

エンドトキシン活性の強弱を 調節する機構の研究

武蔵野大学大学院薬科学研究科

環境衛生学研究室

小倉 紀彦

【目次】

緒言	3
材料および方法	16
結果	
1. 細胞外の情報伝達	
エンドトキシン活性の強弱に及ぼす lipid A 類縁体と受容体群の結合能の影響	23
2. 細胞内の情報伝達	
Lipid A 類縁体による MyD88 依存性および非依存性経路の活性化比較	33
考察	46
総括	55
引用文献	56
謝辞	62

【緒言】

グラム陰性菌の細胞外膜を構成しているエンドトキシンは自然界において類を見ない、非常に強力に自然免疫応答を惹起する物質である。グラム陰性菌の感染による敗血症の例数は米国において年間に 15 万人以上との報告がある (Martin *et. al.*, 2003, Fig. 1)。エンドトキシンは敗血症に伴う播種性血管内凝固症候群である Disseminated Intravascular Coagulation (DIC)、多臓器不全症候群である Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS) およびエンドトキシンショックに至る極めて致死性の高い疾患を引き起こす原因物質であり、その死亡率はおよそ 20%にもなり临床上、非常に大きな問題となることが知られている (Fig. 2)。

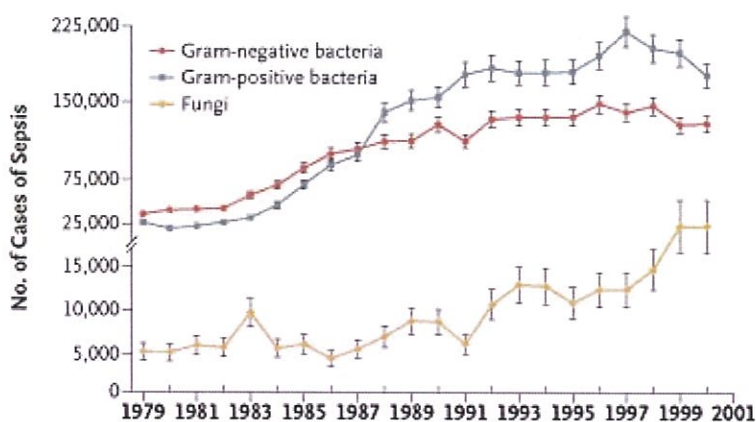


Fig. 1 米国における起因菌毎による敗血症の例数 (1970 - 2000)
Martin *et. al.*, (2003)

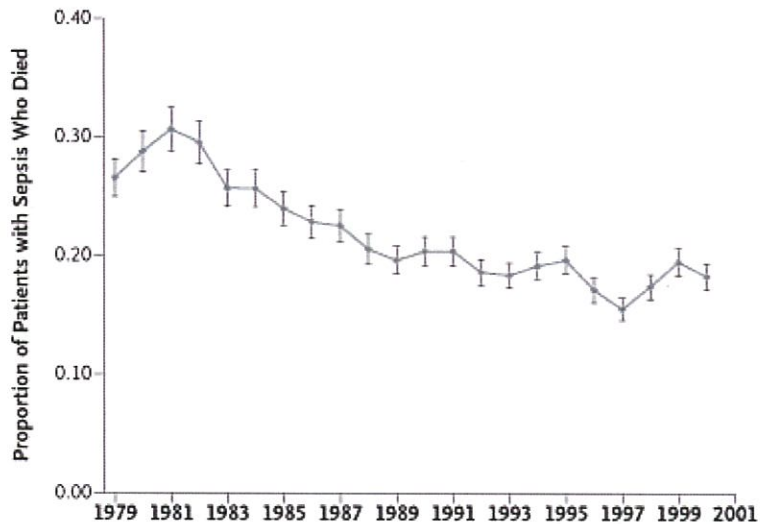


Fig. 2 米国における全起因菌での敗血症入院患者の死亡率 (1970 - 2000)
 Martin *et. al.*, (2003)

体内に入ったエンドトキシンは、Fig. 3, 4 のように、細胞外および細胞内ともに、非常に複雑な情報伝達経路を経て、生物活性を発現する。まず、エンドトキシンは細胞外において血中に存在する LPS-binding protein (LBP) により血中に遊離され、細胞膜上に発現する CD14 に運ばれる。CD14 はエンドトキシンを細胞膜表面で Toll-like receptor 4 (TLR4) に 1:1 で結合している Myeloid differential protein-2 (MD-2) に運搬する。そして、エンドトキシンの結合した TLR4 / MD-2 の複合体がさらに 2 量体を形成することで細胞膜内にシグナルが伝達され、自然

免疫応答が起こることが知られている(Schletter *et. al.*, 1995; Ulevitch & Tobias, 1995; Fujihara *et. al.*, 2003; Miyake, 2004) 。

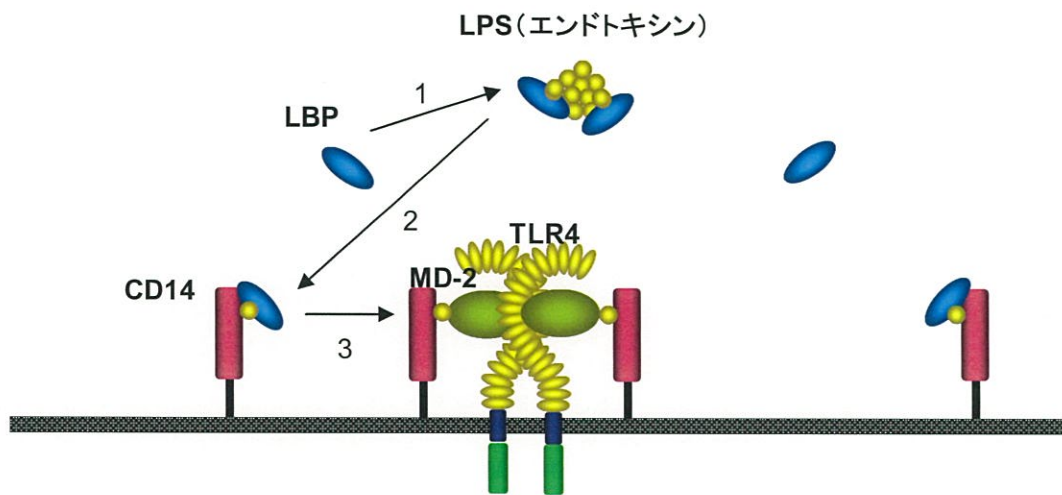


Fig. 3 細胞外におけるエンドトキシンの運搬経路

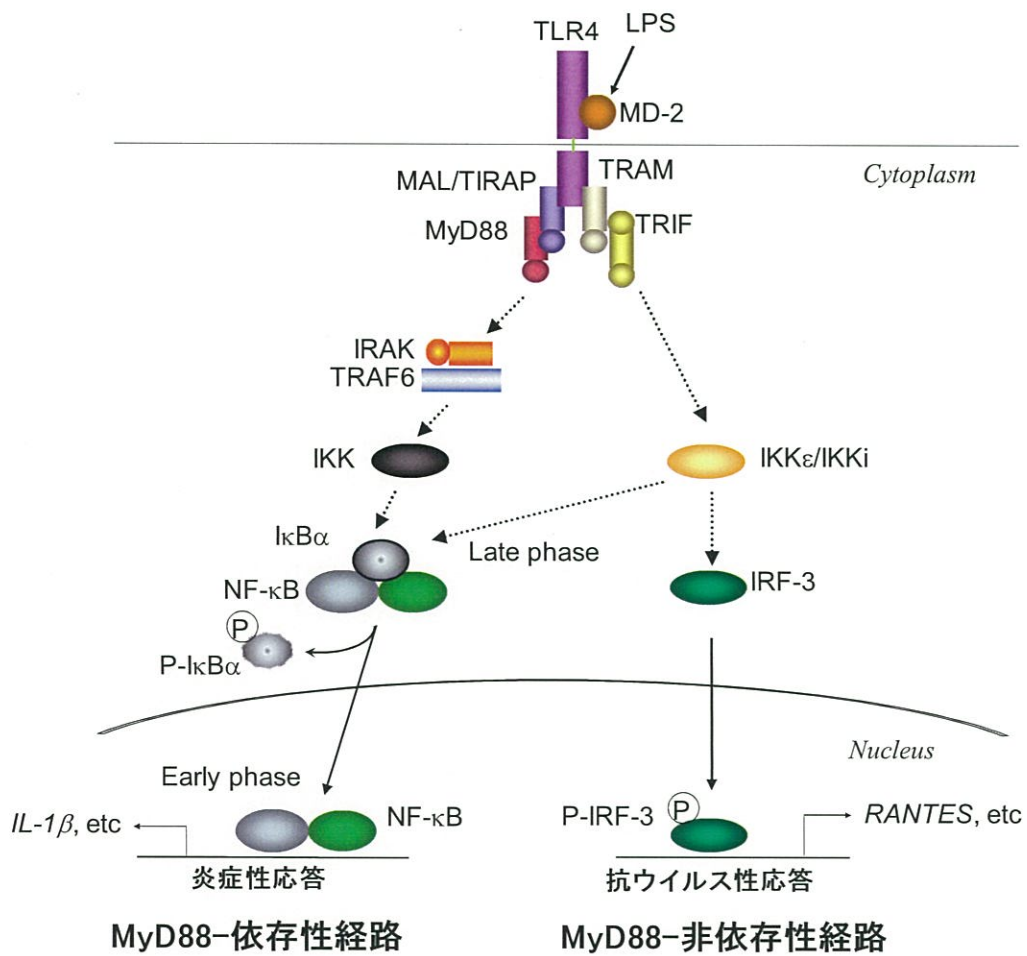


Fig. 4 TLR4 のシグナリング (細胞内での情報伝達経路)

次に細胞内においては、TLR-4/MD-2 の 2 量体化以降、Myeloid differentiation primary response gene (88) (MyD88) 依存性の経路によりシグナルの伝達が行われ、活性を発現することが知られている。細胞内に伝達されたシグナルはアダプタータンパクである MyD88 / Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein (TIRAP) に伝えられ、 Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1), TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) を経て、I κ B kinase (IKK) を活性化する。その後、 Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) の働きを阻害する Inhibitor of kappa B (I κ B α) のリン酸化が誘導され、これによりプロテアソーム依存的な I κ B α の分解が起こる (Hyden & Ghosh, 2012)。次いで pro inflammatory cytokine の遺伝子などの転写因子である NF- κ B が活性化され、early phase とよばれる炎症性応答で見られる IL-1 β , IL-6, IL-8 および TNF- α などが産生される (Kawai *et. al.*, 1999)。一方、細胞膜上でエンドトキシンの結合した CD14 は TLR4 / MD-2 と協調し、 Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) を活性化し、 syk / PLC γ 2 依存性のエンドソームに CD14 / TLR4 / MD-2 の複合体を取り込むことが知られている (Zanoni *et. al.*, 2011)。その後、シグナルは MyD88 非依存性のアダプタータンパクである細胞質に存在する Toll / IL-1R domain-containing

adaptor inducing IFN- β (TRIF) / TRIF-related adaptor molecule (TRAM) に伝えられ、IFN-inducible cytokine など、抗ウイルス応答で見られるタンパクの転写に関わる転写因子である IFN regulatory factor 3 (IRF3) がリン酸化され (Kawai & Akira, 2010)、RANTES、IFN- β 、G-CSF および MCP-1 などが産生される (Hoebe *et. al.*, 2003; Yamamoto *et. al.*, 2003)。また、一方でシグナルは IKK ϵ /IKK ι を介し MyD88 依存性経路に遅れて I κ B α の分解が起こり NF- κ B を活性化し、late phase とよばれる炎症性応答が惹起される (Kawai *et. al.*, 1999; Hoebe *et. al.*, 2003)。

エンドトキシンはグラム陰性菌の細胞外膜を構成している主要な物質である。一般にグラム陰性菌の表層は Fig.5 に示すように 3 層構造をなしており、菌の内側から順に細胞質膜、ペプチドグリカン層および外膜とからなる。エンドトキシンは単に菌の構成成分として形状保持に寄与するのみならず、外部からの種々の攻撃に対して細胞内部を保護している役割を果たしている。

