

エンドトキシン・ 自然免疫研究 20

自然免疫における化学生物学の貢献

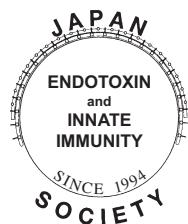
編集

日本エンドトキシン・自然免疫研究会

隅田 泰生

長岡 功

医学図書出版株式会社



エンドトキシン・自然免疫研究 20

—自然免疫における化学生物学の貢献—

編集

日本エンドトキシン・自然免疫研究会

隅田 泰生

長岡 功

執筆者一覧（敬称略）

- 深瀬 浩一（大阪大学大学院理学研究科）
下山 敦史（大阪大学大学院理学研究科）
藤本ゆかり（慶應義塾大学理工学部）
鈴木 香（順天堂大学医学部生化学・生体防御学）
土谷 正和（Charles River, Microbial Solutions）
清水 智治（滋賀医科大学外科学講座）
小幡 徹（滋賀医科大学外科学講座）
園田 寛道（滋賀医科大学外科学講座）
三宅 亨（滋賀医科大学外科学講座）
遠藤 善裕（滋賀医科大学外科学講座）
谷 徹（滋賀医科大学バイオメディカル・イノベーションセンター）
谷 眞至（滋賀医科大学外科学講座）
高橋 徹（岡山県立大学保健福祉学部）
萩沢 康介（防衛医科大学校生理学講座）
木下 学（防衛医科大学校免疫微生物学講座）
宮脇 博基（防衛医科大学校救急部）
佐藤 俊一（防衛医科大学校・防衛医学研究センター情報システム研究部門）
鈴木 英紀（日本医科大学形態解析共同研究施設）
武岡 真司（早稲田大学先進理工学部）
斎藤 大蔵（防衛医科大学校・防衛医学研究センター外傷研究部門）
井上 岳人（兵庫医科大学救急・災害医学講座，神戸大学大学院保健学研究科病態解析学領域）
石川 倫子（兵庫医科大学救急・災害医学講座）
植村 弥希子（神戸大学大学院保健学研究科病態解析学領域）
山下 勇人（神戸大学大学院保健学研究科病態解析学領域）
古賀 由華（神戸大学大学院保健学研究科病態解析学領域）

宇佐美 眞 (神戸大学大学院保健学研究科病態解析学領域)
小谷 穰治 (兵庫医科大学救急・災害医学講座)
永島 裕之 (札幌医科大学医学部微生物学講座)
白石 宗 (札幌医科大学医学部微生物学講座)
北川 学 (札幌医科大学医学部微生物学講座, 同 医療薬学)
山本 聡 (札幌医科大学医学部微生物学講座)
久富 亮佑 (札幌医科大学医学部微生物学講座)
佐藤 豊孝 (札幌医科大学医学部微生物学講座)
涌井 秀樹 (秋田大学大学院理工学研究科疾患生物学研究室)
伊藤 英晃 (秋田大学大学院理工学研究科生化学・分子生物学研究室)
宮本 篤 (札幌医科大学医学部医療薬学)
横田 伸一 (札幌医科大学医学部微生物学講座)
多田 浩之 (東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座口腔微生物学分野)
沼崎 研人 (東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座口腔微生物学分野)
西岡 貴志 (東北大学大学院歯学研究科口腔病態外科学講座口腔診断学分野)
松下 健二 (国立研究開発法人国立長寿医療研究センター口腔疾患研究部)
高田春比古 (東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座口腔微生物学分野)
松村 和典 (国立国際医療研究センター研究所・感染症制御研究部)
切替富美子 (国立国際医療研究センター研究所・感染症制御研究部, 順天堂大学大学院医学研究科微生物学)
切替 照雄 (国立国際医療研究センター研究所・感染症制御研究部, 順天堂大学大学院医学研究科微生物学)
一文字 功 (愛知医科大学感染・免疫学講座)
高村 (赤司) 祥子 (愛知医科大学感染・免疫学講座)
齋藤伸一郎 (東京大学医科学研究所感染遺伝学)
橋本 雅仁 (鹿児島大学理工学域工学系)
馬場梨沙子 (鹿児島大学大学院理工学研究科)
大藪 まみ (鹿児島大学大学院理工学研究科)
橋口 周平 (鹿児島大学理工学域工学系)
隅田 泰生 (鹿児島大学理工学域工学系)
若尾 雅広 (鹿児島大学大学院理工学研究科)
杜若 祐平 (鹿児島大学大学院理工学研究科)
Alast Ahmadiiveli (カリフォルニア大学サンディエゴ校ムーアがんセンター)
馬場 暁士 (鹿児島大学大学院理工学研究科)
大山 真也 (鹿児島大学大学院理工学研究科)
新地 浩之 (鹿児島大学大学院理工学研究科)
Michael Chan (カリフォルニア大学サンディエゴ校ムーアがんセンター)
林 公子 (カリフォルニア大学サンディエゴ校ムーアがんセンター)
Howard B. Cottam (カリフォルニア大学サンディエゴ校ムーアがんセンター)
Dennis A. Carson (カリフォルニア大学サンディエゴ校ムーアがんセンター)
井貫 晋輔 (慶應義塾大学理工学部化学科)
相羽 俊彦 (慶應義塾大学理工学部化学科, 大阪大学大学院理学研究科)
平田 菜摘 (慶應義塾大学理工学部化学科)
柏原 瑛美 (慶應義塾大学理工学部化学科)
喜多 俊介 (北海道大学大学院薬学研究院)
前仲 勝実 (北海道大学大学院薬学研究院)

(執筆順)

序

2016年12月2～3日に第22回日本エンドトキシン・自然免疫研究会を、鹿児島では2007年に丸山征郎先生が開催されて以来9年ぶりに、鹿児島大学郡元キャンパスにおいて開催させていただきました。

今回は、私が化学畑であることから、Chemical Biologyからのエンドトキシン・自然免疫へのアプローチ研究を少し多めに取り入れたいとの思いから、一日目のイブニングレクチャーを、大阪大学大学院理学研究科の深瀬浩一教授にお願いし、「自己と非自己の認識に関わる糖鎖と複合糖質の機能解析と免疫調節への利用：リピドA研究を中心に」というタイトルでお話しいただきました。大阪大学の芝哲夫先生・楠本正一先生が開始されたリピドAの合成研究から、TLR4、Nod系レセプターのリガンドの合成と活性研究まで1時間ではとても足りない研究結果をご紹介いただき、自然免疫の最初の引き金 (initiator) については、構造活性相関を論ずることができるところまで到達したなどの感慨を持った次第です。

二日目には、一般演題として計17演題、そして昨年度の本研究会最優秀賞受賞講演として、順天堂大学医学部の鈴木香先生に「エンドトキシンによる宿主細胞応答に値する生体防御ペプチドの制御機構」のタイトルで約30分間お話しいただきました。このご講演でも、化合物ベースでの相互作用研究が紹介されました。なお、鈴木先生には本誌では、「ヒト生体防御ペプチドLL-37の血管内皮細胞に対する作用～エンドトキシンとの相互作用について～」というタイトルで執筆いただいています。また、一般演題中4題は優秀賞選考セッションで行われ、第22回の本会優秀賞が、下山敦史博士（大阪大学大学院理学研究科）に決定されました。4題ともレベルが高く、僅差での決定となりました。惜しくも選に外れた方も、捲土重来を期していただきたく存じます。

今回は、鹿児島という遠方での開催となりましたので、当日中にご帰宅できるように、二日目は午後で終えようと当番世話人会で決めたため、ご講演時間が短くなってしまい、恐縮しております。それにもかかわらず、ご参会の皆様のご協力をいただき、活発な研究会になりましたこと、またご多忙のなか、本誌に快くご執筆いただいた発表者の皆様に、厚く御礼申し上げます。

最後に、本会の理事長を勤めていただいていた谷徹先生、長年事務局をご担当いただいた清水智治先生、また今回の当番世話人会のメンバーに心から感謝申し上げます。

2017年9月

第22回日本エンドトキシン・自然免疫研究会

当番世話人代表 隅田 泰生

(鹿児島大学大学院理工学研究科化学生命・化学工学専攻)

も く じ

第1章 イブニングセミナー

- 自己と非自己の認識に関わる糖鎖と複合糖質の機能解析と免疫調節への利用：
リピド A 研究を中心に……………深瀬浩一 他… 1

第2章 平成28年度日本エンドトキシン・自然免疫研究会奨励賞・最優秀賞

- ヒト生体防御ペプチド LL-37 の血管内皮細胞に対する作用
～エンドトキシンとの相互作用について……………鈴木 香 …… 7

第3章 平成28年度日本エンドトキシン・自然免疫研究会奨励賞・優秀賞

- 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 他…15

第4章 一般演題

1. Low Endotoxin Recovery (LER) における影響因子……………土谷正和 ……19
2. 潰瘍性大腸炎手術症例での ESP 法でのエンドトキシン推移の検討 ……清水智治 他…22
3. エンドトキシン誘発急性肝障害ラットモデルにおける
肝ヘム代謝関連蛋白の動態……………高橋 徹 ……25
4. 衝撃波による致死性の肺出血マウスに対する新規リポゾーム製剤
H12-ADP-liposome の肺保護効果……………萩沢康介 他…28
5. 精巣男性ホルモン産生細胞におけるアポトーシスへの
エンドトキシン及び IL-18 の関与……………井上岳人 他…31
6. *Helicobacter pylori* LPS は TLR2/TLR10 に認識される……………永島裕之 ……35
7. 納豆由来ペプチドの特異な殺菌効果とその作用機序……………白石 宗 他…39
8. 菌周病関連細菌による好中球からの neutrophil extracellular traps
産生を介した炎症反応の誘導……………多田浩之 他…43
9. IL-4 は高 L-アルギニン濃度で培養した IFN- γ 活性化
マクロファージの結核菌殺菌能を促進する……………松村和典 他…46
10. 抗 MD-1 抗体による, 炎症反応における血清中 MD-1 の測定意義 ……一文字功 他…50
11. Toll-like receptor 7 が 1 型インターフェロンを産生するには
LFA-1 が重要な役割を果たしている……………齋藤伸一郎 ……54
12. 黒酢中の自然免疫活性化物質と酢酸菌由来リポ多糖……………橋本雅仁 他…57
13. ピリミドインドール骨格を有する TLR4 リガンドの構造改変と
構造活性相関解析……………若尾雅広 他…60
14. 糖脂質 α -GalCer を基盤とした脂質改変型 CD1d リガンドの創製研究 ……井貫晋輔 他…64

御案内

索引

第1章

イブニングセミナー

自己と非自己の認識に関わる糖鎖と複合糖質の機能解析と免疫調節への利用：リピド A 研究を中心に

深瀬 浩一¹⁾, 下山 敦史¹⁾, 藤本ゆかり²⁾

¹⁾大阪大学大学院理学研究科, ²⁾慶應義塾大学理工学部

はじめに

細菌の感染により、癌が治癒したり縮小したりすることは 300 年以上前から報告されているなど、細菌の免疫増強作用は古くから知られている^{1,2)}。Coley は *Streptococcus pyogenes* と *Serratia marcescens* を用いた抗癌治療を 1893 年に実施しており、これは世界で最初の癌の免疫療法として知られる。これらの作用は、多細胞生物の持つ種々の自然免疫受容体（パターン認識受容体）が、病原体や微生物に特徴的な分子を認識して免疫系を活性化するために起こることが明らかにされている。

自然免疫活性化因子としては、グラム陰性菌のリポ多糖 (LPS)、細菌細胞壁ペプチドグリカン、DNA、二重鎖 RNA、一重鎖 RNA、細菌の鞭毛タンパク質フラジェリン、リポタンパク質、 β -グルカンなどが知られている。これらの自然免疫活性化因子は、抗原-抗体反応や細胞性免疫などの獲得免疫を活性化するので、ワクチンアジュバントとしての開発研究が進められてきた³⁾。なかでも LPS やその活性本体であるリピド A は強力な免疫増強作用を有するので、炎症作用を減弱し、顕著な毒性を消失させることにより、リピド A 誘導体である MPL がアジュバントとして開発され、認可された。本稿では、LPS の活性本体であるリピド A の構造と活性の相関を中心に、リピド A 類をアジュバントとして使用するための免疫増強作用の制御法について紹介する。

1. 自然免疫活性化因子としてのリピド A

内毒素 (エンドトキシン) は、1892 年に Pfeiffer らによって外毒素 (エキソトキシン) とともにコレラ菌から見出された。内毒素研究は、第二次大戦後に発展し、Westphal は 1945 年に内毒素の本体がグラム陰性菌の外膜を構成する LPS であること、1957 年には LPS の末端に存在するリピド A が活性中心であることを報告した。筆者の師匠にあたる芝、楠本らは Westphal 門下の Lüderitz、Galanos らと共同研究を開始し、大腸菌リピド A (1) (図 1) の正しい構造を提出し、1985 年には大腸菌リピド A の全合成に成功して、リピド A が内毒

素の本体であることを示した。同時期に高山らもリピド A の構造を明らかにした。

LPS ならびにリピド A は、極めて強力な免疫増強作用と炎症惹起作用を有し、サイトカイン産生、一酸化窒素 (NO) 産生、活性酸素産生、白血球遊走、抗菌ペプチド産生、リンパ球活性化などさまざまな免疫応答を誘導することで、細菌からの生体防御に働いている。一方で内毒素は、敗血症の原因の一つであり、多臓器不全、血圧低下、ショックなどの症状を引き起こす⁴⁾。その活性発現機構の解明に向けたブレイクスルーがアンタゴニストの発見である。芝、楠本らは生合成前駆体型リピド A (リピド IVa (2)) の合成に成功し、さらにリピド IVa がマウスに対しては免疫増強作用を示すが、ヒトにおいてはアンタゴニスト作用を示すことが明らかにされた。同時期に *Rhodobacter sphaeroides* lipid A (RSLA) (3) がヒト、マウスともにアンタゴニスト作用を示すことが明らかにされた⁵⁾。これらの発見は LPS 受容体の存在を示すものであり、その探索研究が行われた結果、1996 年に Hoffmann らによりブレイクスルーがもたらされた。彼らはショウジョウバエの Toll 遺伝子が真菌に対する生体防御機構に必須であることを見出し、さまざまな自然免疫受容体発見の契機となった。1997 年には哺乳類のホモログとして Toll 様受容体 (TLR) の存在が指摘され、1998 年には Beutler らが、TLR4 が LPS 受容体であることを明らかにした。

TLR は、細胞外にロイシンリッチリピート (LRR) が複数個並ぶ分子構造を持ち、細胞内にはインターロイキン 1 (IL-1) 受容体細胞内ドメインと相同性の高い TIR (Toll/IL-1 receptor) ドメインをもつ。TLR4 の下流では TIR ドメインにさまざまなアダプター分子 (MyD88, TIRAP, TRAM, TRIF など) が結合してシグナルを伝達する (図 2)。MyD88 を介したシグナルは、転写因子 NF- κ B を活性化し、TNF α や IL-1, IL-6 といった炎症性サイトカインが誘導される。一方で、TRIF を介したシグナルは、転写因子 IRF3 の活性化へとつながり、インターフェロン (IFN) の産生が誘導される。最近では TLR4 を経ない non-canonical 経路として、カスパーゼを活性化し、IL-1 β や IL-18 を誘導する経路も明らかにされた。

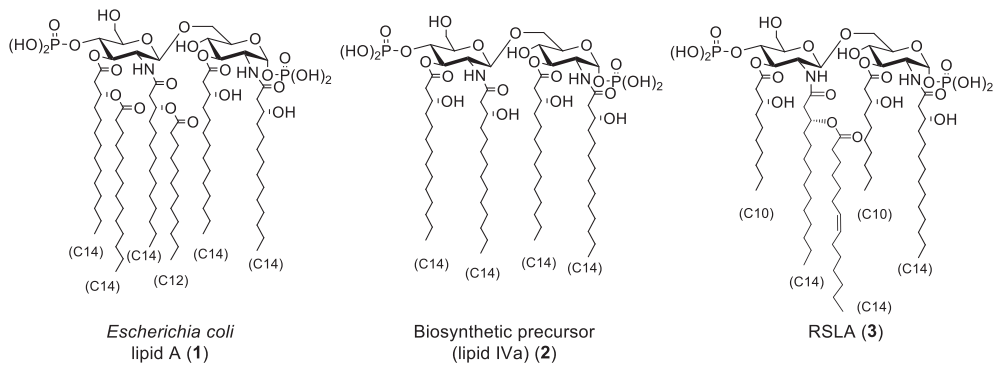


図 1 リピド A の化学構造

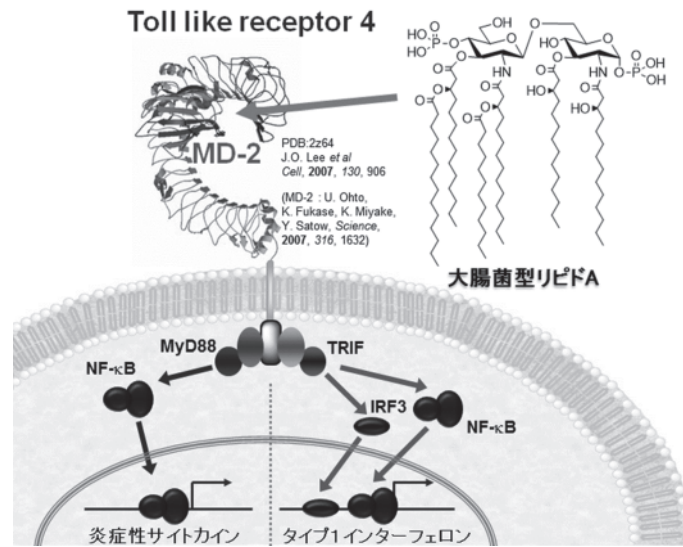


図 2 TLR4 を介した自然免疫活性化機構

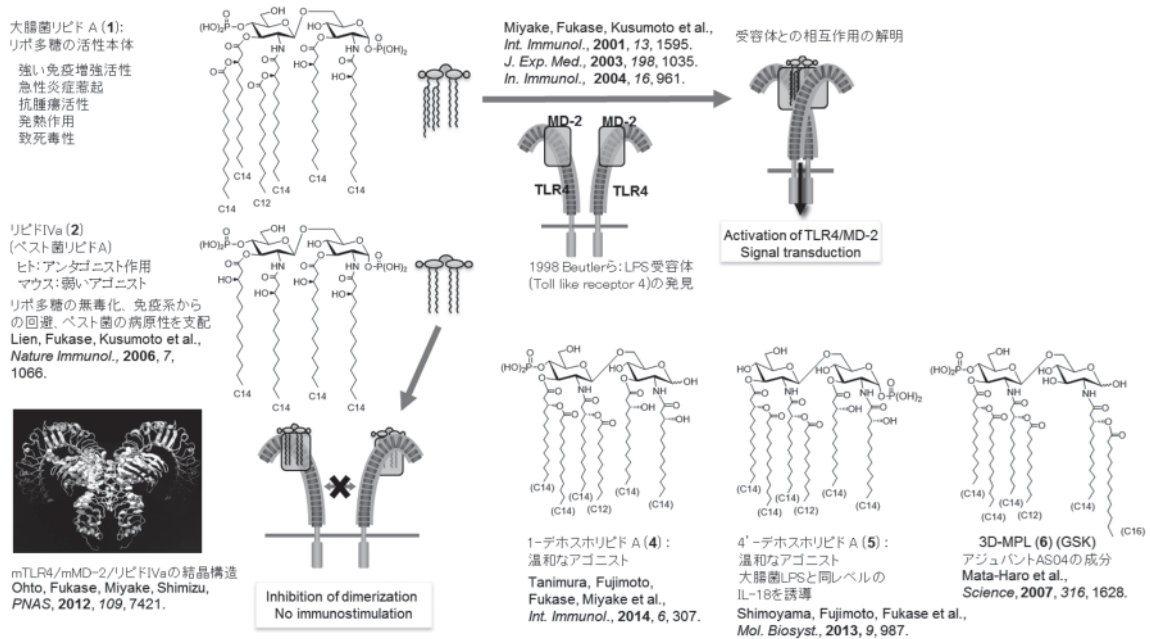


図 3 リピド A の機能研究

続いて、TLR4によるLPSおよびリピドAの認識が解明された。三宅らはTLR4の結合タンパク質であるMD-2がシグナルの伝達に必須であることを明らかにした。われわれの合成した放射性標識リピドA類縁体等を用いて、三宅らは種特異性がMD-2によるリピドAの認識の違いにより生じることなど、TLR4/MD-2複合体とリピドAの相互作用を解明した(図3)⁶⁾。さらにX線結晶構造解析が行われ、大戸、佐藤らは、リピドIVaとヒトMD-2複合体の3次元構造を解明し⁷⁾、続いてLiらは、エーザイの開発したアンタゴニストであるエリトランとマウスTLR4/MD-2複合体の3次元構造を明らかにし⁸⁾、アンタゴニストがMD-2に結合する様子が解かれた。2009年にはLiらによってリポ多糖/ヒトTLR4/MD-2のX線結晶構造解析が行われた⁹⁾。大腸菌型リピドA部の5本のアシル基はMD-2の疎水性ポケットに収容され、残りの一本が隣接するTLR4の疎水性面と相互作用することが引き金になって受容体の二量体化が引き起こされることが見出された。さらに大戸らにより、リピドIVa/マウスTLR4/MD-2複合体の3次元構造が解明され¹⁰⁾、マウス場合はリピドAのアシル基の数が4本であっても、一つのアシル基が隣のTLR4に提示され、二量体化が起こることが明らかとなった。なおアンタゴニストの場合は、リピドA部が180°回転した形でMD-2に結合しており、二量体化は起きない。このようにリピドAのMD-2への結合様式の違いにより、受容体活性化あるいはアンタゴニスト作用が発現することが明らかとなった。

2. リピドAの構造活性相関研究とアジュバントとしての展開

リピドAのアシル基の数や構造は、活性に大きな影響を及ぼす。またリン酸基の数も活性に大きな影響を与える。われわれはさまざまな類縁体を合成し、免疫増強作用やアンタゴニスト作用の強度を制御できることを明らかにしてきた¹¹⁾。例えば1位リン酸を欠くモノホスホリルリピドA(MPL)(504)(4)(図3)は、リピドAに比較すると活性が大きく低下し、温和な免疫増強作用を示す¹²⁾。モノホスホリルリピドAはCD14依存性が低く、TLR4/MD2の二量体化能が大腸菌LPSに比べると大きく低下するが、CD14非依存的で、MyD88-依存的なTNF α 産生能、TRIF-依存的なCD86 up-regulation and IFN β 誘導能を有する¹³⁾。一方4'リン酸を欠くMPL505(5)は、504(4)と同様に温和な免疫増強作用を示す。504(4)のIL-18誘導能が大腸菌LPSよりも低下するのに対して、505(5)のIL-18誘導能は大腸菌LPSと同様レベルに保たれており¹⁴⁾、異なったアジュバント能が予想され、今後の展開が期待される。

グラクソ・スミスクラインは同様の化合物として3D-

MPL(6)(図3)を開発した。3D-MPLは、サルモネラ菌より単離したリピドAのアシル基とリン酸基の構造を最適化することで弱毒化に成功している。この分子は、前述したTLR4/MD2に由来する2つのシグナル経路(図2)のうち、TRIF依存経路を選択的に活性化すると報告された¹⁵⁾。

LPS刺激により、TLR4シグナルに加え、カスパーゼ経路が誘導されるが、これらをすべて過剰に活性化すると、さまざまな毒性が発現される。MPLのようなリピドA誘導体のアジュバントは、LPSに比べ炎症性サイトカインの誘導は抑えつつ、抗原提示の際の共刺激分子CD80とCD86を誘導する¹⁶⁾。このように、リピドAのわずかな構造変換によってシグナル伝達を制御することにより、免疫制御が可能になる。

3. 研究が進むリピドAアジュバント

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ポルフィロモナス・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。その詳細は本誌P.15の「協奏的に作用するTLR4/MD-2制御因子の機能」に記載しており、寄生性細菌由来のリピドAは、TLR4シグナルはほとんど活性化しないが、IL-18誘導能は強力である¹⁴⁾。またこれらのリピドAは、IL-12を誘導する。IL-12とIL-18の共刺激はTh1細胞からIFN- γ 産生を促し、NK細胞を活性化することから、現在アジュバントとしての可能性を検討している。

近年、清野、國澤らは、腸管における免疫誘導組織であるパイエル板に共生している非常にユニークな細菌群(*Alcaligenes*属)を新たに発見し、組織内共生細菌として報告している¹⁷⁾。*Alcaligenes faecalis*由来の菌体成分は宿主に対して、粘膜面獲得免疫の代表格であるIgA産生応答を誘導するが、炎症惹起能力が低い。さらにパイエル板に共生する*A. faecalis*は、自然免疫から獲得免疫への移行に深く関わる樹状細胞内に共生することも明らかにしており、細胞内共生菌としての性質も有している。*Alcaligenes*属はグラム陰性菌であることから、このような共生細菌群に由来するLPS、リピドAもアジュバント候補化合物として大変興味深い。われわれは最近*A. faecalis* LOSの構造を決定し、そのリピドA部の全合成も達成した。合成リピドAは*A. faecalis* LOSと同等の活性を示し、現在アジュバントとしての開発研究を進めている。

また、リピドAアジュバントに抗原分子を共有結合により直接連結させ、化学合成のみで製造される複合化ワクチンの開発も始まっている。Guoらは、脂肪鎖パターンは大腸菌と同じであるが4'位のみリン酸基を有するリピドAと髄膜炎菌抗原である α -2,9-オリゴシアル酸をリンカーを介して結合させた化合物(図4A)

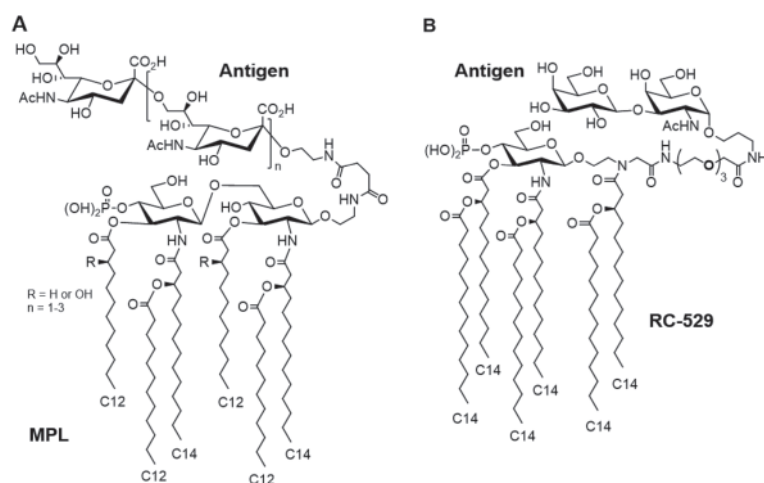


図 4 抗原-アジュバント複合体の化学構造

を合成し、抗体産生増強作用（とくに IgG2b, 2c）を確認している¹⁸⁾。また、Jiang らは、RC-529 と腫瘍関連糖鎖抗原の一種である Thomsen-Freidenreich (TF) 抗原の複合体 (図 4B) の合成を行っており¹⁹⁾、今後の生物活性試験の結果が期待される。

リポド A の活性発現・制御には、親水性部と疎水性部のボリュームの微妙なバランス、疎水部と酸性官能基の空間配置が重要であり、構造修飾によって、受容体活性化の制御、細胞内シグナルの選択の制御が可能である。このことはさまざまなリポド A 誘導体を用いることにより細胞性免疫や液性免疫、あるいは粘膜免疫の応答の制御が可能であることを示している。3D-MPL のように、リポド A 誘導体はすでに安全性の高いアジュバントとして実用されており、今後は抗マラリアワクチンなどの抗原虫ワクチンや抗がんワクチンなどのさまざまな新規ワクチンの開発において、対象となる疾患に応じて、安全性の高いアジュバントが開発されるものと期待される。

文 献

- 1) Kusumoto S, Fukase K, Shiba T : Key structures of bacterial peptidoglycan and lipopolysaccharide triggering the innate immune system of higher animals : chemical synthesis and functional studies. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86 : 322-337, 2010
- 2) Wei MQ, Mengesha A, Good D, et al. : Bacterial targeted tumour therapy—dawn of a new era. *Cancer Lett* 259 : 16-27, 2008
- 3) Leroux-Roels G : Unmet needs in modern vaccinology : adjuvants to improve the immune response. *Vaccine* 28 Suppl 3 : C25-36, 2010
- 4) Molinaro A, Holst O, Di Lorenzo F, et al. : Chemistry of lipid A : at the heart of innate immunity. *Chemistry* 21 : 500-519, 2015
- 5) Golenbock DT, Hampton RY, Qureshi N, et al. : Lipid A-like molecules that antagonize the effects of endotoxins on human monocytes. *J Biol Chem* 266 : 19490-19498, 1991
- 6) Akashi S, Saitoh S, Wakabayashi Y, et al. : Lipopolysaccharide interaction with cell surface Toll-like receptor 4-MD-2 : higher affinity than that with MD-2 or CD14. *J Exp Med* 198 : 1035-1042, 2003
- 7) Ohto U, Fukase K, Miyake K, et al. : Crystal structures of human MD-2 and its complex with antiendotoxic lipid IVa. *Science* 316 : 1632-1634, 2007
- 8) Kim HM, Park BS, Kim JI, et al. : Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell* 130 : 906-917, 2007
- 9) Park BS, Song DH, Kim HM, et al. : The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458 : 1191-1195, 2009
- 10) Ohto U, Fukase K, Miyake K, et al. : Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 : 7421-7426, 2012
- 11) 深瀬浩一, 藤本ゆかり, 下山敦史, 他 : 細菌由来複合糖質の合成と自然免疫研究. *有機化学協会誌* 70 : 113-130, 2012
- 12) Yoshizaki H, Fukuda N, Sato K, et al. : First Total Synthesis of the Re-Type Lipopolysaccharide This work was supported by the Research for the Future Program (No. 97L00502) from the Japan Society for the Promotion of Science. H. Y. is grateful for a JSPS Research Fellowship for Young Scientists (No. 1241) from the Japan Society for the Promotion of Science. The authors are grateful to Mr. Seiji Adachi for his skillful measurement of NMR spectra. *Angew Chem Int Ed Engl* 40 : 1475-1480, 2001
- 13) Tanimura N, Saitoh S, Ohto U, et al. : The attenuated

- inflammation of MPL is due to the lack of CD14-dependent tight dimerization of the TLR4/MD2 complex at the plasma membrane. *Int Immunol* 26:307-314, 2014
- 14) 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
- 15) Mata-Haro V, Cekic C, Martin M, et al. : The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science* 316 : 1628-1632, 2007
- 16) Martin M, Michalek SM, Katz J : Role of innate immune factors in the adjuvant activity of monophosphoryl lipid A. *Infect Immun* 71 : 2498-2507, 2003
- 17) Obata T, Goto Y, Kunisawa J, et al. : Indigenous opportunistic bacteria inhabit mammalian gut-associated lymphoid tissues and share a mucosal antibody-mediated symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 : 7419-7424, 2010
- 18) Liao G, Zhou Z, Suryawanshi S, et al. : Fully Synthetic Self-Adjuvanting α -2,9-Oligosialic Acid Based Conjugate Vaccines against Group C Meningitis. *ACS Cent Sci* 2 : 210-218, 2016
- 19) Lewicky JD, Ulanova M, Jiang ZH : Synthesis of a TLR4 Agonist-Carbohydrate Antigen Conjugate As A Self-Adjuvanting Cancer Vaccine. *ChemistrySelect* 5 : 906-910, 2016

カ	ル	ピ	ス [®]	由	来	の
乳	酸	菌	科	学	か	ら

守る働く乳酸菌[®]

忙しくて
休めない
あなたに!



