

# 協奏的に作用する TLR4/MD-2 制御因子の機能 ～免疫調節作用を有する寄生菌由来リピド A を中心に～

下山 敦史<sup>1)</sup>, 藤本ゆかり<sup>2)</sup>, 深瀬 浩一<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>大阪大学大学院理学研究科, <sup>2)</sup>慶應義塾大学理工学部

## はじめに

自然免疫とは、異物に特有の分子構造パターンが宿主細胞に存在する種々の自然免疫受容体を介して認識されることで活性化される生体防御システムである。自然免疫活性化の際に認識される微生物特有の分子構造パターンの一つにリポ多糖 (LPS) がある。グラム陰性菌の細胞表層成分であり、内毒素 (エンドトキシン) としても知られている LPS は、一般に強い免疫賦活作用を持ち、細菌感染防御に大きな役割を果たすものの、重篤な感染症の場合には敗血症の原因ともなる。その構造は、疎水性の糖脂質リピド A の糖鎖部位に多糖が結合した構造をとっており (図 1)、脂質部分が細胞外膜の外側膜構造を形成している。免疫賦活活性の本体がリピド A であることが最初の全合成<sup>1)</sup>の後、明らかとなり、その後、自然免疫受容体である Toll like receptor 4 (TLR4)/MD-2 が LPS/リピド A の認識を担っていることが示されている<sup>2)</sup>。TLR4 の下流シグナル伝達は MyD88 依存経路と TRIF 依存経路に大別される (図 1)。MyD88 を介したシグナルは、TNF $\alpha$  や IL-6 といった炎症性サイトカインの産生へとつながり、一方で、TRIF を介したシグナルは、抗ウイルス応答を惹起するインターフェロン (IFN) の産生へとつながる。さらには、近年、LPS の細胞質内受容体として caspase 4/11 も報告されている<sup>3)</sup>。大腸菌リピド A (1) などは、これらのシグナルを同時にかつ強力に活性化するため、強い炎症が惹起される。

一方で、LPS との協奏的な作用により、TLR4/MD-2 の機能を制御可能な分子が、われわれを含め、いくつかのグループで見いだされつつある<sup>4)</sup>。われわれは、そのような制御因子のなかでもとくに、寄生菌由来成分や内因性成分といった宿主体内に存在する化合物に着目している。本稿では、そのような LPS と協奏的に作用する内因性もしくは寄生菌由来 TLR4/MD-2 制御因子に関する研究について紹介する。

## 1. 寄生菌由来リピド A による免疫調節作用

寄生菌や病原菌のなかにはステルスのように自然免疫システムをすり抜けるものがあることが、近年、明ら

かにされている。ペストは齧歯類の感染症であるが主としてノミの媒介でヒトにも感染する。ペスト菌は蛋白性の毒素である外毒素を産生し、この毒素が末梢血管を破壊し、浮腫や壊死を形成する。ペスト菌は、27°C では、大腸菌リピド A (1) と同様の構造を有しているが、哺乳類の体温である 37°C ではアンタゴニストであるリピド IVa (2) (図 2) を発現する<sup>5)</sup>。ペスト菌 LPS のアンタゴニスト作用が宿主の自然免疫応答を阻害し、ペスト菌の強い病原性と短い潜伏期間を決定しているのである。このように、近年、細菌の特性と LPS 活性に関連があることが明らかになってきた。そこで、宿主に寄生している細菌ならば、寄生関係を構築するために宿主の免疫を制御可能な LPS 成分を保持している可能性を考え、われわれは、寄生菌リピド A に着目した研究を展開した。