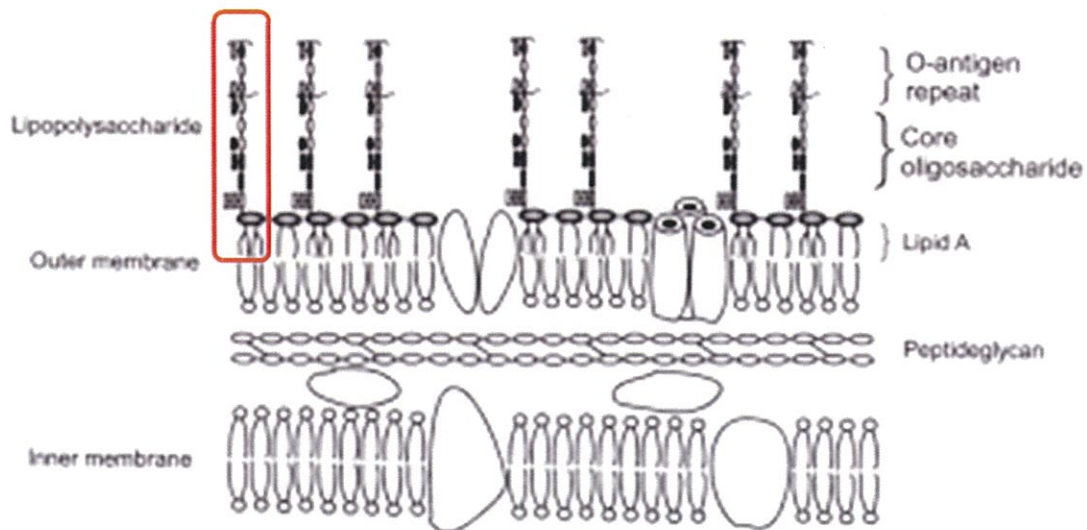


Fig. 5 グラム陰性菌の膜構造と LPS

エンドトキシンの化学構造は 2 糖であるジグルコサミンの 1 および 4' 位にリン酸基を持ち、2,3 および 2',3' 位に脂肪酸を結合した lipid A と呼ばれる脂質を基本骨格とし、そのジグルコサミンの 6' 位に inner core と呼ばれる糖鎖、その次に outer core と呼ばれる糖鎖を結合し、さらにグラム陰性菌の血清型を決定する糖鎖の繰り返し配列を持つ (Fig. 6) ことから、化学的には Lipopolysaccharide (LPS) と呼ばれる (Rietschel *et. al.*, 1982)。

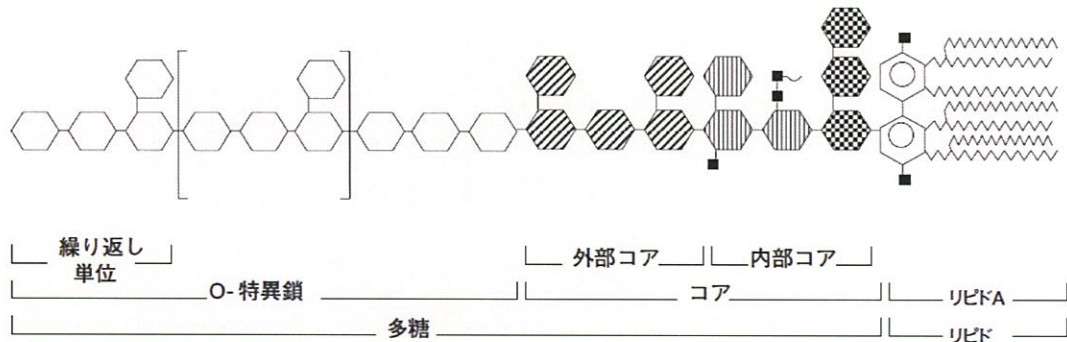


Fig. 6 LPS の構造
 棚元ら 臨床と微生物 (1989)

グラム陰性菌の菌種により O 抗原多糖およびコア多糖を構成する糖の数またはそれ自体の構造が異なることが知られている (Ames *et. al.*, 1974; Leive, 1974)。

代表的なグラム陰性菌の一つとして、夏場の食中毒の原因菌として知られる腸管出血性大腸菌があるが、O 抗原の構造 (O157) と鞭毛抗原 (H7) で分類されおり、*Escherichia coli* O157:H7 と表記される。また、O 抗原を持たないグラム陰性菌もあり、代表的なものとして、*Salmonella minnesota* R595 (Re) がある。これは Rough (R) 型のエンドトキシンとよばれ、野生株の Smooth (S) 型菌から O 抗原が欠損した変異体のエンドトキシンで、糖鎖の長い順から Ra から Re

まで分類されている。Re LPS は最も分子量の小さな R 型のエンドトキシンで、コア多糖からさらに outer core である 4 単位の糖鎖が欠損し、inner core である 2-Keto-3-deoxy-D-mannoctanoic acid (KDO) のみが lipid A と結合したものである。エンドトキシンの基本骨格である lipid A は O 抗原部位に比べると菌種間における共通性が比較的高いと考えられてきたが、脂肪酸の数、種類、結合位置、リン基の有無など様々な構造上の差異が菌種間で知られている。この lipid A が多彩なエンドトキシン活性 (Table 1) のほとんどを担っていること、すなわちエンドトキシンの活性中心であることは最終的には大腸菌型 lipid A の化学合成の成功とその活性研究の成果として証明された (Homma *et. al.*, 1985) 。

A. 生体レベルの作用	B. 細胞レベルの作用	C. 分子レベルの反応
自然免疫系の活性化 発熱性 致死毒性 局所シュワルツマン反応 全身シュワルツマン反応 ショック 血管縮小または拡張 血圧低下 血糖低下 白血球減少 血小板減少 血小板凝集促進 抗腫瘍作用 非特異的感染防御 アジュバント活性 流産 体重減少 骨髄出血壊死 トレランス 放射能障害防御能 網内系殺菌力の亢進	マクロファージ活性化 ・食作用亢進 ・遊走阻止 ・メディエーター産生 インターフェロン インターロイキン1 プロスタグランジン/ロイコトリエン 腫瘍壊死因子 (TNF- α) コロニー刺激因子 T, B 前駆細胞の成熟化 Bリンパ球 ・マイトジェン活性 ・ポリクローナル活性 ・リンフォカイン産生 ・インターフェロン産生 白血球の減少、増多 顆粒球機能亢進	TLR4の活性化 NF- κ Bの活性化 カプトガニ血球成分凝固活性(リムルス活性) 凝固線溶系への作用 ・凝固因子(XII, Hagemann因子)の活性化 ・単球組織因子(III因子)の合成促進 プラスミノーゲン活性化 補体活性化 ・古典経路 ・第2経路

Table 1 エンドトキシンの生物活性
 棚元ら 臨床と微生物 (1989)をもとに改変

活性中心 lipid A の構造活性相関に関する研究はこれまで数多く行われてきた。天然の lipid A を用いた研究として、棚元らは緑膿菌由来の LPS を用いて化学構造と生物活性の相関を調べており lipid A を化学的に分解もしくは修飾することにより発熱活性、アジュバント活性、抗腫瘍活性およびインターフェロン誘発活性が大きく変化することを報告している (Tanamoto *et. al.*, 1978, Tanamoto *et. al.*, 1979)。しかしながら、天然物由来のエンドトキシンは混合物、すなわち単一組成ではなく、同一の菌から抽出されたエンドトキシンでも lipid A がヘテロな構造体であるために信頼のおける構造活性相関が得られず、また厳密かつ系統的な構造活性相関研究は困難であった。その後、先に述べたように lipid A の化学合成の成功により大腸菌型化学合成 lipid A を中心とした多数の類縁体が合成された。これらの合成化合物を用いて、マウスの致死毒性、発熱性、マイトジェン活性、シュワルツマン反応およびインターフェロンの産生量などを指標に、さらに詳細な構造活性相関研究が世界的に活発に行われた (Tanamoto *et. al.*, 1984; Kanegasaki *et. al.* 1986; Kotani *et. al.*, 1986; Galanos *et. al.*, 1986)。これらの結果からジグルコサミン骨格、それに結合する脂肪酸の数、種類、結合位置、リン基の有無などが生物活性の強弱を調節する構造上の要因であることがわかってきた。また、最近では Gaekwad らも lipid A 生合成経路におけるいくつかの合成 lipid

A 類縁体を用いてその構造活性相関を種々のサイトカイン産生量およびそれらの mRNA の発現量を指標に検討したところ、ジグルコサミンの 1 位に結合したリン酸基、脂肪酸の長さおよびアシル化のパターンが活性の調節に重要であることを報告している (Gaekwad *et. al.*, 2010) 。

以上の構造活性相関の総合的な結果として、本研究で用いる 3 つの構造体 (Fig. 7) である 6 本の脂肪酸鎖を持つ大腸菌型の lipid A (compound 506; 以下、506)、506 の 2 位の脂肪酸がダブルアシル化された 7 本の脂肪酸鎖を持つサルモネラ型の lipid A (compound 516; 以下、516) および lipid A の前駆体である、506 の 2' および 3' のダブルアシルがそれぞれ 1 本となった 4 本の脂肪酸鎖を持つ lipid IVa の生物活性が明らかにされた。すなわちヒトの系においては 506 が非常に強い活性を示すが 516 はほとんど活性を示さず、lipid IVa は活性を示さないだけでなく、むしろ他の lipid A のアンタゴニストとしての活性を示す。一方でマウスの系においてはヒトの系と同様、506 が最も強い活性を示したが、lipid IVa も同程度の活性を示し、516 はその 1/10 程度の活性を示す (Tanamoto & Azumi, 2000; Muroi & Tanamoto, 2006) 。

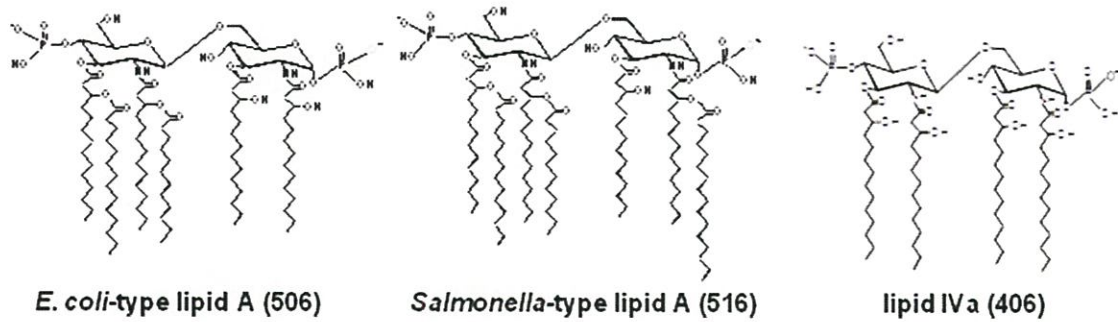


Fig. 7 本検討に用いた lipid A 類縁体の化学構造

以上のように、構造活性相関についての知見は蓄積されてきたが、生体によるこれらの構造体の認識がどのように行われ、どのようにして活性の強弱が調節されているかは全く明らかにされていない。本研究では同じ TLR4 で認識される異なる構造体のエンドトキシンの活性が、どのような機構によって調節されているのかを明らかにすることを目的とした。そのアプローチとして、第一に細胞外において菌体から出たエンドトキシンが細胞膜上の TLR4 に達するまでの過程に着目した。すなわち運搬過程に関与する受容体群である LBP および CD14 のエンドトキシンとの結合能が活性発現に与える影響について、動物種の違いを含めて検討した。一方、エンドトキシンの細胞内におけるシグナル伝達は、非常に複雑な

経路を介するにもかかわらず従来の研究ではそれぞれの段階で起こる現象を個別に評価せず、全体の活性として捉えられていることから、第二のアプローチとして細胞内におけるシグナル伝達のどの過程で活性の調節が行われているかを厳密に調べた。すなわち MyD88 依存性および非依存性の経路の分岐に焦点をあて、それぞれの活性化によって引き起こされるサイトカインの産生量、転写因子の活性化および転写活性に関与するタンパクのリン酸化を個別に評価し、エンドトキシン活性発現への関与を検討した。

なお、用いたエンドトキシンは、先に述べたように純品で、活性評価が確立されている化学合成品である 506、516 およびこれらの前駆体である lipid IVa を用いた。

