感染時の自然免疫受容体 toll-like receptor-2 (TLR2) の発現・機能調節とその炎症応答に関する研究

首藤 剛

Regulation of Expression, Function, and Inflammatory Responses of Innate Immune Receptor Toll-like Receptor-2 (TLR2) during Inflammatory Responses against Infection

Tsuyoshi Shuto

Department of Molecular Medicine, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, 5-1 Oe-Honmachi, Chuo-ku, Kumamoto 862-0973, Japan.

(Received July 23, 2013)

Toll-like receptor-2 (TLR2) is one of the important innate immune receptors that play an important role in recognizing the pathogens and producing inflammatory cytokines. In this review, we focus on the regulatory mechanisms of expression, function and inflammatory responses of TLR2 during pathogenic infection in innate immune cells. We first showed that nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi), an important human pathogen that exacerbates otitis media and chronic obstructive pulmonary diseases (COPD), induces inflammatory responses through activation of NF- κ B via two distinct signals, NIK-IKK α / β -I κ B α and MKK3/6-p38 pathways. Moreover, TLR2 was greatly up-regulated by NTHi through the positive IKK-I κ B α -dependent NF- κ B pathway and the negative MKK3/6-p38 α / β pathway. Importantly, glucocorticoids synergistically enhance NTHi-induced TLR2 up-regulation likely via a negative cross-talk with the inhibitory p38 MAPK. The results provide novel insights into the role of glucocorticoids in regulating host defense and innate immune responses through TLR2 regulation. We next focused on the pathogenesis of cystic fibrosis (CF), a common lethal inherited disorder characterized by recurrent pulmonary infections and obstruction caused by chronic mucus hypersecretion and inflammation. We demonstrated an increased expression of TLR2, due to an enhanced DNA de-methylation and Sp1-dependent transcriptional activation in CF epithelial cells. Furthermore, a Th17 cytokine IL-17A synergistically increased TLR2 signal through an enhancement of p38 phosphorylation. These studies suggest the importance of TLR2 and IL-17 signals in the pathogenesis of CF. Finally, by focusing on neutrophils and CF airway epithelial cells, we identified curcumin as a potent inhibitor of TLR2-mediated inflammatory responses.

Key words—toll-like receptor-2 (TLR2); epithelial cell; cystic fibrosis (CF); curcumin; neutrophil; nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi)

1. はじめに

われわれの身体は、病原性細菌やウイルスを始めとする様々な病原微生物の侵入の脅威に常にさらされている。この侵入に対する防御機構の最前線を担うのは、皮膚や粘膜の上皮細胞や好中球、マクロファージ、NK細胞といった細胞群である。これらの細胞が受け持つ感染防御機構は自然免疫と呼ばれ、感染早期に迅速に働き、病原微生物による病原性が発揮されるのを未然に防ぐのに寄与する。¹⁾ 一方、

自然免疫とは異なり、感染数日後から惹起されるB細胞やT細胞を中心とした免疫機構は、獲得免疫と呼ばれる。生体は、これら2種類の免疫機構をバランスよく発動させ、最終的に病原微生物を排除する。興味深いことに、近年の免疫研究の進展により、自然免疫は一連の免疫応答において獲得免疫の分化を方向付け、免疫系を効率よく発動させるという重要な役割をも担うことが証明された。²⁾ したがって、感染の初期応答のみならず、獲得免疫をも制御する自然免疫応答の調節機構を理解することは、極めて重要であり、このことは、2011年のノーベル生理学・医学賞が自然免疫に関する研究者に与えられた観点からも疑う余地はない。³⁾

自然免疫は、無脊椎動物や植物にも備わる原始的

The author declares no conflict of interest.

熊本大学大学院生命科学研究部遺伝子機能応用学分野
(〒862-0973 熊本市中央区大江本町 5-1)

e-mail: tshuto@gpo.kumamoto-u.ac.jp

本総説は、平成24年度日本薬学会九州支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

な感染防御機構である。地球上の約 90% の生物は獲得免疫を保有せず、自然免疫のみで病原体を認識し、排除できることに鑑みると、生命体における本機構の重要性は明白である。粘膜上皮細胞やマクロファージなどの自然免疫関連細胞は、パターン認識受容体 (pattern recognition receptors; PRRs) を発現し、多彩な病原微生物由来の非自己成分の構造を認識し、一連の免疫応答を開始する。哺乳類における PRRs の中でも、toll-like receptors (TLRs) は、様々な病原微生物の認識及び免疫系の活性化において中心的な役割を担う分子である。⁴⁾