胃に生息し胃潰瘍の起因菌となるヘリコバクター・ピロリや口腔細菌であり歯周病の要因の一つとして知られるボルフィロモナス・ジンジバリスなどの寄生性細菌の LPS は、弱い免疫刺激活性を示す一方、慢性炎症やアテローム性動脈硬化との関連が報告されている<sup>6)</sup>。ピロリ菌およびジンジバリス菌のリピド A は特徴的な構造を有することが知られており、その構造に起因する自然免疫受容体 TLR4/MD-2 の部分的活性化あるいは阻害が、これらの寄生性細菌 LPS の特異な生物活性の要因であると考えられた<sup>7)</sup>。大腸菌リピド A (1) は、炭素数 12 および 14 の 6 本の脂肪鎖を有するが (図 1)、ピロリ菌リピド A (3, 4) については、脂肪鎖の数は 3~4 本と少ないものの、その鎖長はより長く、炭素数 16 および 18 となっている (図 2)。また、リン酸基についても、大腸菌リピド A (1) は 1 位と 4 位に有するが、ピロリ菌リピド A は、1 位のみリン酸基を有する 3a, 4a に加えて、エタノールアミンの縮合したリン酸基を有する 3b, 4b から成る。ジンジバリス菌リピド A (5-8) は 3~5 本のアシル基 (炭素数 15~17) を有し、末端が分岐した脂肪酸も含む。リン酸基に関してはピロリ菌型と同様の多様性があるがエタノールアミン体はマイナー成分としてのみ存在している。このような寄生菌リピド A に共通する構造的特徴として、脂肪鎖が大腸菌に比べて長く、多様性がある、また、1 位のみリ