【材料および方法】

<タンパクの精製>

マウス (m) およびヒューマン (h) 由来の LBP、CD14 および MD-2 の組換えタンパクを産生する安定発現細胞は *Phichia* Expression System (Life Technologies) を用いて、室井ら (2003) の方法で調製した。これらの安定発現細胞は、エンドトキシン含量が極めて低い昆虫細胞用の培地である SF900 III (Life Technologies) を用い、28°C で 48-96 時間、振とう培養を行った。その後、0.45 μ m のポアサイズのポリエーテルスルホン製メンブレン (Nargen) で濾過を行った後、分画分子量が 10,000 (MD-2) および 30,000 (LBP, CD14) の限外濾過膜 (Millipore) で濃縮を行った後、Glutathione 担体 (GE) で hLBP-GST タグタンパクを、または Ni-NTA (Nitrilotriacetic acid) 担体 (QIAGEN) で mLBP-His、mCD14-His、hCD14-His、mMD-2-His、hMD-2-His タグタンパクをアフィニティークロマトグラフィーにより精製した (Muroi *et. al*, 2003)。それぞれの分子量に適した分画分子量の限外濾過膜 (Millipore) を用い、溶媒を PBS に置換した。タンパク量は Bradford (Bio-Rad) 法で定量し、純度は電気泳動後、クマシー染色 (Thermo scientific) で確認したのち、100 μ g/mL となるように 30% グルセロール中で -20°C で使用するまで保存した。

<阻害法による LBP、CD14 と各種 lipid A 類縁体との結合能>

100 µg/mL に調製した mLBP および hLBP のグリセロールストックを 0.1% BSA (Bovine serum albumin, Sigma) in PBS (Phosphate buffered saline, Sigma) で 1 µg/mL に希釈し、Ni-NTA HisSorb Plate (Qiagen) に 200 µL ずつ分注後、室温で 1 時間放置することでそれぞれのタンパクを固相化した。次に 200 µL の 0.1% BSA in PBS で 4 回洗浄し、200 µL の 0.01%ゼラチンをプレートに加えブロッキングを行った。その後、200 µL の 0.1% BSA in PBS で 4 回洗浄し、0.1% BSA in PBS で希釈した各濃度の 506、516 および lipid IVa を 100 µL ずつ加え、続けて 0.1% BSA in PBS で希釈した 1 µg/mL FITC (fluorescein isothiocyanate) -LPS (Molecular Probe) を 10 µL (終濃度 100ng/mL) 加えたのち、室温で 1 時間放置した。その後、0.1% BSA in PBS で 4 回洗浄し、0.1% BSA in PBS で 1/100,000 に希釈した抗 FITC 抗体 -Peroxidase-conjugate (Roche) を 200 µL 加え、室温で 1 時間放置した。その後、0.1% BSA in PBS で 4 回洗浄し、100 µL の TMB (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine) 溶液 (RD system) を加え、室温で 20 分間放置後、100 µL の停止液 (RD system) または 2 mol/L の塩酸を加えたのち、マイクロプレートリーダーで波長 450 nm (参照波長 540 nm) で吸光度を求めた。lipid A 無添加の吸光度を LBP と FITC-LPS の結合の割合が 100% であるとし、各種 lipid A 類縁体の添加により、FITC-LPS と競

合することで低下した吸光度から、LBP と FITC-LPS の結合の割合を求め、結合能の指標とした。

CD14 と lipid A 類縁体との結合能は Biotin-LPS (Invivo Gen) との競合により比較を行ったが、基本的な操作は LBP と lipid A 類縁体との結合能の評価法と同じである。mCD14 の結合能の評価は 200 ng/well の mCD14 を固相化した ELISA binding plate を 3%の BSA でブロッキングし、一昼夜放置したものをを用いた。100 ng/mL の mLBP-His、 100 ng/mL の Biotin-LPS および 0.001 - 10 μ g/mL の各種 lipid A 類縁体をあらかじめ 37°Cにおいて、1 時間静置した後、mCD14 の固相化された ELISA binding plate に加え、さらに 1 時間静置した。Biotin-LPS の検出は 1/20,000 に希釈した streptavidin-POD (Jackson ImmunoResearch) を用い、TMB で発色させた。

hCD14 の結合能の評価は 200 ng/well の hCD14 を固相化した ELISA binding plate を 0.1%のゼラチンでブロッキングし、一昼夜放置したものをを用いた。500 ng/mL の hLBP-GST、 100 ng/mL の Biotin-LPS および 0.005 - 10 μ g/mL の各種 lipid A 類縁体をあらかじめ 37°Cにおいて、1 時間静置した後、hCD14 を固相化した ELISA binding plate に加え、さらに 1 時間静置した。Biotin-LPS の検出は 1/250,000 に希釈した streptavidin-POD を用い、TMB で発色させた。

<Reporter assay>

NF- κ B 依存性のルシフェラーゼレポータープラスミドである pc4-ELAM-L は Bgl II -Apa I フラグメントの pc-ELAM-L (Igarashi *et al.*, 2006) を pcDNA4/TO ベクター (Life Technologies) の Bgl II -Apa I 部位に挿入して作製した。ヒト IFN β プロモーターを含む IRF-3 ルシフェラーゼレポータープラスミドである pc4-hIFN β -luc はヒューマン IFN β プロモーター領域 (-282 to +24) を pc-ELAM-L の Kpn I -Hind III サイトに挿入して作製した pc-hIFN β -luc の Kpn I -Apa I フラグメントを pc4-ELAM-L の Kpn I -Apa I サイトに挿入して作製した。

ルシフェラーゼレポーター活性の測定は五十嵐、大西らの方法に従い、以下のとおり行った (Igarashi *et al.* 2006, Ohnishi *et al.* 2008) 。 J774-ELAM または J774-IFN 細胞 (後述) を $1-3 \times 10^5$ / well となるよう、12 ウェルのプレートに播種し、その 6 時間後に PBS で 2 回洗浄した。細胞は 100 ng/mL となるように LBP を添加した無血清培地である FreeStyle 293 (Life Technologies) に各種 lipid A 類縁体を 0.1-1000 nM となるように加えた培地で、6 時間刺激した。その後、細胞にプロテアーゼ阻害剤カクテル (Nakalai) を添加した lysis buffer (10 mM HEPES-KOH, pH=7.9, 10 mM KCl, 5 mM EDTA, 40 mM β -glycerophosphatase, 0.5% NP-40, 30 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM dithiothreitol) を加え、細胞抽出液を調製した。細胞抽出液のレポーター遺伝子活性は Promega 社のプロトコール

に従い測定を行った。細胞の生存率は細胞の抽出液を Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay kit (Promega) で測定し、ウェル間の細胞数およびトランスフェクション効率の差に基づくレポーター活性の誤差を補正した。

<細胞培養>

マウスマクロファージ様細胞株である J774A.1 細胞および RAW264.7- γ NO(-) (ATCC 供与) は Dulbecco' s modified Eagle' s medium (Life Technologies) に Fetal bovine serum (Life Technologies) 、 Penicillin (Life Technologies) および Streptomycin (Life Technologies) を順に 10%、100 U/mL および 100 μ g/mL となるよう加えた培地 (以下 DMEM) で培養した。pc4-ELAM-L 遺伝子を安定して発現する NF- κ B 依存性のルシフェラーゼレポーター細胞株である J774-ELAM および pc4-hIFN β -luc を安定して発現する IRF3 のレポーター細胞株である J774-IFN- β は Bgl II と Ssp I でそれぞれ直鎖状とした pc4-ELAM-L および pc4-hIFN β -luc プラスミドを X-treamGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche) を用いて、J774A.1 細胞にトランスフェクションした。目的の遺伝子が挿入されたこと確認するため、1 mg/mL の Zeocin で耐性を持つ細胞株を選択した。得られた細胞は 1 mg/mL の Zeocin を含む DMEM で使用するまで継代を行った。

<サイトカイン測定>

IL-1 β および RANTES の産生量は以下のとおり測定を行った。J774A.1 細胞を $6-8 \times 10^5$ / well となるよう、12 ウェルのプレートに播種し、その 6 時間後に PBS で 2 回洗浄した。細胞は 100 ng/mL となるように LBP を添加した無血清培地である FreeStyle 293 (Life Technologies) に各種 lipid A 類縁体を 0.1-1000 nM となるように加えた培地で、16 時間刺激した。培養上清はサイトカインの測定に用い、IL-1 β および RANTES の濃度は ELISA のキット (RD system) を用いて測定した。細胞はプロテアーゼ阻害剤を添加した Lysis buffer (Reporter assay で使用した buffer) で抽出物を調製し、タンパク濃度を Pierce 660nm Protein Assay Reagent (Thermo Scientific) で測定し、サイトカインレベルはタンパク量で補正して求めた。

<Immunoblotting>

J774A.1 または RAW264.7- γ NO(-) 細胞は $1-3 \times 10^6$ / well となるよう、6 ウェルのプレートに播種し、その 16 時間後に PBS で 2 回洗浄を繰り返した。細胞は 100 ng/mL となるように LBP を添加した無血清培地である FreeStyle 293 に各種 lipid A 類縁体を 0.1-1000 nM となるように加えた培地で、16 時間刺激した。細胞に 0.4 M となるよう NaCl を添加し、プロテアーゼ阻害剤を添加した Lysis buffer

を加え、細胞抽出液を調製し、核内に存在するタンパクを含めて抽出を行った。

イムノブロッティングはこれまでに報告されてきた方法 (Muroi & Tanamoto,

2011) を用いて、以下の抗体、I κ B α (C-21; Santa Cruz)、リン酸化 (Ser^{32/36})

I κ B α (5A5; Cell signaling Technology)、IRF3 (4962; Cell signaling Technology)、

リン酸化 (Ser³⁹⁶) IRF3 (4D4G; Cell signaling Technology)、 β -actin (AC-15;

Sigma-aldrich) を用いて行った。

【結果】

1. 細胞外の情報伝達

エンドトキシン活性の強弱に及ぼす lipid A 類縁体と受容体群の結合能の影響

<LBP に対する lipid A 類縁体の結合能>

LBP に対する各種 lipid A 類縁体の結合能を FITC で標識した LPS との競合阻害で確認した。なお、動物種の特異性を検討するためマウスおよびヒューマン由来の LBP を用い、これらをプレートに固相化した。一定濃度の FITC-LPS に対し、各種 lipid A の濃度を増加させていくと両者が競合することにより FITC-LPS の LBP への結合量が低下していくため、より低濃度で FITC-LPS と LBP との結合を阻害する lipid A が LBP と高い結合能を持つ。すなわち、グラフ中の阻害曲線が、より左に位置するものほど LBP との結合能が高いことを意味する。mLBP において、FITC-LPS の結合が 50% 阻害される lipid A 類縁体の濃度、すなわち IC_{50} を比較すると 506 は lipid IVa のおよそ 15 倍となり、516 は 50 倍、すなわち、結合の強さは lipid IVa が最も強く、次に 506 そして 516 の順となった。エンドトキシン活性はマウスの系において 506 と lipid IVa でほぼ同等であり、次いで 516 の順となるため、活性と結合能の関係を比較すると、mLBP との結合能も 506 は 516 より強いことから活性と結合能の強弱に相関を認めた。一方で lipid IVa の活性は

506 と同等であるにもかかわらず、mLBP との結合能は lipid IVa が最も強かった

ことから、活性と結合能の強弱に相関を認めなかった (Fig. 8) 。

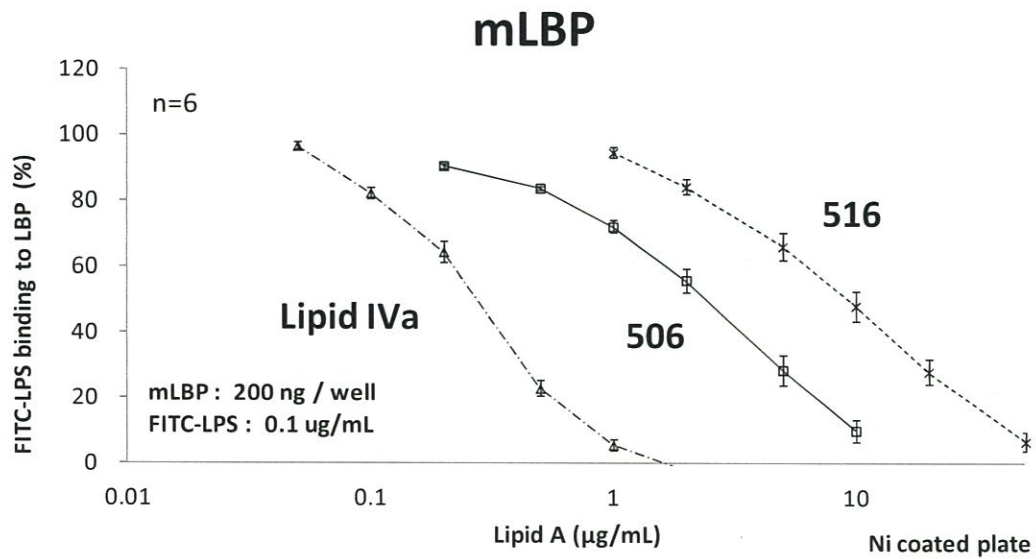


Fig. 8 mLBP に対する lipid A 類縁体の結合能 (FITC-LPS との競合阻害)

