

エンドトキシン活性の強弱を調節する機構の解明

著者	小倉 紀彦
学位名	博士(薬科学)
学位授与機関	武蔵野大学
学位授与年度	2013年度
学位授与番号	32680甲第18号
URL	http://id.nii.ac.jp/1419/00000221/

博士學位論文

内容の要旨及び論文審査結果の要旨

第 8 号

2013年9月

武蔵野大学大学院

は し が き

本号は、学位規則（昭和 28 年 4 月 1 日 文部省令第 9 号）第 8 条による公表を目的として、
2013 年 9 月 18 日に本学において博士の学位を授与した者の論文内容の要旨及び論文審査の
結果の要旨を収録したものである。

目 次

氏 名	学位記番号	学位の種類	論 文 題 目	(頁)
小倉 紀彦	博士甲第 18 号	博士 (薬科学)	エンドトキシン活性の強弱を 調節する機構の解明	… 1

氏名	小倉紀彦
学位の種類	博士(薬科学)
学位記番号	甲第18号
学位授与の日付	2013年9月18日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	エンドトキシン活性の強弱を調節する機構の解明
論文審査委員	主査 武蔵野大学 教授 山下直美 副査 武蔵野大学 教授 阿部和穂 副査 武蔵野大学 教授 棚元憲一

論文内容の要旨

エンドトキシンはグラム陰性菌の外膜成分であり、その化学的本体は lipopolysaccharide (LPS)である。これに起因する重症敗血症の死亡率は 25-30%、敗血症ショックでは 40-70%に達し、米国内だけでもこれによる死者が年間に数十万人にも達すると推定されている臨床上的重大な問題である。LPS は化合物としては単一の物質ではなく、構造上、実に多様な物質の総称であり、その生物活性強度は極めて多岐にわたるにもかかわらず、エンドトキシンの活性化機構の解析においてエンドトキシンは一様のものとして扱われている。従って LPS 分子の構造の違いによる生物活性の差に分子レベルで迫った研究はほとんど見当たらない。エンドトキシンの活性発現調節はマクロファージによる LPS の分子認識からシグナル伝達開始に至る部分によって支配されていると考えられており、その活性化機構に関連する種々の生体因子は明らかにされつつあるが、多様な構造の LPS に対する生体反応に着目した解析は行われていない。また、LPS の活性中心である lipid A はその化学構造の違いだけでなく、同じ構造でも動物種の違いにより、その活性の強度が異なることが知られているが、この活性の強度を調節する機構に関する研究はない。そこで、本研究では生

体が多様な LPS 分子構造を見極め、その活性発現の強弱を調節する機構、すなわちエンドトキシンの活性の強弱を支配している質的な要因を明らかにすることを目的とした。

1. LBP に対する lipid A 類縁体の結合能

血中に入ったエンドトキシンは LPS-binding protein (LBP) により細胞膜上の CD14 分子に運ばれ、次いで CD14 はエンドトキシンを Toll-like receptor 4 (TLR4) のアダプター分子である MD-2 へと引き渡す。エンドトキシンの結合した TLR4/MD-2 複合体は二量体を形成し、これがトリガーとなり細胞内にシグナルが伝達され、複雑な情報伝達経路を経たのち、炎症性サイトカインの転写因子である NF- κ B の活性化を引き起こし、多彩なエンドトキシン活性を発現することが知られている。そこで、まずエンドトキシンが TLR4 まで運ばれるどの過程で活性の調節が行われているのかを検証するため、LBP と化学合成された 3 つの lipid A 類縁体 (*E. coli*-type Compound 506, *Salmonella*-type Compound 516 および lipid A 前駆体 Compound 406) との結合性を検討した。なお、これらの lipid A 類縁体の生物活性はヒトマクロファージでは 516 は 506 に比べて極めて活性が弱く、406 は全く活性を示さず、マウスマクロファージでは 506 の活性は 516 より EC₅₀ の比較でおおよそ 10 倍強く、406 は 506 とほぼ同等であることを当研究室で報告している。