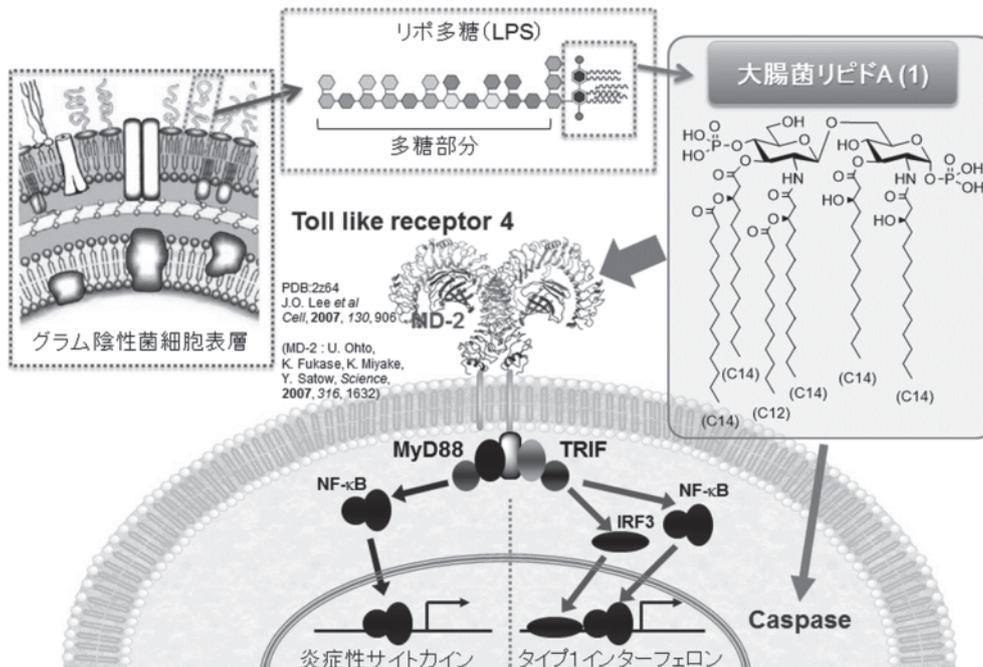


図 1 TLR4 を介した自然免疫活性化機構

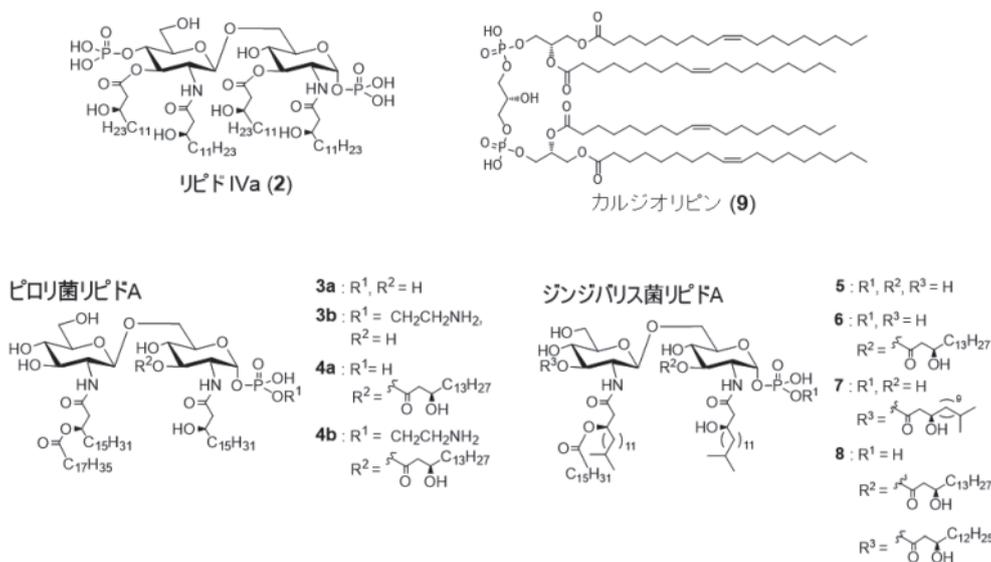


図 2 さまざまなリポド A およびカルジオリピンの化学構造

ン酸基を有した、モノリン酸構造をとっているといった点があげられる。

われわれは、これらの寄生菌リポド A の機能解明を目的として、寄生菌リポド A (3-8) の網羅的的化学合成を実施した<sup>4a,8)</sup>。さらには、化学合成した寄生菌リポド A について、ヒト末梢全血中での種々のサイトカイン誘導活性を測定し、大腸菌 LPS と比較した (図 3A, B)。また、それらのアンタゴニスト作用について、大腸菌 LPS によるサイトカイン誘導に対する阻害活性を測定した (図 3C, D)。その結果、3~4 本の脂肪鎖と通常のリン酸基を有する寄生菌リポド A (3a, 4a, 5, 6) は、

IL-6, TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインについて阻害活性を示した。前述のように IL-6, TNF- $\alpha$  といったサイトカインは MyD88 依存的に誘導されることから、寄生菌リポド A (3a, 4a, 5, 6) は、MyD88 依存経路を阻害していることが示された。一方で、3~4 本の脂肪鎖と、エタノールアミンが結合したリン酸基を有するピロリ菌リポド A (3b, 4b)、および 4~5 本の脂肪鎖と通常のリン酸基を有するジンジバリス菌リポド A (7, 8) は、大腸菌 LPS に比べると大変弱いものの IL-6, TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインについて誘導活性を示した。天然のピロリ菌 LPS においては、リポド A の

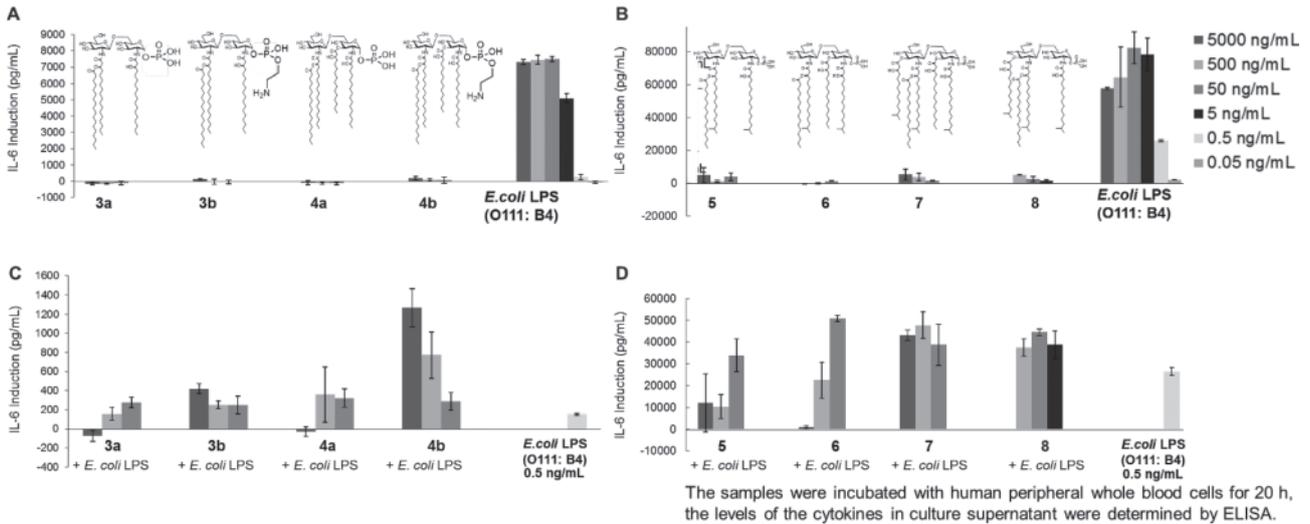


図3 寄生菌リポド A (3-8) のヒト末梢全血中でのサイトカイン誘導および大腸菌 LPS (O111: B4 株) のサイトカイン誘導に対する阻害活性<sup>3)</sup>。  
A および C : IL-6 誘導活性, B および D : 阻害活性。