L-92[®]

乳酸菌配合

第2章

平成28年度日本エンドトキシン・
自然免疫研究会奨励賞・最優秀賞

ヒト生体防御ペプチド LL-37 の血管内皮細胞に対する作用 ～エンドトキシンとの相互作用について～

鈴木 香

順天堂大学医学部生化学・生体防御学

はじめに

平成 28 年 12 月に鹿児島大学で開催された第 22 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会において、奨励賞「最優秀賞」を受賞することができた。著者の所属する順天堂大学医学部生化学・生体防御学講座では、当初は好中球の殺菌メカニズム（とくに、活性酸素生成）、さらに近年では、好中球顆粒内に存在する抗菌ペプチド（とくに、cathelicidin と defensin）のクローニングや機能解析を行ってきた。

私の研究対象であるヒト cathelicidin ペプチドの LL-37 は、エンドトキシンに直接結合してその活性を中和する。このため、敗血症の病態でみられるエンドトキシンによる諸症状に対し、LL-37 の保護効果が期待され、実際にわれわれの研究室において、ラットやマウスのエンドトキシンショックモデルに LL-37 を投与することで生存率が改善することを明らかにしてきた。さらに最近、われわれは、LL-37 がエンドトキシンに結合して中和したのち、中和した状態を保ちながら肝臓の類洞内皮細胞に速やかに取り込まれることを見いだした。肝臓は血液中のエンドトキシンを取り除く「血液浄化機能」を備えており、とくに、肝特有の毛細血管を構成する類洞内皮細胞はエンドトキシンの細胞内取り込みや消化のメカニズムが発達している。したがって、LL-37 を利用して肝臓の血液浄化機能を活性化することが可能となれば、LPS の除去に着目した新たな敗血症治療法の開発が期待される。今回の私の研究内容は細胞培養系での検討にとどまっておらず、生体内における LL-37 のエンドトキシン除去効果の立証に向けて、さらなる検討が必要である。このたびの受賞では、敗血症治療への応用に向けた LL-37 ペプチドの将来性を評価していただいたものと思い、当番世話人の隅田泰生先生、理事長の谷徹先生（当時）、選考委員の諸先生に改めて御礼を申し上げる。

1. cathelicidin ペプチドの構造

cathelicidin はヒトを含む多くの哺乳類のほか、魚類、爬虫類、鳥類に存在する抗菌ペプチドファミリーである。図 1 に示すように、cathelicidin の構造は N 末端の

シグナルペプチド、続いて cathelin 様ドメインと呼ばれる高度に保存された前駆体配列、そして C 末端に位置し抗菌活性を有する成熟ペプチドドメインの 3 領域から成る。cathelicidin は主に好中球や皮膚、歯肉といった外環境に接する上皮細胞で産生されるのだが、好中球においては前駆体の形で顆粒内に蓄えられており、放出されると同時に酵素的切断を受けて成熟ペプチド（抗菌ペプチド）となる。成熟ペプチドの大きさは 12~100 アミノ酸残基と幅広く、また、立体構造は α -helix 型、 β -sheet 型、extended (proline/arginine rich) 型と多様である（図 1）。今日、cathelicidin はさまざまな生物から数多く単離されていて、例えばブタの cathelicidin は 10 種類以上存在する。さらに最近も、新たな cathelicidin 発見の報告は相次いでいる。しかしながら興味深いことに、ヒトでは、前駆体である human cationic antibacterial polypeptide of 18-kDa (hCAP18) から切り出される成熟ペプチドの LL-37 が唯一、同定されているのみである¹⁾。LL-37 は名前が示すとおり、2つのロイシン (L) から始まる 37 アミノ酸残基から成り、 α -helix 型をとる陽イオン性ペプチドである²⁾。

2. 血管内皮細胞のアポトーシスに対する LL-37 の抑制作用

LL-37 を含めて、 α -helix 型の cathelicidin ペプチドはグラム陰性菌から遊離したエンドトキシン（リポ多糖=LPS）に結合してその活性を中和する³⁾。このため、敗血症の病態でみられるような LPS による過剰炎症に対して、LL-37 が保護効果を示すことが期待された。実際にわれわれのグループも、ラットやマウスのエンドトキシンショックモデルに LL-37 を投与することで生存率が改善することを示している⁴⁾。また、LL-37 による LPS 中和のメカニズムも明らかになっている。LL-37 は LPS の lipid A 部位との直接結合によって、単球・マクロファージの LPS 受容体 (CD14 と TLR4) への LPS の結合を阻害し、さらに、この結果として IL-6 や TNF- α などの炎症性サイトカイン産生を低下させるのである⁴⁾。

敗血症の初期においては、炎症性細胞から過剰に産生されるサイトカインが治療標的となるのに対して、



Classification of cathelicidin peptides

α-helical structure

- Human: hCAP18/LL-37
- Rabbit: CAP18, p15s
- Guinea pig: CAP11
- Mouse: mCRAMP
- Rat: rCRAMP
- Bovine: BMAP-27, BMAP-28, BMAP-34
- Sheep: OaMAP-34, SMAP-29
- Pig: PMAP-23, PMAP-36, PMAP-37
- Horse: eCATH-1, eCATH-2, eCATH-3

β-sheet structure

- Bovine: Indolicidin, Dodecapeptide
- Sheep: OaDode
- Pig: Protegrin-1, Protegrin-2, Protegrin-3, Protegrin-4, Protegrin-5

Pro-, Arg-rich peptides (extended structure)

- Bovine: Bac4, Bac5, Bac7
- Sheep: OaBac5, OaBac6, OaBac7.5, OaBac11
- Goat: ChBac5
- Pig: PR-39, Prophenin-1, Prophenin-2

図 1 cathelicidin の構造と分類

cathelicidin は N 末端側からシグナルペプチド, cathelin 様ドメイン, 抗菌ペプチドドメインの 3 つの領域で構成され, 細胞から放出される過程においてシグナルペプチドと cathelin 様ドメインが酵素的に切除されて成熟ペプチドとなる。cathelin 様ドメインは種を超えて高度に保存されている一方, 抗菌ペプチドドメインは可変性を示す。

増悪過程においては, 血管内皮細胞のダメージがもととなって起こる微小循環障害や臓器障害が注目される。われわれは, LL-37 が血管内皮細胞を標的とした敗血症治療にも役立つのではないかと考え, ヒト肺由来微小血管内皮細胞 (human lung microvascular endothelial cell: HMVEC-L) を用いて LPS で誘導されるアポトーシスに対する LL-37 の効果を調べた。HMVEC-L に LPS (100 ng/mL) とタンパク質合成阻害剤である cycloheximide (CHX, 10 μg/mL) を添加したところ, 40% 程度の細胞でアポトーシスが誘導された。これに対し, LL-37 (1 μg/mL) を添加することでアポトーシスは有意に抑制された (図 2A~C)。次に, LPS の HMVEC-L への結合に対する LL-37 (0.1, 1 μg/mL) の効果を調べたところ, LL-37 は LPS の結合を低下させることがわかった (図 2D)。また, LPS/CHX によるアポトーシスが LPS 受容体 (CD14, TLR4) を介していることはこれら受容体の中和抗体を用いて確認した。以上の結果から, LL-37 は血管内皮細胞において, LPS の受容体への結合を阻害することによってアポトーシスを抑制すると考えられた⁵⁾。すなわち, LL-37 は単球

系細胞のみならず, 血管内皮細胞においても LPS の結合を抑制し, LPS 応答を制御することで敗血症に対して保護的にはたらく可能性が示唆された。

Galanos らによって確立された D-galactosamine 負荷マウスエンドトキシンショックモデルは, 肝障害が原因となり死に至る⁶⁾。われわれは LL-37 のアポトーシス抑制効果を *in vivo* で検証するため, このモデルに LL-37 (50 μg/mouse) を投与して肝臓のアポトーシスを調べた。図 3A~C は LPS 投与 5 時間後の肝臓の切片において, アポトーシス細胞の検出のために TUNEL 染色を行った際の顕微鏡写真である。B が示すように, このエンドトキシンショックモデルの肝臓では TUNEL 陽性のアポトーシス細胞が広範囲に多数検出された。また, 血管内皮細胞マーカー CD31 と TUNEL の二重染色の結果, TUNEL のシグナルは血管内皮細胞においても確認された (血管内皮細胞のうち約 30% が TUNEL 陽性であった。図 3D)。このことから, アポトーシスは肝細胞だけでなく血管内皮細胞にも起きていることがわかった。一方, 興味深いことに LL-37 を投与することで肝臓のアポトーシス細胞は顕著に減少し (図 3C), さらに重要なことに, 血管内皮細胞においてもアポトーシスの減少が確認された (10% 以下, 図 3D)。このことから, LL-37 はエンドトキシンショックモデルマウスの肝臓において, 肝細胞や血管内皮細胞のアポトーシスに抑制効果を発揮することが明らかになった⁵⁾。敗血症の病態形成において, 血管内皮細胞のダメージと臓器障害には密接な因果関係があると考えられる。敗血症モデルラットを用いた研究では, 増殖因子投与による血管内皮細胞のアポトーシス抑制が, 肝臓の保護につながることも報告されている⁷⁾。こうしたことから, われわれの研究において, LL-37 による血管内皮細胞のアポトーシス抑制が肝障害の軽減に結びついたことが示唆される。したがって, LL-37 は血管内皮細胞に作用することで敗血症の進行した病態に対しても保護効果を発揮するのではないかと考えられる。

3. 肝類洞内皮細胞の LPS の取り込みに対する LL-37 の活性化作用

肝臓は異物除去を担う中心的な臓器である。門脈から肝臓へ流入する血液は消化管由来の異物を含んでいるが, 肝臓において, 特有の毛細血管系である類洞を通過する間に異物の除去が行われ, 浄化されて全身へと送られる。このとき, 類洞を構成する類洞内皮細胞 (liver sinusoidal endothelial cell: LSEC) と類洞の常在マクロファージであるクッパー細胞は, 血液から LPS などの異物を直接取り込み, 消化する⁸⁾。

先に述べたように, LL-37 は LPS と結合 (中和) することでエンドトキシンショックモデルに保護作用を発揮する。しかしこのとき, LL-37 と結合した LPS が (た

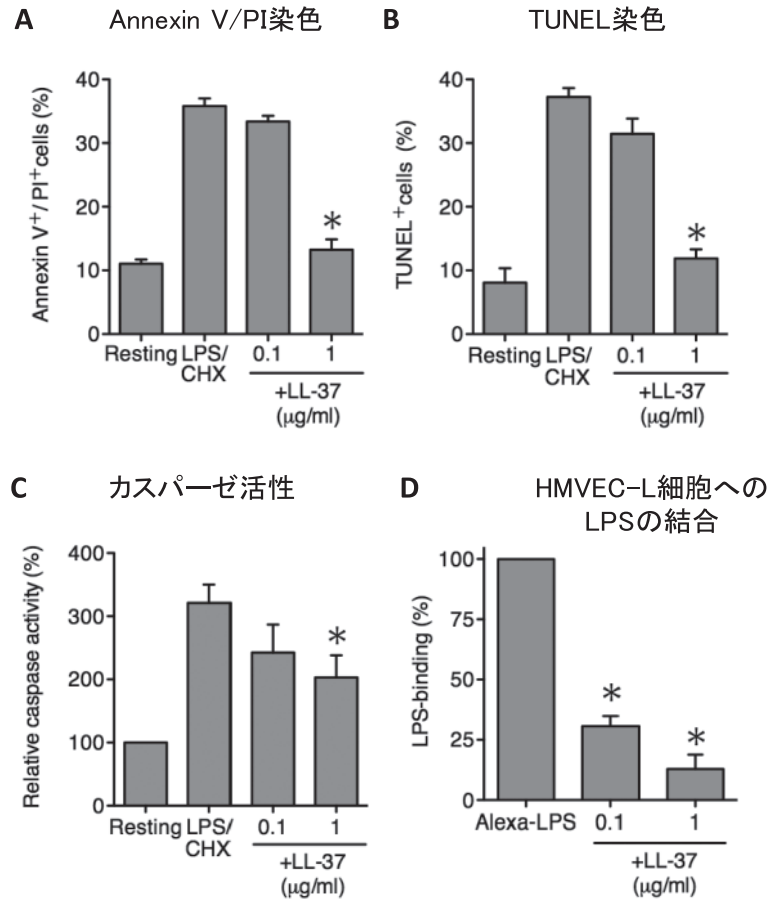


図2 LPS/CHXで誘導されるアポトーシスに対するLL-37の効果
 A-C: HMVEC-LにLPS (100 ng/mL)とCHXを(10 μ g/mL)を作用させ、24時間後にAnnexin V/PI染色(A), TUNEL染色(B), カスパーゼ活性測定(C)を行った。また、ここにLL-37 (0.1, 1 μ g/mL)を添加してアポトーシスに対する効果をみた(A-C)。(*: $p < 0.05$)
 D: 蛍光標識したLPS (1 μ g/mL)をLL-37 (0.1, 1 μ g/mL)の存在下あるいは非存在下でHMVEC-Lに作用させ、2時間後、LPSの取り込みをフローサイロメトリーで測定した。LL-37非存在時のLPSの取り込みを100%として表示した。(*: $p < 0.05$)

とえ中和されたとしても)体内に留まっている状態は好ましくないのではないだろうか。そこでわれわれは、LL-37がLPSを中和した後、さらに、血中からのLPSの除去を活性化すると予想し、human LSECによるLPSの取り込みに対するLL-37の効果を検討した。図4Aは、蛍光標識したLPS (100 ng/mL)をhLSECに2時間作用させた後の顕微鏡写真である。この細胞のLPS取り込み能により、LPSの蛍光シグナルが細胞内に観察される(図4A左)。一方、LPSとともにLL-37 (5 μ g/mL)を作用させた場合、細胞内の蛍光シグナルは顕著に増加した(図4A右)。さらに、フローサイトメトリーでLPSの取り込みを定量的に解析した結果、LL-37 (5 μ g/mL)はLPSの取り込みを約8倍にも増加さ

せることがわかった(図4B)。興味深いことに、LPSとの結合能をもたないスクランブルペプチド(LL-37のアミノ酸組成はそのままに順序を改変したもの)はLPSの取り込みを促進しなかった(図4B)。これらの結果から、LL-37によるLPSの取り込み促進にはLL-37とLPSとの結合が必要であると考えられ、このことからLL-37とLPSは複合体を形成して取り込まれるのではないかと予想された。共焦点蛍光顕微鏡を用いてLL-37とLPSの局在を確認したところ、両者は細胞内で共局在することがわかった(データ掲載せず)。

次に、今度はLL-37を標識してその取り込みをフローサイトメトリーで解析した結果、興味深いことにLL-37はLPSの存在下において数分後からhLSECに

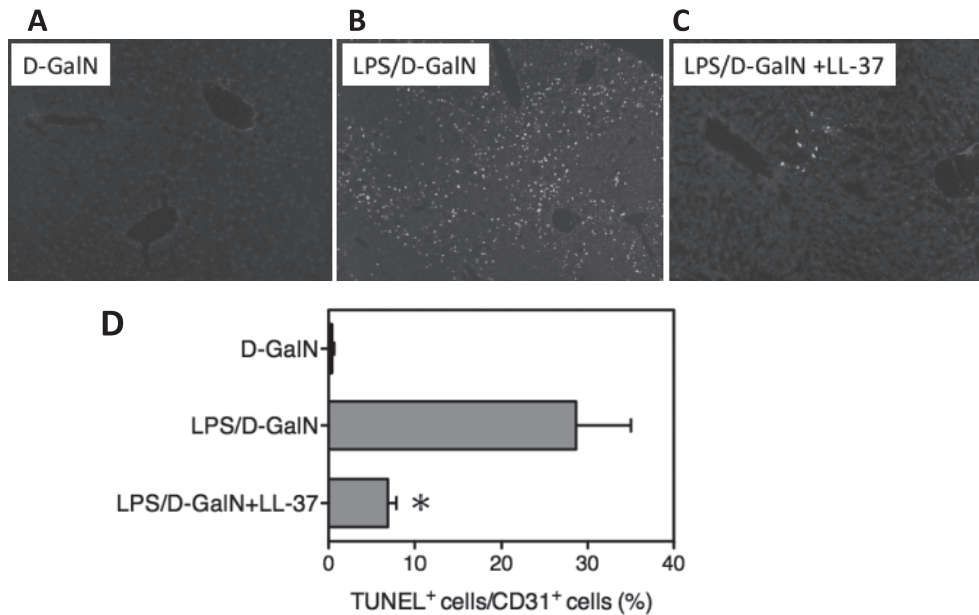


図 3 D-galactosamine 負荷エンドトキシンショックモデルにおける肝臓のアポトーシスに対する LL-37 の効果

A-C: C57BL/6 マウスに D-galactosamine (D-GalN, 18 mg) と LPS (100 ng) を腹腔投与してエンドトキシンショックモデルマウスを作製した。陰性コントロールとして D-GalN のみを、また、LL-37 投与群として LPS/D-GalN に続いて LL-37 (50 μ g) を投与した。投与 5 時間後の肝臓凍結切片を用いて TUNEL 染色を行った (A: D-GalN のみ, B: LPS/D-GalN, C: LPS/D-GalN + LL-37 投与)。

D: 上記の切片を用いて抗 CD31 抗体による免疫染色と TUNEL 染色の二重染色を行い、CD31 陽性の血管内皮細胞における TUNEL 陽性細胞の割合を算出した。(*: $p < 0.05$)

取り込まれたが、LPS が存在しない条件でも同じように取り込まれた (図 5)。すなわち、LL-37 自身が LPS の有無にかかわらずに hLSEC に取り込まれることが明らかとなった。以上の結果から、LL-37 は LPS と結合し (LL-37-LPS の複合体を形成し)、LL-37 自身が hLSEC に速やかに取り込まれる性質に基づいて LPS の取り込みを促進すると考えられた⁹⁾。

続いて LL-37-LPS の複合体の認識にかかわる細胞メカニズムを解明するため、まず、取り込みの受容体について検討した。中和抗体やアンタゴニストを用いた結果、LPS 受容体である CD14 と TLR4、あるいは LL-37 受容体として報告のある formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) は LL-37-LPS 複合体の取り込みにかかわらないことがわかった。そこで、両親媒性ペプチドの細胞内移行とのかかわりが示唆されている細胞膜プロテオグリカン¹⁰⁾を検討した。代表的なグリコサミノグリカンであるヘパラン硫酸やコンドロイチン硫酸を取り込みアッセイの系に添加したところ、興味深いことにヘパラン硫酸の一種であるヘパリンの添加によって LL-37-LPS 複合体の取り込みが低下した (図 6A, B)。一方、コンドロイチン硫酸の添加によっては低下がみられなかった (図 6A, B)。そこでさらに、グリコサミ

ノグリカンの分解酵素であるヘパリナーゼあるいはコンドロイチナーゼで細胞を処理したところ、ヘパリナーゼ処理によって LL-37-LPS 複合体の取り込みが低下したが (図 6C, D)、コンドロイチナーゼでは低下しなかった (図 6C, D)。これらの結果から、LL-37-LPS の複合体の取り込みに類洞内皮細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンが受容体として関与していることが示された⁹⁾。

LPS の取り込みが血管内皮細胞を活性化するという報告がある¹¹⁾。そこで、LL-37 を介した LPS の取り込みが類洞内皮細胞を活性化するか調べるため、TLR4 の下流に位置する 2 つの炎症応答経路、すなわち、アダプター分子 myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) に依存する経路と依存しない経路の両者の活性化について検討することにした。hLSEC に LPS (100 ng/mL) を作用させると、MyD88 依存的応答である intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) の発現が上昇する (図 7A)。しかしながら、LL-37 (1~5 μ g/mL) を添加することで LPS 刺激による ICAM-1 発現は抑制されることがわかった (図 7A)。同様に、LPS は MyD88 非依存的応答である IFN- β の発現を上昇させたが、LL-37 は濃度依存的に抑制した (図 7B)。ここ

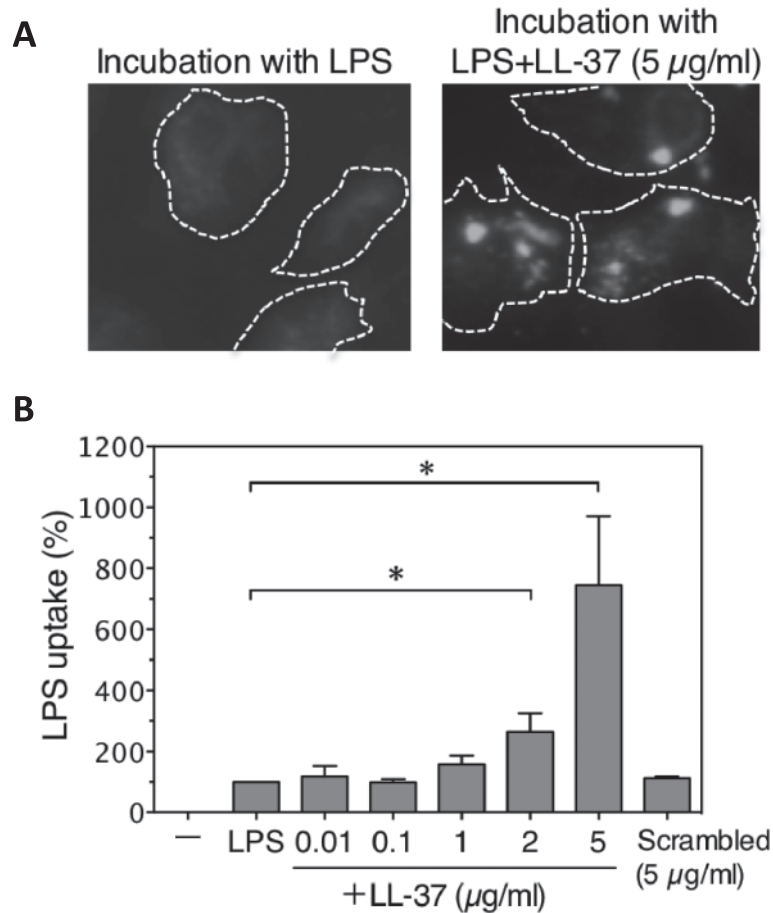


図4 肝類洞内皮細胞のLPSの取り込みに対するLL-37の効果
 A: LSECに蛍光標識したLPS (1 µg/mL)とLL-37 (5 µg/mL)を作用させて、LPSの取り込みを蛍光顕微鏡観察によって解析した。点線は細胞の輪郭を示す。
 B: 蛍光標識したLPS (100 ng/mL)をLL-37 (0.01~5 µg/mL)の存在下あるいは非存在下でLSECに作用させ、2時間後、LPSの取り込みをフローサイトメトリーで測定した。LL-37非存在下における取り込みを100%として表示した。(*: p<0.05)

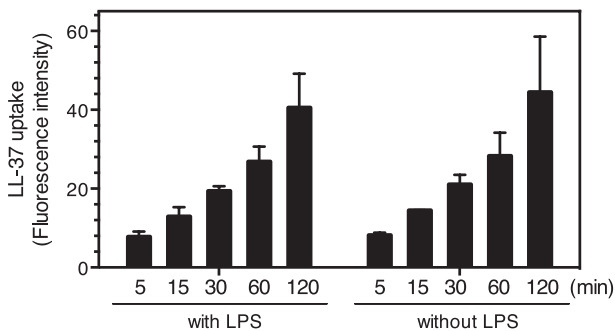


図5 肝類洞内皮細胞におけるLL-37の取り込み
 ビオチン標識したLL-37 (1 µg/mL)をLPS (100 ng/mL)の存在下あるいは非存在下でLSECに作用させ、表示時間後に細胞を回収、固定し、蛍光標識ストレプトアビジンで染色してフローサイトメトリーで測定した。LL-37の取り込みは蛍光強度で示した。

で、LPSの取り込みおよび炎症応答制御に効果を示すLL-37の濃度を比較してみると、重要なことに、LL-37がLPSの取り込みを促進する濃度において(図4)、LPS応答は抑制された(図7)。このことから、LL-37がLPSの取り込みを促進しても類洞内皮細胞におけるTLR4下流の炎症応答は活性化されることがわかった⁹⁾。したがって、LL-37を介したLPSの取り込みは類洞内皮細胞を活性化することなく、LPS除去の促進に寄与すると考えられた。

最後に、取り込まれたLL-37-LPS複合体の細胞内輸送を明らかにするため、異物除去を担うリソソームのマーカであるlysosomal-associated membrane protein-1 (LAMP-1)とLPS、あるいはLL-37との共染色を行った。その結果、LPSはLAMP-1抗体で染まるリソソーム内に検出され、また、LL-37も大部分がリソ