100 ng/mL の FITC-LPS に対し、各種 lipid A である 506 (□)、516 (×)、lipid IVa (△) の濃度を増加し、FITC-LPS と mLBP との結合量 (阻害率) を指標に各種 lipid A と mLBP の結合能を評価した。なお、グラフ上のプロットは平均値 ± S.E.M. (n=6) で表記。

ヒューマン由来の LBP でも IC_{50} を比較すると、マウス由来の LBP と同様、506 は lipid IVa のおよそ 15 倍となり、516 は 50 倍、すなわち、結合の強さは lipid IVa が最も強く、506 そして 516 の順となった。エンドトキシン活性はヒューマンの系において 506 が最も高く 516 はほとんど活性を示さず、lipid IVa はまったく活性を示さないことがわかっている。活性と結合能の関係を比較すると hLBP との結合能も 506 は 516 より強いことから、活性と結合能の強弱に相関を認めた。一方で lipid IVa の活性はほとんど活性を示さないにもかかわらず、hLBP との結合能は lipid IVa が最も強かったことから、活性と結合能の強弱に相関を認めなかった。以上の結果、結合能の強弱はマウスおよびヒト由来の LBP とともに lipid IVa が最も強く、次に 506、そして 516 の順となり、両者に違いがないことから、同じ構造を持つ lipid A でも動物種により活性が異なる現象は、LBP と lipid A との結合能とは無関係であることが明らかとなった (Fig. 9) 。

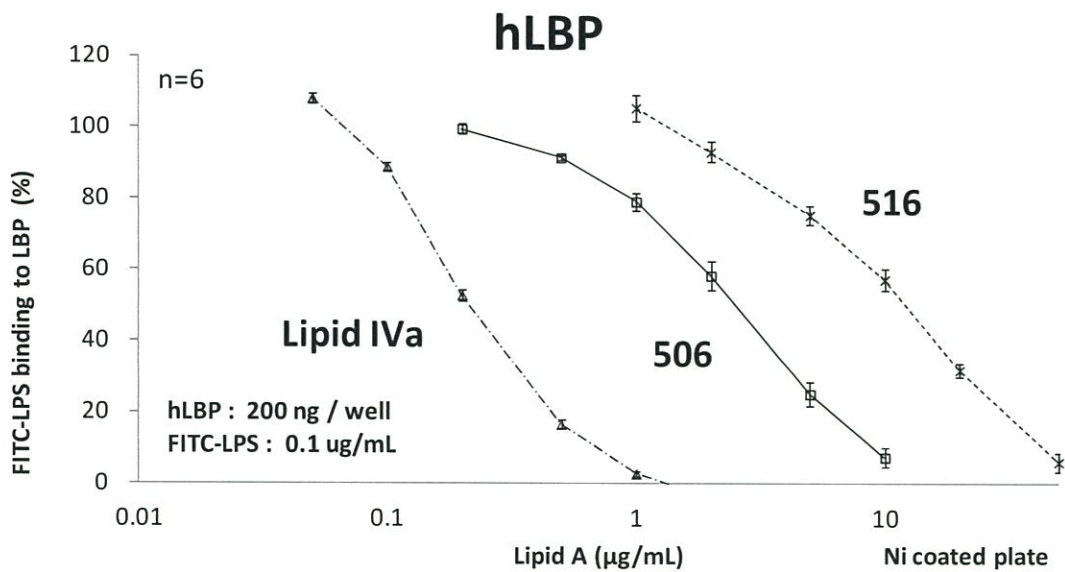


Fig. 9 hLBP に対する lipid A 類縁体の結合能 (FITC-LPS との競合阻害)

100 ng/mL の FITC-LPS に対し、各種 lipid A である 506 (□)、516 (×)、lipid IVa (△) の濃度を増加し、FITC-LPS と hLBP との結合量 (阻害率) を指標に各種 lipid A と hLBP の結合能を評価した。なお、グラフ上のプロットは平均値 ± S.E.M. (n=6) で表記。

<CD14 に対する lipid A 類縁体の結合能>

CD14 に対する各種 lipid A 類縁体の結合能を Biotin で標識した LPS との競合阻害で確認した。LBP と同様、動物種の特異性を検討するため、マウスおよびヒューマン由来の CD14 を用い、これらをプレートに固相化した。mCD14 において、Biotin-LPS の結合が 50% 阻害される lipid A 類縁体の濃度、すなわち IC_{50} を比較すると、506 は lipid IVa のおよそ 20 倍となり、516 は 40 倍、すなわち、結合の強さは lipid IVa が最も強く、次に 506 そして 516 の順となった。エンドトキシン活性はマウスの系において 506 と lipid IVa でほぼ同等であり、次いで 516 の順であることから活性と結合能の関係を比較すると、mCD14 との結合能も 506 と 516 では活性と結合能の強弱に相関を認められた。一方で lipid IVa の活性は 506 と同等であるにもかかわらず、mCD14 との結合能は lipid IVa が最も強かったことから、活性と結合能の強弱に相関を認めなかった (Fig. 10) 。

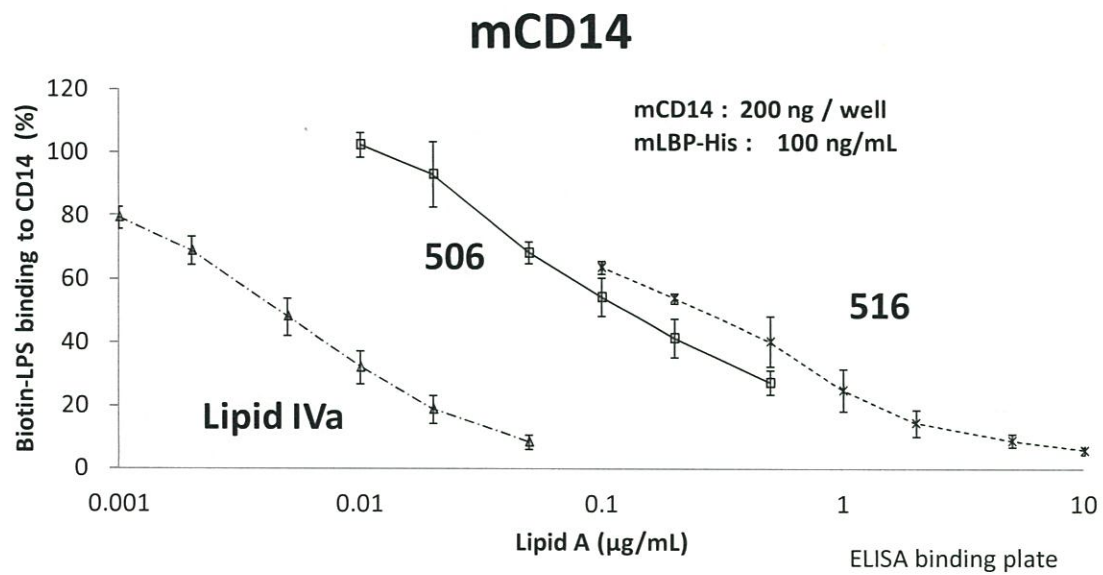


Fig. 10 mCD14 に対する lipid A 類縁体の結合能 (Biotin-LPS との競合阻害)

100 ng/mL の Biotin-LPS に対し、各種 lipid A である 506 (□), 516 (×)、lipid IVa (△) の濃度を増加し、Biotin-LPS と mCD14 との結合量 (阻害率) を指標に各種 lipid A と mCD14 の結合能を評価した。なお、グラフ上のプロットは平均値 ± S.E.M. (n=3) で表記。

ヒューマン由来の CD14 で IC_{50} を比較すると、マウス由来の CD14 と同様、506 は lipid IVa のおよそ 20 倍となり 516 は 50 倍、すなわち結合の強さは lipid IVa が最も強く、506 そして 516 の順となった。エンドトキシン活性はヒューマンの系において 506 が最も高く、次いで 516 となり、lipid IVa はほとんど活性を示さないため、活性と結合能の関係を比較すると、hCD14 との結合能も 506 は 516 より強いことから、この 2 者においては活性と結合能の強弱に相関を認めた。一方で lipid IVa の活性はほとんど活性を示さないにもかかわらず、hLBP との結合能は lipid IVa が最も強かったことから、活性と結合能の強弱に相関を認めなかった。以上の結果、結合能の強弱はマウスおよびヒト由来の CD14 とともに lipid IVa が最も強く、次に 506、そして 516 の順となり両者に違いがないことから、LBP と同様、同構造の lipid A でも動物種により活性が異なる現象は CD14 と無関係であることが明らかとなった (Fig. 11) 。

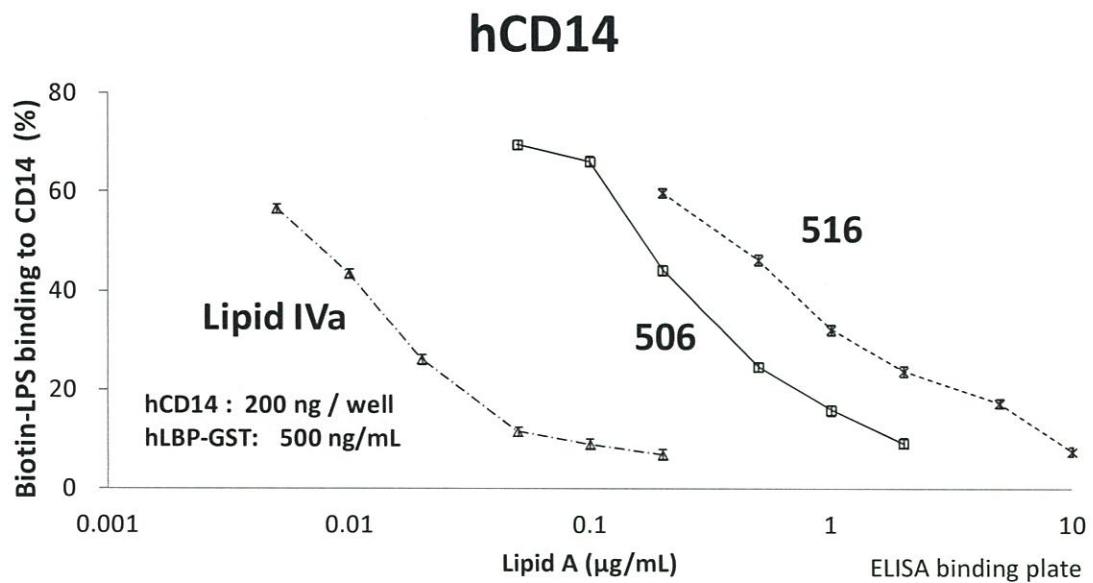


Fig. 11 hCD14 に対する lipid A 類縁体の結合能 (Biotin-LPS との競合阻害)

100 ng/mL の Biotin-LPS に対し、各種 lipid A である 506 (□)、516 (×)、lipid IVa (△) の濃度を増加し、Biotin-LPS と hCD14 との結合量 (阻害率) を指標に各種 lipid A と hCD14 の結合能を評価した。なお、グラフ上のプロットは平均値 ± S.E.M. (n=3) で表記。

これらの結果より、マウスおよびヒューマンとも LBP および CD14 への結合能は lipid IVa が最も高く、次いで 506 そして 516 の順となった。506 と 516 では LBP および CD14 との結合能とエンドトキシン活性の強弱に相関が認められたことから、506 と 516 の活性の調節を LBP および CD14 が一部関与している可能性が考えられた。一方、lipid IVa では LBP および CD14 への結合能とエンドトキシン活性に相関が認められなかったことから、これより後のイベント、すなわち細胞内でのシグナル伝達過程により、活性の強弱が調節されている可能性が考えられた。