一方、TLRs シグナリングを介した宿主細胞の過剰な免疫活性化は、ときに重篤な炎症性疾患を誘発することも知られている。したがって、TLRs 発現の調節機構を解明し、適切に調節するような物質の探索は、抗炎症薬開発の観点から注目されている。⁵⁾ 本総説では、生体防御のフロントラインである上皮細胞や免疫初期応答に必須である好中球に着目し、TLRs の中でも、多くの病原体に保存された構造を幅広く認識することで知られる TLR2⁶⁾ について、その発現・機能調節と炎症応答に関する筆者らのこれまでの研究成果を中心に概説する。

2. 上皮細胞における莢膜非保有型インフルエンザ菌 (NTHi) 誘導性炎症性シグナル伝達機構の解明

鼻咽喉などの上気道及び肺などの下気道には、生後間もなくから細菌が生着し、常在細菌叢を形成している。これらの細菌は、通常は宿主とのバランスのとれた生活をしており、病原性はない。しかしながら、なんらかの原因で、細菌と生体防御系のバランスが破綻すると、細菌は粘膜上皮を破って生体に侵入し、定着さらには増殖する。この段階で、細菌叢は病原微生物となり感染症を引き起こす。これまで、上下気道感染症の増悪に関与する細菌が多く報告されてきたが、その中でも、中耳炎や慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease; COPD) を増悪させることでよく知られるのは、莢膜非保有型インフルエンザ菌 (nontypeable *Haemophilus influenzae*; NTHi) である。^{7,8)} NTHi 感染に対する治療には、主に抗生物質が用いられるが、乱用による薬剤耐性菌の増加により、近年、効果的な予防薬、つまりワクチンの開発が重要となってきた。莢膜保有型インフルエンザ菌 (Hi) に対して

は、莢膜の多糖体を抗原とするワクチンが開発されているが、⁹⁾ NTHi は莢膜を保有しないため、このワクチンは無効である。したがって、これまでの「細菌」側に着目した研究とは異なる観点からの NTHi 感染症治療薬の開発が急務である。そこで、筆者らは、NTHi 感染症の本体である炎症応答に係わる「宿主」側因子を同定し、NTHi 感染症の治療標的としての妥当性を明らかにすることを究極の目的とし、まず、NTHi が、炎症性転写因子である nuclear factor- κ B (NF- κ B)¹⁰⁾ の活性化を介して病態を発現させるか否かについて種々の検討を行った。

その結果、NTHi は、ヒト上皮細胞における NF- κ B を強く活性化させた。このとき、NTHi 感染刺激 5 時間後において NF- κ B リポーター活性はプラトーに達し、未刺激状態の 70 倍という強力な活性を得た。また、各種シグナル分子の阻害剤又はドミナントネガティブ変異体を用いた解析により、NTHi は、「NF- κ B-inducing kinase (NIK)-I κ B kinase (IKK) α/β 依存性 inhibitor of NF- κ B (I κ B) α リン酸化及び分解経路」及び「MAP kinase kinase (MKK) 3/6-p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) リン酸化路」の 2 つの経路を同時に活性化し、その下流に存在する NF- κ B を協調的に活性化させた。一方、TGF- β -activated kinase 1 (TAK1)¹¹⁾ のドミナントネガティブ変異体の強制発現は、I κ B α リン酸化経路と p38 MAPK リン酸化経路の両方を抑制し、NTHi 感染による NF- κ B の活性化を抑制した。次に筆者らは、NTHi 感染による NF- κ B の活性化に重要な宿主細胞受容体の同定を行った。その結果、グラム陽性菌感染において重要な役割を持つ TLR2 が、NTHi 感染による NF- κ B の活性化に必要であることが明らかとなった。最後に筆者らは、NTHi のどの分子が宿主細胞の NF- κ B 活性化に重要であるかを調べたところ、NTHi 外膜構成リポタンパク質である P6¹²⁾ が、NF- κ B を活性化させることが明らかになった。この活性化は、

首藤 剛

熊本大学大学院生命科学研究部・准教授。99 年熊本大学薬学部卒業、01 年同大学大学院薬学研究科博士前期課程修了。同年同薬学研究科助手、06 年同医学薬学研究部講師。10 年同生命科学研究部講師、13 年より現職。99 年-00 年米国ハウスイヤー研究所実験助手。04 年-05 年米国 CPMCRI 研究員。

NTHi 感染により起こる NF- κ B の活性化と同様の経路を介して起こることが示唆された.¹³⁾ 以上の結果より, NTHi は, 宿主受容体 TLR2-TAK1 経路を活性化し, I κ B α リン酸化経路と p38 MAPK リン酸化経路の両経路を介して, 炎症性転写因子 NF- κ B の活性化を引き起こすことが明らかになった.