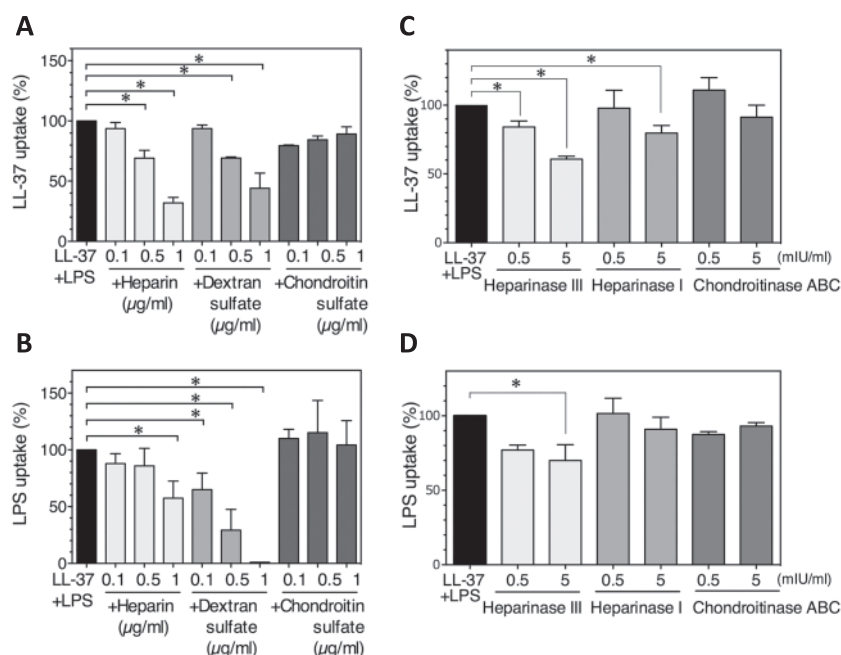


図 6 LL-37 と LPS の取り込みに対するグリコサミノグリカンの関与
 A-B: ヘパリン, デキストラン硫酸, コンドロイチン硫酸 (各 0.1, 0.5, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加して LL-37 (A) あるいは LPS (B) の取り込みに対する効果を調べた。取り込みはフローサイトメトリーで測定し、グリコサミノグリカン非存在下における取り込みを 100% として表示した。(* : $p < 0.05$)
 C-D: LSEC をグリコサミノグリカン分解酵素であるヘパリナーゼ I, III あるいはコンドロイチナーゼ ABC (各 0.5, 5 mIU/mL) で処理して、LL-37 (C) あるいは LPS (D) の取り込みに対する効果を調べた。取り込みはフローサイトメトリーで測定し、酵素未処理細胞における取り込みを 100% として表示した。(* : $p < 0.05$)

ソーム内に検出された (データ掲載せず)。これらの結果から、LL-37-LPS の複合体は類洞内皮細胞に取り込まれた後、リソソームに運ばれて分解される可能性が示された⁹⁾。

おわりに

本稿では、ヒト cathelicidin ペプチド LL-37 の血管内皮細胞に対する作用を紹介した。前半では、LPS で誘導される血管内皮細胞のアポトーシスに対し、LL-37 が抑制効果を表すことを示した。血管内皮細胞における LPS 受容体の発現は単球系細胞に比べ顕著に弱く¹²⁾、血管内皮細胞が LPS 応答細胞として注目されることは多くない。しかしながら、血管内皮細胞における LPS-TLR4 応答が敗血症の病態形成に大きくかかわるとして、近年、再認識されている¹³⁾。また、後半では肝臓特有の血液浄化機能に着目して、LL-37 が肝臓の類洞内皮細胞による LPS の取り込みを促進することを示した。このとき、類洞内皮細胞において TLR4 シグナルの活性化は起こらず、さらに、取り込まれた LPS が細胞内消化を担うリソソームに局在したことから、

LL-37 の作用は宿主細胞の活性化をすることなくエンドトキシン除去の促進に寄与すると考えられる。

謝 辞

日頃よりご指導いただき、また、この度の奨励賞にご推奨いただきました順天堂大学医学部生化学・生体防御学講座の長岡功教授に厚く御礼申し上げます。本研究は JSPS 科研費 (16K08789, 20590456) および私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 (S1201013) の支援を受けて行われました。

文 献

- 1) Larrick JW, Hirata M, Balint RF, et al. : Human CAP18 : a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun* 63 : 1291-1297, 1995
- 2) Johansson J, Gudmundsson GH, Rottenberg ME, et al. : Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *J Biol Chem* 273 : 3718-3724, 1998
- 3) Larrick JW, Morgan JG, Palings I, et al. : Complementary DNA sequence of rabbit CAP18—a unique lipopoly-

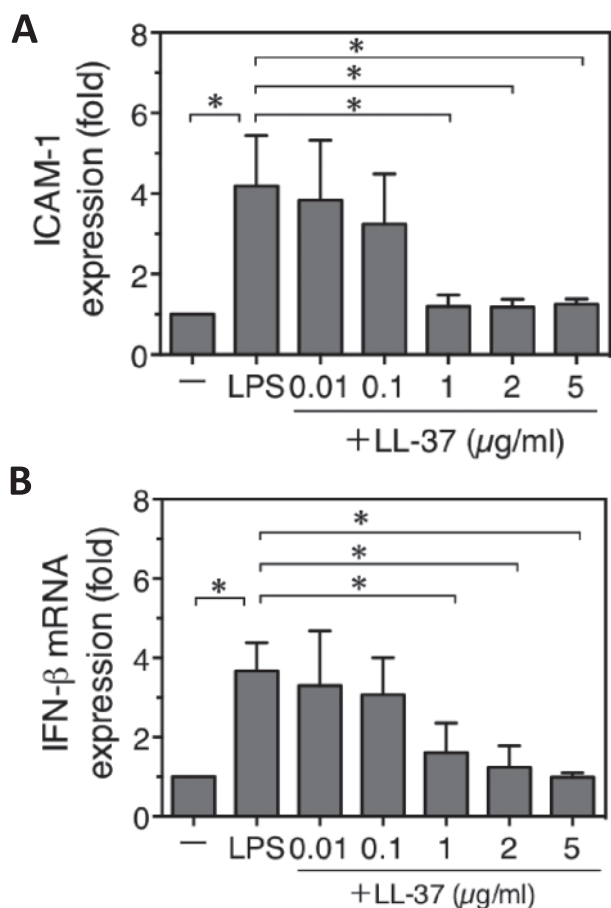


図7 TLR4の下流応答の活性化に対するLPSの取り込みの効果

A: LSECにLPS (100 ng/mL)をLL-37 (0.01~5 μg/mL)の存在下あるいは非存在下で作用させ、24時間後、ICAM-1の発現をウェスタンブロット法により定量した。結果は未刺激時の発現に対する比で表示した。(*: p<0.05)

B: LSECにLL-37 (0.01~5 μg/mL)の存在下あるいは非存在下でLPS (100 ng/mL)を作用させ、4時間後、IFN-βのmRNA発現をRT-PCR法により定量した。結果は未刺激時の発現に対する比で表示した。(*: p<0.05)

saccharide binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 179 : 170-175, 1991

- 4) Nagaoka I, Hirota S, Niyonsaba F, et al. : Cathelicidin family of antibacterial peptides CAP18 and CAP11 inhibit the expression of TNF-α by blocking the binding of LPS to CD14⁺ cells. *J Immunol* 167 : 3329-3338, 2001
- 5) Suzuki K, Murakami T, Kuwahara-Arai K, et al. : Human anti-microbial cathelicidin peptide LL-37 suppresses the LPS-induced apoptosis of endothelial cells. *Int Immunol* 23 : 185-193, 2011
- 6) Galanos C, Freudenberg MA, Reutter W : Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 76 : 5939-5943, 1979
- 7) Namisaki T, Yoshiji H, Kojima H, et al. : Salvage effect of the vascular endothelial growth factor on chemically induced acute severe liver injury in rats. *J Hepatol* 44 : 568-575, 2006
- 8) Kamimoto M, Rung-Ruangkijkrui T, Iwanaga T : Uptake ability of hepatic sinusoidal endothelial cells and enhancement by lipopolysaccharide. *Biomed Res* 26 : 99-107, 2005
- 9) Suzuki K, Murakami T, Hu Z, et al. : Human host defense cathelicidin peptide LL-37 enhances the lipopolysaccharide uptake by liver sinusoidal endothelial cells without cell activation. *J Immunol* 196 : 1138-1147, 2016
- 10) Kaneider NC, Djanani A, Wiedermann CJ : Heparan sulfate proteoglycan-involving immunomodulation by cathelicidin antimicrobial peptides LL-37 and PR-39. *ScientificWorldJournal* 7 : 1832-1838, 2007
- 11) Dunzendorfer S, Lee HK, Soldau K, et al. : Toll-like receptor 4 functions intracellularly in human coronary artery endothelial cells : roles of LBP and sCD14 in mediating LPS responses. *FASEB J* 18 : 1117-1119, 2004
- 12) Lloyd-Jones KL, Kelly MM, Kubes P : Varying importance of soluble and membrane CD14 in endothelial detection of lipopolysaccharide. *J Immunol* 181 : 1446-1453, 2008
- 13) Khakpour S, Wilhelmssen K, Hellman J : Vascular endothelial cell Toll-like receptor pathways in sepsis. *Innate Immun* 21 : 827-846, 2015

<鹿児島空港>



【2階出発口前 スカイショップ】

- 6番ゲート隣・前「スカイテラス」
- 9番ゲート売店
- 2階出発口前「スカイショップ」

鹿児島中央駅2階「えきマチー丁目」
ぐるめ横丁 <塩おでん 金久>

薩摩の焼酎・お料理をご用意しております。
旅の一幕に、一杯呑んでお帰り下さい。



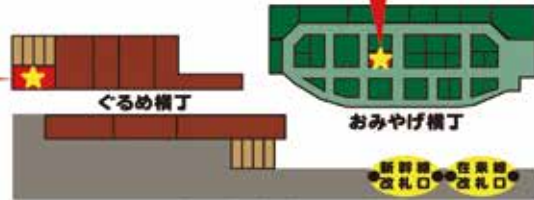
くろず屋の標は、安心・安全の証。
皆さまの健康作りのお手伝い...
それが私共、くろず屋の願いです。



鹿児島中央駅2階「えきマチー丁目」
みやげ横丁 <くろず屋>



老舗の黒酢商品を多数取り揃えております。
鹿児島土産や毎日の健康のお供に。



【鹿児島中央駅 2階】

生きてまます腸まで届く

生菌製剤

ミヤBM[®] 細粒

MIYA-BM[®] FINE GRANULES

生菌製剤

ミヤBM[®] 錠

MIYA-BM[®] TABLETS

酪酸菌(宮入菌)製剤

Clostridium butyricum MIYAIRI 株

【効能・効果】 腸内菌叢の異常による諸症状の改善

【用法・用量】 <ミヤBM[®] 細粒> 通常、成人1日1.5~3gを3回に分割経口投与する。なお、年齢、症状により適宜増減する。
<ミヤBM[®] 錠> 通常、成人1日3~6錠を3回に分割経口投与する。なお、年齢、症状により適宜増減する。

【使用上の注意】 1.副作用:宮入菌を有効成分とする製剤(宮入菌製剤)を使用した症例641例中、報告された副作用は無かった。
2.適用上の注意:アミノフィリン、イソニアジドとの配合により着色することがあるので、配合を避けることが望ましい。

キラリと光るグローバルプロバイオティクス製薬企業

Miyarisan ミヤリサン製薬株式会社

資料請求先: [事業戦略部学術課] 東京都北区上中里1丁目10-3 TEL03-3917-1191 FAX03-3940-1140

薬価基準収載



第3章

平成28年度日本エンドトキシン・
自然免疫研究会奨励賞・優秀賞

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¹⁾, 藤本ゆかり²⁾, 深瀬 浩一¹⁾

¹⁾大阪大学大学院理学研究科, ²⁾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¹⁾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²⁾。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 α 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³⁾。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⁴⁾。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⁵⁾。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ポルフィロモナス・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⁶⁾。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⁷⁾。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

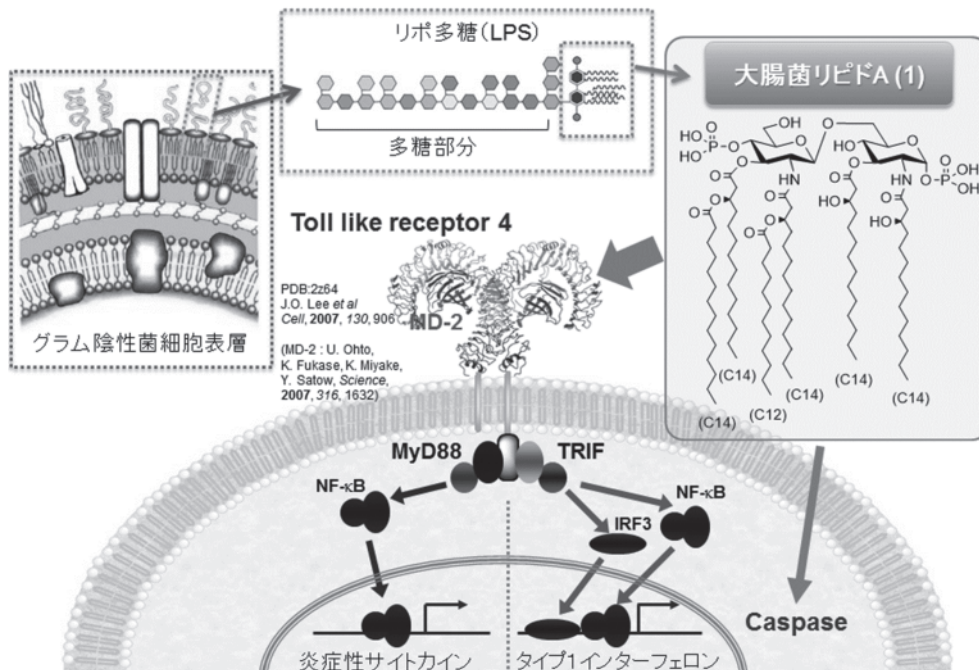


図 1 TLR4 を介した自然免疫活性化機構

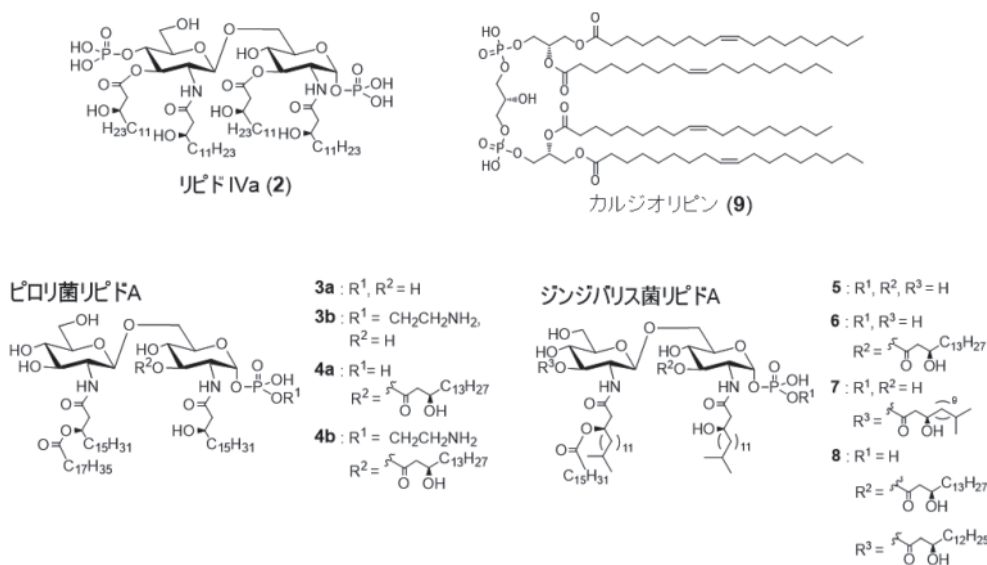


図 2 さまざまなリポド A およびカルジオリピンの化学構造

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^{4a,8)}。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- α 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- α 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- α 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

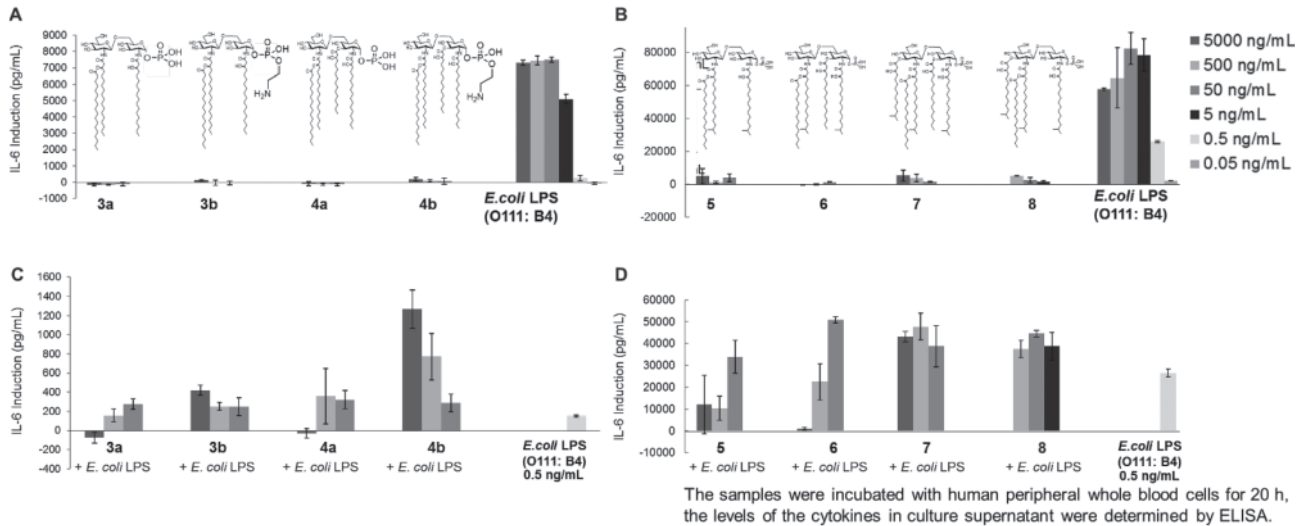


図3 寄生菌リポド A (3-8) のヒト末梢全血中でのサイトカイン誘導および大腸菌 LPS (O111:B4 株) のサイトカイン誘導に対する阻害活性³⁾。
A および C : IL-6 誘導活性, B および D : 阻害活性。

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⁹⁾と依存しないという報告¹⁰⁾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- κ 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³⁾、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^{4b)}。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¹¹⁾、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、リピドAを分解してリピドIVa(2)に導き、そのアンタゴニスト作用を利用して、リポ多糖やリピド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¹²⁾。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) Triantafilou 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

第4章

一般演題

1. Low Endotoxin Recovery (LER) における影響因子

土谷 正和

Charles River, Microbial Solutions

はじめに

Low Endotoxin Recovery (LER) は、製品に添加した標準エンドトキシンの活性が十分に回収できない現象であり、主としてキレート剤と界面活性剤を含む製剤で観察されている^{1,2)}。米国食品医薬品局 (FDA) がこれを患者に対するリスクと考えていることから³⁾、現在、医薬品業界で問題となっている。LER における影響因子については、温度、pH、緩衝液や界面活性剤の種類、攪拌方法などが報告されているが^{4,5)}、その影響に関する動力学的な解析はみあたらない。今回、LER における影響因子として温度、pH、塩濃度、クエン酸濃度、リン酸濃度、ポリソルベート 20 濃度について、これらの LER に対する影響を動力学的に調べた⁶⁾。

1. LER 溶液中のエンドトキシン活性の動力学的解析

LER 条件における米国標準エンドトキシン (RSE) の活性変化の反応速度定数を測定した。LER におけるエンドトキシン活性の変化を活性型 (LPS_a) から不活性型 (LPS_i) への一次反応と見なせると仮定し、反応速度を v 、反応速度定数を k とすると、

$$v = -d [LPS_a] / dt = k [LPS_a]$$

LPS_a の初期濃度を c 、時間 t における LPS_a の減少濃度を x とすると、

$$-d (c - x) / dt = dx / dt = k (c - x)$$

上式を積分すると、 $t=0$ のとき $x=0$ なので、

$$k = 1/t * \ln (c / (c - x))$$

この式を変形して、

$$\ln (c / (c - x)) = kt$$

LPS_a が回収率で表されるとき、 $c=1$ 、 $c-x$ は時間 t における回収率となるので、時間 t とエンドトキシン回収率の逆数の自然対数をプロットし、その傾きを k として得た。このプロットにおける相関係数は、傾きが小さい (0.1 以下) のもの (30 測定中 3 例) を除き、すべて 0.97 以上と良好であった。すなわち、LER を見かけの一次反応とする仮定は妥当と考えられた。

LER の程度を評価するため、RSE 活性が 50% になるまでの時間を、半減期 (LER50) として次式で求めた。

$$LER50 = \ln (1/0.5) / k = 0.693 / k$$

RSE 活性の経時的変化の測定は、以下の方法で行っ

た。LER 条件の溶液を設定温度で保温した後、エンドトキシンを添加して反応を開始した。この反応液から 0.01 mL の試料を採取し、あらかじめ等量のエンドトキシン試験用水を添加したリムルス試薬 (LAL) 0.2 mL に添加し、トキシノメーター (和光純薬) で活性を測定した。この方法は、試料を別途希釈する必要がないため、経時的変化の測定に適していた。

2. LER における影響因子

温度、pH、塩濃度が LER 溶液中の RSE の半減期に及ぼす影響を図 1~3 に示す。RSE 活性の低下には、温度の影響が大きく、温度が高いほど半減期は短かった (図 1)。室温 (約 25°C) と冷蔵 (約 3°C) では、半減期が 100 倍程度の差を示した。また、半減期は pH が高いほど短く、クエン酸とリン酸で影響の程度が異なった (図 2)。この原因として、クエン酸がキレート剤であるのに対し、リン酸は LPS のリン酸基と競合的に二価イオンを奪い合っているため、違いが生じた可能性が考えられる。温度および pH が示した傾向は、Reich らの報告⁴⁾と同様であった。塩濃度と半減期には正の相関が認められ、濃度が低いほど半減期は短かった (図 3)。

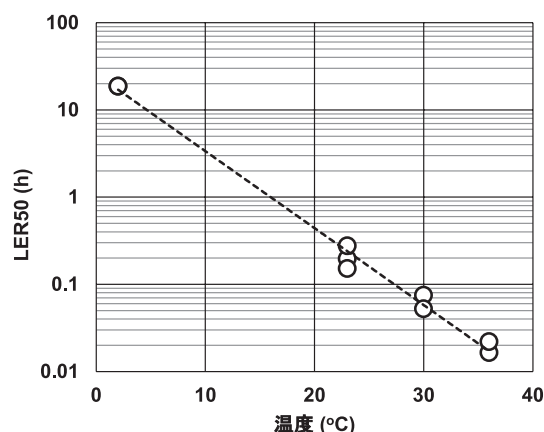


図 1 温度が LER 溶液中の RSE の半減期に及ぼす影響

LER 溶液として、0.2~5.0 EU/mL の RSE を含む 10 mM クエン酸ナトリウム、0.05% ポリソルベート 20 (pH 7.3~7.4) を使用した。点線は回帰直線を表し、回帰係数が -0.996 と良好な直線性を示した。

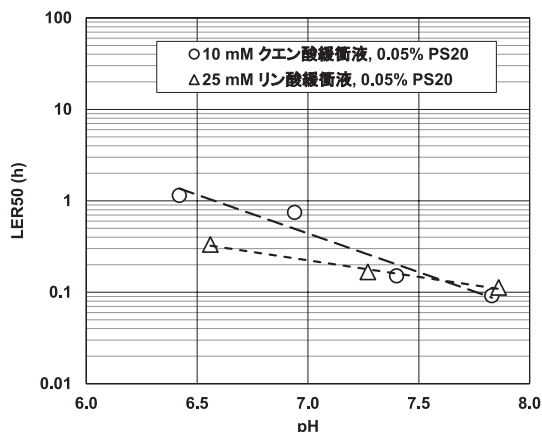


図 2 pH が LER 溶液中の RSE の半減期に及ぼす影響

LER 溶液として、5.0 EU/mL の RSE を含む 10 mM クエン酸ナトリウム、0.05 %ポリソルベート 20 (pH 6.4~7.8, ○) ならびに 25 mM リン酸緩衝液、0.05 %ポリソルベート 20 (pH 6.6~7.9, △) を使用した。点線は回帰直線を表し、回帰係数も -0.967 (クエン酸), -0.994 (リン酸) と良好な直線性を示した。

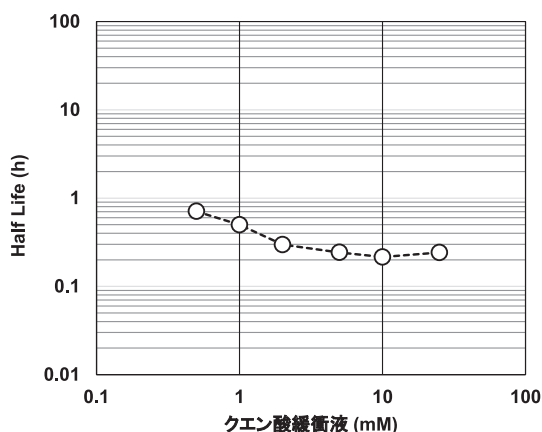


図 4 クエン酸濃度が LER 溶液中の RSE の半減期に及ぼす影響

LER 溶液として、5.0 EU/mL の RSE を含む 0.5~25 mM クエン酸ナトリウム、0.05 %ポリソルベート 20、0.8%塩化ナトリウム (pH 7.4) を使用した。

LER 溶液の成分として一般的に用いられるクエン酸、リン酸、ポリソルベート 20 (PS20) の濃度が、LER 溶液中の RSE の半減期に及ぼす影響を調べた。クエン酸は、低濃度で半減期が長い傾向があったが、通常の使用濃度(5~25 mM)では変化が認められなかった(図 4)。リン酸濃度の対数と半減期の対数には負の直線関係が認められた (図 5)。この違いも、リン酸とクエン酸の二価イオンに対する作用の違いに起因する可能性が考

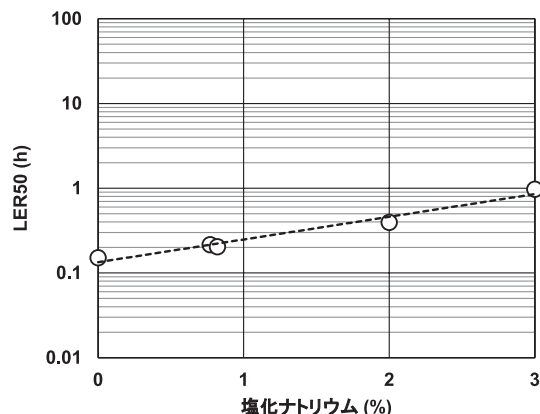


図 3 塩化ナトリウム濃度が LER 溶液中の RSE の半減期に及ぼす影響

LER 溶液として、5.0 EU/mL の RSE を含む 10 mM クエン酸ナトリウム、0.05 %ポリソルベート 20 (pH 7.4) を使用した。点線は回帰直線を表し、回帰係数が -0.986 と良好な直線性を示した。

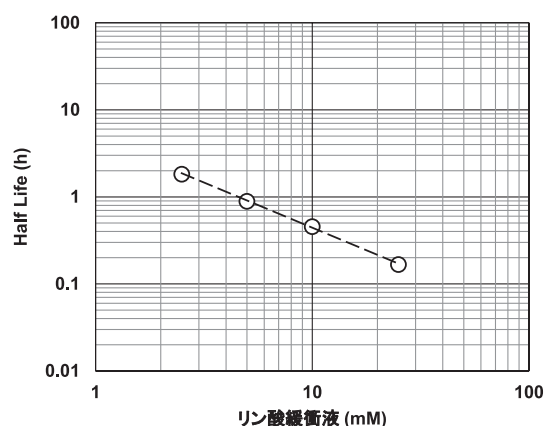


図 5 リン酸濃度が LER 溶液中の RSE の半減期に及ぼす影響

LER 溶液として、5.0 EU/mL の RSE を含む 2.5~25 mM リン酸緩衝液、0.05 %ポリソルベート 20 (pH 7.1~7.4) を使用した。点線は両対数グラフの回帰直線を表し、回帰係数が -1.00 と良好な直線性を示した。

