージ系細胞株RAW264.7細胞の培養上清中にLPSを添加し、活性化後にアポトーシスに対する感受性がどのように変化するか調べた。LPS刺激したRAW264.7細胞とヒトFasL cDNA導入細胞株FFL、FDC2、FFSあるいはコントロール細胞株FBHを共培養し、FasLに対する感受性を検討した。膜型FasLを発現するFFLやFDC2と共培養した場合には、LPS前処理しなかった時に比べて、LPS処理した時に有意に細胞死が誘導された。コントロール細胞株FBHや可溶性FasLのみを発現するFFSと共培養したときには差が見られなかった。このことから、LPS刺激により活性化したマクロファージはFasLに対する感受性が上昇することが判明した。

細胞株で見られたLPSによるFasL感受性の誘導が、生理的な細胞においても誘導される反応かどうかを調べた。C57BL/6マウスにチオグリコレートを腹腔内投与し、腹腔浸潤細胞中のマクロファージを単離した。この腹腔マクロファージに対してLPS前処理を2日間行い、その後リコンビナントFasLを加え、更に24時間培養した後に細胞の生存率を測定した。その結果、LPS処理しなかった腹腔マクロファージはFasLに対して全く感受性を示さなかったのに対して、LPS処理を2日間行った細胞についてはFasLの添加により有意な生存率の低下が観察された。このことから、LPSによるFasLに対する感受性の誘導は細胞株だけでなく、生体内の生理的なマクロファージにおいても誘導される反応であることが示された。

FasLは活性化T細胞に対して、アポトーシスだけでなくネクローシスによっても細胞死を誘導することが既に報告されている。そこでマクロファージをLPSとFasLで刺激した際に誘導される細胞死がアポトーシスであるか否かを調べた。アポトーシスに伴うクロマチンDNAのヌクレオソーム単位の切断をアガロースゲル電気泳動法とSub-G1測定法で検出した結果、LPSで前処理し、更にFasLで処理したRAW264.7細胞においてはDNAの断片化が検出された。またこの時、アポトーシスに特徴的な細胞膜のプレビングを伴う細胞死を起こしている様子が観察された。これらの結果から、LPS前処理後にFasLで

誘導されるマクロファージの細胞死はネクローシスではなくアポトーシスであることが明らかとなった。

LPSにより活性化したマクロファージがFasL以外のアポトーシス誘導シグナルに対しても感受性が上昇するか否かを調べた。RAW264.7細胞をLPS存在下、非存在下で4時間前処理した後に、FasL、TNF- α 、エトポシドVP-16、スタウロスポリンといったアポトーシス誘導分子存在下で6時間培養した。その結果、TNF- α では生存率の低下は全く誘導されなかった。また、VP-16、スタウロスポリンによっては生存率の低下が引き起こされるもののLPS前処理の有無による差がほとんど見られなかった。このことから、マクロファージはLPSによる活性化後に、FasL刺激に特異的なアポトーシス感受性が上昇するものと考えられる。

マクロファージをLPSで刺激したとき、FasLに特異的にアポトーシス感受性が上昇することから、細胞表面のFasとFasLの発現量の変化をフローサイトメーターを用いて解析した。RAW264.7細胞はLPSによる刺激を受ける前から一定量のFasを細胞表面に発現しているが、LPS刺激を受けた後、更にFasの細胞表面の発現量が上昇することがわかった。このFas発現量の上昇によりFasL感受性の上昇が獲得されるものと考えられる。さらに、RNase Protection Assayにより、転写レベルにおけるアポトーシス関連分子の発現を調べた。Fasの転写レベルの発現はLPS刺激後に6-30倍まで上昇していた。また、カスパーゼ8の転写レベルの発現についても2倍程度であるが上昇していた。

FasL感受性を誘導するシグナルがTLRを介していることを明らかにするために、TLR4変異マウスであるC3H/HeJマウスを用いた以下のような実験を行った。C3H/HeJマウスと野生型マウスであるC3H/HeNマウスにチオグリコレートを腹腔内投与し、腹腔浸潤細胞中のマクロファージを単離した。この腹腔マクロファージに対してLipid A刺激を2日間行い、細胞表面のFasの発現を調べた。また、Lipid A刺激後にFasLを加え、更に24時間培養した後に細胞の生存率を測定した。細胞表面へのFasの発現上昇が野生型C3H/HeNマウス由来のマクロファージには誘導されたのに対し、TLR4変異C3H/HeJマウス由来のマクロファージにはFasの発現上昇は起こらなかった。また、FasLに対する感受性の上昇が野生型C3H/HeNマウス由来のマクロファージには誘導されたのに対し、TLR4変異C3H/HeJマウス由来のマクロファージでは感受性の上昇は起こらなかった。これらの結果から、FasLに対する感受性を誘導するシグナルはToll-like receptorを介して細胞内に伝わっていることが明らかとなった。