2. 細胞内の情報伝達

Lipid A 類縁体による MyD88 依存性および非依存性経路の活性化比較

<サイトカイン産生>

MyD88 依存性経路の活性化により産生されるサイトカインである IL-1 β および MyD88 非依存性経路の活性化により産生されるサイトカインである RANTES (Bjorkbacka *et. al.*, 2004; Hirotsu *et. al.*, 2005) の産生量を指標とし、506, 516 および lipid IVa の刺激によるそれぞれの経路の活性化を検討した。マウスマクロファージ様細胞株である J774A.1 を、506, 516 および lipid IVa で刺激し、それぞれのサイトカイン量を ELISA で測定し、最大産生量の 50%を得る各種 lipid A 類縁体の濃度すなわち、EC₅₀ と最大産生量で比較を行った。

IL-1 β の産生量は 506 で刺激を行うと、1 nM から高い産生量を示し、それより高い濃度ではわずかに増加、またはほぼプラトーとなった。516 の刺激では、10 nM で高い産生量を示し、それ以上の濃度では、プラトーとなった。Lipid IVa の刺激では 10 nM から産生量が増加し始め、1000 nM まで、用量依存的に増加した。EC₅₀ で比較すると、IL-1 β の産生量は 506 が最も高く、次に 516、lipid IVa の順となり、それぞれ 506 のおよそ 1/10 および 1/100 であった。一方、IL-1 β の産生量は最大活性で比較すると、全ての lipid A 類縁体で 1000 nM においてほぼ同等であ

った (Fig. 12) 。

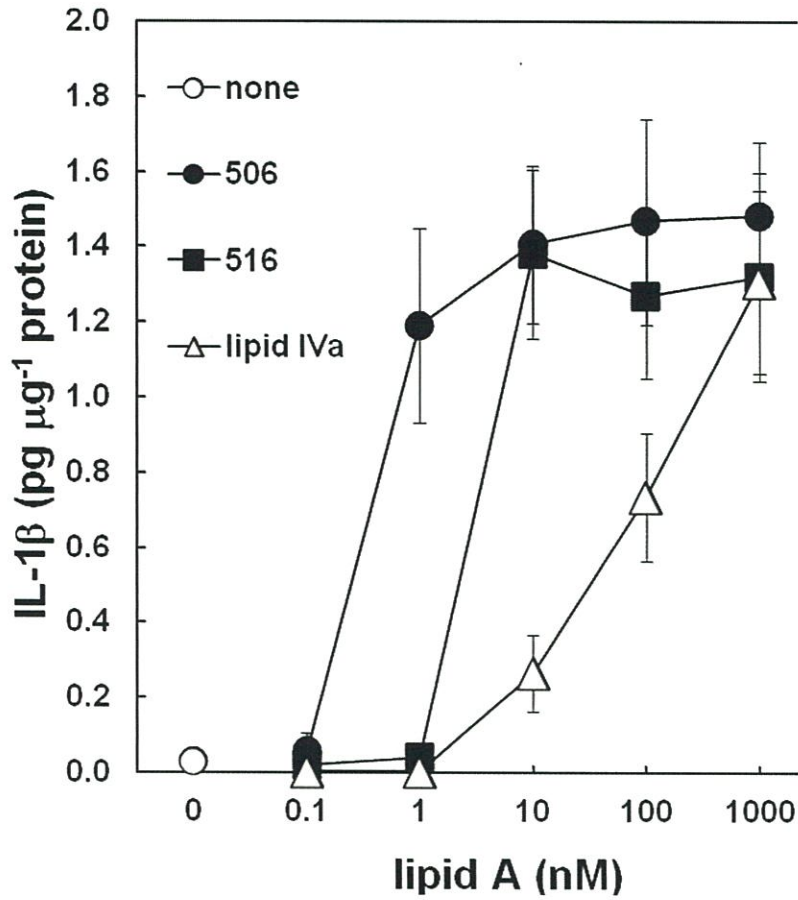


Fig. 12 各種 lipid A 類縁体の刺激による IL-1 β の産生量

マウスマクロファージ様細胞株 (J774A.1) を LBP 存在下において各種 lipid A である 506 (●)、516 (■)、lipid IVa (△) で刺激し IL-1 β の産生量の用量依存性を調べた。IL-1 β の産生量は刺激 16 時間後の培養上清を用いて測定し、細胞抽出液のタンパク量で標準化した。なお、グラフ上のプロットは平均値 \pm S.E.M. (n=7) で表記。

次に RANTES の産生量は 506 で刺激すると、1 nM から産生量が増加し始め、10 nM で、ほぼプラトーとなった。516 の刺激では、10 nM で高い産生量を示し、それより高い lipid A 濃度ではわずかに増加、またはほぼプラトーとなった。Lipid IVa の刺激では 10 nM から産生量が増加し、それ以上の濃度ではプラトーとなった。EC₅₀ で比較すると、506 が最も高く、次に 516 と lipid IVa が同等であり、それぞれ 506 のおよそ 1/5 であった。一方、RANTES の産生量は最大活性で比較すると、1000 nM において 506 と 516 は同等であったが、lipid IVa はこれらの lipid A のおよそ 1/2 ~ 1/3 となった。IL-1 β の産生量は lipid A 類縁体の種類によって EC₅₀ は異なるものの、その最大産生量はほぼ同等であった一方、RANTES の産生量においては 506 および 516 は同等であったが、lipid IVa はこれらの lipid A より小さく、他の lipid A と比較して特異な反応を示した (Fig. 13)。

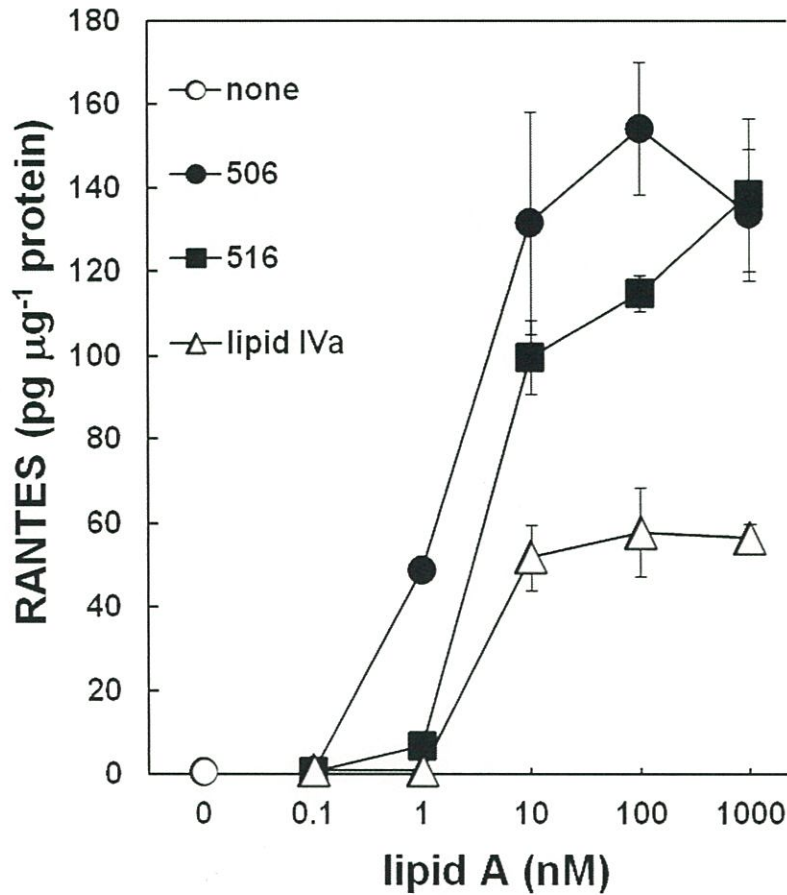


Fig. 13 各種 lipid A 類縁体の刺激による RANTES の産生量

マウスマクロファージ様細胞株 (J774A.1) を LBP 存在下において各種 lipid A である 506 (●)、516 (■)、lipid IVa (△) で刺激し RANTES の産生量の用量依存性を調べた。RANTES の産生量は刺激 16 時間後の培養上清を用いて測定し、細胞抽出液のタンパク量で標準化した。なお、グラフ上のプロットは平均値 ± S.E.M. (n=3) で表記。

<転写活性>

サイトカイン産生に至るまでには、種々のシグナル伝達経路が関与するため、エンドトキシンの活性を正しく反映していない可能性が考えられた。そこでより受容体に近い、IL-1 β の転写因子である NF- κ B (Schindler & Baichwal, 1994) および RANTES の転写因子である IRF-3 (Honda & Taniguchi, 2006) の転写活性を調べた。具体的には MyD88 依存性経路により活性化される NF- κ B のレポーター活性および MyD88 非依存性経路により活性化される IRF-3 のレポーター活性を指標とし、506, 516 および lipid IVa の刺激によるそれぞれの経路の活性化を検討した。

NF- κ B のレポーター活性は 506 で刺激を行うと 1 nM から 10 nM まで用量依存的に活性が増加し、それ以上の濃度ではプラトーとなった。516 の刺激では 10 nM から高い活性を示し、それより高い lipid A 濃度では、わずかに活性が増加する傾向が認められた。Lipid IVa の刺激でも、516 と同様 10 nM で高い活性を示し、それ以上の濃度では、ほぼプラトーに達した。EC₅₀ で比較すると、NF- κ B のレポーター活性は 506 が最も高く、ついで 516、lipid IVa はほぼ同等の活性を示し、それぞれ 506 のおよそ 1/10 であった。一方、NF- κ B のレポーター活性の最大活性で比較すると、1000 nM において lipid IVa は他の lipid A 類縁体と比較するとわ

ずかに低くなったものの、全ての lipid A 類縁体で概ね同等であった (Fig. 14) 。

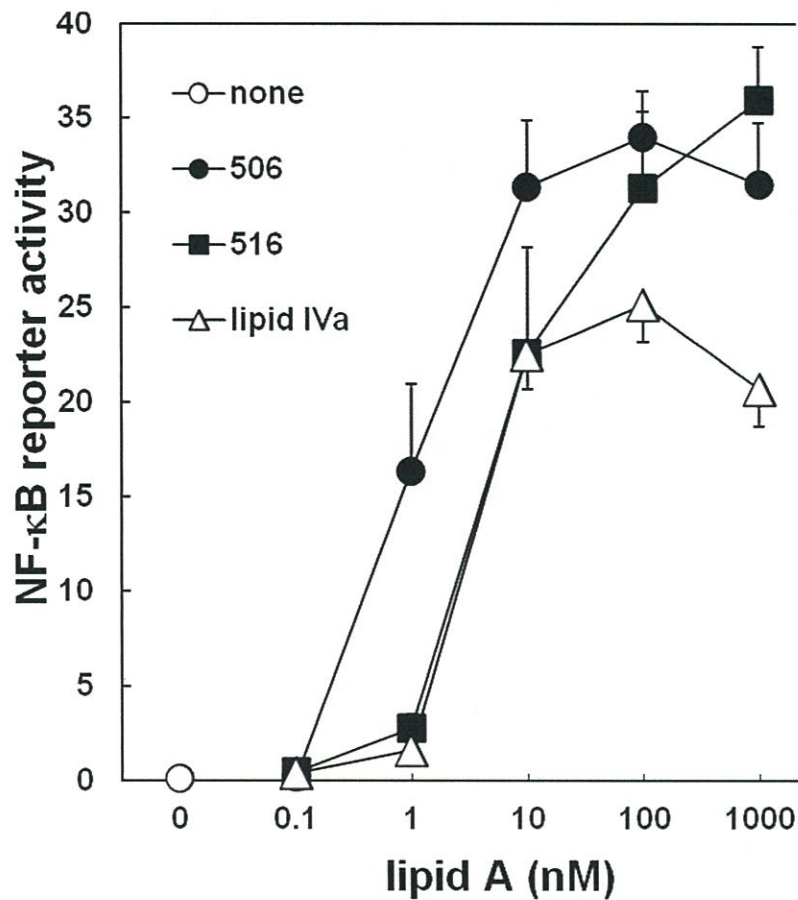


Fig. 14 各種 lipid A 類縁体の刺激による NF-κB のレポーター活性

マウスマクロファージ様細胞株 (J774A.1) を LBP 存在下において各種 lipid A である 506 (●)、516 (■)、lipid IVa (△) で刺激し NF-κB のレポーター活性の用量依存性を調べた。NF-κB のレポーター活性は刺激 6 時間に測定し、生細胞数を反映する ATP 量で標準化した。なお、グラフ上のプロットは平均値 ± S.E.M. (n=5) で表記。