3. 上皮細胞における NTHi 誘導性 TLR2 遺伝子発現上昇に係わるシグナル伝達機構の解明

TLR2 は, グラム陽性菌のみならず, 多彩な病原菌を認識する TLRs であることから, 生体における重要性は高い. 一般に, マクロファージ, リンパ球, 好中球などの血球系細胞における TLR2 の発現量は高く,⁶⁾ 一方, 上皮細胞における TLR2 の発現量は低いことが知られている. これは, 生体のフロントラインに位置する上皮細胞が, 容易に免疫応答を開始しないための生体の持つ負の制御機構の 1 つであると考えられるが, 上皮細胞における TLR2 の発現は, 炎症惹起中においても低く保たれているのであろうか? 興味深いことに, 筆者らは, NTHi の上皮細胞への感染刺激が, TLR2 遺伝子そのものの発現を上昇させることを見い出した. このとき, TLR2 発現誘導率は, NTHi 感染刺激 3 時間後において, 未刺激時の約 4 倍, 5 時間後において約 10 倍であり, NTHi 感染時間依存的に TLR2 発現量は増加することが明らかになった.¹⁴⁾ 次に筆者らは, NF- κ B 活性化経路が, TLR2 の発現調節に関与しているか否かの検討を行うため, NF- κ B の核移行

阻害剤 caffeic acid phenethyl ester (CAPE), I κ B α の分解阻害剤 MG-132 を処理し, TLR2 の定量的 reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を行った. その結果, 両阻害剤により TLR2 遺伝子の発現上昇が顕著に抑制された. また, NF- κ B p65 サブユニットの過剰発現は, その発現量依存的に TLR2 遺伝子の発現上昇を引き起こした. 最後に, I κ B α 及び IKK β の変異体の過剰発現の影響を検討し, NTHi 誘導性の IKK β -I κ B α 依存性 NF- κ B 活性化経路が, NTHi 誘導性の TLR2 遺伝子の発現上昇において重要であることが示された.

次に筆者らは, p38 MAPK 活性化経路が, TLR2 の発現調節に関与しているか否かの検討を行うため, p38 MAPK の特異的阻害剤 SB203580 を処理し, TLR2 の定量的 RT-PCR 法を行った. 興味深いことに, 様々な濃度の SB203580 の処理は, NTHi 誘導性の TLR2 遺伝子の発現上昇を 2-5 倍の範囲で増強した. また, p38 MAP キナーゼ及びその上流分子である MKK3/6 の野生型及び変異体の過剰発現の実験より, NTHi 刺激依存的な MKK3/6-p38 MAPK 活性化経路が, NTHi 誘導性の TLR2 遺伝子の発現上昇を負に調節していることが明らかになった (Fig. 1, Left).¹⁴⁾

以上の結果より, NTHi は, IKK β -I κ B α 依存性 NF- κ B 活性化経路により, 宿主受容体 TLR2 の発現量を増加させ, 一方, NTHi により同時に活性化される p38 MAPK 活性化経路は, TLR2 の発現を

Fig. 1. Schematic Representation of the Signaling Pathway Involved in Dexamethasone (DEX)-mediated Enhancement of NTHi-induced TLR2 Expression *via* Inhibition of p38 MAPK in Human Epithelial Cells

NTHi up-regulates TLR2 expression *via* a positive IKK-I κ B α -dependent NF- κ B pathway and a likely negative MKK3/6-p38 α / β pathway. Glucocorticoids, well known potent anti-inflammatory agents, synergistically enhance NTHi-induced TLR2 up-regulation likely *via* a negative cross-talk with the inhibitory p38 MAPK pathway. The up-regulated TLR2 leads to enhanced immune and inflammatory responses.

むしろ負に調節することが明らかになった (Fig. 1, Left). しかし, NTHi 感染は, 結果として TLR2 の発現量を増加させることから, NF- κ B 活性化経路と p38 MAPK 活性化経路のバランスが, NTHi 感染時の TLR2 の発現量を規定する重要な因子であることが示された.