えられる。ポリソルベート 20 濃度は、低濃度で長い半減期を示したが、通常の使用濃度 (0.01%~0.2%) ではほぼ一定であった (図 6)。

おわりに

エンドトキシン試験法は、ウサギを用いた発熱性試験法の代替法であり、試料中のエンドトキシン活性を測定するものである。エンドトキシン活性は、エンドトキシン単位 (EU) で表される。エンドトキシン試験法は、エンドトキシンの活性を測定しており、エンドト

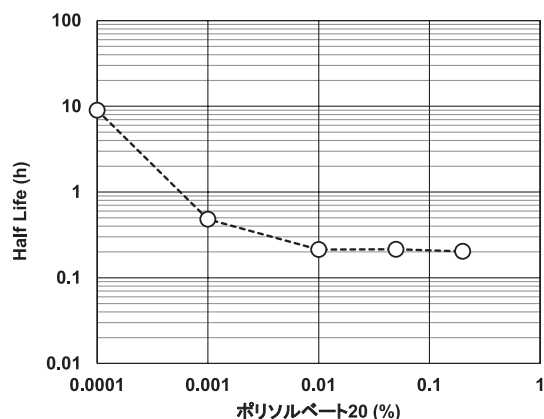


図 6 ポリソルベート 20 濃度が LER 溶液中の RSE の半減期に及ぼす影響
LER 溶液として、5.0 EU/mL の RSE を含む 10 mM クエン酸ナトリウム、0.0001 %~0.2% ポリソルベート 20 (pH 7.4) を使用した。

キシンの重量や絶対量を測定しているわけではない。われわれは、標準エンドトキシンの重量を知っているため、その比活性 (EU/ng) を計算できるし、これを標準品の品質検査に用いることができる。しかし、実際の試料中のエンドトキシンはその由来も分からず、比活性を知ることはほぼ不可能である。試料に添加した標準エンドトキシンの活性が変化することは、その試料の条件が通常使用される標準品の状態と異なっているために起こる現象である。エンドトキシン試験法が、試料中のあるがままのエンドトキシン活性を測定するための試験であることを考えると、LER はエンドトキシン試験法自体の問題とは考えにくい。仮に、エンドトキシン試験法で検出できない LPS があるとすれば、それは新しい研究対象であり、その生体への影響は今

後調べていく必要のあるものかもしれない。いずれにしても、測定できない LER 条件下の LPS は、これまでエンドトキシン試験法で検査してきた対象とは異なるものであることは間違いない。この点で、FDA が LER をエンドトキシン試験法上の問題として捉えているとすれば、大きな間違いである。ただ、エンドトキシン試験法で検出できない LPS のリスクについては、これまで全く研究されておらず、人体への影響がないとはいえない。この点については、今後の研究が期待される。今回の結果は、LPS の LER 条件下における挙動を理解するために役立つものと思われる。また、LER を抑えることが必要な場合は、低い pH、高い塩濃度が好ましく、試料をできるだけ低温で保存することがとくに重要と考えられる。

文 献

- 1) Eaton J : LER : The Challenge of Meeting Regulatory Expectations. PDA Lett 51(10) : 22, 2015
- 2) Chen D, Wintzingerode F, Eaton J, et al : PDA LER Task Force Holds its First Workshop. PDA Lett 52(8) : 16-18, 2016
- 3) Hughes PF, Thomas C, Suvarna, K, et al : Low Endotoxin Recovery : An FDA Perspective. BioPharma Asia 4 : 14-25, 2015
- 4) Reich J, Lang P, Grallert H, et al : Masking of endotoxin in surfactant samples : Effects on Limulus-based detection systems. Biologicals 44 : 417-422, 2016
- 5) Bolden JS, Warburton RE, Phelan R, et al : Endotoxin recovery using limulus amebocyte lysate (LAL) assay. Biologicals 44 : 434-440, 2016
- 6) Tsuchiya M : Factors affecting reduction of reference endotoxin standard activity caused by chelating agent/detergent matrices. (To be published)

2. 潰瘍性大腸炎手術症例での ESP 法でのエンドトキシン推移の検討

清水 智治¹⁾, 小幡 徹¹⁾, 園田 寛道¹⁾, 三宅 亨¹⁾, 遠藤 善裕¹⁾
谷 徹²⁾, 谷 眞至¹⁾

¹⁾滋賀医科大学外科学講座, ²⁾同 バイオメディカル・イノベーションセンター

はじめに

グラム陰性菌の細胞壁成分であるエンドトキシン (ET) は非常に強い急性炎症反応を引き起こす物質とされており, マクロファージなどの免疫担当細胞を刺激して, 種々の炎症性サイトカイン, 血小板活性化因子, 一酸化窒素などを産生し, 致死的な循環不全や多臓器不全の原因となると考えられている¹⁾。

潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis : UC) は, 原因不明の炎症性腸疾患であり, 大腸に広範囲の潰瘍性病変を形成して, 出血などの症状を来す。大腸粘膜の荒廃により腸内細菌に含まれる ET が生体内へ流入してくる可能性が指摘されている²⁾。

今回, UC で手術を必要とした症例での新しい高感度 ET 測定法³⁻⁴⁾である ESP 法での ET の推移を検討したので報告する。

1. 症例 1

36 歳女性, 5 年前に UC・全大腸型を発症した。慢性持続型でステロイド投与, シクロスポリン持続投与されるが寛解に至らず, 外来にて内服薬にて治療を行われていた。ステロイド副作用により圧迫骨折を併じたため手術適応と判断された。手術直前の臨床的重症度分類は中等症, Seo's index : 212.3 (中等症) の診断であった。下部消化管内視鏡検査では, 粘膜は深い潰瘍

はみられないが易出血性で浅い潰瘍や顆粒状粘膜が連続性に広がり, Matts Grade 3-4 と判断された (図 1)。

腹腔鏡下大腸全摘術, 回腸 J 型囊肛門吻合術, 一時的な小腸人工肛門造設術が施行された。手術時間 715 分, 出血量 850 mL であった。術前には発熱なく, 敗血症様の症状は認めなかった。術前の ESP 法での ET 値は高値を示したが, 手術直後, 術後 1 日目には低下した (表 1)。従来法での ET 値は検出限界以下であった。術後経過は良好であり, Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) の項目も 2 ポイント以下で合併症なく術後在院日数 18 日で退院となった。

2. 症例 2

42 歳女性, 1 年前に UC・全大腸型を発症した。3 カ月前に内科入院となり免疫抑制剤などにより治療されたが, 免疫抑制剤によるコントロールも困難であり, 手

表 1 各種検査所見 (症例 1)

	術前	術直後	POD1	POD5	POD7
ESP (pg/mL)	32.1	3.8	10.7	—	—
WBC (/mm ³)	5,300	13,800	8,900	8,100	7,400
CRP (mg/dL)	1.74	17.29	18.34	1.22	2.68
SIRS 項目数	0	1	1	0	0

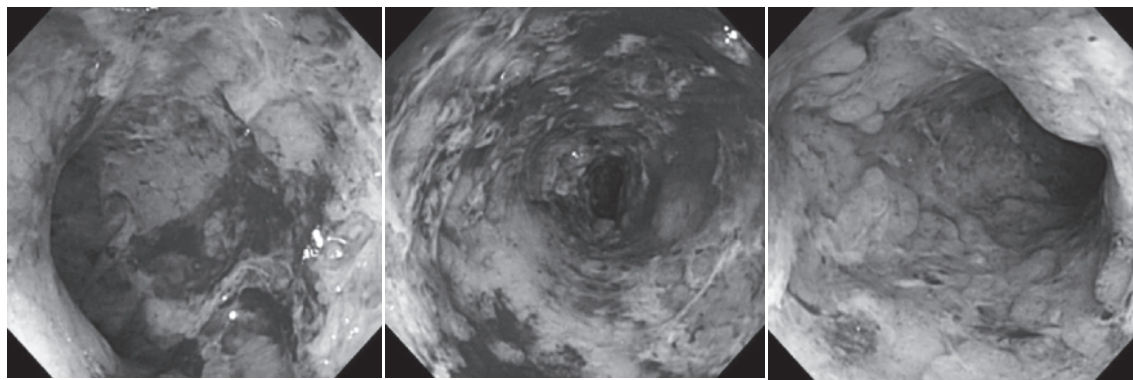


図 1 下部消化管内視鏡検査所見 (症例 1)

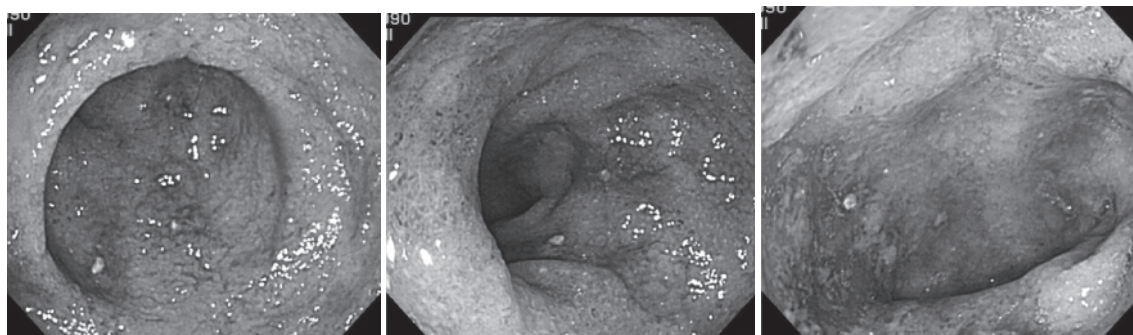


図2 下部消化管内視鏡検査所見 (症例2)

表2 各種検査所見 (症例2)

	術前	術直後	POD1	POD5	POD7
ESP (pg/mL)	62.5	11.8	3.6	—	—
WBC (/mm ³)	6,200	14,600	11,200	4,300	4,800
CRP (mg/dL)	0.1	8.96	12.48	2.41	1.01
SIRS 項目数	0	1	1	0	0

表3 各種検査所見 (症例3)

	術前	術直後	POD1	POD5	POD7
ESP (pg/mL)	302	3.2	163	—	—
WBC (/mm ³)	22,100	20,100	18,800	26,800	15,800
CRP (mg/dL)	16.04	15.84	14.45	17.89	1.31
SIRS 項目数	4	4	2	3	3

術適応と判断された。手術直前にはタクロリム点滴、ペンタサ、プレトニゾン 10 mg、白血球除去療法が施行されていた。臨床的重症度分類は、入院時に中等症であったが、手術前には重症と診断された、Seo's index は入院時 256.8 (重症) から手術前 218.7 (中等症) と変化していた。下部消化管内視鏡検査では、全周性に小顆粒状の粘膜があり、易出血性で、明らかな潰瘍形成は認めず、Matts grade 3 であった (図2)。腹腔鏡下大腸全摘術、回腸J型囊肛門吻合術、一時的な小腸人工肛門造設術を施行、手術時間 404 分、出血量 510 mL であった。症例1と同様に術前に敗血症様の症状は認めず、術前の高値を示した ESP 法での ET 値は手術後には低下し、従来法では検出されなかった (表2)。術後経過は良好であり、術後在院日数 9 日で退院となった。

3. 症例3

62 歳男性、2 週間前に下血にて他院を受診し、潰瘍性大腸炎・全大腸型と診断され、入院加療を受けていた。腹痛憎悪があり、意識レベルの低下を認めたため、当院に転院となった。転院時の腹部 CT 検査にて、中毒性巨大結腸症と診断され、緊急手術となった。臨床的重症度分類は劇症型、開腹結腸全全摘術、小腸人工肛門造設術を施行、手術時間 171 分、出血量 1,315 mL であった。術前から敗血症性ショックの状態であった。術前の非常に高値を示した ESP 法での ET 値は手術後には低下し、術翌日に再上昇を認めた。術後集中治療管理を必要とした。術後在院日数 100 日で退院となった。

4. 考察

ESP 法での健常人での ET は中央値 0.0738 pg/mL (0.0312~0.3445 pg/mL) であった。比濁時間分析法では、健常人では ET は検出されないと報告されている。ESP 法は高感度であるので、感染徴候のない“健常”と考えられている人でも数十 pg/mL の Et 値を検出することがあるが、その意義については今後の検討を要する³⁾。

先行研究では、UC 患者での血中 ET の上昇の報告がされている。Aoki らは 1978 年にラジオイムノアッセイを用いて活動性 UC 患者の血漿中 ET の上昇を報告している⁵⁾。この報告以降では、リムルス試薬を用いて UC 患者の ET は健常コントロールと比較して軽度上昇⁶⁾もしくは高い傾向にあるが有意差がないとの報告が多い⁷⁾。われわれの観察との違いは、血液採取のタイミングや測定方法の違いによると考えられる。

UC の重症症例で高 ET 血症を観察し、トレミキシンTMによる ET 吸着療法を 2 回施行したところ、その 2 週間後に症状が緩解した報告がある⁸⁾。今回の検討では、重症症例で ET の高値を認めたことから、トレミキシンが難治性重症患者の治療のターゲットとなる可能性が考えられる。

おわりに

少数例の検討ではあるが、UC における ESP 法による血中 ET 測定は、術前の病勢を評価できる可能性が示唆された。今後、UC や敗血症患者に対する大規模な

症例検討と一般の医療施設でも測定が可能となるように汎用機器や ESP 法に最適な測定キットの開発が必要であると考えている。

謝 辞

本研究の一部は学術研究助成基金助成金基盤研究 (C) (一般) 課題番号 16K10536 による。

文 献

- 1) Shimizu T, Obata T, Sonoda H, et al. : Diagnostic potential of endotoxin scattering photometry for sepsis and septic shock. *Shock* 40 : 504-511, 2013
- 2) McGuckin MA, Eri R, Simms LA, et al. : Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 15 : 100-113, 2009
- 3) 小幡徹 : 臨床試料における新しい高感度エンドトキシン測定法. *日血栓止血会誌* 20 : 66-71, 2009
- 4) 清水智治, 小幡徹, 赤堀浩也, 他 : Endotoxin scattering photometry (ESP) 法による血中 ET 測定の現状と課題. “エンドトキシン・自然免疫研究 15” 筒井ひろ子, 他編. 医学図書出版, 2012, p31-34
- 5) Aoki K : A study of endotoxemia in ulcerative colitis and Crohn's disease. I. Clinical study. *Acta Med Okayama* 32 : 147-158, 1978
- 6) Gardiner KR, Halliday MI, Barclay GR, et al. : Significance of systemic endotoxaemia in inflammatory bowel disease. *Gut* 36 : 897-901, 1995
- 7) Kruis W, Schussler P, Weinzierl M, et al. : Circulating lipid A antibodies despite absence of systemic endotoxemia in patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 29 : 502-507, 1984
- 8) Nakamura T, Kawagoe Y, Ueda Y, et al. : Polymyxin B-immobilized fiber hemoperfusion in a patient with active ulcerative colitis. *ASAIO J* 51 : 471-473, 2005

3. エンドトキシン誘発急性肝障害ラットモデルにおける肝ヘム代謝関連蛋白の動態

高橋 徹

岡山県立大学保健福祉学部

はじめに

2016年、敗血症が新たに「感染に対する宿主生体反応の調節不全で生命を脅かす臓器障害」と定義された¹⁾。敗血症の宿主生体反応の調節不全として、感染により免疫系の正常な制御を逸脱した全身性炎症反応があげられる。この過剰な全身性炎症反応により惹起された酸化ストレスが多臓器不全を引き起こし、しばしば致死的原因となる。

ヘムは、ヘモグロビン、ミオグロビン、チトクロームなど生体が生きていく上で必須のヘム蛋白の補欠分子である。しかし、ヘム蛋白から遊離したヘムは炎症細胞のパターン認識受容体 (pattern-recognition receptor: PRR) によって認識され、炎症反応を惹起する傷害関連分子パターン (damage-associated molecular patterns: DAMPs) の一つであると提唱されている²⁾。また、遊離ヘムは脂溶性の鉄であることから、酸化ストレスを増幅することにより、実質細胞を障害することが知られている²⁾。実際、盲腸結紮穿孔 (cecal ligation and puncture: CLP) によるマウス敗血症モデルで、遊離のヘムが病態の悪化に大きな役割を果たしていることが報告されている³⁾。

一方、生体には過剰な遊離ヘムを分解するための生体防御機構が備わっている。これがヘム分解の律速酵素 Heme Oxygenase-1 (HO-1) である⁴⁾。ヘムは HO-1 によって分解される過程で、CO、鉄を遊離しビリベルジンに変換される。ビリベルジンはビリベルジン還元酵素によってビリルビンにただちに交換される。また、鉄はフェリチンによって取り込まれる。HO-1 の分解によって生成された微量の CO、生理的範囲内のビリルビンは抗炎症・抗酸化・抗アポトーシス作用を有することから、HO-1 は pro-oxidant であるヘムを分解し、CO、ビリルビンなど生体防御的に働く物質を生成するストレス蛋白の一つに位置付けられている⁴⁾。

Bach1 は HO-1 の抑制性転写因子であり、遊離ヘムが増加するとヘム-Bach1 複合体が形成され核外に汲み出され、その結果 HO-1 が誘導されることが *in vitro* の系を用いて明らかにされている⁵⁾。しかし、*in vivo* のヘム増強性の酸化ストレス下における HO-1 の誘導調節

機構については、完全に明らかになっているとは言い難い。

そこで、本稿では、敗血症の重症化に遊離ヘムが果たす役割について概説した後、エンドトキシン (lipopolysaccharide: LPS) 誘発急性肝障害ラットモデルにおける肝 Bach1 の動態を遊離ヘムと関連させて検討した私たちの研究について述べる。

1. 敗血症の重症化に遊離ヘムが果たす役割

1-1. 遊離ヘムの生成と動態²⁾

敗血症では少なからず溶血が発生し、赤血球からヘモグロビンが遊離する。ヘモグロビンのヘム鉄は二価から三価に酸化され、メトヘモグロビンになる。さらに、メトヘモグロビンからヘム分子は遊離し、酸化還元反応活性化能を有する遊離ヘムが生ずる。細胞外のヘモグロビン、遊離ヘムは、血漿中のハプトグロビン、ヘモペキシンによってそれぞれ、捕捉される。ハプトグロビン/ヘモグロビン複合体、ヘモペキシン/ヘム複合体は、CD163、CD91 受容体を介してマクロファージに取り込まれ、マクロファージ内に誘導された HO-1 によって分解、無害化される。一方、著しい溶血が発生し、ハプトグロビンとヘモペキシンの除去能を上回るヘモグロビン・ヘムが生じると遊離ヘムは血漿中に蓄積し、炎症反応増強作用を有する DAMPs、また、酸化ストレス増幅作用を有する pro-oxidant として、病態増悪化に貢献する。

1-2. 遊離ヘムの炎症反応増強作用²⁾

ヘム蛋白から遊離したヘムは炎症反応増強作用を有する。ヘムは Toll-like receptor-4 (TLR4) のアゴニストであることが報告されている。ヘムは TLR4 を介して、好中球を活性化し、その遊走能を増強し、neutrophil extracellular traps (NETs) の生成を促進する。マクロファージにおいては、ヘムは TLR4-MyD88 経路を介して tumor necrosis factor (TNF) の分泌促進作用を示す。また、NLRP3 インフラマソームを介して、IL-1 β の分泌を促進する。さらに遊離ヘムは、LPS 刺激によるマクロファージのサイトカイン産生を増強することが報告されている。血管内皮細胞に対して、ヘムは TLR4

を介して、血管透過性を亢進させる。これらのヘムの作用は適度であれば感染に対して生体保護的に働くが、その反応が過剰となった場合、過剰な炎症反応・凝固反応を引き起こし、敗血症の重篤化に寄与する。

1-3. 遊離ヘムの酸化ストレス増幅作用²⁾

遊離ヘムは炎症反応を増幅するのみならず、Reactive Oxygen Species (ROS) の産生を増強することにより、実質細胞に障害を与える。ヘムは、ヘム蛋白のヘムポケットに収まっている間は、生体の維持に重要な働きをしている。しかし、ヘム蛋白から遊離したヘムは、疎水性蛋白であるため、細胞膜のリン脂質のような非極性分子と相互反応を起こしやすい。例えば、TNFでprimingされた細胞では、発生した過酸化水素から反応性に富むヒドロキシラジカルを産生するフェントン反応を触媒することにより、ROS産生を促進し、細胞膜の脂質過酸化を引き起こす。その結果、細胞はアポトーシスに陥る。すなわち、遊離ヘムは酸化ストレスをpro-oxidantとして増幅することにより、実質細胞に対して細胞毒増幅因子として作用する。

2. 敗血症性肝障害におけるヘム関連蛋白の動態

2-1. 敗血症性肝障害における遊離ヘムの増加

先述したように敗血症は「感染に対する宿主生体反応の調節不全で生命を脅かす臓器障害」がその本態である。肝臓は生体にとって必須物質である栄養素の合成・代謝、薬物・毒物の解毒、さらには免疫応答にもかかわっていることから、敗血症による肝障害はその重篤化の大きな要因となる。われわれは、雄性SDラットにエンドトキシン (Lipopolysaccharide : LPS : 10 mg/kg) を静脈内投与しエンドトキセミアで特徴づけられる敗血症モデルを作製した。本モデルではLPS投与後、血清AST・ALT値が有意に上昇し、組織学的にも巣状壊死をともなう肝傷害像が認められた。また、LPS投与後HO-1 mRNAの発現増加とヘム合成の律速酵素：デルタアミノレブリン酸合成酵素 (δ -aminolevulinic acid synthase : ALAS1) mRNAの発現抑制が認められた。細胞内の遊離ヘムはpro-oxidant、炎症増強因子として実質細胞にとっても有害であることから、恒常状態では、細胞内で極めて低レベルに保たれており、その調節はALAS1とHO-1によって行われている⁴⁾。すなわち、ヘムによってALAS1の発現は低下し、HO-1の発現は上昇する⁴⁾。したがって、LPS投与後、HO-1の発現増加とALAS1の発現抑制がみられたことは、肝細胞内の遊離ヘムが増加したことを示唆している。肝細胞内で遊離ヘムを供給するヘム蛋白は明らかでない。しかし、肝臓内では薬物代謝酵素チトクロームP450が主要なヘム蛋白であり、薬物性の肝障害では薬物の代

謝にもなっておりチトクロームP450が崩壊することが報告されていることから⁴⁾、LPSによって障害を受けたチトクロームP450のヘムが遊離ヘムの増加に関与している可能性が考えられる。

2-2. 敗血症性肝障害におけるHO-1抑制性転写因子：Bach1の動態

Bach1はヘムによって調節されるHO-1遺伝子の抑制性転写因子である⁵⁾。すなわち、Bach1は恒常状態ではHO-1の転写調節領域にあるmaf recognition element (MARE) 配列に小maf蛋白とともに結合し、HO-1の転写活性化を抑制している。一方、細胞内の遊離ヘム濃度が上昇するとヘムとBach1は結合し、その複合体は核外に運びだされ、代わりに、転写因子Nrf2と小maf蛋白が二量体を作りMARE配列に結合しHO-1の転写が開始される。このBach1を介するヘムによるHO-1遺伝子の転写調節化のメカニズムは*in vitro*の系を用いた実験で明らかにされた。

われわれは、敗血症急性肝障害モデルにおけるBach1の動態を明らかにするために、LPS投与後の肝細胞の核分画のBach1蛋白発現の変化をWestern blot法を用いて経時的に検討した。核Bach1蛋白は無処置のラットでは有意な発現が認められていたが、LPS投与ラットでは、投与1時間後にその発現は著明に低下した。LPS投与1時間後の核Bach1レベルを生食投与による対照ラットの1時間後の核Bach1レベルと比べると前者は後者の10%以下であった。その後、核Bach1蛋白の発現は急激に回復し、3時間後には、ほぼ無処置ラットのレベルに復した。このLPSによる核内Bach1発現低下における遊離ヘムの関与を検討するために、ラットに50 mg/kgのヘム単独投与を行い、1時間後に肝細胞の核Bach1蛋白レベルを検討した。その結果、興味深いことに、ヘム単独投与によっても核Bach1蛋白レベルは、顕著に低下した。ヘム投与1時間後の核Bach1レベルを生食投与による対照ラットの1時間後の核Bach1レベルと比べるとLPS投与と同様に前者は後者の10%未満であった。この事実は、間接的ではあるが、LPS投与後の核Bach1レベルの一過性の低下に肝細胞内に増加した遊離ヘムが関係することを示唆している。

LPS投与は肝臓の核Bach1蛋白の発現に顕著な影響を及ぼしたので、肝Bach1 mRNAの発現に及ぼす効果を検討した。無処置のラット肝ではBach1 mRNAの発現はほとんど認められなかったが、LPS投与ラットでは1時間後にBach1 mRNAレベルは有意に増加し、3時間後に最大値となり、その後急激に減少し、12時間後には最大値の50%となり、24時間後には元のレベルに復した。

3. 敗血症性急性肝障害における肝の核 Bach1 蛋白発現低下と Bach1 mRNA 誘導の生物学的意義

3-1. Bach1 の動態変化の分子生物学的意義

LPS 投与後の肝細胞内 HO-1 発現上昇・ALAS1 発現低下と、核 Bach1 蛋白発現低下、Bach1 mRNA の誘導を総合的に考察し敗血症性急性肝障害モデルにおける肝ヘム代謝の動態について以下のような仮説を立てることができる。LPS により肝の主要ヘム蛋白：チトクローム P450 が傷害され、ヘムが遊離する。肝細胞で増加した細胞内遊離ヘムは、MARE 配列上にある Bach1 と結合して核外に汲み出される。一方、MARE 配列には Bach1 の代わりに転写因子 Nrf2 が結合し、その結果、HO-1 の転写が活性化される。すなわち、LPS 投与後に認められた核 Bach1 蛋白減少はヘムによる HO-1 誘導過程を反映していることが推察される。ヘムが HO-1 の primary inducer であり、ヘム単独投与で肝の核 Bach1 発現が急激に低下したことからも、LPS 投与後の HO-1 誘導にこのヘム-Bach1-Nrf2 メカニズムが関与していることがうかがわれる。一方、Bach1 mRNA の誘導は、核内に枯渇した Bach1 蛋白を補うために引き起こされたと考えられる。われわれは、四塩化炭素肝障害の動物モデルにおいて肝のヘム蛋白から遊離したヘムが酸化ストレスを増幅することにより肝障害を増悪化させることを示し、このモデルにおいても Bach1 mRNA が誘導され、その増加が核に枯渇した Bach1 蛋白を補うための代償反応であることを示唆した⁶⁾。

3-2. Bach1 の動態変化の病態生理学的意義

げっ歯類敗血症モデルで、HO-1 は pro-oxidant である遊離ヘムを分解し、生体保護的に働くことが報告されている³⁾。また、Bach1 ノックアウトマウスを用いた研究で、冠動脈の虚血再灌流モデルの急性増悪期において、Bach1 の欠損は HO-1 の過発現を介して臓器保護的に働くことが報告されている⁷⁾。過剰な遊離ヘムが生体に負荷される敗血症性臓器障害の急性期においてヘム分解酵素である HO-1 の誘導は、生体にとって有益である。しかし、過剰なヘムの分解が終了した回復期において HO-1 の過剰発現が続くと、生体機能の維持にとって必須のヘム蛋白をむしろ傷害してしまう可能性がある。したがって、エンドトキセミア誘発性急性肝障害における Bach1 の動態は、ヘム分解のための HO-1 の一過性誘導とその役目が終了した HO-1 発現抑制を介して細胞内ヘム代謝の微妙な調節に貢献していると推測される。