次に IRF-3 のレポーター活性は 506 で刺激すると 1 nM からレポーター活性が増加し始め、10 nM まで用量依存的に増加し、それ以上の濃度ではプラトーとなった。516 の刺激では 10 nM から高いレポーター活性を示し、それより高い濃度では、ほぼプラトーとなった。Lipid IVa の刺激では 10 nM でレポーター活性が増加し、それ以上の濃度ではプラトーとなった。EC₅₀ で比較すると、506 が最も高く、次に 516 と lipid IVa が同等であり、それぞれ 506 のおよそ 1/5 であった。一方 IRF-3 のレポーター活性の最大活性で比較すると、1000 nM において、506 および 516 は同等であったが、lipid IVa はこれらの lipid A のおよそ 1/3 となった。NF-κB のレポーター活性は lipid A 類縁体の種類によって、EC₅₀ は異なるものの、その最大活性は概ね同等であった。IRF-3 のレポーター活性の最大活性については、506 および 516 は同等であったが、lipid IVa はこれらの lipid A のおよそ 1/3 となり、他の lipid A と比較して特異な反応を示し、RANTES の産生量の結果と整合性を認めた (Fig. 15)。

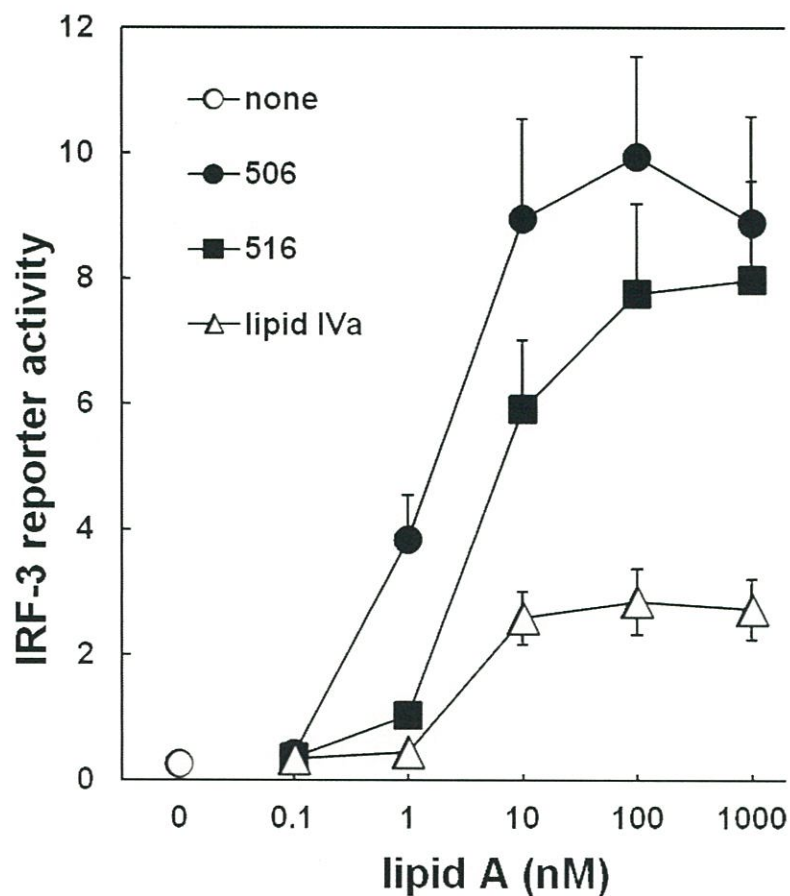


Fig. 15 各種 lipid A 類縁体の刺激による IRF-3 のレポーター活性

マウスマクロファージ様細胞株 (J774A.1) を LBP 存在下において各種 lipid A である 506 (●), 516 (■), lipid IVa (△) で刺激し IRF-3 のレポーター活性の用量依存性を調べた。IRF-3 のレポーター活性は刺激 6 時間に測定し、生細胞数を反映する ATP 量で標準化した。なお、グラフ上のプロットは平均値 ± S.E.M. (n=5) で表記。

<転写因子の活性化>

次に MyD88 依存性および非依存性経路を介して活性化される転写因子について検討した。MyD88 依存性経路では NF- κ B の活性化に必要な I κ B α のリン酸化を、MyD88 非依存性経路では IRF-3 のリン酸化を 2 つのマウスマクロファージ様細胞株である J774A.1 および RAW264.7- γ NO(-)を用いて検討を行った。mLBP を添加した無血清培地において、J774A.1 細胞を 1 μ M の 506 および lipid IVa で 5 ~ 180 分間刺激を行った。その後、細胞にプロテアーゼ阻害剤を添加した Lysis buffer を加えて核内に存在するタンパクを含めた抽出液を調製し、リン酸化した I κ B α (P-I κ B α) および IRF-3 (P-IRF-3)、さらに、総 I κ B α および IRF-3 をそれぞれの抗体で検出した。また、細胞数および細胞の生存率の指標として actin を検出した。I κ B α のリン酸化は lipid IVa の刺激後 5 分で検出され、その後は、506 での刺激と同レベルのリン酸化が認められたが、両 lipid A 類縁体で、刺激 15 分後に I κ B α の分解によるリン酸化レベルの低下が認められた。一方、506 による 30 ~ 60 分間の刺激において IRF-3 のリン酸化は明瞭に認められたが、lipid IVa の刺激による IRF-3 のリン酸化は全ての刺激時間を通してほとんど認められなかった (Fig. 16 左)。506 および lipid IVa の刺激による I κ B α のリン酸化と 506 による IRF-3 のリン酸化はどちらも刺激後 90 分で観察されることから、90 分における両 lipid A

類縁体刺激の用量依存性を 0.1 – 1000 nM の範囲で調べた。1 nM において、506 は lipid IVa と比較して高いレベルのリン酸化を誘導したが、より高い濃度においては、506 および lipid IVa とほぼ同レベルのリン酸化を認めた。IRF-3 においても、506 の刺激で 10 nM からのリン酸化が認められたが、lipid IVa の刺激では全ての濃度において IRF-3 の発現が認められたにもかかわらず、ほとんどリン酸化は認められなかった (Fig. 16 右) 。

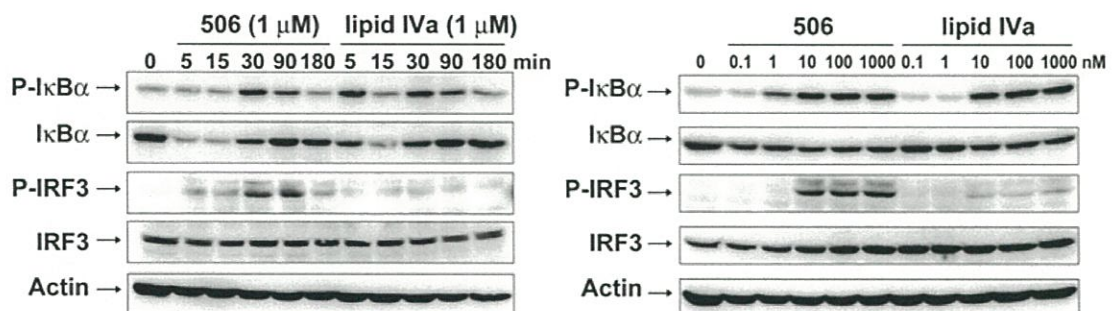


Fig. 16 各種 lipid A 類縁体の刺激による転写因子の活性化 1

マウスマクロファージ様細胞株 (J774A.1) を LBP 存在下において 506 および lipid IVa で刺激し、それぞれ、1 μM における IκBα および IRF-3 のリン酸化の経時変化ならびにそれぞれの刺激 90 分後における IκBα および IRF-3 のリン酸化の用量依存性を調べた。また、細胞の生存率は actin を指標に確認した。

Lipid IVa の刺激により、IRF-3 がリン酸化されない現象は J774A.1 細胞株特有の現象である可能性を否定するため、RAW264.7- γ NO(-) 細胞株でも同様の検討を実施した。J774A.1 細胞株で観察されたとおり、506 および lipid IVa の刺激による I κ B α のリン酸化は、それぞれ、ほぼ同じ濃度から見られた。また IRF-3 は 506 の刺激で 10 nM からリン酸化が認められたものの、lipid IVa の刺激では全ての濃度においてリン酸化はほとんど認められなかったことから、両マクロファージ様細胞株で整合性、すなわち、共通の現象が認められた (Fig. 17) 。

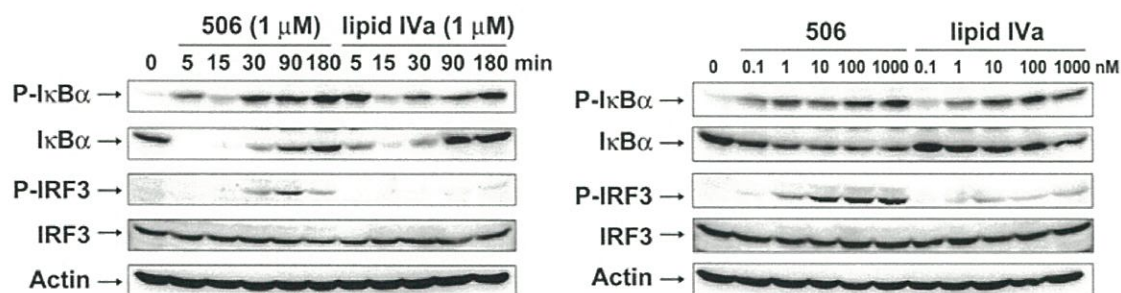


Fig. 17 各種 lipid A 類縁体の刺激による転写因子の活性化 2

マウスマクロファージ様細胞株 (RAW264.7- γ NO(-)) を LBP 存在下において 506 および lipid IVa で刺激し、それぞれ、1 μ M における I κ B α および IRF-3 のリン酸化の経時変化ならびにそれぞれの刺激 90 分後における I κ B α および IRF-3 のリン酸化の用量依存性を調べた。また、細胞の生存率は actin を指標に確認した。

TLR4 の刺激による IRF-3 のリン酸化は MyD88 非依存性の経路でのみ活性化される一方、NF- κ B の活性化は MyD88 非依存性の経路も一部関与する。そこで、より詳細に MyD88 依存性経路でのみ活性化される 506 および lipid IVa 刺激による影響を比較するため、lipid A 類縁体刺激後、10 分における I κ B α のリン酸化を調べた。この理由として、lipid A 刺激後の早い時間 (early phase) では、I κ B α のリン酸化には MyD88 非依存性の経路の活性化が関与しないためである。実際には、J774A.1 細胞をまずプロテアソーム阻害剤である lactacystin を加えた培地で培養することにより I κ B α の分解を阻害し、次に mLBP を添加した無血清培地で J774A.1 細胞を 0.1 – 1000 nM の 506 および lipid IVa で 10 分間刺激を行い、I κ B α のリン酸化を検討した。Lactacystin は当該濃度では完全に I κ B α の分解を阻害しなかったが I κ B α のリン酸化レベルは両 lipid A 類縁体でほぼ同等であった。この条件において、506 と lipid IVa の刺激による I κ B α のリン酸化レベルは両者とも用量依存的に高くなったが、これは両 lipid A 類縁体が同レベルで MyD88 依存性の経路の活性化を効果的に行っていることを意味している。なお、actin のレベルから lactacystin および両 lipid A 類縁体は細胞の生存率に影響を与えていないと考えられる (Fig. 18) 。