4. グルココルチコイド製剤が NTHi 誘導性 TLR2 遺伝子発現上昇に与える影響

TLR2 遺伝子発現を特異的にコントロールできる薬剤は, 炎症反応及び免疫反応の制御において重要な意義を持つと考えられる. 前章の結果より, NTHi 感染時の TLR2 の発現量は, NF- κ B 活性化経路と p38 MAPK 活性化経路のバランスにより調節されていることから, 次に筆者らは, 従来から強力な抗炎症薬として知られ, NF- κ B 抑制作用を有することで知られるグルココルチコイド製剤 dexamethasone (DEX)¹⁵⁾に着目し, NTHi 誘導性の TLR2 発現上昇に対する影響を調べた. その結果, 予想に反して, NF- κ B 活性化経路への影響よりも p38 MAPK 活性化経路に強く影響を与えることを見出した. 具体的には, 様々な濃度の DEX の投与は, SB203580 投与時と同様に, NTHi 誘導性の TLR2 遺伝子の発現誘導を 2-5 倍の範囲で増強した. つまり, DEX は, NTHi 感染時に, TLR2 発現を負に制御する p38 MAPK 活性化経路を阻害することによって, 結果として, TLR2 遺伝子の発現量を増加させるというユニークな作用を有することが明らかになった. 次に筆者らは, DEX による NTHi 誘導性 TLR2 遺伝子発現増強効果がグルココルチコイド受容体 (GR) を介した作用であることを明らかにし, その作用は, DEX/GR 複合体による p38 MAPK 活性化阻害作用に起因することを明らかにした (Fig. 1, Right).¹⁴⁾

最後に筆者らは, NTHi 感染に起因して生じる中耳炎患者の中耳上皮組織における TLR2 の発現量を, 抗 TLR2 抗体を用いた免疫組織染色にて検査したところ, 健常者における TLR2 の発現に比べ, 中耳炎患者における TLR2 の発現は高いことが明らかになった.¹⁴⁾

以上の結果をまとめると, NTHi は, 自身を認識する TLR2 の発現を上昇させることが明らかになった. また, NTHi 感染によって誘導された TLR2 発現が, グルココルチコイド製剤の使用により, さ

らに増強されることが示された (Fig. 1). 一般に, 宿主受容体である TLR2 の発現を病態時に増強することは, 一見, 炎症を増悪させると捉えることができる. しかしながら, 一方では, TLR2 の発現を増強することは, 宿主の自然免疫能を高めるとも考えることができることから, 今後, グルココルチコイド製剤による NTHi 誘導性 TLR2 遺伝子発現の増強作用が, 臨床的にどのような意味を持つか精査する必要がある.

5. 嚢胞性線維症 (CF) 上皮細胞における TLR2 遺伝子の発現上昇機構の解明

気道炎症を伴う有名な疾患の 1 つに, 嚢胞性線維症 (cystic fibrosis; CF) がある. CF は, 白色人種の間で最も頻度の高い致死性の遺伝性疾患である. その原因遺伝子は, CF transmembrane conductance regulator (CFTR) であり, cAMP 依存性の Cl⁻ イオンチャネルをコードしている.¹⁶⁾ CF 患者は, 通常, その平均寿命は約 30 歳と短命であるが, その原因は, 主として進行性の呼吸器閉塞と細菌感染による持続的炎症に伴う肺機能低下である.¹⁶⁾ しかしながら, CF における慢性炎症の分子メカニズムの詳細は, 多くの議論がなされているが, いまだ不明な点も多い.

こうした状況の中, 2 つの独立したグループが, CF 上皮細胞における TLR2 の発現量及び応答性が上昇し, CF 気道上皮細胞の細菌感染への感受性増大を引き起こすという興味深い報告を発表した.^{17,18)} しかしながら, なぜ CF 気道上皮細胞において TLR2 の発現が上昇するのかに関するメカニズムは不明であったことから, 筆者らは, CF 上皮細胞における TLR2 遺伝子発現上昇メカニズムを解明し, CF 治療標的としての TLR2 シグナルの妥当性を検証することを究極の目的とし, 種々の検討を行った.