おわりに

敗血症にともない発生する血管内溶血によって生ずるヘモグロビンから遊離したヘムは、炎症反応増強作用、酸化ストレス増幅作用により敗血症の増悪化に寄与する。また、敗血症性急性肝障害により、細胞内に増加した遊離ヘムも膜脂質を障害することにより、肝細胞障害性に働くと考えられる。肝細胞内の過剰の遊離ヘムは、ヘムによって誘導される HO-1 によって無毒化される。敗血症性急性肝障害における HO-1 誘導は、*in vitro* と同様、ヘムによる HO-1 転写抑制因子 Bach1 の核外移行によって誘導されることが示唆される。一方、HO-1 の過剰発現によるチトクローム P450 など、肝細胞にとって必要なヘム蛋白の分解を防ぐために、回復期には HO-1 の誘導は収束されねばならない。この HO-1 発現抑制に必要な Bach1 蛋白を核内に補充するために、Bach1 mRNA が誘導されると考えられる。Bach1-ヘム経路による HO-1 誘導のメカニズムの解明は、新たな敗血症性急性肝障害に対する治療戦略の開発につながる可能性がある。

謝 辞

本研究の遂行に多大なご支援をいただいた岡山大学大学院医歯薬学総合研究科麻酔蘇生学分野の皆様へ深謝致します。

文 献

- 1) Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al.: The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315: 801-810, 2016
- 2) Soares MP, Bozza MT: Red alert: labile heme is an alarmin. *Curr Opin Immunol* 38: 94-100, 2016
- 3) Larsen R, Gozzelino R, Jeney V, et al.: A central role for free heme in the pathogenesis of severe sepsis. *Sci Transl Med* 2: 51ra71, 2010
- 4) Takahashi T, Shimizu H, Morimatsu H, et al.: Heme oxygenase-1: a fundamental guardian against oxidative tissue injuries in acute inflammation. *Mini Rev Med Chem* 7: 745-53, 2007
- 5) Igarashi K, Sun J: The heme-Bach1 pathway in the regulation of oxidative stress response and erythroid differentiation. *Antioxid Redox Signal* 8: 107-118, 2006
- 6) Tanioka T, Shimizu H, Takahashi T, et al.: Induction of hepatic Bach1 mRNA expression by carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Biomed Rep* 2: 359-363, 2014
- 7) Yano Y, Ozono R, Oishi Y, et al.: Genetic ablation of the transcription repressor Bach1 leads to myocardial protection against ischemia/reperfusion in mice. *Genes Cells* 11: 791-803, 2006

4. 衝撃波による致死肺出血マウスに対する新規リポソーム製剤 H12-ADP-liposome の肺保護効果

萩沢 康介¹⁾, 木下 学²⁾, 宮脇 博基³⁾, 佐藤 俊一⁴⁾, 鈴木 英紀⁵⁾
武岡 真司⁶⁾, 斎藤 大蔵⁷⁾

¹⁾防衛医科大学校生理学講座, ²⁾同 免疫微生物学講座, ³⁾同 救急部
⁴⁾防衛医科大学校・防衛医学研究センター情報システム研究部門
⁵⁾日本医科大学形態解析共同研究施設, ⁶⁾早稲田大学先進理工学部
⁷⁾防衛医科大学校・防衛医学研究センター外傷研究部門

はじめに

Blast Lung Injury (衝撃波肺損傷) は爆発事故などにおいて頻発する。肺は鼓膜に次いで爆発・衝撃波による損傷を被りやすい臓器である。それは衝撃圧が肺胞と毛細血管の境界を通過する際に、肺胞壁の破断を生じ、出血、肺挫傷、気胸などを引き起こすためである。現在に至るまで Blast Lung Injury に対する効果的な治療法は確立されておらず、治療ガイドラインは頸椎保護、気道確保、酸素供給、呼吸管理、出血の制御と循環管理を推奨しているに過ぎない¹⁾。

Blast Lung Injury の病態生理は、いくつかの急性肺傷害の病態が複合している。肺胞壁の機械的過進展という点では、人工呼吸による肺損傷 (VILI) に類似している。また低酸素症/低血圧の遷延という点では、虚血再灌流傷害モデルに類似している。これらに共通するのは肺胞への出血と滲出液・炎症細胞の浸潤である。その病態制御に、内因性アデノシンの産生とアデノシン受容体の活性化が重要であることがわかってきた。

われわれは人工血小板として H12-ADP-liposome (平均径 210 nm) を開発してきた。これは血小板が凝集するために不可欠な血小板膜糖タンパクの IIb/IIIa 複合体をターゲットに、これと特異的に結合するフィブリノゲンの活性化部位である γ 鎖のカルボキシル末端にある 12 個のペプチド (HHLGGAKQAGDV 配列: H12) をリポソーム膜の表面に組み込むとともに、リポソーム内部に血小板活性化作用があるアデノシン 5'-二リン酸 (ADP) を含有させている²⁾。H12-ADP-liposome は活性化血小板が存在する出血部位に H12 部分を使って集まり、そこで血小板同士の凝集を補強するとともに内封 ADP を放出する。H12-ADP-liposome の投与で、致死的な低血小板性の凝固障害を呈した動物の止血凝固能が回復し救命効果が認められている³⁾。さらに内封 ADP は、P2Y 受容体を介した血小板凝集促進作用だけでなく、アデノシンに代謝され臓器保護

に働くことが期待される。

1. レーザー衝撃波による Blast Lung Injury

波長 694 nm の Q スイッチ・ルビー・レーザーをマウス右側背に密着させた天然ゴムとアクリル板で合成された円形標的 (直径 12.0 mm・厚さ 0.5 mm) に単発照射し、プラズマ現象による衝撃波を形成すると⁴⁾、融合性出血が直下の右肺下葉に生じ、びまん性の点状出血が右肺および左肺門部に生じた。照射対側の左肺門病変は衝撃波が気管分岐部を越えて伝播したと考えられる。病理学的には肺胞壁の伸展と毛細血管の破壊に伴う肺胞出血の所見は、Tsokos らによって報告されたヒトの Blast Lung Injury の病理所見⁵⁾と合致した。レーザー強度による死亡閾値の検討では、8J 以上で鼻出血 (咯血) ありのものはすべて 1 時間以内に死亡した。

2. H12-ADP-liposome 投与による救命効果

レーザー照射直前に、H12-ADP-liposome や ADP-liposome, PBS-liposome, H12-PBS-liposome をおのおの 20 mg 静脈内投与したところ、H12-ADP-liposome 投与で有意に生存率が上がった。さらにレーザー照射直後に H12-ADP-liposome を投与しても救命効果が得られた (図 1)。H12-ADP-liposome 投与群でも右肺には融合性の出血が生じたが、左肺では軽度の散在性出血がみられるに過ぎなかった。Yelverton らが提唱している病理学上の重症度分類である Pathological injury スコア⁶⁾は H12-ADP-liposome 投与群 (35.2 ± 2.3) が H12-PBS-liposome 投与群 (40.0 ± 2.0) と比べて有意に軽減しており、Yelverton らが 36 点以上を重症肺傷害と定義していることとも合致している。さらに、肺胞における好中球集積も、H12-ADP-liposome 投与群で有意に軽減していた。

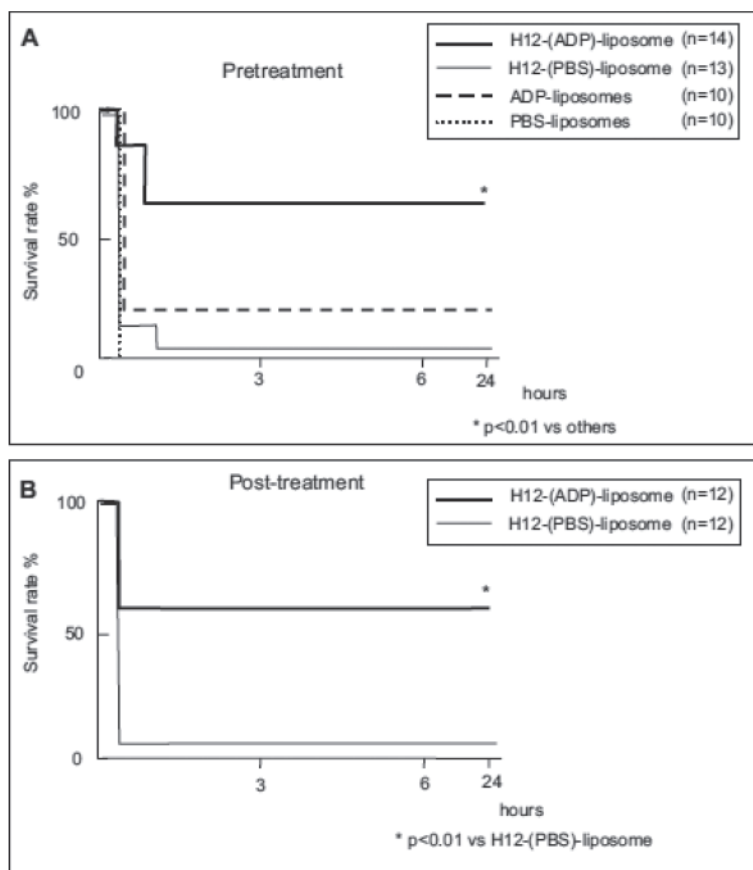


図1 マウスの生存率
(文献¹¹より引用)

3. H12-ADP-liposome 投与による臓器保護のメカニズム解明

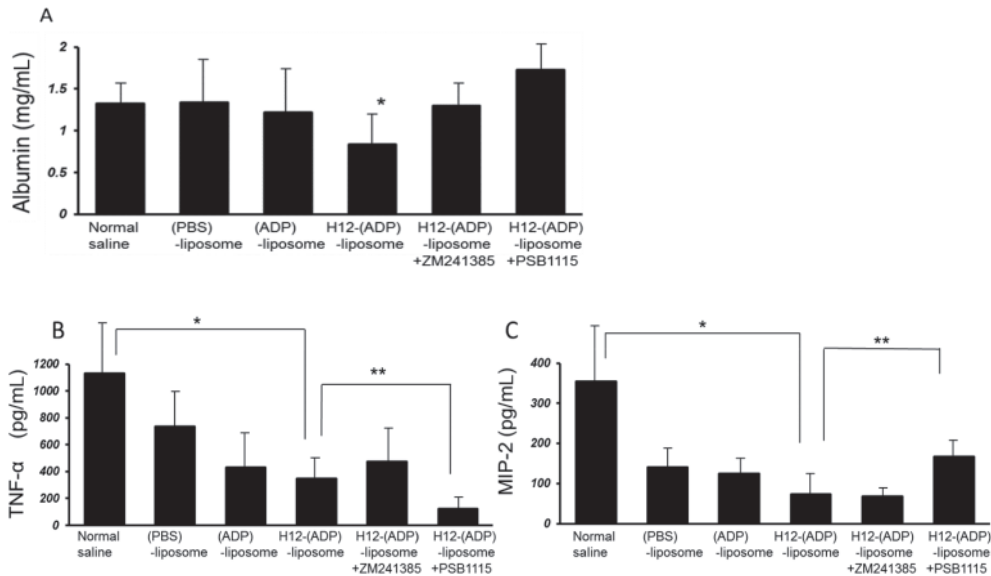
H12-ADP-liposome は出血部位に集まる性質があるので、出血局所でADPがどのように働くかについてADPの代謝産物であるアデノシンに着目した。その受容体拮抗薬であるアデノシン A2A 受容体拮抗薬 (ZM241385), もしくはアデノシン A2B 受容体拮抗薬 (PSB 1115) を衝撃波受傷の1時間前に投与し、その後、H12-ADP-liposome や ADP-liposome, PBS-liposome, 生理食塩水をおのおの尾静脈から投与しレーザー衝撃波 8J を右肺に照射した。3時間後にマウスから気管支肺胞洗浄液 (BALF) を採取したところ、BALF 中へのアルブミン漏出は H12-ADP-liposome 投与群においてのみ有意に減少していた (図 2A)。さらに H12-ADP-liposome 投与は、BALF 中の TNF- α および MIP-2 の上昇を有意に抑制していたが、アデノシン A2A 受容体拮抗薬は、H12-ADP-liposome 投与による BALF 中の TNF- α 抑制効果を阻害した。また、アデノシン A2B 受容体拮抗薬は H12-ADP-liposome 投与による BALF 中の MIP-2 の減少効果を阻害した (図 2B, C)。すなわち、H12-ADP-liposome は本来の止血作用とともに、局所で放出される ADP が病変部で代謝されアデノシ

ンとなり組織保護効果を発揮したと考えられた。一般的に、生理学的濃度でアデノシンは A1, A2A および A3 受容体を活性化する。対照的に、アデノシン A2B 受容体は高濃度アデノシンで作用すると考えられている⁷⁾。とくに低酸素病態を伴う場合にアデノシン A2B 受容体作用が活性化することが報告されている⁸⁾。

おわりに

Blast Lung Injury の病態に近似した致死性のマウス肺出血モデルをレーザー衝撃波で作製したが、H12-ADP-liposome の投与で Blast Lung Injury の低減・救命効果が得られた。アデノシン受容体拮抗薬を使った薬理的検討では、Blast Lung Injury による好中球誘導性ケモカインである MIP-2 放出亢進と好中球の遊走浸潤を H12-ADP-liposome 投与が A2B 受容体を介して抑制し、急性期の予後改善につながっていたことが示唆された。

この Blast Lung Injury モデルと成因や病理像が類似している以下の病態についていくつかの報告がある。すなわち、VILI に関しては Eckle らが肺胞・毛細血管バリアの欠損が肺の A2B 受容体を介して減じられると報告した⁹⁾。さらに、彼らは A2B 受容体を介して VILI による毛細血管から肺胞への vascular leak の軽減が得



* p<0.05 vs. Normal Saline, ** p<0.05 vs. H12-(ADP)-liposomes + PSB 1115

図 2 気管支肺胞洗浄液の解析結果
(文献¹¹⁾より改変し引用)

られること、A2B 受容体作動薬がある種の「肺利尿」効果を示し、肺胞クリアランスが改善して臓器保護につながる」と述べている⁹⁾。低酸素換気モデルで生じる肺胞への好中球の遊走浸潤が A2B 受容体を介して抑制されることも報告している⁸⁾。Haskó らは、A2A 受容体を介するアデノシンの外傷/出血性ショック軽減効果を報告している¹⁰⁾。このほか、A2A 受容体を介したアデノシンの抗炎症効果の報告は多数認められる。しかしながら、衝撃波により誘起された臓器傷害病態におけるアデノシン A2A 受容体の役割は不明な点が多い。血漿中のアデノシンの半減期が非常に短い (1~2 秒) ことが、外因性に投与したアデノシンの実験結果の解釈を難しくしており今後さらなる検討が必要と考える。

謝 辞

本研究は JSPS 科研費 25462843 の助成を受けたものです。

文 献

- Horrocks CL : Blast injuries : biophysics, pathophysiology and management principles. J R Army Med Corps 147 : 28-40, 2001
- Okamura Y, Takeoka S, Eto K, et al. : Development of fibrinogen gamma-chain peptide-coated, adenosine diphosphate-encapsulated liposomes as a synthetic platelet substitute. J Thromb Haemost 7 : 470-477, 2009
- Nishikawa K, Hagsisawa K, Kinoshita M, et al. : Fibrinogen γ -chain peptide-coated, ADP-encapsulated liposomes rescue thrombocytopenic rabbits from non-compressible liver hemorrhage. J Thromb Haemost 10 : 2137-2148, 2012
- Satoh Y, Sato S, Saitoh D, et al. : Pulmonary blast injury in mice : a novel model for studying blast injury in the laboratory using laser-induced stress waves. Lasers Surg Med 42 : 313-318, 2010
- Tsokos M, Paulsen F, Petri S, et al. : Histologic, immunohistochemical, and ultrastructural findings in human blast lung injury. Am J Respir Crit Care Med 168 : 549-555, 2003
- Yelverton JT : Pathology scoring system for blast injuries. J Trauma 40 (3 Suppl) : S111-115, 1996
- Fredholm BB : Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. Cell Death Differ 14 : 1315-1323, 2007
- Eckle T, Faigle M, Grenz A, et al. : A2B adenosine receptor dampens hypoxia-induced vascular leak. Blood 111 : 2024-2035, 2008
- Eckle T, Grenz A, Laucher S, et al. : A2B adenosine receptor signaling attenuates acute lung injury by enhancing alveolar fluid clearance in mice. J Clin Invest 118 : 3301-3315, 2008
- Haskó G, Xu DZ, Lu Q, et al. : Adenosine A2A receptor activation reduces lung injury in trauma/hemorrhagic shock. Crit Care Med 34 : 1119-1125, 2006
- Hagsisawa K, Kinoshita M, Miyawaki H, et al. : Fibrinogen γ -Chain Peptide-Coated Adenosine 5' Diphosphate-Encapsulated Liposomes Rescue Mice from Lethal Blast Lung Injury via Adenosine Signaling. Crit Care Med 44 : e827-837, 2016

5. 精巣男性ホルモン産生細胞におけるアポトーシスへのエンドトキシン及び IL-18 の関与

井上 岳人^{1,2)}, 石川 倫子¹⁾, 植村弥希子²⁾, 山下 勇人²⁾, 古賀 由華²⁾
 宇佐美 眞²⁾, 小谷 穰治¹⁾

¹⁾兵庫医科大学救急・災害医学講座

²⁾神戸大学大学院保健学研究科病態解析学領域

はじめに

Post-intensive care syndrome は ICU での集中治療後、呼吸障害や神経筋障害、運動機能障害などの身体的障害や認知機能のみならず精神的障害も生じる可能性がある^{1,2)}。重症病態治療後の生殖機能および性腺機能に対する影響はほとんど報告されていない。重症感染症である敗血症に注目すると男性敗血症患者の約 20% を生殖適齢期を含む 18 から 45 歳が占めているため³⁾、重症感染症後の性腺機能を調べることは重症病態後の QOL の観点からも重要と考えられる。男性生殖器への病原菌の感染や炎症は精子の機能不全や形成不全を引き起こし、男性不妊の原因となっており⁴⁾、実際に、エンドトキシンで誘起された全身性炎症下では精巣でのステロイドホルモンの合成や精子形成が阻害されることが報告されている⁵⁾。われわれはエンドトキシンに起因する急性炎症期では内因性 interleukin (IL)-18 が精巣生殖細胞のアポトーシスを誘導するものの、急性炎症後の回復期では内因性 IL-18 が抑止に作用し、炎症のステージに依存しアポトーシスを調整している

可能性を見出し⁶⁾、IL-18 が新たな急性炎症下での精巣炎治療ターゲットとなる可能性を示してきた。また、この結果は急性炎症時の体内の IL-18 の動態をコントロールすることにより、炎症に伴う生殖細胞のアポトーシスを未然に防ぎ、男性不妊の一因である乏精子症や無精子症となるリスクを回避できる可能性を示した重要な知見である。しかし、精巣内の各細胞（ライディッヒ細胞やセルトリ細胞）と IL-18 との関連を明らかにすることはできておらず、これらの関係性を示すことは IL-18 を急性炎症下での精巣炎治療ターゲットとする上で重要であると考えられる。

1. 精巣における IL-18

精巣は精子形成が行われる精細管とその間の間質から構成され、精細管内には生殖細胞とセルトリ細胞が、間質には男性ホルモンを産生するライディッヒ細胞が存在する⁷⁾ (図 1)。精子形成や精巣の恒常性の維持にはセルトリ細胞やライディッヒ細胞が重要な役割を担っているが⁷⁾、炎症性サイトカインである IL-18 は精巣の恒常性の維持に関与している可能性が報告されており、

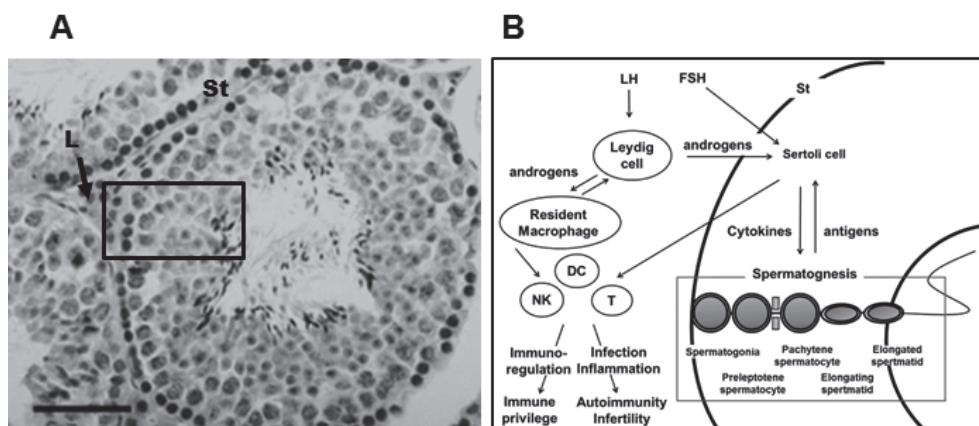


図 1 精巣切片および精巣における immuno communication

A : 精巣切片。L : ライディッヒ細胞, St : 精細管, スケール : 50 μ m。

B : 精巣における immuno communication (参考文献²⁰⁾図より一部改変)。St : 精細管, DC : dendritic cell, NK : natural killer cell

精巣内では恒常的に生殖細胞，ライディッヒ細胞や常在型マクロファージなどで産生される⁸⁻¹¹。また，LPS (lipopolysaccharide) に起因するマウス全身性炎症下の精巣では，LPS 濃度依存的に IL-18 の発現が増加することが報告されている^{12,13}。しかし，われわれの既報⁶を含め IL-18 の生殖細胞以外の精巣を構成する細胞，つまりライディッヒ細胞やセルトリ細胞への役割は明らかではない。本稿では精巣男性ホルモン産生細胞であるライディッヒ細胞のアポトーシスに対するエンドトキシンの影響ならびに IL-18 との関係について概説する。

2. 炎症刺激下でのライディッヒ細胞

マウスライディッヒ細胞は LPS 刺激に対して toll-like receptor 4 を介し，炎症反応が惹起される¹⁴。われわれはマウスライディッヒ細胞由来 TM3 細胞を LPS で刺激し経時的に解析した。LPS 刺激後 1 時間にてライディッヒ細胞の tumor necrosis factor (TNF)- α mRNA および IL-6 mRNA の発現は一過性に上昇し

た。一方で，IL-18 タンパクの発現は非刺激群，LPS 刺激群に差はなく，両群ともに刺激後も増加は認められなかった。したがって，ライディッヒ細胞では炎症時に積極的に IL-18 を分泌する機能は無いと考えられた。そこで，ライディッヒ細胞以外の細胞から炎症時に産生される IL-18 がアポトーシスに及ぼす影響を検討することとし，最初に LPS 刺激におけるライディッヒ細胞のアポトーシス経路を確認した。アポトーシス経路には主に death receptor (DR) 経路と mitochondria (Mt) 経路が存在し¹⁵，われわれの先行研究⁶より DR 経路に焦点をあてた。DR 経路では，TNFR1 や Fas などの DR とそのリガンド (L) の活性を介し，アポトーシスが誘起される。DR のアダプター分子として Fas-associated protein with death domain (FADD) が存在し¹⁷，FADD の DD と TNFR1 や Fas の相互作用により caspase-8 を活性化し，caspase-3 依存的なアポトーシスを誘導する^{15,16}。われわれの結果では，ライディッヒ細胞の cleaved caspase-3 の発現は LPS 濃度に関係なく刺激 6 時間で発現が確認でき，12 時間以降，発現

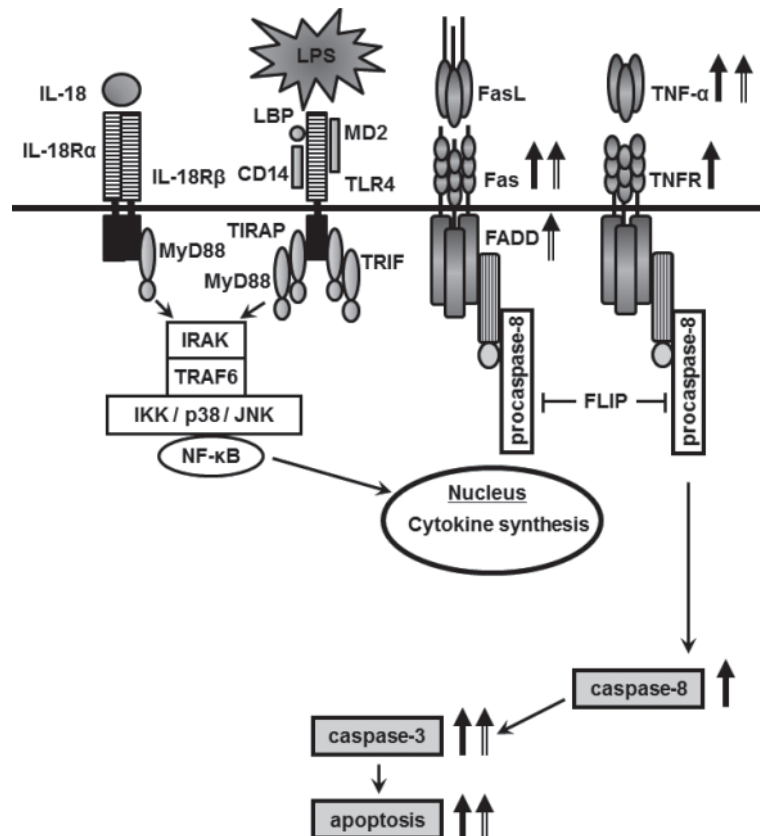


図 2 LPS 刺激ならびに recombinant IL-18 刺激による death receptor 経路関連遺伝子・タンパクの発現量
ライディッヒ細胞由来 TM3 細胞に LPS もしくは recombinant IL-18 で刺激し解析した。
➡: LPS 刺激により発現増加, ⇒: recombinant IL-18 刺激により発現増加。(参考文献¹⁹より一部改変)

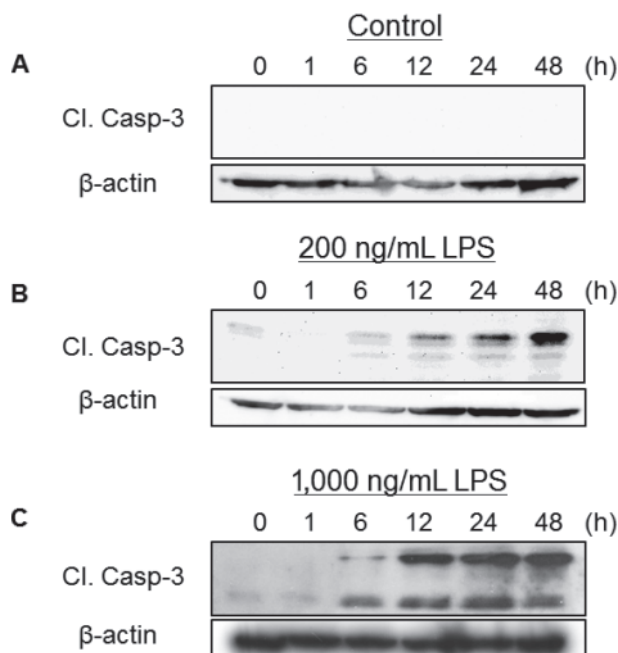


図3 LPS刺激によるマウスライディッヒ細胞 cleaved caspase-3の発現

LPS刺激濃度にかかわらず刺激6時間後でライディッヒ細胞のアポトーシスが確認でき、12時間以降発現が増強した。

A：LPS非刺激（control群）。B：200 ng/mL LPS刺激群。C：1,000 ng/mL LPS刺激群。Cl. Casp：cleaved caspase

が増加しアポトーシスが誘導された。DR経路関連因子の発現はLPS刺激12時間後TNFR1 mRNA, Fas mRNA および cleaved caspase-8の発現が増加した。FasL mRNA, FADD mRNAは非刺激群と差はなかった。したがって、LPS刺激によりFas, TNF- α , TNFR1, cleaved caspase-8の発現が増加し、caspase-3を活性化しライディッヒ細胞のアポトーシスが誘導された可能性が示唆された（図2, 3）。以上より、LPSによるライディッヒ細胞アポトーシスにはDR経路の関与が示唆されたが、Zhouらの研究¹⁷⁾にてLPS刺激によりラットライディッヒ細胞がMt経路を介しアポトーシスが誘導されることが報告されており、LPSに対するライディッヒ細胞のアポトーシスはDR経路だけでなくMt経路でも調節されていると考えられる。また、ライディッヒ細胞の主な役割であるステロイドホルモン（テストステロン）合成はsteroidogenic acute regulatory protein (StAR)により調整されている。StARは、ステロイドホルモン合成の律速段階にあたるコレステロールのMt外膜から内膜への移行に関与する因子であり、StARの発現が誘導され、ステロイドホルモンの合成・分泌が促進される¹⁸⁾。われわれの結果では炎症刺激下でのライディッヒ細胞StARの発現はcleaved caspase-3の発現が増加する12時間以降で