ヒトおよびマウスの LBP (hLBP, mLBP) を得るため、それぞれのタンパクをコードした遺伝子配列に Histidine (His) タグおよび Glutathion S-transferase (GST) タグの配列を挿入し、プラスミドを製作した。細胞の構成要素としてエンドトキシンを持たない酵母 (*Pichia pastoris*) に、これらのプラスミドをトランスフォームし、安定発現細胞を樹立後、エンドトキシン濃度が管理された培地を用いて、細胞を培養した。目的のタンパクを細胞外に分泌させ、His タグ蛋白は Ni-sepharose を用い、GST タグ蛋白は Glutathion-sepharose を利用し、エンドトキシンフリーの状態で精製を行った。LBP と lipid A との結合は、Ni がコートされたプレートに LBP を固相化し、FITC でラベルされた LPS との競合阻害率で評価した。

hLBP および mLBP とも、406 は 0.1 \cdot g/mL から FITC-LPS の結合を阻害し始め、1 \cdot g/mL でほぼ完全に阻害した。一方、506 は 0.5 \cdot g/mL から阻害が見られ、1 \cdot g/mL でほぼ完全に阻害し、516 では 2 \cdot g/mL から阻害が見られ、50 \cdot g/mL でほぼ完全に阻害した。FITC-LPS の結合が 50% 阻害される lipid A 類縁体の濃度、すなわち IC₅₀ を比較すると、506 は 406 のおおよそ 15 倍となり、516 は 50 倍、すなわち、結合の強さは hLBP, mLBP とも 406 \gg 506 $>$ 516 となった。

2. CD14 に対する lipid A 類縁体の結合能

次に、ヒトおよびマウスの CD14 を精製し、lipid A との結合を biotin でラベルされた LPS との競合阻害率で評価した。

hCD14 において、406 は 5 ng/mL から biotin-LPS の結合を阻害し始め、50 ng/mL でほぼ完全に阻害した。一方、506 は 50 ng/mL から阻害が見られ、2 \cdot g/mL でほぼ完全に阻害し、516 では 50 ng/mL から阻害が見られ、10 \cdot g/mL でほぼ完全に阻害した。IC₅₀ を比較すると、506 は 406 のおよそ 20 倍となり、516 は 50 倍、すなわち、hCD14 との結合の強さは 406 >> 506 > 516 となった。mCD14 では 406 は 1 ng/mL から biotin-LPS の結合を阻害し始め、50 ng/mL でほぼ完全に阻害した。一方、506 は 20 ng/mL から結合を阻害し始め、0.5 \cdot g/mL でおよそ 70% の阻害が見られた。516 では 0.1 \cdot g/mL から阻害が見られ、5 \cdot g/mL でほぼ完全に阻害した。IC₅₀ を比較すると、506 は 406 のおよそ 20 倍となり、516 は 40 倍、すなわち、mCD14 との結合の強さは hCD14 と程度の差はあるものの、hCD14 と同様に 406 >> 506 > 516 となった。

3. Lipid A 類縁体による TLR 4 の MyD88 依存的・非依存的経路の活性化比較

ここまでの結合実験で、ヒトおよびマウスの LBP、CD14 とも 406 が最も親和性が高く、406 の生物活性がこれらに対する結合能だけでは説明できないことが明らかになった。Lipid A の生物活性は LBP、CD14 を介して受け継がれた lipid A が TLR4/MD-2 複合体に結合し、その情報が細胞内に伝達されることによって生じる。TLR4 の細胞内情報伝達機構には TLR4 の細胞内アダプター分子である MyD88 を介する経路と介さない経路の 2 つが存在することが明らかにされてきたが、従来の lipid A の生物活性はこの 2 つの経路を区別することなく、全体の活性として捉えられてきた。本研究では各種 lipid A 類縁体の MyD88 依存性および非依存性のシグナル経路の違いによる活性の差に注目して、先の 3 つの lipid A 類縁体に加えて monophosphoryl lipid A (MPLA) を含めた 4 つの lipid A 類縁体を用いた解析を行った。

マウスマクロファージ様細胞株である J774A.1 および RAW264.7 \cdot NO(-) を lipid A 類縁体で刺激し、(1) IL-1 \cdot および RANTES 産生は ELISA で、(2) 転写因子の活性化は reporter assay で、(3) 転写因子のリン酸化は Western Blotting でそれぞれ検出した。

(1) MyD88 依存性サイトカインである IL-1 \cdot の各 lipid A 類縁体刺激による産生量は EC₅₀ で比較すると、516、MPLA および 406 はそれぞれ 506 の 10、100 および 500 倍であり、それぞれの lipid A 類縁体で大きく異なったが、最大産生量はほぼ同等であった。一方、MyD88 非依存性サイトカイン

