

	ほんだ ゆたか
氏 名	本田 穰
学 位	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	新大院博(医)第246号
学位授与の日付	平成20年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博 士 論 文 名	Altered expression of TLR homolog RP105 on monocytes hypersensitive to LPS in patients with primary biliary cirrhosis (原発性胆汁性肝硬変におけるLPSに対し高反応性を示す単球表面のTLR同位体RP105発現の変化)
論文審査委員	主査 教授 味岡 洋一 副査 教授 青柳 豊 副査 教授 内藤 眞

#### 博士論文の要旨

原発性胆汁性肝硬変(primary biliary cirrhosis; PBC)は肝外病変を高率に合併する自己免疫性疾患である。これまでに外来性抗原、特に微生物由来ペプチドと分子相同性を有するヒトピルビン酸脱水素酵素複合体(PDC)-E2 componentに対する自己反応性リンパ球がPBCの病態機序に関与していることが示唆されている。微生物病原体の構成成分は自然免疫系においてはToll-like receptor (TLR)によって認識されるが、PBCの病態におけるTLRの関与は不明である。本研究はPBC症例における自然免疫応答、特に細菌由来成分の認識に重要なTLR2とTLR4を介した免疫応答について検討することを目的とした。

【対象と方法】無症候性PBC 25例、慢性ウイルス性肝炎(CVH) 10例と健常人 15例より末梢血単核球(PBMC)を分離後、TLR2のリガンドであるpeptidoglycan (PGN)およびTLR4のリガンドであるlipopolysaccharid (LPS)で刺激培養し、刺激後の培養上清中のサイトカインをcytometric beads array (CBA)により、TLRなどの表面抗原発現をflow cytometry (FACS)により、また核抽出分画におけるnuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65をELISAにより定量した。更に、最近TLR4シグナル伝達のnegative regulatorであることが報告されたradioprotective 105 (RP105)発現をLPS刺激前後にFACSにより解析した。RP105 mRNA発現は磁気ビーズを用いて分離した細胞分画を用いてreal-time PCR法により検討した。

【結果】PBC症例より分離したPBMCでは、LPS刺激後のIL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8産生と活性化NF- $\kappa$ B p65が健常人より有意に高値を示し、CD14陽性単球における活性化マーカーであるCD83発現がCVH症例(p=0.028)や健常人(p<0.001)と比較して有意に高く、LPS刺激に対し高反応性であった。更にTLRのリガンド刺激によるシグナル

伝達経路の解析を行ったところ、real-time PCR法で定量したTLRのアダプター分子である myeloid differentiation factor 88 (MyD88)の mRNA 発現が PBC 症例で明らかに高値であり、その結果が NF- $\kappa$ Bp65 の活性化および核内移行を促進し、種々の炎症性サイトカン産生亢進に寄与していることが示唆された。

次に、PGN および LPS の刺激がそれぞれの固有のレセプターである TLR2 および TLR4 の発現に与える影響を検討するため、TLR2 および TLR4 の細胞表面発現を FACSにより測定した。刺激前の TLR2/4 発現は PBC 症例と健常人の間に差異は認められず、PGN 刺激 1 時間後に CD14 陽性単球上の TLR2 発現は増強するものの PBC 症例と健常人、CVH との間に有意差は認めなかった。対照的に TLR4 は LPS 刺激 1 時間後に発現は低下するが、PBC 症例では CVH(18.0  $\pm$  3.5 vs. 13.9  $\pm$  5.4; P=0.046)や健常人 (vs. 11.4  $\pm$  4.5; P<0.001)と比較して有意に発現が高かった。

更に、LPS に対する高反応性の原因として、TLR4 シグナル伝達の negative regulator であることが報告された TLR4 homolog である RP105 について解析したところ、未刺激では PBC 症例の CD14 陽性単球における RP105 発現は陽性率、発現強度(MFI)とも CVH、健常人と有意な違いは認められなかったが、LPS 刺激後の CD14 陽性単球における発現強度は CVH 症例(187.6  $\pm$  88.1, range; 91.2-346.3 vs. 335.2  $\pm$  155.1, 111.0-565.8; P=0.016)や健常人 (vs. 344.9  $\pm$  137.3, 131.1-568.5; P<0.001)と比較して有意に低下していた。また、LPS 刺激後の CD14 陽性単球における RP105 mRNA 発現も健常人と比較して有意に低下していた(0.012  $\pm$  0.006, 0.003-0.023 vs. 0.025  $\pm$  0.010, 0.010-0.041; P<0.001)。

【考察】PBC は微生物感染が発症機序の一つと推定されているものの、これまで微生物感染に対する重要な防御機構である自然免疫の病態への関与は明らかにされていなかった。本研究において、(1)PBC 症例の単球は TLR4 リガンド刺激に対して高反応性を示し、炎症性サイトカインを高産生すること、(2)PBC 症例単球における TLR4 リガンド刺激に対する高反応性の原因として、TLR4 シグナルの negative regulator である RP105 の発現低下の関与が示唆されることが明らかとなった。RP105 は以前から SLE などの自己免疫疾患との関連が報告されており、SLE においては RP105 発現の低下した B 細胞が自己抗体産生に関与している可能性が報告されている。本研究で認められた PBC における RP105 発現低下を伴う自然免疫応答の異常は、他の自己免疫疾患との関連においても興味深い知見と考えられた。

(論文審査の要旨)

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) は微生物感染が発症機序の一つと推定されているが、微生物感染に対する防御機構である自然免疫の関与については明らかにされていない。微生物病原体は、自然免疫系では Toll-like receptor (TLR) により認識される。本研究は、PBC における TLR2 と TLR4 を介した免疫応答について検討した。

無症候性 PBC 25 例、慢性ウイルス性肝炎 (CVH) 10 例と健常人 15 例より採取・分離した末梢血単核球 (PBMC) を TLR2 のリガンドである peptidoglycan (PGN) および TLR2 のリガンドである lipopolysaccharide (LPS) で刺激培養し、培養上清中のサイトカイン、TLR などの表面抗原発現、核抽出分画における nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) の発現、TLR4 シグナル伝達の negative regulator である radioprotective 105 (RP105) の発現、をそれぞれ検討した。

PBC 症例より分離した PBMC では、LPS 刺激後 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 産生と活性化 NF- $\kappa$ B が健常人より有意に高値を示した。更に TLR のアダプター分子である MyD88 の mRNA 発現が亢進していた。また、LPS 刺激後の RP105 発現は健常人に比べ有意に低下していた。

以上のことより、本研究は PBC 症例における自然免疫応答の異常、すなわち PBC 症例の単核球が TLR4 リガンド刺激により炎症性サイトカインを高産生すること、その原因として TLR4 シグナルの negative regulator である RP105 の発現低下の関与が示唆されること、を明らかにした点で、学位論文としての価値を認める。