まず筆者らは, 健常人由来の 16HBE14o-細胞に比べ, CF 患者由来の CFBE41o-細胞における TLR2 の発現が 3.5 倍高いことを明らかにした. 次に筆者らは, CFBE41o-細胞には, 機能的な TLR2 が発現していることを確認し, そのリガンド応答性も CF 細胞において 3.5 倍上昇していることを明らかにした. また, 正常型 CFTR を恒常的に発現する CF 気道上皮細胞 (CFBE41o-/WT-CFTR) は, その親細胞 (CFBE41o-) に比べ, TLR2 の発現及びリガ

ンド応答性が低値を示したことから,¹⁹⁾ 上皮細胞における CFTR の存在が, CLR2 の発現量を規定する重要な因子であることが明らかになった [Fig. 2 (B)].

さらに筆者らは, CF 気道上皮細胞における

TLR2 発現上昇のメカニズムを解明することを目的とし, CF 細胞におけるエピジェネティック遺伝子制御機構の破綻の可能性に関して検討を行った. その結果, DNA 脱メチル化促進剤である 5-azacytidine (5-AC) の 16HBE14o-に対する処理は, TLR2

Fig. 2. A Potential Model Representing the Mechanisms Underlying Hypomethylation-dependent TLR2 Promoter Activation in Human Epithelial Cells

A) Schematic representation showing that the specific CpG sites are highly demethylated in CF epithelial cells and these CpG sites overlap with a minimal region that is necessary and sufficient to maintain basal TLR2 promoter activity. Binding sites for different transcription factors are indicated (binding site for: SP1, open circle; NF-κB, solid circle; ETS, gray circle). Indicated black lines are CpG sites that can be methylated. Transcriptional start site is indicated as +1. Methylation status of CpGs that are highly demethylated and modestly demethylated in CF cells are indicated as open box and grey box, respectively. Minimal region that is necessary for basal TLR2 expression is indicated as solid box. B) A model for the mechanisms of DNA demethylation-dependent TLR2 promoter activation in human epithelial cells. As shown in left panel, increased methylation of CpG#18-20 within TLR2 promoter is observed in non-CF epithelial cells, followed by the enhanced recruitment of unknown factors "X" that could recognize methylated CpGs and suppress SP1-dependent transcriptional activation without affecting the binding of SP1 to those CpGs. 5-Azacytidine (5-AC) treatment of non-CF cells leads to inducing demethylation of CpG#18-20. On the other hand, CF epithelial cells express high level of TLR2 gene through decreased methylation of CpG#18-20, which might abolish the recruitment and activity of factors "X" in these cells. The existence of CFTR-dependent epigenetic regulation at specific CpGs in human epithelial cells is intimated by the fact that the introduction of WT-CFTR gene into CFBE41o- (CF) cells increased the methylation of CpG#18-20.

プロモーター上における DNA 脱メチル化を引き起こし、TLR2 遺伝子発現を増強した。また、bisulfite を用いた sequence 法により 16HBE14o-細胞及び CFBE41o-細胞における TLR2 プロモーター領域の DNA メチル化を数値化したところ、CFBE41o-細胞における TLR2 プロモーター領域は、顕著に脱メチル化されていることが明らかになった。これらの筆者らの結果より、CF 患者由来の細胞における TLR2 の発現上昇は、TLR2 プロモーター領域の DNA 脱メチル化を介した、いわゆるエピジェネティックな機構により制御されていることが明らかになった [Fig. 2(B)].¹⁹⁾

最後に筆者らは、TLR2 プロモーター領域の脱メチル化による TLR2 転写機構の解明を行った。まず、TLR2 プロモーター領域解析により、転写開始部位付近に存在する SP1 結合領域 (SP1-2) が、TLR2 発現調節機構における重要な領域であることが明らかになった [Fig. 2(A)]。また筆者らは、SP1-2 領域のメチル化が直接 SP1 の結合を抑制しないことを見出し、DNA のメチル化による別の因子のリクルートが TLR2 発現を抑制する可能性を示した [Fig. 2(B)].²⁰⁾

以上の筆者らの結果より、CF 上皮細胞における TLR2 発現の上昇及びそのリガンド応答性の上昇は、TLR2 遺伝子プロモーター領域の脱メチル化に起因することが初めて明らかになった。¹⁹⁾ また、DNA 脱メチル化に伴う TLR2 遺伝子発現の上昇は、転写因子 SP1 のはたらきにより制御されていることも明らかになり、²⁰⁾ これらの知見は、CF 疾患炎症誘発機構の解明に大きく貢献するものである。