ンである RANTES の産生量の EC_{50} を比較すると 516、MPLA および 406 は全て 506 の 5 倍となり、さらに 406 刺激による IL-1 \cdot の最大産生量は他の化合物のおよそ 50% となった。(2) IL-1 \cdot 遺伝子の転写に関与する NF- \cdot B の各 lipid A 類縁体刺激によるレポーター活性は EC_{50} で比較すると、516、MPLA および 406 は全て 506 の 5 倍となり、その最大活性は全ての化合物でほぼ同等であった。一方で RANTES の転写に関与する IRF3 レポーター活性の EC_{50} も、NF- \cdot B の場合と同様、516、MPLA および 406 は全て 506 の 5 倍となったが、406 の刺激による最大レポーター活性は他の化合物のおよそ 50% となり、RANTES 産生の場合と同様な結果となった。(3) NF- \cdot B の活性化に関与する I- \cdot B \cdot のリン酸化は 506 および 406 刺激でほぼ同等に認められたが、IRF3 のリン酸化は 506 刺激で認められたものの、406 刺激ではほとんど検出されなかった。これらの結果から、406 は他の lipid A 類縁体と異なり TLR4 の MyD88 非依存性経路に比較して依存性経路を優位に活性化することが明らかになった。

以上より、ヒトおよびマウスの LBP と CD14 に対する 506 および 516 の結合能は活性とほぼ相関することを見出し、これら lipid A の活性の違いには LBP および CD14 に対する親和性の差が一部関与している可能性が考えられた。一方で 406 はヒト細胞では全く活性を示さないにもかかわらず LBP ならびに CD14 との結合能が最も高かったこと、さらには、406 は MD-2 には結合するがヒト TLR4 の二量体化を引き起こさないと報告されていることから、CD14 に結合した後の段階で活性の強弱が調節されていると考えられる。また、406 はマウスマクロファージ細胞において MyD88 依存性のシグナルを活性化するにもかかわらず、MyD88 非依存性の系ではその活性が弱いことから、マウスの TLR4 では二量体化より後の段階でも活性の調節機構が働いていることが考えられた。

本研究から、エンドキシン活性の強弱の調節は受容体群による細胞膜上で起こるエンドキシンの TLR4/MD-2 への運搬過程だけでなく、細胞内におけるシグナル伝達経路も関与することが明らかとなった。しかし LBP、CD14 を介して受け継がれた lipid A が最終的に TLR4/MD-2 複合体とどのように結合し、それが生物活性発現に向けての情報伝達にどのような影響を与えるかという点については検討できず、今後の大きな課題の一つとして残されている。

論文審査結果の要旨

エンドトキシンは自然免疫を強力に惹起する物質であり、敗血症を惹起する原因物質である。重症例はエンドトキシンショックを引き起こし、その致死率は20%にもおよぶ。その応答性を制御することは、重要な課題である。本研究は、エンドトキシンの基本骨格である lipid A に注目し、化学合成した lipid A をもってその生物活性を調節する機構を明らかにすることを目的として研究が施行された。

まず、化学合成した lipid A (506, 516, 406) が細胞膜上の受容体である TLR4 に達するまでの過程に注目して、調節機構を明らかにすることを試みた。運搬過程に関与する受容体群 LBP および CD14 と lipid A (506, 516) との結合能と生物活性の強弱には相関が認められ、506 と 516 では活性の調節には LBP および CD14 が一部関与していることが明らかになった。一方 406 は LBP および CD14 の結合能と生物活性が相関を認めなかった。406 はマウスでは強力なエンドトキシン活性を示すのみヒューマンでは活性を全く示さないが、LBP および CD14 に対する結合能は、マウスでもヒューマンでも最も強力であることが明らかになった。lipid A の活性が動物種によって異なる現象には、lipid A との結合能は無関係であることを明らかにした。次に、細胞内刺激伝達の差異を明らかにする目的で MyD88 依存性及び非依存性の経路を解析し、非依存性の経路に各種 lipid A で差異があることを明らかにした。

本研究の成果により、新たなエンドトキシン活性の調節機構が明らかになった。特に、lipid A (406) が MyD88 依存性、非依存性経路を区別し、特徴的な活性を示すことを示したことは、非常に新しい知見であり、今後さらなる発展性が期待できる。本研究を発信する意義は大きく、本論文は学位論文(博士、薬科学)に値するものと考えた。さらに、審査にて、申請者は、博士(薬科学)の学位にふさわしい見識を有していると評価した。