PAMPs刺激によって起こるFasの発現上昇に転写因子NF- κ Bが関与するかどうかを調べた。RAW264.7細胞に、NF- κ B-Luciferaseレポータープラスミドを遺伝子導入した。LPS刺激を施した細胞については、LPS刺激をしなかった細胞に比べて、ルシフェラーゼ活性が上昇していた。この時、LPS刺激の2時間前から、NF- κ Bの核への移行を阻害することによりその活性を抑えるNF- κ B特異的な阻害ペプチドSN50で細胞を前処理しておくことによりルシフェラーゼ活性は有意に抑えられた。ネガティブコントロールペプチドSN50Mでは抑制されなかった。また、NF- κ BがFasL感受性に及ぼす影響を調べると、未処理やSN50Mで前処理した細胞では、LPSとFasL刺激により生存率が20%以下に低下するのに対し、SN50で前処理した細胞の生存率の低下は効果的に抑制された。さらに、SN50はLPSが誘導する細胞表面へのFasの発現上昇をほぼ完全に抑えたが、SN50Mでは抑えられなかった。これらの結果から、LPSがマクロファージに誘導するFasL感受性の上昇には転写因子NF- κ B作用が必須であることが明らかとなった。

活性化したマクロファージがFasを発現しアポトーシスに対する感受性が上昇するという現象の生理学的な意義を考えた際、T細胞と同じようにアポトーシスが拡大したクローンの速やかな縮小という炎症反応の調節機構に関わっていることを想定し、次のような実験を行った。Fasの変異マウスである*lpr*マウスの腹腔にUVを照射して増殖能を失わせた大腸菌を投与した。Fas/FasLのシステムが炎症反応の終息時において活性化マクロファージのクリアランスに関わっているのなら腹腔に浸潤してきたマクロファージの減少が*lpr*マウスでは野生型マウスと比較すると遅れると予測した。大腸菌投与後、4日目には*lpr*マウス、野生型マウス共にほぼ同数のマクロファージが腹腔に浸潤してきた。その後、腹腔マクロファージの数は減少するが予想していたような*lpr*マウスにおける腹腔マクロファージ減少の遅れはみられなかった。この結果から、マクロファージにおいて、Fas/FasLを介するアポトーシスがT細胞と同じように拡大したクローンの速やかな縮小という炎症反応の調節機構に関わっている可能性は低いと考えられる。

マウス腹腔好中球にFasLを作用させたとき、FasLは好中球にアポトーシスを誘導するだけでなくIL-1 β の産生も誘導することが報告されている。そこで、マクロファージにおける、FasLが誘導するIL-1 β の産生にLPS前処理がどのような影響を及ぼすかを調べた。C57BL/6マウス由来のチオグリコレート誘導腹腔マクロファージをLPS存在、非存在下で2日間培養し、FasL存在下で更に24時間培養した。その結果、LPS処理した細胞はFasLの濃度依存的なIL-1 β の産生が見られた。しかし、LPS処理しなかった細胞においてはFasL刺激だけではIL-1 β の産生が見られなかった。

以上の結果から、マクロファージはPAMPs刺激により活性化し、細胞表面のFas発現量を上昇させる。これによりFasLが誘導するアポトーシスに対して感受性を示すようになるが、これは免疫応答の終息をもたらすものではなく、より強い炎症反応を誘導するための応答であると考えられる。

学位論文審査結果の要旨

獲得免疫系で中心的な役割を果たすT細胞は抗原で活性化された後、役目を終わるとFasリガンド(FasL)によりアポトーシスが誘導され、排除される。一方、自然免疫系で重要なマクロファージは、pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) と総称される種々の病原体成分により活性化される。本研究では、PAMPsで活性化したマクロファージのFasL感受性の変化とその生理的意義について検討し、次の結果を得た。1) LPS等のPAMPsで活性化されたマクロファージはFasL感受性が高まる。2) これはFasの発現がNF- κ Bの活性化に依存して上昇することと相関する。3) LPS刺激によるFasL感受性の上昇はToll様受容体4を介して伝達される。4) 大腸菌死菌を投与して誘導したマウス腹膜炎モデルで、浸潤マクロファージ数の増減の動態には野生型マウスとFas欠損lprマウスの間で有意差がなく、T細胞非依存性の炎症の退行期における活性化マクロファージの排除には、Fasは必須ではない。5) LPS活性化マクロファージをFasLで刺激すると、アポトーシスを起こすと同時に大量のIL-1 β が放出された。以上の結果より、PAMPs刺激はマクロファージのFasL感受性を増大させ、これは炎症の抑制よりも、むしろ誘導に関与する現象と考えられた。本研究は、自然免疫系におけるFasLの役割に新しい知見を加えるものであり、博士(理学)に値すると評価された。