6' 位に酸性糖 Kdo が付加された部分構造をとっている。3b に Kdo を付加した誘導体も合成し活性を評価したところ、こちらは炎症性サイトカイン阻害活性を示した。以上の結果から、これらの寄生菌は、宿主の自然免疫から逃れるように進化しており、宿主への感染に有利であるようにリポ多糖の活性を抑えるアンタゴニスト作用を有するか免疫活性化作用が極めて弱いリポド A を有すると考えられ、LPS の分子構造が病原性に関連することが示唆された。

また、すべての寄生菌リポド A (3-8) が、慢性炎症に関与する IL-18 を誘導し、3a, 4a, 5, 6 は IL-18 の選択的な誘導作用を示すことをみいだした。LPS 刺激による IL-18 の誘導は、TLR4/MD-2 に由来する 2 つのシグナル経路 (図 2) のうち、TRIF 経路に依存するという報告<sup>9)</sup> と依存しないという報告<sup>10)</sup> がそれぞれある。ピロリ菌リポド A によるサイトカインの選択的誘導がどの経路によるものかは、現在、解析が続けられているが、ピロリ菌リポド A が、TLR4 依存の多くのサイトカインに対して阻害活性を示したことに加え、ピロリ菌リポド A による TLR4 依存の NF- $\kappa$ B の活性化はみられなかったこと、さらには、2014 年にヒトの caspase 4 が細胞質内の LPS 受容体であることが報告されたことから<sup>3)</sup>、現在、細胞質内 LPS 受容体などを介する他の経路が IL-18 誘導に関与する可能性を考えている。

## 2. 大腸菌 LPS と協奏的に作用する寄生菌由来および内因性因子

一方で、エタノールアミン結合型リン酸基を有するピロリ菌リポド A (3b, 4b) は、それ自身の免疫活性化作用は大変弱いものの、大腸菌 LPS が共存した際に、

強い免疫活性化を惹き起こすことも明らかになった (図 3C)。2 つのタイプのリポド A 共存時に得られた免疫活性化作用は、ピロリ菌リポド A (3b, 4b) と大腸菌 LPS、それぞれの活性の単純な合計よりも明らかに強く、2 つの因子が協奏的に作用し、相乗的な効果がもたらされているものと推測された。

このような LPS の免疫活性化作用に対する相乗的増強効果については、これまでに、所属グループとドイツ Borstel 研究所のグループとの共同研究により、TLR4/MD-2 受容体のアンタゴニストとして知られるリポド IVa (2) やカルジオリピン (9) (図 2) が、混合比や混合法によっては、大腸菌リポド A (1) の活性を相乗的に増強させることが報告されている<sup>4b)</sup>。すなわち、リポド IVa (2) を大腸菌リポド A (1) に対して、等モル量以上で混合させた場合はアンタゴニスト活性がみられたが、少量 (モル比で 10~20% 程度) 作用させた場合は相乗的増強効果が観測された。また、この作用は大腸菌リポド A (1) とリポド IVa (2) 混合物の混合比だけでなく、混合法にも依存する。2 つの化合物を一度クロロホルム中で懸濁させ、クロロホルムを除いた後に水に懸濁させることで調整される混合物を用いた場合のみ、上述の相乗的増強効果が観測され、2 つの化合物をそれぞれ水に懸濁させ混合した場合は、アンタゴニスト作用のみが観測された。このことから、相乗的増強効果の発現には、2 つの化合物から形成される超分子の組成が大変重要であることも示唆されている。また、カルジオリピン (9) についても同様の傾向が報告されている。

大腸菌リポド A (1) の生合成前駆体であるリポド IVa (2) は外因性物質であるが、カルジオリピン (9)

は細菌細胞膜成分としてだけでなく、高等生物のミトコンドリア内膜に主に存在する内因性のグリセロリン脂質としても知られる。近年、アポトーシス過程における酸化ストレスなどによって、不飽和度の高いカルジオリピンは容易に酸化され、酸化体が免疫応答や細胞内シグナル伝達への関与することが報告されているが<sup>11)</sup>、分子レベルでのメカニズムは不明瞭である。われわれは最近、カルジオリピン(9)とその酸化体(エポキシ体)について、大腸菌LPSとの相乗的免疫活性化能を評価し、酸化体がより強い相乗効果を示す結果を得ている。これらの結果から、カルジオリピンを含む内因性リガンドの修飾による免疫調節機構が存在するのではないかと考えている。