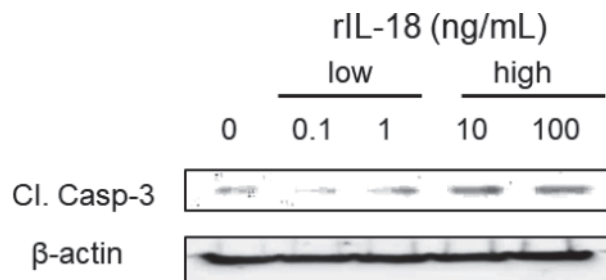


図4 recombinant IL-18刺激によるマウスライディッヒ細胞 cleaved caspase-3の発現

recombinant IL-18刺激12時間後、高濃度のIL-18刺激によりライディッヒ細胞のアポトーシスが誘導された。Cl. Casp：cleaved caspase

低下していた。したがって、炎症刺激下においてライディッヒ細胞のアポトーシスが生じステロイドホルモンの産生能が低下している可能性が示唆された。

3. ライディッヒ細胞とIL-18刺激

次に、急性炎症下における精巣でのIL-18の増加は炎症刺激後、精巣内に浸潤するマクロファージなど^{6,19)}の炎症性細胞に由来するものと考えられるため、ライディッヒ細胞に対する免疫細胞由来IL-18の影響を検討した。ライディッヒ細胞(TM3細胞)を低濃度(0.1および1 ng/mL)ならびに高濃度(10および100 ng/mL)のrecombinant IL (rIL)-18で12時間刺激し、その影響を解析した。高濃度のrIL-18はライディッヒ細胞のDR経路関連因子のFas mRNA, TNF- α mRNA, FADD mRNAの発現を増加させ、cleaved caspase-3の発現を活性化し、アポトーシスを誘起した(図2, 4)。同時に高濃度のrIL-18刺激によってライディッヒ細胞のStARの発現が低下することが明らかとなった。以上のことより、急性炎症下における精巣内の過剰なIL-18は生殖細胞のアポトーシス⁶⁾と同様に精巣の間質細胞に対してもアポトーシスを誘導し、ステロイドホルモン合成を低下させるのではないかと考えられた。

おわりに

LPSおよび高濃度のIL-18は男性ホルモン産生細胞であるライディッヒ細胞に対し、DR経路を活性化しアポトーシスを誘導した。われわれの既報⁶⁾では感染後、浸潤した免疫細胞から産生される過剰なIL-18により生殖細胞のアポトーシスが増加する可能性を示したが、本研究では、同時に過剰なIL-18がライディッヒ細胞のアポトーシスも誘起する可能性が示唆された。このことより精巣に浸潤する免疫細胞由来の過剰なIL-18を抑制することは全身性炎症下に起因する精巣炎の新たな治療ターゲットになりうるのではないかと考えている。つまり、急性炎症時の体内のIL-18の動態をモ

ニタリングすることで、生殖機能不全ならびに性腺機能不全のリスクを回避するための治療方針を決定する重要なツールとなる可能性がある。ゆえに、高度生殖医療や重症病態後の QOL 改善に貢献できるのではと考えている。

文 献

- 1) Herridge MS, Cheung AM, Tansey CM, et al. : One-year outcomes in survivors of the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 348 : 683-693, 2003
- 2) Stevens RD, Dowdy DW, Michaels RK, et al. : Neuromuscular dysfunction acquired in critical illness : a systematic review. *Intensive Care Med* 33 : 1876-1891, 2007
- 3) Beale R, Reinhart K, Brunkhorst FM, et al. : Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis (PROGRESS) : lessons from an international sepsis registry. *Infection* 37 : 222-232, 2009
- 4) Schuppe HC, Meinhardt A, Allam JP, et al. : Chronic orchitis : a neglected cause of male infertility? *Andrologia* 40 : 84-91, 2008
- 5) Reddy MM, Mahipal SV, Subhashini J, et al. : Bacterial lipopolysaccharide-induced oxidative stress in the impairment of steroidogenesis and spermatogenesis in rats. *Reprod Toxicol* 22 : 493-500, 2006
- 6) Inoue T, Aoyama-Ishikawa M, Kamoshida S, et al. : Endogenous interleukin 18 regulates testicular germ cell apoptosis during endotoxemia. *Reproduction* 150 : 105-114, 2015
- 7) Cheng CY, Mruk DD : The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol Rev* 64 : 16-64, 2012
- 8) Strand ML, Wahlgren A, Svechnikov K, et al. : Interleukin-18 is expressed in rat testis and may promote germ cell growth. *Mol Cell Endocrinol* 240 : 64-73, 2005
- 9) Komsky A, Huleihel M, Ganaiem M, et al. : Presence of IL-18 in testicular tissue of fertile and infertile men. *Andrologia* 44 : 1-8, 2012
- 10) Abu Elhija M, Lunenfeld E, Persky L, et al. : Constitutive expression of IL-18 binding protein in murine testicular tissues and cells. *Eur Cytokine Netw* 19 : 25-29, 2008
- 11) Abu Elhija M, Lunenfeld E, Eldar-Geva T, et al. : Over-expression of IL-18, ICE and IL-18 R in testicular tissue from sexually immature as compared to mature mice. *Eur Cytokine Netw* 19 : 15-24, 2008
- 12) AbuElhija M, Lunenfeld E, Eldar-Geva T, et al. : Lipopolysaccharide increased the expression levels of IL-18, ICE and IL-18 R in murine Leydig cells. *Am J Reprod Immunol* 60 : 151-159, 2008
- 13) Abu Elhija M, Lunenfeld E, Huleihel M : LPS increases the expression levels of IL-18, ICE and IL-18 R in mouse testes. *Am J Reprod Immunol* 60 : 361-371, 2008
- 14) Shang T, Zhang X, Wang T, et al. : Toll-like receptor-initiated testicular innate immune responses in mouse Leydig cells. *Endocrinology* 152 : 2827-2836, 2011
- 15) Tripathi R, Mishra DP, Shaha C : Male germ cell development : turning on the apoptotic pathways. *J Reprod Immunol* 83 : 31-35, 2009
- 16) Tourneur L, Chiocchia G : FADD : a regulator of life and death. *Trends Immunol* 31 : 260-269, 2010
- 17) Zhou PH, Hu W, Zhang XB, et al. : Protective Effect of Adrenomedullin on Rat Leydig Cells from Lipopolysaccharide-Induced Inflammation and Apoptosis via the PI3K/Akt Signaling Pathway ADM on Rat Leydig Cells from Inflammation and Apoptosis. *Mediators Inflamm* 2016 : 7201549, 2016
- 18) Manna PR, Dyson MT, Stocco DM : Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression : present and future perspectives. *Mol Hum Reprod* 15 : 321-333, 2009
- 19) 井上岳人, 石川倫子, 西野哲, 他 : エンドトキシン血症時における精巣生殖細胞アポトーシスと内因性 IL-18 の役割. “エンドトキシン・自然免疫研究 17” 日本エンドトキシン・自然免疫研究会編. 医学図書出版株式会社, 2014, p98-102
- 20) Inoue T : Testicular germ cell apoptosis during orchitis. In “Spermatozoa : Biology, Motility, and Function and Chromosomal Abnormalities” eds Erickson BT, Nova Science Publishers, Inc. 2014, p149-168

6. *Helicobacter pylori* LPS は TLR2/TLR10 に認識される

永島 裕之

札幌医科大学医学部微生物学講座

はじめに

われわれの体は病原体を認識し、排除する免疫機構を備えている。病原体の固有の分子構造 microbial-associated molecular patterns (MAMPs) を認識し、免疫反応を惹起し生体防御に必要な遺伝子群を発現する。Toll-like receptor (TLR) は、pattern recognition receptors (PRRs) のなかで最初に同定された受容体で、さまざまな MAMPs を認識することが明らかになっている¹⁾。ヒトでは 10 種類 (TLR1-10)、マウスでは 12 種類 (TLR1-9, 11-13) の TLR が存在しており、それぞれ異なる ligand を認識する。そのなかで TLR10 の ligand はいまだに報告されていない。

多くの TLR は homodimer を形成するものの、TLR1, TLR2, TLR6, TLR10 は TLR1 family とよばれ、heterodimer を形成し、lipopeptide が主な ligand である。TLR の細胞外領域に ligand が結合すると TLR2 は acyl 基の数の違いにより TLR1 もしくは TLR6 と heterodimer を形成し、それぞれを tri-acyl lipopeptide, di-acyl lipopeptide を識別する^{2,3)}。

Helicobacter pylori (*H. pylori*) の LPS は著しく低い内毒素活性を示すことから、*H. pylori* 感染において TLR4 の関与が少ないと考えられてきた。*H. pylori* に関しては TLR が免疫に関与していないという考えもあったように、いまだ十分な理解がされていない。一方で TLR2 に認識されるとの報告も散見され、現在も議論がなされている。

技術的な進歩から、糖尿病、脂質異常、関節リウマチなどのありふれた疾患も含め、多くの疾患で Genome-Wide Association Study (GWAS) が行われるようになった。1~10 万人規模を対象にして行われるもので、これまでの *in vitro* の研究では判明し得なかった真の意味での疾患感受性遺伝子が発見されるようになってきた。2013 年にヨーロッパで行われた研究で、*H. pylori* 感染者に優位な single nucleotide polymorphism (SNP) を GWAS を用いて検討された。その結果 TLR10 が疾患感受性遺伝子として報告された⁴⁾。これまで *H. pylori* 感染症において報告が多くなされていた TLR4 や TLR2 ではなく、TLR10 が結果として得られたことは大きな驚きとともに知れ渡ることとなった。

さらにわれわれは *H. pylori* の LPS が TLR2/TLR10

に認識されることを明らかにした⁵⁾。*H. pylori* の LPS は tetra-acyl lipid A という特徴的な構造をしており、これまで不明であった TLR10 の ligand 構造を示唆するデータであり、さらに今後の LPS 研究に一石を投じる結果と思われたので、最新のデータとともに概説する。

1. *H. pylori* と地域差

H. pylori 感染症はヨーロッパおよび東アジアなどの地域によって *H. pylori* 感染率、胃癌発症率に大きな差異がある疾患である。地域差を説明する因子がわかれば胃癌の発症を防げるとの理由で、これまでは CagA, VacA, OipA などの *H. pylori* の菌側の因子に関する研究が多くなされていた⁶⁾。しかし、とくに胃癌発症の多い日本や韓国などの東アジアでは、ほぼすべての *H. pylori* が CagA を有しており、菌側の因子のみでは説明がつかない。一方で宿主因子はあまり研究のなされていない領域であった。

2. *H. pylori* と宿主との関係

胃内に生息する *H. pylori* は、人類が 58,000 年前にアフリカ大陸に誕生して以来、人類とともに進化してきた⁷⁾。遺伝子シーケンス解析からヨーロッパ、アメリカ大陸、東南アジアなど地域によって違いが有り、人が世界に拡散するとともに *H. pylori* も多様化してきた。最近の研究では起源の違う *H. pylori* 株を有する場合に胃癌発症が増えることが報告されている⁷⁾。アフリカ系祖先の系統が強い人に対してはほぼ無害であるのに対して、アメリカ先住民系統が強い人に対しては胃癌発症を促しやすいとの結果が得られている⁸⁾。

3. *H. pylori* LPS は TLR2/TLR10 に認識される

われわれは、これまでも *H. pylori* 感染症の地域差に注目し、病態に影響する宿主因子の研究を行ってきた。同じような衛生環境であるものの比較的胃癌が多いとされているブータンと、比較的胃癌発症が少ないとされているドミニカ共和国に赴き、フィールド調査を行った。健常者における *H. pylori* 感染率、病理学的所見、胃癌発症率などを比較した⁹⁾。胃粘膜組織を内視鏡的にサンプリングし、遺伝子発現量を比較検討した。16 例を対象にマイクロアレイを用いた解析を行い、*H. pylo-*

ri 感染者と非感染者の比較を行った。その結果、感染者で *tlr10* mRNA が有意に高く発現していることを発見した。これまで *H. pylori* 感染症において関連性があるとされている *tlr2*, *tlr4* ではそれぞれ fold change は 3.1, 2.5 であったのに対して, *tlr10* は 15.4 と非常に大きな差が認められた。感染に伴う TLR の遺伝子発現量の上昇は一般的には ligand 刺激が関与していると理解されている。そこで *H. pylori* LPS が TLR10 の ligand であるという仮説をたて、全 275 症例を対象に *tlr10* の発現量を比較した。統計学的に有意に *H. pylori* 感染者で *tlr10* の発現が高いことを認めた。さらに *H. pylori* 感染者において *tlr10* と *tlr2* の間では発現量に有意な正の相関を認めた。免疫染色からその発現部位は、主に胃粘膜上皮であった。胃癌由来で、極性を有し monolayer を形成する比較的 normal 粘膜に近い cell line である NCI-N87 を用いた感染実験を行った。その結果、時間依存的、濃度依存的に *tlr10* の発現量が増加することが判明した。これらのことから *H. pylori* の菌体成分中の分子が TLR10 の ligand であるという仮説をたてた。HEK 細胞を用い ligand の同定を行った。HEK に TLR を transfection し、heat-killed *H. pylori* で刺激すると、TLR2/TLR10 を transfection したもので最も高い NF- κ B の活性化が得られた。さらにどの成分が ligand であるかを検討するために、菌体最外層にある LPS で同様の実験を行った。同様に TLR2/TLR10 を transfection したもので最も高い NF- κ B の活性化がみられた。以上のことから *H. pylori* LPS が TLR2/TLR10 の ligand であることが判明した⁵⁾ (図 1)。

4. TLR と *H. pylori* LPS

一般的な LPS が TLR4 に認識されることは明らかになっており、2009 年に Jie-Oh Lee らが構造解析を行い LPS と TLR4 の結合様式を結晶構造解析にて報告した¹⁰⁾。*E. coli* に代表される hexa-acyl lipid A が TLR4 に認識されることが明らかになった¹⁰⁾。一方 acyl 基の数が少ない penta-acyl もしくは tetra-acyl lipid A では TLR4 が dimer を形成できず、炎症を惹起する生理活性が下がる。penta-acyl や tetra-acyl lipid A を有するグラム陰性菌は腸内に生息するものに多く認められており、*H. pylori* は tetra-acyl lipid A の構造を有している。Tetra-acyl lipid A は生合成過程において、当初 hexa-acyl 体 (de novo form) として合成されたものが processing を受けて tetra-acyl 体となる (図 1)。この変化はグラム陰性菌が宿主の免疫機構から逃れるための戦略の一つと考えられている^{11,12)}。Trent らは *H. pylori* の lipid A の processing に関与する酵素を knock out し、hexa-acyl lipid A を発現した変異株を作製して mice に感染させた。すると TLR4 に認識されることで

H. pylori は宿主からすべて排除され、慢性胃炎を発症しないことを示した。

一方さまざまな議論はあるものの、*H. pylori* LPS は TLR2 に認識されるという報告が複数の研究者から発表されている^{13,14)}。多くの報告は TLR2 のみに注目しており TLR1, TLR6 に関して述べられた報告は少ない。横田らは、TLR2/TLR1 が TLR2/TLR6 より *H. pylori* LPS を強く認識することを報告している¹⁵⁾が、TLR10 に関する報告はこれまで存在していなかった。

5. *H. pylori* と宿主因子としての TLR10

筆者が行った研究は *H. pylori* LPS が TLR2/TLR10 に認識されるというものであるが、TLR10 は *H. pylori* 感染症において、宿主の疾患感受性遺伝子としても報告されている⁴⁾。Mayerle らは、GWAS を用いて *H. pylori* の seroprevalence の解析を行い、論文中では TLR1 を疾患感受性遺伝子として報告した。しかし実際のデータでは、最も p 値の低かった rs10004195 は TLR10 に関与している SNP であり、その他にも多数の TLR10 に関与している SNP が結果として得られている。われわれの結果と Mayerle らの報告から、TLR10 が重要な宿主因子であることが強く示唆された。

6. PRR としての TLR10 と *H. pylori* LPS との関係

H. pylori LPS が TLR2/TLR10 に認識されていることを改めて PRR として考察したい。これまでわかっていることとして TLR10 は TLR1, TLR6 と同じ 4p14 染色体上に code されており、それぞれ非常に遺伝子配列が似ている。また gene sequence の解析からこれらの TLR は遺伝子重複によって生成したものと報告されている¹⁶⁾。そのため TLR10 も TLR2 と heterodimer を形成し、なんらかの lipopeptide を認識するものと考えられていた。Govindaraj¹⁷⁾ らは、コンピュータを用いた計算上の ligand として Pam₃CSK₁ などの tri-acyl peptide を認識する可能性があることを報告しているが、実際の証明はされていなかった。Tetra-acyl lipid A という特徴的な構造を有している *H. pylori* LPS が、われわれのデータから TLR2/TLR10 に認識されることが示唆された。TLR2 の ligand として報告されている分子は共通の acyl 基 2 本の部分構造を有しており³⁾、*H. pylori* LPS にも類似の構造が存在する。TLR2 は TLR1, TLR6 もしくは TLR10 と heterodimer を形成する。TLR2 が共通構造の 2 本の acyl 基を認識しているとすれば、TLR10, TLR1, TLR6 が残りの acyl 基の数の違いを見分けていることが考えられる。*H. pylori* LPS の tetra-acyl lipid A では、共通構造の 2 本の acyl 基が TLR2 によって、残り 2 本の acyl 基が TLR10 によって認識されているのかもしれない (図 1)。

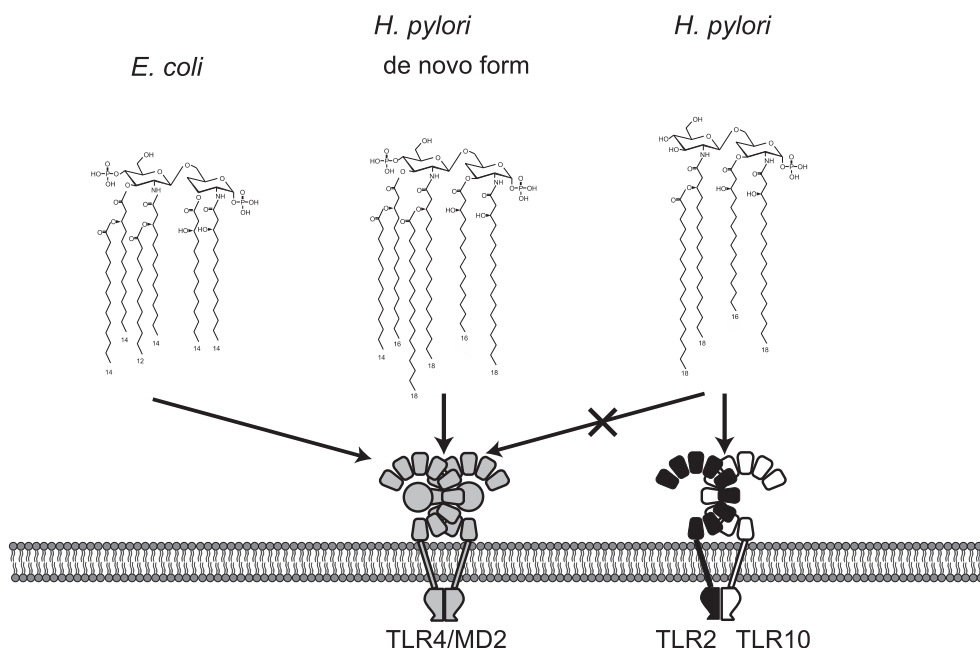


図1 *H. pylori* と *E. coli* LPS の lipid A の構造と TLR による認識

Hexa-acyl lipid A を有する *E. coli* LPS は TLR4/MD2 に認識される。Tetra-acyl lipid A を有する *H. pylori* LPS は TLR4 に認識されず、TLR2/TLR10 に認識されることがわれわれの研究によって明らかとなった。一方、lipid A 生合成の processing 過程を欠損させた *H. pylori* 変異株では hexa-acyl lipid A を有する LPS (de novo form) を発現しており、TLR4 に認識されるようになる。

TLR2, TLR4 はともに細菌表面にある構造物 (LTA, LPS) を認識しているが、TLR2 はこれまで予想されていたよりも多種多様な ligand を認識していることがわかってきた。これは MAMPs の多様性に対応するべく幅広い ligand を認識するように TLR2 システムが進化してきたものと考えられている¹⁸⁾。TLR4 と比較して TLR2 は ligand としてのスペクトラムが非常に広い。グラム陰性菌はグラム陽性菌へと進化し、やがてマイコバクテリウム、真菌などへ進化を遂げている。TLR2 システムの多様性は bacteria の envelope evolution への対応によるものであるとの仮説に非常に合致する所見であると考えられる。いずれも細胞最外層にある lipid を含んだ膜の一部を認識していることは大変興味深い。

7. GWAS など遺伝子免疫研究からわかってきたこと

gene duplication は非常に重要な遺伝子の進化過程である。ウニは T cell, B cell などのリンパ球は有していないものの、253 もの TLR を有している。遺伝子重複によって TLR の数を増やし、さまざまな病原体を認識するという免疫機構を有していると報告されている¹⁹⁾。これらの事実からも gene duplication は宿主免疫の多様性を生み出す重要な進化機構のひとつであると位置づけることができる。またこれまでの研究であまり注目されていなかった TLR10-TLR1-TLR6 の locus には

positive selection がかかっていると複数の研究者から報告されている。Netea のグループは疫学調査で得られた 500 名の健常人を対象とし、bacteria, fungi, virus, TLR ligands など血液サンプルを刺激し、サイトカインの誘導の違いの検討を行った。そこで TLR10-TLR1-TLR6 の locus がサイトカイン産生の能力に大きな影響を与えていることを報告した²⁰⁾。Quintana-Murci らも TLR10-TLR1-TLR6 の locus に positive selection が認められることを報告しており、この領域がヨーロッパとアフリカで大きく違うことを報告している。Netea ら、Quintana-Murci らが総じて述べていることはヒトを対象にした大規模な網羅的解析では、TLR10-TLR1-TLR6 の locus の解析は生物進化、ヒトのさまざまな疾患の個人差を説明できる可能性があるとして述べている。TLR10-TLR1-TLR6 に対してさらなる解析が必要であるが、*H. pylori* 感染症がこれらの研究のモデルケースとなると考えられる。

おわりに

TLR10 が *H. pylori* 感染症において重要な働きをしていることはわれわれの結果と GWAS を用いた結果から確実なものとなった。これまで行われていた *in vitro*, マウスを用いた *in vivo* の実験系では明らかにできなかった結果である。TLR10 の解析は今現在 *H. pylori* でのデータ以外は乏しいものの、lipid A の構造の変化

は腸内細菌として有名な *Bacteroides* 属などを含む commensal bacteria に多く共通して認められる。*H. pylori* LPS の解析は今後腸内細菌叢研究への応用に結びつく示唆に富む結果と考えられた。

文 献

- 1) Kawai T, Akira S : The role of pattern-recognition receptors in innate immunity : update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11 : 373-384, 2010
- 2) Jin MS, Kim SE, Heo JY, et al. : Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a triacylated lipopeptide. *Cell* 130 : 1071-1082, 2007
- 3) Jin MS, Lee JO : Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity* 29 : 182-191, 2008
- 4) Mayerle J, den Hoed CM, Schurmann C, et al. : Identification of genetic loci associated with *Helicobacter pylori* serologic status. *JAMA* 309 : 1912-1920, 2013
- 5) Nagashima H, Iwatani S, Cruz M, et al. : Toll-like receptor 10 in *Helicobacter pylori* infection. *J Infect Dis* 212 : 1666-1676, 2015
- 6) Yamaoka Y : Mechanisms of disease : *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7 : 629-641, 2010
- 7) Linz B, Balloux F, Moodley Y, et al. : An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* 445 : 915-918, 2007
- 8) Kodaman N, Pazos A, Schneider BG, et al. : Human and *Helicobacter pylori* coevolution shapes the risk of gastric disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 111 : 1455-1460, 2014
- 9) Nagashima H, Iwatani S, Cruz M, et al. : Differences in interleukin 8 expression in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa tissues from patients in Bhutan and the Dominican Republic. *Hum Pathol* 46 : 129-136, 2015
- 10) Park BS, Song DH, Kim HM, et al. : The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458 : 1191-1195, 2009
- 11) Cullen TW, Giles DK, Wolf LN, et al. : *Helicobacter pylori* versus the host : remodeling of the bacterial outer membrane is required for survival in the gastric mucosa. *PLoS Pathog* 7 : e1002454, 2011
- 12) Needham BD, Trent MS : Fortifying the barrier : the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 11 : 467-481, 2013
- 13) Smith SM, Moran AP, Duggan SP, et al. : Tribbles 3 : a novel regulator of TLR2-mediated signaling in response to *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *J Immunol* 186 : 2462-2471, 2011
- 14) Smith MF Jr, Mitchell A, Li G, et al. : Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF- κ B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J Biol Chem* 278 : 32552-32560, 2003
- 15) Yokota S, Ohnishi T, Muroi M, et al. : Highly-purified *Helicobacter pylori* LPS preparations induce weak inflammatory reactions and utilize Toll-like receptor 2 complex but not Toll-like receptor 4 complex. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51 : 140-148, 2007
- 16) Huang Y, Temperley ND, Ren L, et al. : Molecular evolution of the vertebrate TLR1 gene family—a complex history of gene duplication, gene conversion, positive selection and co-evolution. *BMC Evol Biol* 11 : 149, 2011
- 17) Govindaraj RG, Manavalan B, Lee G, et al. : Molecular modeling-based evaluation of hTLR10 and identification of potential ligands in Toll-like receptor signaling. *PLoS One* 5 : e12713, 2010
- 18) Li J, Lee DS, Madrenas J : Evolving Bacterial Envelopes and Plasticity of TLR2-Dependent Responses : Basic Research and Translational Opportunities. *Front Immunol* 4 : 347, 2013
- 19) Rast JP, Smith LC, Loza-Coll M, et al. : Genomic insights into the immune system of the sea urchin. *Science* 314 : 952-956, 2006
- 20) Li Y, Oosting M, Smeekens SP, et al. : A Functional Genomics Approach to Understand Variation in Cytokine Production in Humans. *Cell* 167 : 1099-1110 e14, 2016

7. 納豆由来ペプチドの特異な殺菌効果とその作用機序

白石 宗¹⁾, 北川 学^{1,2)}, 山本 聡¹⁾, 久富 亮佑¹⁾, 佐藤 豊孝¹⁾
涌井 秀樹³⁾, 伊藤 英晃⁴⁾, 宮本 篤²⁾, 横田 伸一¹⁾

¹⁾札幌医科大学医学部微生物学講座, ²⁾同 医療薬学

³⁾秋田大学大学院理工学研究科疾患生物学研究室, ⁴⁾同 生化学・分子生物学研究室

はじめに

納豆は、蒸煮した大豆に納豆菌 [*Bacillus subtilis* (*natto*)] を植菌して発酵させた日本の代表的な発酵食品である。また、東アジアを中心に大豆を原料とした無塩発酵食品は少なからず存在するが、「糸引き」は日本の納豆にみられる代表的な特徴であり、日本独自の発酵食品であると考えられている¹⁾。

これまでの研究により、納豆は栄養価が高いだけでなく、さまざまな機能性を備えていることが明らかになっている。例えば、納豆に含まれる酵素の Nattokinase は、線溶酵素を活性化させることで血栓を溶解する作用が知られている²⁾。さらに、納豆由来の複数のペプチドには、血圧の上昇を抑制する効果が報告されている³⁾。その他にも、食後血糖値の上昇抑制⁴⁾や、血清総コレステロールの上昇抑制⁵⁾など、多くの生理作用をもつことが知られている。

近年、われわれの共同研究グループの伊藤らは、納豆由来のペプチド (納豆ペプチド) にかん細胞株を死滅させる活性があることを報告した^{6,7)}。ヒトを含む多くの生物は生体防御ペプチドを有しており、その多くは抗菌作用とがん細胞株への細胞毒性を併せもっていることから、納豆ペプチドも抗菌活性をもつことが予測された。本稿では、われわれの研究で明らかになった納豆ペプチドの殺菌効果とその作用機序⁸⁾について解説する。