6. CF 上皮細胞における TLR2 シグナル誘導性 IL-8 発現に対する IL-17A の作用

IL-17 は、分子量 20–30 kD のペプチドからなるホモダイマーの糖タンパク質であり、現在、相同性を持つ 6 個のファミリー分子 (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL-17F) からなる。²¹⁾ この中でも、IL-17A は、最も主要な IL-17 ファミリー分子であり、Th1 細胞及び Th2 細胞でなく、主に Th17 細胞と呼ばれる 2005 年に同定された T 細胞サブセットより産生される。このように産生された IL-17A は、繊維芽細胞や上皮細胞、血管内皮細胞、マクロファージなど種々の細胞に作用し、炎症性サイトカインやケモカイン、細胞接着因子など種

々の因子を誘導して炎症応答を惹起する。IL-17A は、細菌感染時の初期に誘導されることから、特に宿主防御に多大な役割を担うと考えられており、実際に、IL-17A ノックアウト (KO) マウスは、*Citrobacter rodentium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* など多くの細菌感染に対して易感染性である。

一方、IL-17A の過剰産生は、関節リウマチ、糖尿病、多発性硬化症等を始め多くの自己免疫疾患に関与していることも明らかにされている。²²⁾ また、COPD や喘息などの慢性呼吸器疾患においてもその発現が亢進している。²³⁾ このように、IL-17A は、多くの炎症性疾患においてその発現が亢進しており、現在では、それぞれの病態における IL-17A の詳細な発現や機能に注目が集まっている。

このような背景の中、筆者らは、CF 気道上皮細胞における TLR2 シグナル誘導性 IL-8 発現に対する IL-17A の役割について、種々の検討を行った。まず筆者らは、CFBE41o-細胞及び DHBE-CF (初代培養 CF 気管支上皮細胞) を用いて、IL-17A 単独刺激を行ったところ、IL-17A は両細胞において IL-8 の産生を誘導することを見出した。このとき、IL-8 発現誘導は、IL-17A 依存的 p38 及び ERK MAPKs シグナルに依存することが明らかになった。次に筆者らは、IL-17A が CFBE41o-細胞及び DHBE-CF 細胞において、TLR2 シグナルによる IL-8 の産生誘導を相乗的に増強することを見出した。興味深いことに、IL-17A は、CFTR に変異のないヒト気道上皮細胞株 (16HBE14o-, Calu-3, A549) 及び健常人由来のヒト初代気管支上皮細胞 (NHBE) においては、IL-8 産生増強作用を示さなかった。最後に筆者らは、CF 気道上皮細胞における IL-17A 依存性 IL-8 産生増強作用に、TLR2 及び IL-17A シグナルの下流共通分子である p38 MAPK の活性化が、重要であることを明らかにした。以上の結果より、IL-17A は、おそらく p38 MAPK 活性化を増強することで、CF 患者の気道における細菌感染誘導性の IL-8 産生を増大させることが明らかになった (Fig. 3).²⁴⁾ なお、本結果は、CF 気道上皮細胞において IL-17A が感染刺激をモジュレートするという新たな IL-8 発現制御機構が存在することを明らかにし、その機構において p38 MAPK の重要性を明らかにするものである。本成果が、今後、

Fig. 3. Schematic Representation of the Mechanism Responsible for the Synergism between IL-17A and TLR2 Signal to Induce IL-8 Expression in CF Airway Epithelial Cells

IL-17A synergistically increases IL-8 production induced by TLR2 agonist peptidoglycan (PGN) in a human CF bronchial epithelial cell line and primary cells. IL-17A-dependent synergism appears to be the result of enhanced PGN-induced phosphorylation of p38 MAPK.

CFの炎症病態の治療において新たな治療ターゲットの提起につながるものとなることを期待したい。

7. ウコン主成分 curcumin はヒト単球、好中球及びCF上皮細胞におけるTLR2の発現を抑制する

これまでの報告により、CFにおける気道病態の形成においては、上皮細胞のみならず、好中球が重要な役割を担う。そこで筆者らは、CF気道病態形成における好中球のTLR2シグナルの重要性を明らかにすることを目的とし、種々の検討を実施した。なお、好中球は、有用な細胞株が存在しないことから、筆者らは、DMSO誘発性好中球様分化HL-60細胞（dHL-60細胞）を過去の文献に倣って作製し、まず、ヒト初代培養好中球（polymorphonuclear leukocyte; PMN）と比較検討することから開始した。その結果、dHL-60細胞は、PMNと同等の好中球マーカー分子の発現及び遊走活性を有し、さらに、dHL-60細胞におけるTLR2遺伝子発現量及びそのリガンド応答性は、PMNと同等であることが示された。²⁵⁾