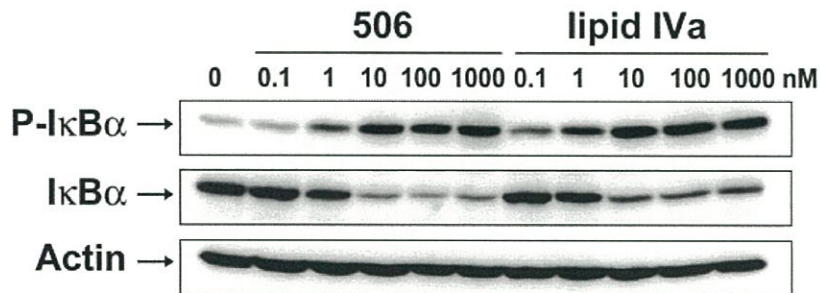


Fig. 18 各種 lipid A 類縁体の刺激による転写因子の活性化 3

マウスマクロファージ様細胞株 (J774A.1) を 20 μ M の lactacystin で 30 分間処理したのち LBP 存在下において 506 および lipid IVa で 10 分間刺激し、I κ B α のリン酸化の用量依存性を調べた。また、細胞の生存率は actin を指標に確認した。

また、他のプロテアソーム阻害剤である MG-132 を lactacystin に代えて使用したが同様の結果となった (データは示していない)。これらの結果をまとめると lipid IVa 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わかった。

【考察】

Lipid A 類縁体の生物活性は IL-1 β , IL-6, IL-8 および TNF- α を含む、炎症性のサイトカインの産生量などを指標に広く研究されてきた。また、lipid A の構造活性相関についても、グラム陰性菌から単離された精製 lipid A を用いた研究が多く報告されている。しかし、これらの精製 lipid A は一般的に単一の組成ではないだけでなく、自然免疫を活性化する菌の構成成分が含まれていることがある。このような状況で lipid A の構造活性相関を解釈するのは、非常に困難を極める。そのため、本研究では、化学合成された lipid A 類縁体を用いた。

まず、リガンドが結合しなければ、情報伝達は行われなことを前提とし、受容体群と各種 lipid A 類縁体との結合能を指標に、エンドトキシン活性を調節している受容体を検討するとともに動物種による特異性を明らかにすることを試みた。

LBP はエンドトキシンの受容体の一つであり、lipid A を CD14 に運搬し、CD14 と lipid A の複合体の形成を触媒する。LBP は急性の炎症などで血中に現れる 60 kDa の糖タンパクで、肝臓が主な生合成部位である。本研究において、LBP と 3 つの lipid A 類縁体の結合能はそれぞれ大きく異なることから、LBP は lipid A の構造を識別することがわかった。しかし、結合能の強弱はマウスおよびヒト由来の LBP とともに lipid IVa が最も強く、次に 506、そして 516 の順となり、両者に違

いがないことから、同じ構造を持つ lipid A でも動物種により活性が異なる現象には、LBP と lipid A との結合能が無関係であることが明らかとなった。一方で、これまでに報告されている各種 lipid A 類縁体の生物活性の強弱とマウスおよびヒューマン由来の LBP との結合能の強弱については、506 と 516 で相関が認められたことから、506 と 516 の活性の調節を LBP が一部関与している可能性が考えられた。

CD14 は 55 kDa の糖タンパクで、単球、マクロファージ、好中球の細胞表面に発現しているものや、血中に遊離しているものが存在する。CD14 の lipid A の結合領域は 57 番目から 64 番目のアミノ酸であり、通常、CD14 と lipid A は 1:1 で結合する (Hailman *et. al.*, 1994; Juan *et. al.*, 1995)。mCD14 と hCD14 で評価条件は異なったものの結合能の強弱は両者ともに lipid IVa が最も強く、次に 506 そして 516 の順となり、両者に違いがないことから CD14 でも LBP と同様、同構造の lipid A でも動物種により活性が異なる現象には CD14 と lipid A との結合能が無関係であることが明らかとなった。一方で、これまでに報告されている各種 lipid A 類縁体の生物活性の強弱とマウスおよびヒト CD14 との結合能の強弱については、506 と 516 で相関が認められたことから、506 と 516 の活性の調節を CD14 も LBP と同様、一部関与している可能性が考えられた。CD14 は lipid A だけでなく細菌の外膜の構成成分であるペプチドグリカンやリポプロテインと結合

するなど LBP と同様、非特異的に lipid A に類似した構造に結合することが知られている (Manukyan *et. al.*, 2005) にもかかわらず、先に述べたように CD14 と lipid A 類縁体の結合能はその構造により異なること、すなわち CD14 が lipid A の構造を識別することは興味深い。なおかつ 506 と 516 で結合能と活性の強弱の相関が認められたことは CD14 が lipid A の構造活性相関、すなわち活性の強弱の調節に大きな役割を果たしているものと考えられる。

MD-2 は分子量がおよそ 17-25 kDa の 160 個のアミノ酸からなる糖タンパクであり、血中に遊離または TLR4 に一対で結合している (Miyake 2004) 。 MD-2 は lipid A の構造を認識し、TLR4/MD-2 が 2 量体を形成することで、細胞内にシグナルの伝達が行われることが知られている。一方、外因性のリガンド、すなわち病原体によらない内因性のリガンドである脂肪酸なども MD-2 に結合し、生理活性を示すことも知られている。小川らはマクロファージ様細胞株 (Raw 264) および脂肪細胞様細胞株 (3T3-L1) において飽和脂肪酸が TLR4 を介した NF- κ B の活性化に影響を与えている、つまり内因性のリガンドが免疫能の調節に関与していることを報告している (Ogawa *et. al.*, 2007) 。 よって MD-2 は免疫、すなわち生体防御のみならず生体の恒常性においても非常に重要な役割を持つと考えられている。本研究ではマウスおよびヒューマン由来の MD-2 を LBP および CD14 と同様に精製し、それぞれについて機能を有することを確認した。実際には

HEK293 細胞に CD14, TLR4 を発現させ LBP を共存させた条件において LPS で刺激し、MD-2 の添加により NF- κ B のレポーター活性が上昇することを確認した (データは示していない) 。 CD14 と同様 MD-2 と lipid A の結合は 1:1 (Miyake 2004) であり FITC-LPS または Biotin-LPS と十分に結合させるため、LBP、CD14 共存下における様々な ELISA の条件を検討したが、良好な結合の条件は見つからなかった。この時 MD-2 はマイクロプレートに固相化していたことから立体的な障害により、マーカの結合した LPS と十分に結合ができないものと考えられたため、MD-2 が遊離した条件において検討を行ったがマーカの結合した LPS との用量依存的な結合は認められなかった。MD-2 は疎水性のポケットがあり lipid IVa の 4 本の脂肪酸鎖が埋まることが結晶構造解析から知られているが (Ohto *et. al.*, 2007)、TLR4/MD-2 の 2 量体の形成時には MD-2 のポケットに収まらない lipid A の脂肪酸鎖およびリン酸基が TLR4 と相互作用を持つとの報告がある (Ohto *et. al.*, 2012) 。 よって MD-2 は単独ではなく TLR4 に結合した状態で lipid A と効率よく結合する可能性が考えられた。このことが本研究でマーカの結合した LPS と MD-2 の結合を検出できなかった一因かもしれない。

室井らは MD-2 の 57 番目から 79 番目および 108 番目から 135 番目のアミノ酸が動物種の違いによる lipid IVa の活性の差を決定していると報告しており Thr (57)、Val (61)、Glu (122) を Ala に置換した mMD-2 と mCD14、mTLR4 を強制

発現させた HEK293 細胞を lipid IVa で刺激するとアゴニスト活性が消失すると報告している。また、lipid IVa でマウスの細胞を刺激すると TLR4/MD-2 が 2 量体を形成することが知られており 506 と同等の強い生物活性を引き起こす一方、lipid IVa でヒトの細胞を刺激すると TLR4/MD-2 は 2 量体を形成せず、活性を示さないだけでなくアンタゴニストとして働くことが知られている。これらのことから、動物種の違いによるアミノ酸配列の違いが lipid A の活性の強弱に大きな影響を与えているものと推察される。また、lipid IVa の刺激による TLR4/MD-2 の 2 量体形成の有無には TLR4 も関与していることから、TLR4 もエンドトキシン活性の強弱の調節に一定の役割を持っていると推察される。TLR4 の 299 番目のアミノ酸が Asp から Gly に、399 番目のアミノ酸が Thr から Ile に変異した遺伝子多型の TLR4 はエンドトキシンに対する感受性が低いことが報告されている。また、TLR4 の 299 番目のアミノ酸を Asp から Gly に置き換えた場合、アゴニスト活性を発現する際の TLR・MD-2・LPS の 2:2:2 の M 型の立体構造が異なる一方で、399 番目のアミノ酸を Thr から Ile に置換したものではその立体構造に影響は認められなかったとのことである (Ohto *et. al.*, 2012)。これまで、TLR4 の役割は lipid A が MD-2 に結合した際、細胞内にそのシグナルを伝達するものと考えられてきたが TLR4 自体もエンドトキシン活性の強弱の調節に関与しているのかも知れない。

以上のことから、細胞外においてエンドトキシン活性の強弱の調節が行われていることが確認できた一方、細胞内におけるシグナル伝達過程においても活性の強弱が調節されていることも、以前から報告されている (Golembock *et. al.*, 1991; Perera *et. al.*, 1993)。しかし lipid A の構造活性相関を MyD88 依存性および MyD88 非依存性経路の活性化に着目した研究はほとんど見当たらない。Gaekwad らは *E. coli*, *Salmonella minnesota*, *S. typhimurium*, *Neisseria meningitides* の lipid A と同じ構造を持つ、化学合成された lipid A 類縁体の構造活性相関を MyD88 依存性および MyD88 非依存性経路の活性化を介して産生される様々なサイトカインの産生量を指標として報告している。しかしながら、これらの結果から、lipid A の構造と MyD88 依存性および MyD88 非依存性サイトカインの活性化に特徴的な相関は認められていない。また、それぞれのサイトカインの mRNA レベル、さらに、RAW264.7- γ NO(-)、BAC1.2F5 および初代培養樹状細胞を用いて網羅的な解析を行っているが、結論として「lipid A の構造がサイトカイン産生のパターンを調節している証拠は見つからなかった。」としている。しかし本研究では、lipid IVa がマウスのマクロファージ細胞において MyD88 依存性および非依存性の経路を明瞭に区別し、非常に特徴的な活性を示すことを見出した。すなわち lipid IVa は MyD88 非依存性経路と比較して、依存性の経路を優位に活性化することである。

本研究において MyD88 依存性経路の活性化により産生される IL-1 β の lipid IVa の刺激による最大産生量は 506 の刺激による最大産生量と同等であり、同じく MyD88 依存性である I κ B α のリン酸化も lipid IVa による刺激と 506 による刺激では、リン酸化のレベルは両者で同程度であった。一方、MyD88 非依存性経路の活性化により産生される RANTES の lipid IVa の刺激による最大産生量は 506 での刺激による最大産生量より 50%以上低かった。同じ MyD88 非依存性である IRF-3 のリン酸化は 506 の刺激では認められたものの、lipid IVa ではほとんど認められず、IRF-3 の活性化は RANTES 産生に必要であることから、この IRF-3 のリン酸化の欠如が、lipid IVa の partial agonist 様作用の原因となっているのかも知れない。このように MyD88 依存性経路における lipid IVa の full agonist 作用は以前から報告されている (Golenbock *et. al.*, 1991; Perera *et. al.*, 1993) が、MyD88 非依存性経路で見られた lipid IVa の partial agonist 活性の報告は本研究が初めてである。

これまでにマウスマクロファージにおける lipid IVa および 506 の刺激による TNF- α の産生量を EC₅₀ で比較するとそのレベルはほぼ同等またはわずかに lipid IVa で低くなること (Tanamoto & Azumi, 2000)、CD14, TLR4 および MD-2 を強制発現させた HEK293 細胞における lipid IVa および 506 の刺激による NF- κ B の活性化を EC₅₀ で比較すると、活性化のレベルはほぼ同等またはわずかに lipid IVa