1. 納豆ペプチドの特徴

がん細胞株への細胞毒性をもつ納豆ペプチドは、53 残基のペプチド (LNGTSMASPH VAGAAALILS KHPNLSASQV RNRLSSTATY GSSFYYGKGL INV) であり、 α -ヘリックス構造が予測される配列で、正電荷をもつアルギニンおよびリジン残基が点在している。これらは Cathelicidine ファミリーをはじめとする多くの抗菌ペプチドに認められる構造である^{6,7)}。納豆ペプチドは、さまざまながん細胞株を死滅させる活性があり、正常細胞株に対しては毒性を示さないことが明らかになっている。この作用機序は、細胞の膜破壊であることが示唆されている。がん細胞株への細胞毒性は、蒸煮大豆単体および納豆菌単体には認められず、発酵産

物の納豆であることが重要であると考えられている^{6,7)}。納豆 1 パック (約 50 g) から凍結乾燥重量で約 100 mg の納豆ペプチド標品が取得可能である。

2. 納豆ペプチドの特異な殺菌効果

種々の細菌および真菌に対する納豆ペプチドの最小生育阻止濃度 (MIC) を表 1 に示した。納豆ペプチドの十分な殺菌活性の発揮には、培地中にウマ溶血液を添加する必要があるが、*Bacillus* 属細菌のなかの *B. subtilis* グループ (*Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*) と *Streptococcus pneumoniae* (肺炎球菌) に対して特異的な殺菌効果が認められた。さらに、納豆ペプチドの殺菌効果の発揮に必要な溶血液中の成分を検討したところ、ヘミン (鉄を含むポルフィリン) が重要であることが示唆された。これまでに、納豆の抗菌成分としては、細菌の芽胞形成に関与するジピコリン酸が知られている。ジピコリン酸は、グラム陽性および陰性細菌、真菌など幅広い抗菌スペクトルをもつことが報告されている⁹⁾。一方、納豆ペプチドは *B. subtilis* グループの細菌と肺炎球菌にのみ殺菌効果を示すという特異な狭域の抗菌スペクトルを持つことが示された。

3. 納豆ペプチドの殺菌効果の作用機序

納豆ペプチド存在下での殺菌曲線と菌体の形態変化から、*B. subtilis* と肺炎球菌では、作用機序に違いがあることが示唆された。*B. subtilis* では、ペプチド添加直後から速やかな生菌数の減少が認められ (図 1A)、形態観察からその殺菌機序は膜傷害であることが示唆された (図 2A, B)。納豆ペプチドのがん細胞株への細胞毒性も、膜傷害が示唆されていることから^{6,7)}、*B. subtilis* に対しても同様の作用が働いている可能性がある。一方、肺炎球菌では、ペプチドへの曝露初期 (数時間以内) は通常の増殖を示し、その後急速な殺菌が観察された (図 1B)。この殺菌機序は、死滅した菌体の形態観察から溶菌であることが示唆された。さらに、本来双球菌である肺炎球菌 (図 2C) が、納豆ペプチド曝露初期にはレンサ状になっており (図 2D)、菌体の分裂時に分離異常が起きていることが示唆された。肺炎球菌の主要

表 1 微量液体希釈法によるウマ溶血液存在下でのグラム陽性細菌, グラム陰性細菌, 真菌に対する納豆ペプチドの MIC

グラム陽性細菌					
細菌種		菌株	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
<i>Bacillus</i>	<i>cereus</i>	JCM 2152 ^T	>128		
		AHU 1358	>128		
<i>Bacillus</i>	<i>licheniformis</i>	AHU 1371	8		
<i>Bacillus</i>	<i>megaterium</i>	AHU 1373	>128		
<i>Bacillus</i>	<i>pumilus</i>	AHU 1386	8		
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	AHU 1708 ^T	8		
		AHU 1035	16		
		AHU 1037	8		
		AHU 1604	8		
		AHU 1615	16		
		Enterococcus	<i>faecalis</i>	HU1 (VRE)	>128
				M2486	>128
Enterococcus	<i>faecium</i>	M2483	>128		
<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>	ATCC 9338	64		
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	NRIC 1067 ^T	>128		
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	ATCC 7469 ^T	>128		
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	ATCC 25923	>128		
		SUNAI (HA-MRSA)	>128		
		SR-581 (CA-MRSA)	>128		
		JCM 5671 ^T	64		
<i>Streptococcus</i>	<i>agalactiae</i>	JCM 12971 ^T	64		
<i>Streptococcus</i>	<i>mitis</i>	JCM 5705 ^T	64		
<i>Streptococcus</i>	<i>mutans</i>	JCM 5705 ^T	64		
<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>	ATCC 49619	8		
		R6	8		
		SR11	16		
		MH101 (PRSP)	16		
		237 (PRSP)	8		
		442 (Mucoid)	8		
		<i>Streptococcus</i>	<i>pyogenes</i>	JCM 5674 ^T	128
		<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	JCM 5707 ^T	128
		<i>Streptococcus</i>	<i>sanguinis</i>	JCM 5708 ^T	64
		グラム陰性細菌			
細菌種		菌株	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
<i>Acinetobacter</i>	<i>baumannii</i>	ATCC 19606 ^T	>128		
		SRAC2	>128		
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	ATCC 25922	>128		
		ATCC 35218	>128		
		7249 (ST131)	>128		
<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i>	ATCC 51907	>128		
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	ATCC 27853	>128		
		PA103	>128		
		9728 (Mucoid)	>128		
		SRSM2	>128		
<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>	SRSM2	>128		
真菌					
真菌種		菌株	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	SRCA1	>128		
		SRCA4	>128		

VRE:バンコマイシン耐性腸球菌, HA-MRSA:院内感染型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌, CA-MRSA:市中感染型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌, PRSP:ペニシリン耐性肺炎球菌

な自己溶菌酵素である LytA の遺伝子欠損株では, 殺菌時間が遅延することから, ペプチドの肺炎球菌への殺菌機序は, 細胞分裂時の分離異常に伴って生じる溶菌であると考えられる。

おわりに

納豆ペプチドは, 非常に特異な狭域の抗菌スペクトルを有している。肺炎球菌は, 高齢者の市中肺炎, 小児ではしばしば急性中耳炎などを引き起こし, さらに細

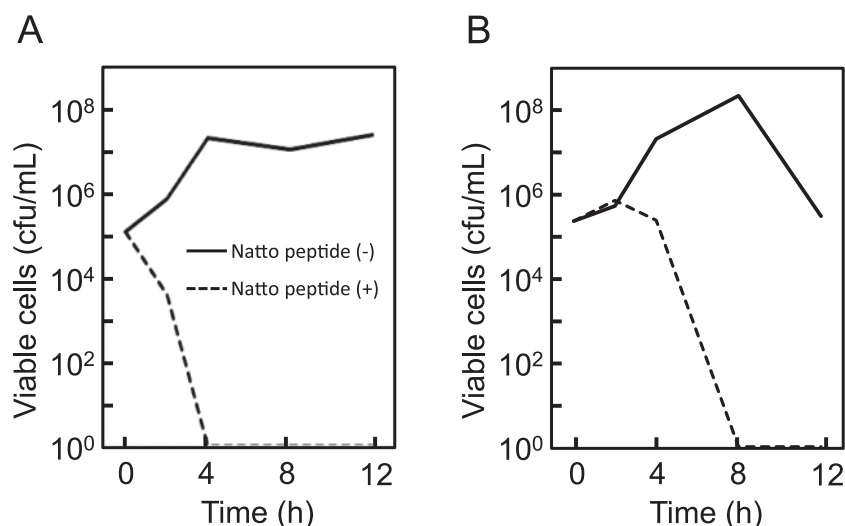


図1 納豆ペプチドの殺菌効果
納豆ペプチド非存在下 (—) および存在下 ($64 \mu\text{g}/\text{mL}$) (---) での *B. subtilis* AHU 1708^T (A) および *S. pneumoniae* R6 (B) の生菌数の推移。

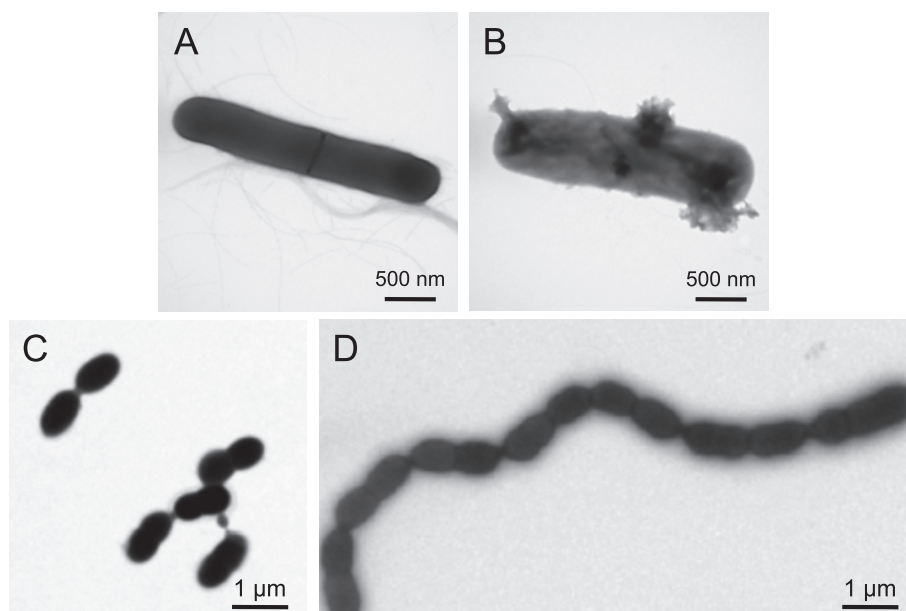


図2 納豆ペプチドによる細胞形態の変化
B. subtilis AHU 1708^Tの納豆ペプチド非存在下 (A) と存在下 ($64 \mu\text{g}/\text{mL}$) (B) での培養4h後の透過電子顕微鏡写真。*S. pneumoniae* R6の納豆ペプチド非存在下 (C) と存在下 ($64 \mu\text{g}/\text{mL}$) (D) での培養4h後の透過電子顕微鏡写真。

菌性髄膜炎に代表される侵襲性感染症を起こす。また、ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) の頻度が高く、その他の抗菌薬に対する交叉耐性も問題となっている¹⁰⁾。納豆ペプチドは、マクロライド系やキノロン系抗菌薬に交叉耐性を示す PRSP に対しても感受性株と同等の殺菌効果を示し、感染予防や治療への有用性が期待される。さらに肺炎球菌に対する作用機序、標的分子を明らかにすることで、常在細菌叢に影響を与えない肺炎球菌特異的な狭域スペクトルの抗菌薬の創薬にもつ

ながると考えている。一方で、納豆ペプチドの抗菌活性とヘミンの関連など、まだまだ不明な点も多く、さらなる研究の進展が必要である。

納豆のような日本古来の伝統的な発酵食品の機能性解明は、われわれの健康維持に役立つだけでなく、卓越した日本の食文化を明らかにする上でも重要と考える。

文献

- 1) 原敏夫：納豆のルーツを求めて。化と生 28：676-681,

1990

- 2) Sumi H, Hamada H, Nakanishi K, et al. : Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haematol* 84 : 139-143, 1990
- 3) 嶋影逸, 新保守, 山田清繁, 他 : プロテアーゼ処理挽き割り納豆からの ACE 阻害物質の精製・同定と高血圧自然発症ラットにおける納豆の血圧上昇抑制作用. *食品臨床栄養* 6 : 1-8, 2011
- 4) 石川篤志, 岸幹也, 山上圭吾 : 納豆, 大豆が健常成人の食後血糖値に与える影響. *生活衛生* 53 : 257-260, 2009
- 5) 辻啓介, 辻悦子 : 納豆がラットのコレステロールレベルに及ぼす影響. *栄養誌* 44 : 41-44, 1986
- 6) 畠山詩織, 加福万愉, 岡本知也, 他 : 納豆抽出成分による抗がん作用機構の解析. *素材物性学雑誌* 27 : 15-19,

2016

- 7) 伊藤英晃 : 納豆抽出抗菌ペプチドの抗がん剤への応用. “抗菌ペプチドの機能解明と技術利用” 長岡功編. シーエムシー出版, 2017, p163-175
- 8) Kitagawa M, Shiraishi T, Yamamoto S, et al. : Novel antimicrobial activities of a peptide derived from a Japanese soybean fermented food, Natto, against *Streptococcus pneumoniae* and *Bacillus subtilis* group strains. *AMB Express* 7 : 127, 2017
- 9) 須見洋行, 大杉忠則 : 納豆および納豆菌中の抗菌成分ジピコリン酸. *日農化会誌* 73 : 1289-1291, 1999
- 10) 横田伸一, 佐藤清, 吉田繁, 他 : フルオロキノロン耐性 *Streptococcus pneumoniae* の検出状況と分子疫学的検討. *感染症誌* 78 : 428-434, 2004

8. 歯周病関連細菌による好中球からの neutrophil extracellular traps 産生を介した炎症反応の誘導

多田 浩之¹⁾, 沼崎 研人¹⁾, 西岡 貴志²⁾, 松下 健二³⁾, 高田春比古¹⁾

¹⁾東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座口腔微生物学分野

²⁾同 口腔病態外科学講座口腔診断学分野

³⁾国立研究開発法人国立長寿医療研究センター口腔疾患研究部

はじめに

歯周病は歯周病関連細菌による感染症であるが、歯周病における歯の喪失を引き起こす歯周組織の破壊は歯周病関連細菌の感染による慢性炎症によりもたらされ、歯周組織における炎症の遷延化は糖尿病や動脈硬化性疾患など、他臓器における炎症性疾患の病態形成に影響を及ぼすことが注目されている。好中球の新たな機能である Neutrophil extracellular traps (NETs) は、自然免疫における感染防御機構である一方、炎症性疾患や自己免疫疾患などさまざまな病態を増悪させることが示唆されている。しかしながら、歯周病の病態形成における NETs の機能的役割については十分に明らかにされていない。本稿では、歯周病関連細菌である *Fusobacterium nucleatum* 感染による好中球からの NETs 産生の意義について、われわれの知見を概説したい。

1. NETs による炎症反応の誘導

自然免疫系において、好中球は粘膜組織における感染防御の最前線を担う免疫担当細胞であり、病原体の刺激に応じて貪食、脱顆粒やサイトカイン産生を行うことで感染防御を担う。2004年、好中球の新たな感染防御機構として NETs が発見された¹⁾。好中球は、細菌、真菌やウイルスなど病原微生物の刺激に応じ、網目状の構造物である NETs を放出し、NETs で病原体を捕獲して破壊する。真菌感染において、好中球は小型の酵母形真菌に対しては貪食を行うのに対して、貪食が不可能な大型の菌糸形真菌に対しては NETs を産生することから、好中球による NETs 産生は、貪食で対処できない感染に対応する免疫応答と捉えられる²⁾。NETs を放出した好中球は、細胞の生存に必要な DNA を放出することで apoptosis や necrosis とは異なる細胞死形態である NETosis に至る。好中球の NETosis 誘導は、細胞死を伴う suicidal NETosis と細胞が生存し機能を保持した状態で NETs 放出を行う vital NETosis の2つのメカニズムが明らかにされている³⁾。Suici-

dal NETosis は、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)、コレステロール結晶や自己抗体などの刺激により、数時間で誘導される。刺激後、NADPH オキシダーゼ活性化により産生された活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) は、peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) 活性化を誘導する。PAD4 はヒストンをシトルリン化することでクロマチンが脱凝縮し、好中球エラスターゼやミエロペルオキシダーゼによる核膜や細胞膜の崩壊に伴いクロマチンが細胞質に移行することでクロマチンに顆粒および細胞質タンパク質が結合し、NETs として細胞外に放出される。一方、vital NETosis は、黄色ブドウ球菌や大腸菌の感染もしくは菌体成分の刺激により、補体受容体、Toll-like receptor (TLR) 2 や TLR4 を介して、数十分と短時間で誘導される。Vital NETosis 誘導は ROS 非依存的で核膜や細胞膜構造は保持され、NETs 放出後も細胞は生存する。NETs はクロマチン線維から成る網状構造物に、ヒストン、好中球プロテアーゼ、ミエロペルオキシダーゼ、抗菌ペプチドや炎症性サイトカインなどが結合しており、これらの分子により NETs に捕捉された病原体は破壊される。NETs は感染防御に重要な役割を担う一方、過剰な NETs 産生や慢性的な NETs の刺激は、動脈硬化性疾患、関節リウマチや全身性エリテマトーデスなど炎症性疾患の病態増悪や、糖尿病における創傷治癒の遅延にかかわることが明らかにされている^{2,4~7)}。

2. 歯周病と NETs

歯周病の病態形成において、歯と歯肉の境界部である歯周ポケットの歯肉上皮バリアは、歯周病関連細菌に対する感染防御の最前線を担う。歯周ポケット内はグラム陰性偏性嫌気性菌を中心とする歯周病関連細菌が常在し温床となっており、それに応じて免疫担当細胞が集積することで炎症が遷延化し、歯肉上皮バリアは破綻する。歯周病患者の歯周ポケットでは、集積する免疫担当細胞の80~95%が好中球であり、老齢マウスを用いた解析から歯周ポケット内への好中球の浸潤

は加齢に伴い増加することが明らかにされている⁸⁾。免疫組織染色の研究結果から、慢性歯周炎患者の歯肉上皮組織には NETs が局在すること⁹⁾、好中球を歯周病関連細菌の一種である *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* や *F. nucleatum* で刺激すると NETs 産生が誘導されることが示されている¹⁰⁾。NETs を産生することができない好中球プロテアーゼのカテプシン C 遺伝子異常を伴う Papillon-Lefèvre 症候群では重度歯周炎の罹患リスクが高いことから¹¹⁾、好中球は歯周病関連細菌に対する感染防御に重要な役割を担うことが示唆される。しかしながら、好中球の過剰な活性化は慢性炎症を引き起こし、NETs が歯周病の病態増悪にかかわる可能性が考えられる。そこでわれわれは、歯周病関連細菌による NETs 産生および NETs が歯周病の病態形成に及ぼす影響について検討した。

3. *F. nucleatum* による NETs 依存性 MIF 産生誘導ならびに NETs による炎症の誘導

歯周病関連細菌の一種であるグラム陰性偏性嫌気性桿菌 *F. nucleatum* は、う蝕の原因菌であるミュータンスレンサ球菌群や歯周病関連細菌と強い共凝集能を有しており、歯周組織のバイオフィームであるデンタルプラークの形成にかかわる。そこで、*F. nucleatum* 感染によるヒト好中球からの NETs 産生と同 NETs による炎症反応の誘導について、ヒト前骨髄球細胞株 HL-60 を all-trans retinoic acid 処理で分化誘導した好中球様細胞を供試し検討した。同好中球を *F. nucleatum* で感染 4 時間後に透過型電子顕微鏡で観察すると、細胞から網状構造物が放出され、*F. nucleatum* が捕捉されていることが観察された。この構造物は細胞膜非透過性 DNA 染色試薬の SYTOX Green で染色され、DNase I 処理で分解されたことから、同構造物は NETs であることが明らかとなった。次に *F. nucleatum* 感染後の好中球を DNase I で処理して抽出した NET 分画におけるシトルリン化ヒストン H3 発現をウェスタンブロット法で解析した結果、*F. nucleatum* 感染により産生された NET 分画には、著明なシトルリン化ヒストン H3 発現が認められた。また、Transwell フィルターを用いた実験結果から、好中球からの NETs 産生には細胞と細菌の直接的な接触が必要であり、NETs 産生の誘導には多量の細菌が必要であったことから、NETs は重度歯周炎の病態形成にかかわる可能性が示唆された。そこで、*F. nucleatum* 感染により好中球から産生された NETs に含まれる各種サイトカインなどの発現について、メンブレンレイ法で網羅的に解析した結果、*F. nucleatum* 誘導性 NETs には、好中球エラスターゼ、ミエロペルオキシダーゼ、抗菌ペプチド LL-37、IL-8 や MCP-1 などのケモカインに加え、マクロファージ遊走

阻止因子 (macrophage migration inhibitory factor : MIF) が著明に発現することが明らかとなった。また、歯周病は複数の歯周病関連細菌による混合感染であることから、他種の歯周病関連細菌の感染による NET 分画の MIF 産生について検討したところ、他の歯周病関連細菌感染も同様に NETs 産生を誘導するが、同 NET 分画における MIF 産生量は *F. nucleatum* が最も高いレベルであった。MIF は、好中球を始め T 細胞、B 細胞、樹状細胞、マクロファージや mast 細胞など多様な免疫担当細胞から産生され、TNF- α 、IFN- γ や IL-1 β を始めとする多様な炎症性サイトカイン産生を惹起し、炎症のマスターレギュレーターとして機能する¹²⁾。また、MIF はアテローム性動脈硬化症、関節リウマチや炎症性腸疾患など炎症性疾患の病態を増悪させることが注目されており、MIF が新たな治療薬のターゲットと捉えられている¹³⁾。*F. nucleatum* 感染細胞の NET 分画および培養上清における MIF 産生を測定したところ、興味深いことに *F. nucleatum* による MIF 産生は NET 分画にのみ認められ、培養上清に MIF 産生は検出されなかった。それに対して、*F. nucleatum* 感染による IL-8 産生は、NET 分画ならびに培養上清の双方で検出され、免疫蛍光染色の結果から MIF は NETs と共局在することが確認された。以上の結果から、歯周病関連細菌の感染により産生された NETs には MIF が著明に結合することが明らかとなった。

次に、*F. nucleatum* 誘導 NETs による炎症反応の誘導について、血管内皮細胞を介する細胞遊走作用 (transmigration) について検討した。Transwell フィルター上に培養したヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を *F. nucleatum* 感染好中球から抽出した NET 分画で刺激後、フィルター下部に IL-8 含有培地を添加し、フィルター上部に好中球を添加することで HUVEC を介してフィルター下部へ transmigration した好中球数を測定した。その結果、HUVEC を *F. nucleatum* 感染 NET 分画で刺激すると、好中球の transmigration が著明に亢進した。一方、動脈硬化症においてコレステロール結晶の刺激で好中球から放出された NETs は、マクロファージを刺激しマクロファージの泡沫細胞への形成を促進させることで病態増悪にかかわる⁶⁾。そこで、低密度リポタンパク質 (low density lipoprotein : LDL) によるマクロファージの泡沫細胞への形成における *F. nucleatum* 感染 NETs に影響について検討した。マクロファージを *F. nucleatum* 感染 NETs で刺激すると、LDL による泡沫細胞への形成が促進されマクロファージからの IL-6 産生が著明に亢進した。以上の結果から、歯周病関連細菌の感染により好中球から産生された NETs は炎症反応を亢進させ、好中球の遊走促進や泡沫細胞の形成促進の誘導にかかわることが示唆された (図 1)。

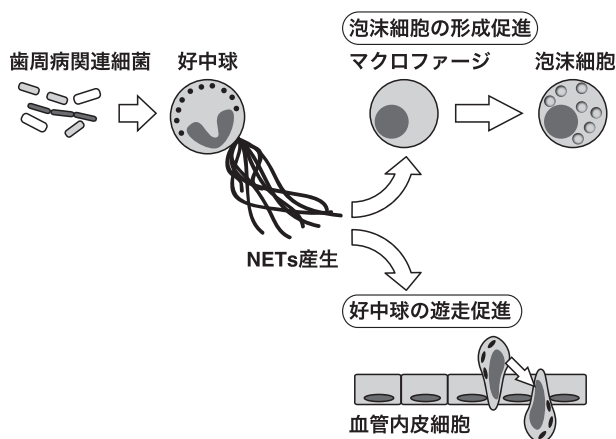


図1 歯周病関連細菌により好中球から産生された NETs による炎症反応の誘導

おわりに

歯周病関連細菌である *F. nucleatum* 感染により好中球から産生される NETs には MIF が高発現し、NETs は泡沫細胞の形成促進や好中球の遊走促進を誘導することで炎症反応を亢進させることを示した。歯周病における NETs 産生は、歯周組織における炎症の遷延化や他臓器の炎症性疾患の病態形成にかかわる可能性があり、今後さらなる検討が必要と考えられる。

文 献

- 1) Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. : Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303 : 1532-1535, 2004
- 2) Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, et al. : Neutrophil sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol* 15 : 1017-1025, 2014
- 3) Jorch SK, Kuberski P : An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med* 23 : 279-287, 2017
- 4) Macanovic M, Sinicropi D, Shak S, et al. : The treatment of systemic lupus erythematosus (SLE) in NZB/W F1 hybrid mice : studies with recombinant murine DNase and with dexamethasone. *Clin Exp Immunol* 106 : 243-252, 1996
- 5) Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, et al. : NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med* 5 : 178ra40, 2013
- 6) Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, et al. : Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science* 349 : 316-320, 2015
- 7) Wong SL, Demers M, Martinod K, et al. : Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nat Med* 21 : 815-819, 2015
- 8) Eskandari MA, Jotwani R, Abe T, et al. : The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss. *Nat Immunol* 13 : 465-473, 2012
- 9) Cooper PR, Palmer LJ, Chapple ILC : Neutrophil extracellular traps as a new paradigm in innate immunity : friend or foe? *Periodontol* 2000 63 : 165-197, 2013
- 10) White PC, Chicca IJ, Cooper PR, et al. : Neutrophil Extracellular Traps in Periodontitis : A Web of Intrigue. *J Dent Res* 95 : 26-34, 2016
- 11) Hart TC, Hart PS, Michalec MD, et al. : Haim-Munk syndrome and Papillon-Léfevre syndrome are allelic mutations in cathepsin C. *J Med Genet* 37 : 88-94, 2000
- 12) Calandra T, Roger T : Macrophage migration inhibitory factor : a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3 : 791-800, 2003
- 13) Morand EF, Leech M, Bernhagen J : MIF : a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis. *Nat Rev Drug Discov* 5 : 399-411, 2006

9. IL-4 は高 L-アルギニン濃度で培養した IFN- γ 活性化マクロファージの結核菌殺菌能を促進する

松村 和典¹⁾, 切替 富美子^{1,2)}, 切替 照雄^{1,2)}

¹⁾ 国立国際医療研究センター研究所・感染症制御研究部

²⁾ 順天堂大学大学院医学研究科微生物学

はじめに

結核は、世界人口の 1/3 が感染していると推計され、年間約 1,000 万人が新規に罹患し、約 140 万人が亡くなる、今なお重要な感染症である¹⁾。近年では、薬剤耐性結核菌の出現や、HIV 感染者の主要な死亡原因が結核であることが問題となっており、新規薬剤やワクチンの開発が急務である。結核菌に対する宿主の感染防御機構を調べることは、それらの開発に重要である。これまでわれわれは、宿主の持つ抗酸化酵素 Peroxiredoxin1 が抗結核に寄与することを示してきた²⁾。本稿では、結核に対する宿主の免疫応答や、抗結核に重要な役割を担うマクロファージの遺伝子発現制御について紹介し、今回われわれが見出した、高 L-arginine (L-Arg) 濃度で培養したマクロファージにおいて、Interleukin (IL)-4 が Nitric oxide (NO) 産生を促進し、結果的に、結核菌殺菌能も向上させた結果を説明する。さらに、この変化をもたらす分子機構について考察し、最後に、このような宿主の感染防御機構を解明することが、結核に対する新規治療法の開発に寄与している例を紹介する。

1. 結核に対する宿主の免疫応答

結核菌に対する宿主の防御応答において軸となるのは、Type 1 helper T (Th1) 細胞応答である³⁾。結核菌は、結核発病者の咳やくしゃみなどを通じて空気感染する菌であり、非感染者が吸い込んだ結核菌は、肺マクロファージ、好中球、単球、さらには樹状細胞などの貪食細胞に捕捉される。結核菌を捕捉した貪食細胞は、炎症性サイトカインを産生し、かつ、抗原提示することで、CD4 陽性 T 細胞を Th1 細胞に分化させる。Th1 細胞が産生するサイトカイン Interferon (IFN)- γ は、マクロファージを活性化し、抗結核能を発揮させる。なかでも Nitric oxide synthase 2 (NOS2) の発現促進は、結核菌殺菌能を有する NO の産生を増大させる。