そこで筆者らは、上記の好中球モデル（dHL60）及びヒト単球細胞株THP-1を用いて、TLR2の発現や機能を抑制する物質の探索を試みた。このとき、筆者らは、過去の報告により抗炎症作用が期待された安全性の高い化合物であるウコンの主成分curcuminに着目した。²⁶⁾ まず、dHL60, THP-1にcurcuminを処理し、TLR2遺伝子の発現量を検討した結果、curcumin高用量処理（40 μ M）は、これらの細胞においてTLR2遺伝子発現を処理時間依存的に有意に減少させた。一方、curcumin低用量（<40 μ M）処理は、TLR2遺伝子発現にほとん

ど影響を与えず、むしろわずかながら増加させる傾向にあった。興味深いことに、curcuminによるTLR2発現抑制作用は、ヒト末梢血より単離したPMN及び単球においても同様に認められた。また、curcumin高用量処理は、TLR2リガンド刺激時のIL-8発現量も有意に抑制した。興味深いことに、curcuminによるTLR2遺伝子発現抑制は、抗酸化剤*N*-acetylcysteine（NAC）により抑制されたことから、curcuminが産生するラジカルが、TLR2遺伝子発現抑制に関与していることが示唆された。²⁷⁾

次に筆者らは、curcuminが、CF気管支上皮細胞においても、TLR2発現を抑制するのではないかと考え、CFBE41o-及びDHBE-CF細胞を用いた検討を行った。その結果、CFBE41o-及びDHBE-CF細胞において、curcumin高用量処理は、TLR2のmRNA発現及びタンパク質の膜上発現量、さらには、リガンド応答性を有意に抑制した。さらに、curcuminは、TLR2発現に寄与している転写因子SP1のタンパク質発現を減少させることで、TLR2遺伝子の発現を抑制することが明らかになった。

以上の結果より、curcuminは、様々な細胞においてTLR2発現及び機能を強く抑制する化合物であることが明らかになった。²⁷⁾ Curcuminは、安全性の高い化合物であるが、bioavailabilityが極めて低いことも否めない。今後、本知見を基に、新規のTLR2阻害薬の開発へ向けた取り組みを期待したい。

8. おわりに

以上、本稿では、自然免疫受容体TLR2の発現・機能調節とその炎症応答に関するこれまでの筆者らの研究について概説した。特に、ここで紹介した知見は、中耳炎病態時、COPDの急性増悪時、又はCF病態時に、気道上皮細胞におけるTLR2を介した自然免疫応答が活性化していることを示し、^{14,19)} 特にCF病態時には、IL-17Aがその炎症病態形成に重要な役割を担うことを示唆している。²⁴⁾ 一方、感染の初期応答に強く関与し、炎症病態形成に寄与する好中球が、機能的なTLR2を発現し、そのシグナルを介して炎症応答すること、²⁵⁾ また、curcuminが、CF気道上皮細胞や好中球のTLR2発現・機能を抑制できる成分であることが明らかになった。²⁷⁾ これらの種々の研究により、筆者らは、感染に起因する各種炎症性疾患において、自然免疫受容体であるTLR2が、どのように制御され、どの

ように活性化されるのかについての分子基盤を明らかにした。現在、筆者らは、COPD や CF の気道病態を再現するマウス²⁸⁾を解析し、本マウスにおける TLRs の役割についての機能解析及び TLRs を標的とした治療薬の開発を目指して種々の検討を実施中である。