## おわりに

生体内では、リポドAを分解してリポドIVa(2)に導き、そのアンタゴニスト作用を利用して、リポ多糖やリポドAによる強力な免疫活性化や炎症反応から通常状態に回復させ、恒常性を保つことが示唆されている<sup>12)</sup>。LPSとの協奏的作用がみだされている寄生菌由来成分や内因性成分は、体内に恒常的に存在している成分であり、これらのリガンドも生体内恒常性の維持や破綻に関与する可能性が高い。現在、カルジオリピン以外にもいくつかの内因性リガンドが同様な効果を示すことをみだしつつあり、内因性因子や寄生菌由来成分による免疫調節メカニズムの解明を目指し、研究を展開している。

## 文 献

- 1) Imoto M, Yoshimura H, Sakaguchi N, et al. : Total synthesis of *Escherichia coli* lipid A, the endotoxically active principle of cell-surface lipopolysaccharide. *Bull Chem Soc Jpn* 60 : 2205-2214, 1987
- 2) Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. : Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice : mutations in *Tlr4* gene. *Science* 282 : 2085-2088, 1998
- 3) Shi J, Zhao Y, Wang Y, et al. : Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature* 514 : 187-192, 2014
- 4) a) Shimoyama A, Saeki A, Tanimura N, et al. : Chemical synthesis of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide partial structures and their selective proinflammatory responses. *Chemistry* 17 : 14464-14474, 2011 ; b) Mueller M, Lindner B, Kusumoto S, et al. : Aggregates are the biologically active units of endotoxin. *J Biol Chem* 279 : 26307-26313, 2004
- 5) Kawahara K, Tsukano H, Watanabe H, et al. : Modification of the structure and activity of lipid A in *Yersinia pestis* lipopolysaccharide by growth temperature. *Infect Immun* 70 : 4092-4098, 2002
- 6) a) Hynes SO, Ferris JA, Szponar B, et al. : Comparative chemical and biological characterization of the lipopolysaccharides of gastric and enterohepatic helicobacters. *Helicobacter* 9 : 313-323, 2004 ; b) Nielsen H, Birkholz S, Andersen LP, et al. : Neutrophil activation by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides. *J Infect Dis* 170 : 135-139, 1994 ; c) Pérez-Pérez GI, Shepherd VL, Morrow JD, et al. : Activation of human THP-1 cells and rat bone marrow-derived macrophages by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun* 63 : 1183-1187, 1995 ; d) Danesh J, Wong Y, Ward M, et al. : Chronic infection with *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*, or cytomegalovirus : population based study of coronary heart disease. *Heart* 81 : 245-247, 1999
- 7) Triantafyllou M, Gamper FG, Lepper PM, et al. : Lipopolysaccharides from atherosclerosis-associated bacteria antagonize TLR4, induce formation of TLR2/1/CD36 complexes in lipid rafts and trigger TLR2-induced inflammatory responses in human vascular endothelial cells. *Cell Microbiol* 9 : 2030-2039, 2007
- 8) Fujimoto Y, Shimoyama A, Saeki A, et al. : Innate immunomodulation by lipophilic termini of lipopolysaccharide ; synthesis of lipid As from *Porphyromonas gingivalis* and other bacteria and their immunomodulative responses. *Mol Biosyst* 9 : 987-996, 2013
- 9) Imamura M, Tsutsui H, Yasuda K, et al. : Contribution of TIR domain-containing adapter inducing IFN-beta-mediated IL-18 release to LPS-induced liver injury in mice. *J Hepatol* 51 : 333-341, 2009
- 10) Kanneganti TD, Lamkanfi M, Kim YG, et al. : Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity* 26 : 433-443, 2007
- 11) Tyurina YY, Domingues RM, Tyurin VA, et al. : Characterization of cardiolipins and their oxidation products by LC-MS analysis. *Chem Phys Lipids* 179 : 3-10, 2014
- 12) Lu M, Munford RS : The transport and inactivation kinetics of bacterial lipopolysaccharide influence its immunological potency in vivo. *J Immunol* 187 : 3314-3320, 2011