で低くなること (Perera *et. al.*, 1993) などが報告されており、本研究における NF- κ B 依存性のレポーター活性の EC₅₀ の結果と概ね整合している。しかし、同じ MyD88 依存性のサイトカインである IL-1 β の産生量を EC₅₀ で比較すると lipid IVa の刺激による産生量のレベルは 506 の刺激による産生量のおよそ 1/1000 であった。この結果は lipid IVa と 506 の刺激による IL-1 β の産生量とその転写因子である NF- κ B 活性化においてそれらの EC₅₀ の相関性が低いことを示している。その理由として、IL-1 β の産生のプロセスが非常にユニークであることが挙げられる。Lipid A の刺激により MyD88 依存性経路が活性化され、NF- κ B の活性化により IL-1 β の mRNA の発現が誘導される (Martinon *et. al.*, 2002; Bryant and Fitzgerald, 2009)。こののち、IL-1 β の前駆体である pro- IL-1 β が産生され、酵素である Caspade-1 によりインフラマソームに運ばれたのち成熟型の IL-1 β となる。この Caspade-1 もその前駆体である pro- Caspade-1 が NLRP3 により活性化される必要があり (Chilton *et. al.*, 2012)、このような複雑な経路を介することから IL-1 β の産生量と NF- κ B のレポーター活性に整合性が取れなかったのかもしれない。実際に、Mono-Phospholyl lipid A (MPLA) を用いて、マウスの腹膜細胞および RAW264.7- γ NO(-)細胞を刺激すると、IL-1 β 産生量は非常に低いものの、その mRNA の発現は強く誘導されていることが報告されている (Okemoto *et. al.*, 2006; Mata-Haro *et. al.*, 2007; Embry *et. al.*, 2011)。加えて、Gaekwad らはいく

つかの lipid A 類縁体や精製 LPS で BAC1.2F5 細胞を刺激したところ pro-IL-1 β は産生されたものの成熟型の IL-1 β の産生量は pro-IL-1 β と比較して著しく低いことを報告している。それゆえ、lipid IVa の刺激だけでは pro-IL-1 β から、成熟型である IL-1 β を産生するには不十分だと推察される。

Lipid A 分子が MD-2 に結合すると、TLR4/MD-2-lipid A 二量体が形成され、TLR4 の細胞内領域である TIR ドメインが会合することで、シグナルの伝達が行われ、MyD88 依存性の経路が活性化される。一方、MyD88 非依存性経路の活性化は、エンドサイトーシスにより TLR4 がエンドソームに取り込まれてから行われることが知られている。TLR4 のエンドサイトーシスには CD14 が重要な役割を持っていることが報告されているが、lipid A が MD-2 に認識されてからのどのようにしてエンドサイトーシスが起こるかについては未だよくわかっていない。本研究では、lipid IVa が十分な IRF-3 のリン酸化を引き起こさなかったことから、lipid IVa が MyD88 依存性経路を十分に活性化できないのは、この IRF-3 のリン酸化より前の段階でシグナルが滞っているためと考えられる。Lipid IVa の刺激により引き起こされる TLR4 のエンドサイトーシスは 506 での刺激と比較して、限定的であることがこの原因として考えられるが、この現象を解明するためにはさらなる調査が必要である。

【総括】

本研究により、エンドトキシン活性の強弱の調節は細胞外および細胞内の両シグナル伝達経路がそれぞれ関与しており、非常に複雑に制御されていることが明らかとなった。506 と 516 は LBP および CD14 との結合能とそれぞれの生物活性の強弱に相関が認められたことから、506 と 516 の活性の調節は LBP および CD14 が一部関与している可能性が考えられた。一方で、細胞内のシグナル伝達経路において、lipid IVa は MyD88 非依存的な経路の活性化能が弱く、他の lipid A と異なる挙動を示した。これらのことから、エンドト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トキシンの 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。

【引用文献】

- Ames GF, Spudich EN, Nikaido H. (1974) Protein composition of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*: effect of lipopolysaccharide mutations. *J Bacteriol.* **117**: 406-16.
- Bryant C & Fitzgerald KA (2009) Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. *Trends Cell Biol.* **19**: 455-464.
- Chilton PM, Embry CA, Mitchell TC. (2012) Effects of Differences in Lipid A Structure on TLR4 Pro-Inflammatory Signaling and Inflammasome Activation. *Front Immunol.* **3**: 154.
- Fujihara M., Muroi M., Tanamoto K., Suzuki T., Azuma H. & Ikeda H. (2003) Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol Ther.* **100**: 171-194.
- Gaekwad J, Zhang Y, Zhang W, Reeves J, Wolfert MA & Boons GJ (2010) Differential induction of innate immune responses by synthetic lipid a derivatives. *J Biol Chem.* **285**: 29375-29386.
- Galanos C, Lüderitz O, Rietschel ET, Westphal O, Brade H, Brade L, Freudenberg M, Schade U, Imoto M, Yoshimura H, et al. (1985) Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur J Biochem.* **148**: 1-5.
- Galanos C, Lüderitz O, Freudenberg M, Brade L, Schade U, Rietschel ET, Kusumoto S, Shiba T. (1986) Biological activity of synthetic heptaacyl lipid A

- representing a component of *Salmonella minnesota* R595 lipid A. *Eur J Biochem.* **160**: 55-59.
- Golenbock DT, Hampton RY, Qureshi N, Takayama K & Raetz CR (1991) Lipid A-like molecules that antagonize the effects of endotoxins on human monocytes. *J Biol Chem.* **266**: 19490-19498.
- Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, Busse LA, Zukowski MM, Wright SD. (1994) Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med.* **179**: 269-277.
- Hayden MS & Ghosh S (2012) NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev.* **26**: 203-234.
- Hoebe K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabet K, Kim SO, Goode J, Lin P, Mann N, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Han J, Beutler B. (2003) Identification of *Lps2* as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature.* **424**: 743-748.
- Homma JY, Matsuura M, Kanegasaki S, Kawakubo Y, Kojima Y, Shibukawa N, Kumazawa Y, Yamamoto A, Tanamoto K, Yasuda T, et al. (1985) Structural requirements of lipid A responsible for the functions: a study with chemically synthesized lipid A and its analogues. *J Biochem.* **98**: 395-406.
- Igarashi A., Ohtsu S., Muroi M. & Tanamoto K. (2006) Effects of possible endocrine disrupting chemicals on bacterial component-induced activation of NF- κ B. *Biol. Pharm. Bull.* **29**: 2120-2122.
- Juan TS, Hailman E, Kelley MJ, Busse LA, Davy E, Empig CJ, Narhi LO, Wright SD, Lichenstein HS. (1995) Identification of a lipopolysaccharide binding

- domain in CD14 between amino acids 57 and 64. *J Biol Chem.* **270**: 5219-5224.
- Juan TS, Hailman E, Kelley MJ, Wright SD, Lichenstein HS. (1995) Identification of a domain in soluble CD14 essential for lipopolysaccharide (LPS) signaling but not LPS binding. *J Biol Chem.* **270**: 17237-17242.
- Kanegasaki S, Tanamoto K, Yasuda T, Homma JY, Matsuura M, Nakatsuka M, Kumazawa Y, Yamamoto A, Shiba T, Kusumoto S, et al. (1986) Structure-activity relationship of lipid A: comparison of biological activities of natural and synthetic lipid A's with different fatty acid compositions. *J Biochem.* **99**: 1203-1210.
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. & Akira, S. (1999) Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity.* **11**: 115-122.
- Kawai T & Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* **11**: 373-384.
- Kotani S, Takada H, Tsujimoto M, Ogawa T, Takahashi I, Ikeda T, Otsuka K, Shimauchi H, Kasai N, Mashimo J, et al. (1985) Synthetic lipid A with endotoxic and related biological activities comparable to those of a natural lipid A from an Escherichia coli re-mutant. *Infect Immun.* **49**: 225-237.
- Leive L. (1974) The barrier function of the gram-negative envelope. *Ann N Y Acad Sci.* **235**:109-129.
- Manukyan M, Triantafilou K, Triantafilou M, Mackie A, Nilsen N, Espevik T, Wiesmüller KH, Ulmer AJ, Heine H. (2005) Binding of lipopeptide to CD14

- induces physical proximity of CD14, TLR2 and TLR1. *Eur J Immunol.* **35**: 911-921.
- Martin GS, Mannino DM, Eaton S & Moss M (2003) The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* **348**: 1546-1554.
- Martinon F, Burns K & Tschopp J (2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol Cell.* **10**: 417-426.
- Miyake K. (2004) Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol.* **12**: 186-192.
- Muroi M, Ohnishi T, Azumi-Mayuzumi S & Tanamoto K (2003) Lipopolysaccharide-mimetic activities of a Toll-like receptor 2-stimulatory substance(s) in enterobacterial lipopolysaccharide preparations. *Infect Immun.* **71**: 3221-3226.
- Muroi M & Tanamoto KI (2011) IRAK-1-mediated negative regulation of Toll-like receptor signaling through proteasome-dependent downregulation of TRAF6. *Biochim Biophys Acta.* **1823**: 255-263.
- Muroi M & Tanamoto KI (2006) Structural regions of MD-2 that determine the agonist-antagonist activity of lipid IVa. *J. Biol. Chem.* **281**: 5484-5491.
- Ohnishi T, Yoshida T, Igarashi A, Muroi M & Tanamoto K (2008) Effects of possible endocrine disruptors on MyD88-independent TLR4 signaling. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **52**: 293-295.
- Ohto U, Fukase K, Miyake K, Satow Y. (2007) Crystal structures of human MD-2 and its complex with antiendotoxic lipid IVa. *Science.* **316**: 1632-1634.

- Ohto U, Yamakawa N, Akashi-Takamura S, Miyake K, Shimizu T. (2012) Structural analyses of human Toll-like receptor 4 polymorphisms D299G and T399I. *J Biol Chem.* **287**: 40611-40617.
- Ohto U, Fukase K, Miyake K, Shimizu T. (2012) Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2. *Proc Natl Acad Sci.* **109**: 7421-7426.
- Okemoto K, Kawasaki K, Hanada K, Miura M & Nishijima M (2006) A potent adjuvant monophosphoryl lipid A triggers various immune responses, but not secretion of IL-1 β or activation of caspase-1. *J Immunol.* **176**: 1203-1208.
- Perera PY, Manthey CL, Stutz PL, Hildebrandt J & Vogel SN (1993) Induction of early gene expression in murine macrophages by synthetic lipid A analogs with differing endotoxic potentials. *Infect Immun.* **61**: 2015-2023.
- Rietschel ET, Kirikae T & Schade FU et al. (1994) Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* **8**: 217-225.
- Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, Itoh M, Yuan X, Mizuarai S, Kotani H, Yamaoka S, Miyake K, Aoe S, Kamei Y, Ogawa Y. (2007) Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **27**: 84-91.
- Schletter, J., Heine, H., Ulmer, A.J. & Rietschel, E.T. (1995) Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch. Microbiol.* **164**: 383-389.
- Tanamoto KI, Abe C, Homma Y, Kuretani K, Hoshi A, Kojima Y. (1978) A compound possessing antitumor and interferon-inducing activities derived

- from the common antigen (OEP) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biochem.* **83**: 711-718.
- Tanamoto K, Abe C, Homma JY, Kojima Y. (1979) Regions of the lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* essential for antitumor and interferon-inducing activities. *Eur J Biochem.* **97**: 623-629.
- Tanamoto K, Galanos C, Lüderitz O, Kusumoto S, Shiba T. (1984) Mitogenic activities of synthetic lipid A analogs and suppression of mitogenicity of lipid A. *Infect Immun.* **44**: 427-433.
- Tanamoto K, Zähringer U, McKenzie GR, Galanos C, Rietschel ET, Lüderitz O, Kusumoto S, Shiba T. (1984) Biological activities of synthetic lipid A analogs: pyrogenicity, lethal toxicity, anticomplement activity, and induction of gelation of *Limulus amoebocyte lysate*. *Infect Immun.* **44**: 421-426.
- Tanamoto, K. & Azumi, S. (2000) *Salmonella*-type heptaacylated lipid A is inactive and acts as an antagonist of lipopolysaccharide action on human line cells. *J. Immunol.* **164**: 3149-3156.
- Ulevitch, R.J. & Tobias, P.S. (1995) Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin *Annu. Rev. Immunol.* **13**: 437-457.
- Yamamoto M, Sato S & Hemmi H et al. (2003) Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science.* **301**: 640-643.
- Zanoni I, Ostuni R, Marek LR, Barresi S, Barbalat R, Barton GM, Granucci F & Kagan JC (2011) CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell.* **147**: 868-880.
- 棚元憲一 (1989) 臨床と微生物 **16**: 58-66

【謝辞】

本研究に関して終始ご指導ご鞭撻をいただきました棚元憲一教授、室井正志准教授に心より感謝いたします。また、本論文をご精読いただき、有用なご意見を頂きました山下直美教授、阿部和穂教授に深謝いたします。

研究をお手伝いいただきました杉浦友香さん、大槻新さん、菊村和正さん、利根川健一さん、そして、様々な面でサポートをいただきました環境衛生学研究室の皆さんに心より感謝いたします。