謝辞 本稿で紹介した一連の研究は、主に熊本大学大学院薬学教育部遺伝子機能応用学分野で行われたものであり、終始ご指導頂いた、本分野教授の甲斐広文先生、ご助力頂いた Mary Ann Suico 先生に厚く御礼申し上げます。また、個々のプロジェクトの成功は、Jian-Dong Li 先生（現在、ジョージア州立大学）、Dieter Gruenert 先生（現在、カリフォルニア州立大学サンフランシスコ校）、佐藤圭創先生（現在、九州保健福祉大学）の熱心なご指導の賜物と、心から感謝致します。さらに、これらの研究が達成できたのは、本分野に所属した多くの大学院生の努力の甲斐あつてのことであり、特に、古田貴志博士、島崎省吾博士、水之江翔太博士、大平裕子修士、小野智美修士に感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Błach-Olszewska Z., *Arch. Immunol. Ther. Exp.* (Warsz), **53**, 245–253 (2005).
- 2) Werling D., Jungi T. W., *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **91**, 1–12 (2003).
- 3) O'Neill L. A., Golenbock D., Bowie A. G., *Nat. Rev. Immunol.*, **13**, 453–460 (2013).
- 4) Akira S., Takeda K., *Nat. Rev. Immunol.*, **4**, 499–511 (2004).
- 5) Anwar M. A., Basith S., Choi S., *Exp. Mol. Med.*, **45**, e11 (2013).
- 6) Borrello S., Nicolo C., Delogu G., Pandolfi F., Ria F., *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, **24**, 549–556 (2011).
- 7) Foxwell A. R., Kyd J. M., Cripps A. W., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 294–308 (1998).
- 8) Thanavala Y., Lugade A. A., *Adv. Otorhinolaryngol.*, **72**, 170–175 (2011).
- 9) Morris S. K., Moss W. J., Halsey N., *Lancet Infect. Dis.*, **8**, 435–443 (2008).
- 10) Blackwell T. S., Christman J. W., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **17**, 3–9 (1997).
- 11) Ninomiya-Tsuji J., Kishimoto K., Hiyama A., Inoue J., Cao Z., Matsumoto K., *Nature*, **398**, 252–256 (1999).
- 12) Nelson M. B., Murphy T. F., van Keulen H., Rekosh D., Apicella M. A., *Rev. Infect. Dis.*, **10**, S331–S336 (1988).
- 13) Shuto T., Xu H., Wang B., Han J., Kai H., Gu X. X., Murphy T. F., Lim D. J., Li J. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 8774–8779 (2001).
- 14) Shuto T., Imasato A., Jono H., Sakai A., Xu H., Watanabe T., Rixter D. D., Kai H., Andalibi A., Linthicum F., Guan Y. L., Han J., Cato A. C., Lim D. J., Akira S., Li J. D., *J. Biol. Chem.*, **277**, 17263–17270 (2002).
- 15) Barnes P. J., *Biochem. Soc. Trans.*, **23**, 940–945 (1995).
- 16) Ratjen F., Doring G., *Lancet*, **361**, 681–689 (2003).
- 17) Muir A., Soong G., Sokol S., Reddy B., Gomez M. I., Van Heeckeren A., Prince A., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **30**, 777–783 (2004).
- 18) Firoved A. M., Ornatowski W., Deretic V., *Infect. Immun.*, **72**, 5012–5018 (2004).
- 19) Shuto T., Furuta T., Oba M., Xu H., Li J. D., Cheung J., Gruenert D. C., Uehara A., Suico M. A., Okiyonedo T., Kai H., *FASEB J.*, **20**, 782–784 (2006).
- 20) Furuta T., Shuto T., Shimasaki S., Ohira Y., Suico M. A., Gruenert D. C., Kai H., *BMC Mol. Biol.*, **9**, 39 (2008).
- 21) Korn T., Bettelli E., Oukka M., Kuchroo V. K., *Annu. Rev. Immunol.*, **27**, 485–517 (2009).
- 22) Miossec P., Kolls J. K., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **11**, 763–776 (2012).
- 23) Tan H. L., Rosenthal M., *Thorax*, **68**, 788–790 (2013).
- 24) Mizunoe S., Shuto T., Suzuki S., Matsumoto C., Watanabe K., Ueno-Shuto K., Suico M. A., Onuki K., Gruenert D. C., Kai H., *J. Pharmacol. Sci.*, **118**, 512–520 (2012).
- 25) Shuto T., Furuta T., Cheung J., Gruenert D. C., Ohira Y., Shimasaki S., Suico M. A., Sato K., Kai H., *Leuk. Res.*, **31**, 1721–1728 (2007).
- 26) Singh S., Aggarwal B. B., *J. Biol. Chem.*, **270**, 24995–25000 (1995).
- 27) Shuto T., Ono T., Ohira Y., Shimasaki S., Mizunoe S., Watanabe K., Suico M. A., Koga

T., Sato T., Morino S., Sato K., Kai H.,
Biochem. Biophys. Res. Commun., **398**, 647–
652 (2010).

28) Mall M., Grubb B. R., Harkema J. R., O’Neal
W. K., Boucher R. C., *Nat. Med.*, **10**, 487–493
(2004).