一方、CD4 陽性 T 細胞が分化する細胞として、寄生虫感染やアレルギー反応において主要な免疫応答を担うのが Th2 細胞である。Th2 細胞が産生するサイトカ

イン IL-4 や IL-13 は、マクロファージに Arginase (ARG) 1 の発現を誘導させる⁴⁾。ARG1 は、NOS2 が NO 産生に用いる基質 L-Arg を競合的に消費する酵素であるため、結果的に NO 産生を抑制する可能性がある。この作用から、IL-4/13 は抗結核応答を阻害すると推測され、実際、結核患者の血清に含まれる IL-4 レベルは健常人より高い⁵⁾。しかし、IL-4 や IL-4 受容体のノックアウトマウスは、野生型マウスと比較して、結核菌に対する抵抗性が向上していると明確に示す結果は得られていない³⁾。ただし、ARG1 のコンディショナルノックアウトマウスは、野生型マウスと比較して、結核菌抵抗性が高いと報告されている⁶⁾。これまでのところ IL-4/13 が宿主の抗結核応答を阻害するかどうか不明である。

2. マクロファージの NOS2 発現誘導機構

マクロファージの NOS2 発現誘導は、細菌などを貪食することから始まる⁷⁾。細菌のもつ代表的なリガンド Lipopolysaccharide (LPS) とマクロファージの表面にある受容体 Toll like-receptor 4 (TLR4) が結合することで、シグナル伝達が始まり、最終的に転写因子 NF- κ B が活性化、核内へ移行し、Nos2 遺伝子のプロモーター領域に結合する。一方、転写因子 Interferon response factor (IRF) 3 がリン酸化し、核内移行して IFN- α/β が産生される。分泌された IFN- α/β は、受容体と結合し、Janus kinase (JAK) を活性化する。活性化した JAK は、転写因子 Signal transducers and activators of transcription (STAT) 1 を活性化、その結果 STAT1 \cdot STAT2 \cdot IRF9 の 3 つの転写因子で構成される複合体 (IFN-stimulated gene factor : ISGF3) が形成され、ISGF3 が核内に移行し、Nos2 遺伝子のプロモーター領域にある IFN-stimulated response element (ISRE) 配列に結合し、前述の NF- κ B と協調して NOS2 発現を増大させる。

Th1 細胞が産生する IFN- γ は、STAT1 を活性化するため、NOS2 発現誘導を、さらに促進する⁴⁾。結核菌が感染したマクロファージでも、この経路により NOS2 を発現するが、結核菌が感染しただけでは NO は、ほと

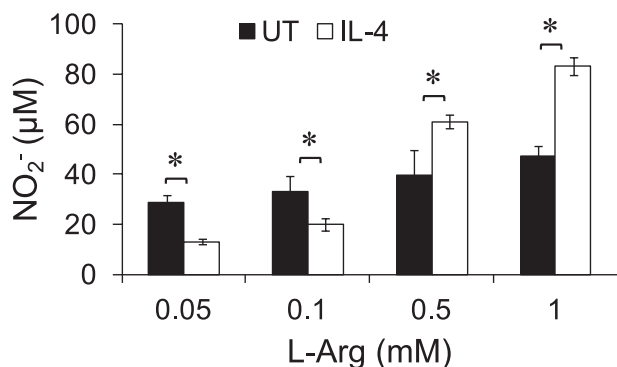


図1 LPS刺激マクロファージのNO産生に与えるIL-4の影響

C57BL/6 マウスから調整した骨髄由来マクロファージを、培地中のL-Arg濃度を0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mMに調整して培養し、10 ng/mL IL-4を添加して24時間後、100 ng/mL LPSで刺激した。LPS刺激して48時間後、培地上清に含まれるNO濃度をGriess法で測定した。

* : p < 0.05

んど産生されない。IFN- γ による活性化を経て、結核菌を殺菌するのに十分な量のNOを産生するようになる⁸⁾。一方、Th2細胞が産生するIL-4/13は、このNOS2発現誘導を抑制すると考えられてきた⁹⁾。しかし、IL-4/13によるNOS2発現誘導抑制機構は明らかになっていない。

3. IL-4によるNO産生制御にL-Arg濃度が与える影響

われわれは、IL-4によるNO産生抑制が、培地中のL-Arg濃度に依存することを見出した。0, 0.1, 0.5および1.0 mMのL-Arg濃度をもつ培地で培養した骨髄由来マクロファージをLPSで刺激し、培養上清に含まれるNOを測定したところ、L-Arg濃度が生理濃度に近い0.1 mM以下では、IL-4はNO産生を抑制し、0.5 mM以上ではNO産生を促進した(図1)。NO産生の違いは、NOS2とARG1の発現バランスによるものと考えられた。LPS刺激のみの細胞では、NOS2が発現するのに対し、ARG1は、ほとんど発現していない(図2)。一方、IL-4添加後LPS刺激した細胞では、NOS2とARG1両方が発現している。L-Arg濃度が0.1 mM以下の場合、ARG1がL-Argを消費するためNO産生は低下するが、0.5 mM以上だと、L-Argが十分に存在するため、ARG1による競合的消費の影響は低下する。さらに、IL-4添加後LPS刺激した細胞の方が、LPS刺激のみの細胞より、NOS2発現が増加しており、そのため、IL-4添加後LPS刺激した細胞によるNO産生が、LPS刺激のみの細胞と同程度ではなく、有意に多く産生する、という結果が得られたものと推察された。こ

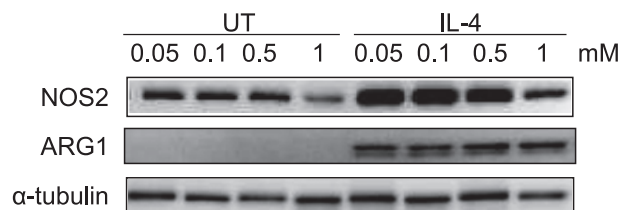


図2 LPS刺激マクロファージのNOS2/ARG1発現に与えるIL-4の影響

図1と同様の条件で行い、LPS刺激して24時間後に細胞破砕液を調整した。ウェスタンブロットにより、NOS2およびARG1を検出した。

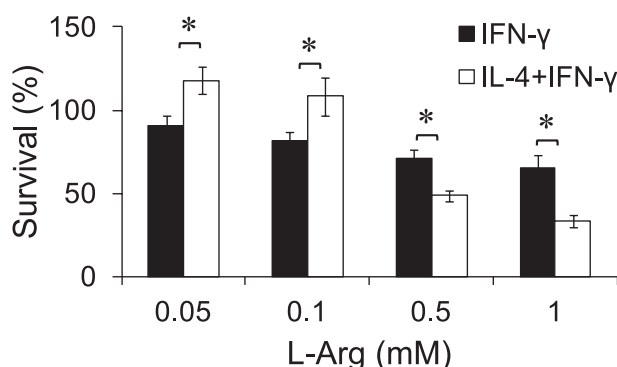


図3 IFN- γ 活性化マクロファージの結核菌殺菌能に与えるIL-4の影響

骨髄由来マクロファージをIFN- γ およびIL-4/IFN- γ で刺激し、結核菌Erdman株を1細胞あたり5つの菌の割合で感染させた。感染4時間後と72時間後に細胞を破碎し、平板培地にプレーティング、3~4週間後に生菌数を測定した。感染4時間後の生菌数を基準に、感染3日後の生存率を算出した。* : p < 0.05

のIL-4によるNOS2発現増加は、L-Arg濃度依存性はみられず、常にLPS刺激によるNOS2発現を促進していた。一方、ARG1発現は、LPS刺激やL-Arg濃度によらず一定であった。

このIL-4依存的NO産生増加が、結核菌殺菌能を促進させているか確認するため、IFN- γ 活性化マクロファージに結核菌を感染させ3日後に生存率を算出した(図3)。L-Arg濃度が0.1 mM以下の場合、IL-4は結核菌殺菌能を阻害し、0.5 mM以上の場合、IL-4は結核菌殺菌能を促進した。これより、NO産生能と結核菌殺菌能に相関がみられ、IL-4は、細胞周囲の環境によっては、結核菌殺菌能を促進することが示唆された。

4. IL-4によるNOS2発現促進機構

IL-4がマクロファージ表面のIL-4受容体と結合すると、JAK-STAT経路が活性化し、転写因子STAT6がリン酸化して核内に移行し、ARG1を初めとするIL-4/STAT6経路特異的遺伝子が発現する⁴⁾。そこで、

STAT6が、このIL-4依存的NOS2発現促進に関与しているかどうか確認するため、STAT6をノックダウンあるいは阻害剤処理により、STAT6の機能を失わせると、IL-4依存的NOS2発現促進は減少した(未発表)。前述のとおり、LPSでマクロファージを刺激すると、IFN- α/β 依存的にISGF3が形成され、NOS2発現が増強するが、このIL-4依存的NOS2発現促進も、ISGF3とかかわりがあるのではないかと考え、STAT6を免疫沈降したところ、ISGF3を構成する転写因子の一つIRF9と結合していた(未発表)。IRF9は、*Nos2*遺伝子のプロモーター領域のISRE配列に結合する転写因子である。よって、IL-4添加してLPSで刺激したマクロファージ内では、少なくともSTAT6とIRF9がISGF3様複合体を形成して、ISRE配列に結合し、NOS2発現を促進する機構が考えられた。

5. 腹腔マクロファージにおけるIL-4によるNOS2発現抑制機構

IL-4によるNOS2発現促進は、骨髄由来マクロファージだけでなく、肺胞、常在性腹腔マクロファージでもみられた(未発表)。一方、チオグリコレート滲出性腹腔マクロファージでは、IL-4はNOS2発現を抑制し、これまでの報告⁹⁾と一致した。チオグリコレートをマウスの腹腔に注射すると、腹膜炎が起きる。腹膜炎を起こしたマウスの腹腔には、生理活性物質Prostaglandin (PG)が滲出する。なかでも15d-PGJ₂は、NOS2発現を抑制する作用を有する¹⁰⁾。チオグリコレート滲出腹腔マクロファージは、15d-PGJ₂へ暴露した結果、IL-4がNOS2発現を抑制する可能性が考えられる。

6. 感染防御の知見を新規治療法開発に生かす試み

ヒト*NOS2A*遺伝子の多型は、結核感受性と相関がある¹¹⁾。結核の病状進行に伴い形成される肉芽腫でNOS2が発現し、結核患者の肺や末梢血から単離したマクロファージは、結核菌を殺菌可能な量のNOを産生する¹²⁾。ヒトの結核において、IL-4/13およびARG1の結核抵抗性への関連は明らかになっていないが、肉芽腫ではARG1も発現しており、NO産生を阻害している可能性が示唆されている¹³⁾。仮にIL-4/13によってARG1が発現していたとしても、結核患者の血中L-Arg濃度を上昇させれば、NO産生が増大し、結核菌をより殺菌できる可能性がある。実際、L-Argを多く含むピーナッツや精製L-Argのサプリメントを結核患者に投与して、病状が改善したという報告がある^{14,15)}。抗結核薬ほどの効果は無いが、薬剤耐性結核菌の出現頻度を減らすため、宿主の防御応答を増強する、このような補助療法の探索が期待される。

おわりに

マクロファージや好中球をはじめとする貪食細胞は、多くの病原体に対して生体防御の最前線で活躍する免疫細胞である。これまでIL-4はマクロファージのNO産生を抑制すると考えられてきたが、この表現型は、培地中のL-Arg濃度に応じて変わりうるものであった。また、IL-4はNOS2発現を抑制すると考えられてきた。これは、ある型のマクロファージでみられるが、他のマクロファージでは、むしろ促進していた。それらの分子機構を明らかにすることが今後の課題である。

文 献

- 1) World Health Organization : Global tuberculosis report 2016. 2016
- 2) Matsumura K, Iwai H, Kato-Miyazawa M, et al. : Peroxiredoxin 1 Contributes to Host Defenses against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 197 : 3233-3244, 2016
- 3) Flynn JL, Chan J : Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 19 : 93-129, 2001
- 4) Martinez FO, Gordon S : The M1 and M2 paradigm of macrophage activation : time for reassessment. *PLoS One* 9 : e100000, 2014
- 5) van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW : Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* 15 : 294-309, 2002
- 6) El Kasmi KC, Qualls JE, Pesce JT, et al. : Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nat Immunol* 9 : 1399-1406, 2008
- 7) Bogdan C : Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity : an update. *Trends Immunol* 36 : 161-178, 2015
- 8) Ehrt S, Schnappinger D, Bekiranov S, et al. : Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and *Mycobacterium tuberculosis* : signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. *J Exp Med* 194 : 1123-1140, 2001
- 9) Bogdan C, Vodovotz Y, Paik J, et al. : Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. *J Leukoc Biol* 55 : 227-233, 1994
- 10) Petrova TV, Akama KT, Van Eldik LJ : Cyclopentanone prostaglandins suppress activation of microglia : down-regulation of inducible nitric-oxide synthase by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 4668-4673, 1999
- 11) Azad AK, Sadee W, Schlesinger LS : Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis. *Infect Immun* 80 :

3343-3359, 2012

- 12) MacMicking JD : Cell-autonomous effector mechanisms against mycobacterium tuberculosis. Cold Spring Harb Perspect Med 4 : doi : 10.1101/cshperspect.a018507, 2014
- 13) Mattila JT, Ojo OO, Kepka-Lenhart D, et al. : Microenvironments in tuberculous granulomas are delineated by distinct populations of macrophage subsets and expression of nitric oxide synthase and arginase isoforms. J Immunol 191 : 773-784, 2013
- 14) Schön T, Elias D, Moges F, et al. : Arginine as an adjuvant to chemotherapy improves clinical outcome in active tuberculosis. Eur Respir J 21 : 483-488, 2003
- 15) Farazi A, Shafaat O, Sofian M, et al. : Arginine adjunctive therapy in active tuberculosis. Tuberc Res Treat 2015 : 205016, 2015

10. 抗 MD-1 抗体による, 炎症反応における血清中 MD-1 の測定意義

一文字 功, 高村 (赤司) 祥子

愛知医科大学感染・免疫学講座

はじめに

Myeloid Differentiation 1 (MD-1) は別名 Lymphocyte Antigen 86 (Ly86) と呼ばれ, 自然免疫受容体である Toll-like receptor (TLR) に構造が似た分子, Radioprotective 105 (RP105) に会合して発現している血清蛋白である。RP105/MD-1 複合体は, B 細胞の生存や増殖を制御して免疫反応に関係していることが知られている。しかし生体内での MD-1 単独の役割はよくわかっていない。著者らはマウス体内での MD-1 の意義を探るため, マウス抗 MD-1 モノクローナル抗体を作製した。それらを用いた結果もまじえて, 現在までにわかっている RP105 および MD-1 に関する知見について述べる。

1. RP105/MD-1 とは

TLR はショウジョウバエの感染防御機構を担う受容体のヒトマウスホモログとして発見され, 現在のところヒトでは 10 種類, マウスでは 13 種類同定されている。樹状細胞やマクロファージ, B 細胞などの免疫担当細胞を中心に, 皮膚や上皮細胞など外界の異物と接触する可能性のある細胞に広く分布して, 自然免疫応答に関して重要な役割を果たしている。ほとんどの TLR ではロイシンリッチリピートの繰り返し構造部分に病原体由来の核酸やリポペプチドを直接結合させて認識する。ただし TLR4 だけは分泌蛋白 MD-2 と会合して発現しており, 脂質リガンドである LPS は MD-2 のポケットに入って TLR4/MD-2/LPS ダイマーを形成することで細胞活性化が生じる¹⁾。

RP105 は当初, B 細胞表面に発現し, 放射線やステロイドで誘発される B 細胞のアポトーシスを抑制する分子として同定された。RP105 は TLR4 同様 22 個のロイシンリッチリピートをもつ分子である。細胞に単独で発現させても細胞表面には発現しないため, RP105 の発現を維持するにはさらに他の分子の関与が予想された。そこで RP105 に対する抗体を用いてマウス脾臓細胞で免疫沈降を行ったところ, 分泌蛋白 MD-1 が共沈分子として同定された²⁾。MD-1 遺伝子欠損マウス由来の細胞では, RP105 は細胞上に発現できないが, MD-

1 を共発現させると細胞表面上に発現する。これらの結果から MD-1 は RP105 が細胞表面上に発現するのに不可欠であると考えられた。B 細胞では, TLR4 が MD-2 と会合するのと同様に RP105 は MD-1 と会合し, RP105/MD-1 複合体となってマウスの成熟 B 細胞を放射線やステロイド誘導性アポトーシスから回避させ, かつ強い増殖反応を惹起する³⁾。MD-1 には, MD-2 が LPS を取り込むポケットを持っているのと同様フォスファチジルコリンなどのリン脂質を取り込むポケットが存在することが最近の構造解析の報告で示されている。

RP105 遺伝子, MD-1 遺伝子はヒトの免疫細胞では B 細胞, 樹状細胞, マクロファージなどでは高く発現しているが, T 細胞では発現が低い。

2. 血清 MD-1 の測定

われわれは MD-1 の生体内での役割を探索するため, 2 種類の抗 MD-1 抗体を作製した (JR7G1, JR2G9)。Ba/F3 細胞の細胞表面に RP105/MD-1 複合体を発現させた細胞 (Ba/RPMD-1) と細胞膜貫通部分を含む MD-1-myc (Ba/MD-1mycTM) を発現させた細胞を用いて調べたところ, JR7G1 は両者とも認識できたが, JR2G9 は後者のみ認識できた。このことから JR7G1 は RP105 とは会合していない MD-1 単独状態だけでなく, RP105/MD-1 複合体の状態でも MD-1 を認識できるが, JR2G9 は RP105 と会合している近傍の MD-1 エピトープを認識するため, RP105 との会合状態では認識できないことがわかった (図 1)。

この 2 つの抗体を用いて ELISA 法を確立し, マウス血清中の MD-1 の濃度を測定したところ, 健常状態でも 0.29 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~0.91 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の MD-1 が存在することがわかった。RP105 遺伝子欠損マウスでは, 野生型マウスに比べてわずかに血清中 MD-1 濃度が高かった。このことから細胞膜上の RP105 は MD-1 と複合体を形成することや血清中に MD-1 を遊離することで, 血清中の MD-1 濃度を調整している可能性が考えられた。

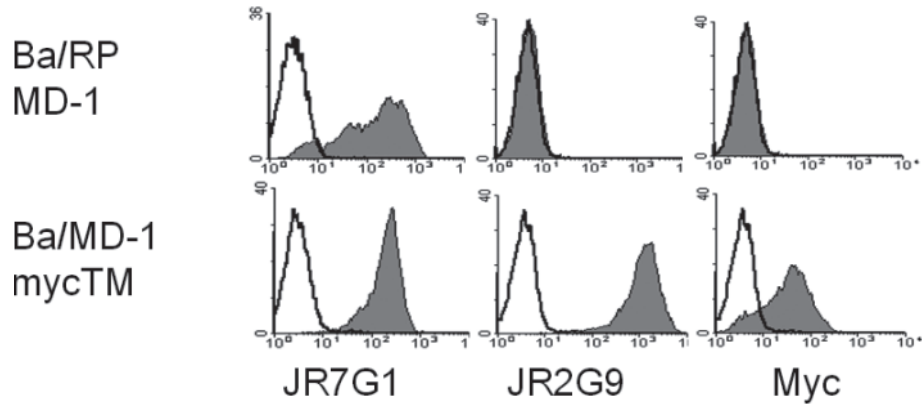


図1 マウス MD-1 モノクローナル抗体の特徴

JR7G1 は MD-1 単独状態だけでなく、RP105/MD-1 複合体も認識する。JR2G9 は MD-1 単独状態を認識する。(Thomas Jennings R, Odkhuu E, Nakashima A, et al. : Inflammatory responses increase secretion of MD-1 protein. Int Immunol 28 : 503-512, 2016. Figure 1 より引用)

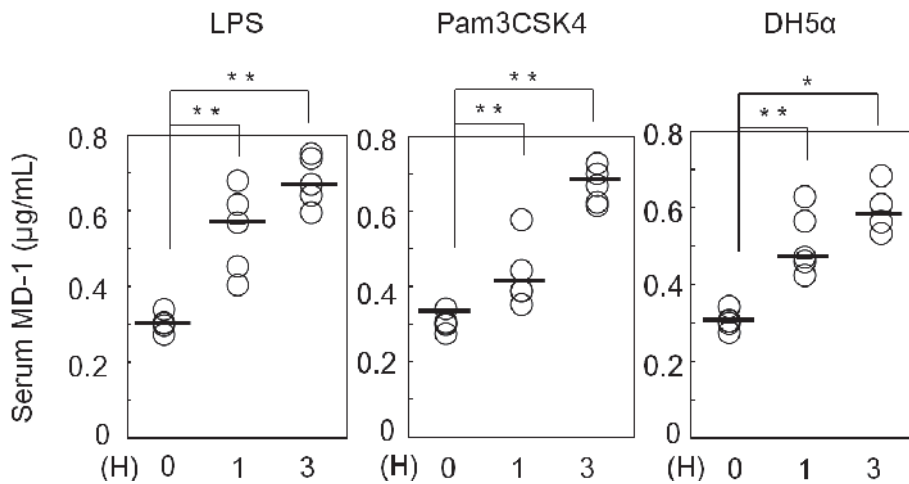


図2 マウス血清中 MD-1 濃度の変化

マウスに LPS, Pam₃CSK₄, DH5α (死菌) を投与すると、投与 1 時間後、3 時間後で血清中 MD-1 は上昇していた。(Thomas Jennings R, Odkhuu E, Nakashima A, et al. : Inflammatory responses increase secretion of MD-1 protein. Int Immunol 28 : 503-512, 2016. Figure 3 より引用)

3. 炎症における RP105 および MD-1

3-1. 感染症における RP105/MD-1

TLR4 に会合する MD-2 は敗血症患者の血中で増加して、LPS を中和している。また RP105 遺伝子欠損マウスや MD-1 遺伝子欠損マウス由来の B 細胞では、LPS 刺激で誘導される細胞増殖が抑制され、CD86 活性化も減弱していた。これらのことから LPS による応答にも RP105 や MD-1 が関与していると考えられる。

一方でこの反応においてはいまだ不明な点も多く、結晶構造解析からも RP105/MD-1 と TLR4/MD-2 が直接会合するとは考えにくく、免疫沈降においても LPS は RP105/MD-1 とは共沈しなかったことから B

細胞での TLR4 反応促進は、RP105/MD-1 と TLR4/MD-2 が直接会合するのではなく、間接的に相互作用をしていると考えられる。

われわれは TLR4 のリガンドである LPS, TLR1/TLR2 のリガンドである Pam₃CSK₄, 熱処理した大腸菌 (DH5α) をマウスに投与して血清中 MD-1 濃度を測定したところ、いずれも血清中 MD-1 の増加を認めた (図 2)。またマウス骨髄由来マクロファージを LPS の活性中心である Lipid A で刺激したところ、上清中の MD-1 濃度の上昇を認めた。このことから感染症発症の際には血清中 MD-1 濃度が急速に上昇し、その原因の一つとしてマクロファージからの産生が考えられた。

3-2. 虚血処置における RP105/MD-1

また手術後/外傷後モデルとして、肝血流/腎血流を虚血後に再灌流させたマウスの血清中 MD-1 を測定した。肝臓を虚血処理した後、再灌流させた 90 分後のマウスの血清中 MD-1 は再灌流前と比べて平均値で 4 倍以上増加していた。また片腎を摘出した後、残腎の腎動脈を 30 分間結紮した後再灌流させたマウスの血清中 MD-1 は結紮を行わなかったマウスと比べて再灌流直後、一日後、三日後とも平均値で 2 倍以上増加していた。これらのことから手術後/外傷後モデルとして臓器を虚血後再灌流すると血液中に MD-1 が増加していることがわかった。

最近 Xiong らは、心不全末期状態で心移植を行った肥大型心筋症患者の心筋では、ドナー患者に比べて MD-1 遺伝子の発現が低下していたと報告した。またマウス大動脈結紮後の心筋肥大反応が、野生型マウスに比べて MD-1 遺伝子欠損マウスで増大しており、逆に MD-1 遺伝子過剰発現マウスでは心筋肥大が野生型に比べて抑制されていたと報告した。さらにこの心筋肥大が MEK-ERK1/2, NF- κ B 活性化シグナル依存的に生じており、MD-1 はこれらのシグナルも抑制することも示した⁴⁾。これらのことから MD-1 は病的な心筋リモデリングを制御していることが明らかになった。

3-3. 自己免疫疾患における RP105/MD-1

Koarada らは SLE やシェーグレン症候群、皮膚筋炎、IgG4 関連疾患患者の血液中の病勢の増悪とともに RP105 陰性 B 細胞が増加している、治療による症状軽快時には減少したと報告している⁵⁾。また異常 T 細胞が脾臓やリンパ節に蓄積することによって脾腫やリンパ節腫脹を来し全身性エリテマトーデスモデルといわれている lpr 遺伝子変異マウスでは血清中の MD-1 が野生型マウスと比較して、上昇しているという報告もある。これらのことから RP105 および MD-1 が自己免疫性疾患の発症や病勢に関係している可能性が考えられる。

3-4. 肥満・高脂肪/高カロリー食負荷における RP105/MD-1

脂肪組織ではマクロファージをはじめとする免疫細胞が浸潤していて、さまざまな炎症促進性サイトカインが放出されている。その結果動脈硬化などが生じ心血管疾患や脳血管疾患の発症に大きくかかわっている。Watanabe らは MD-1 欠失マウスに高脂肪食を与えても、肥満にならないことを報告した⁶⁾。ヒトでも肥満者では MD-1 遺伝子のメチル化が起こっているという報告もあり、MD-1 は肥満形成にかかわっていると考えられる。一方で Karper らは RP105 遺伝子が欠損したマウスでは、動脈硬化の指標となる血管内膜新生が増

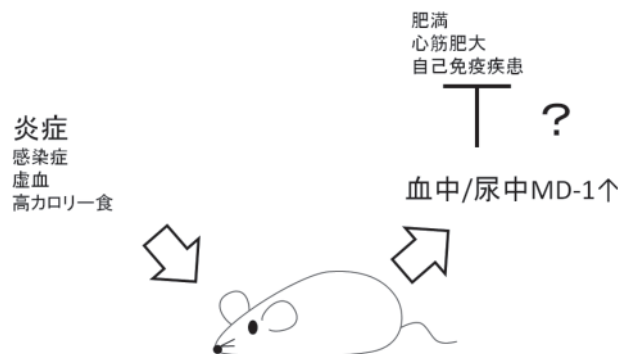


図 3 炎症と MD-1

感染症・虚血・高カロリー食負荷などの炎症応答惹起は、マウスの血中/尿中 MD-1 濃度を増加させる。MD-1 は肥満、心筋肥大、自己免疫疾患などの発症に関与している可能性がある。

加していたと報告している⁷⁾。

われわれは高脂肪/高カロリー食をマウスに与えて、血清中、尿中の MD-1 を測定した。高脂肪/高カロリー食を与えた群では、標準食に比べて、投与開始 2 週間後に血清中の平均値で約 1.3 倍、尿中では約 2 倍増加していた。MD-1 には脂質を取り込むポケットが存在していることから、MD-1 の血清濃度の変化に伴い会合脂質の血清濃度も調節される可能性が考えられる。

おわりに

マウスの健常状態でも血中に MD-1 は単独で存在しており、炎症状態では血中 MD-1 が上昇していることがわかった。感染症モデルや術後モデルなどの急性炎症状態だけでなく、高脂肪/高カロリー食負荷の慢性炎症状態でも血清中 MD-1 は増加することがわかった(図 3)。RP105 分子および RP105/MD-1 複合体の機能は明らかになってきたが、MD-1 単独の機能はまだわからないことが多い。今後はこれら炎症反応における MD-1 の詳しい働きや、ヒトで同様のことが起こっているかの報告が待たれる。MD-1 の機能を明らかにすることは新たな疾患情勢を反映するマーカーや治療法の開発に寄与すると考えられる。

文 献

- 1) Park BS, Song DH, Kim HM, et al. : The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458 : 1191-1195, 2009
- 2) Miyake K, Shimazu R, Kondo J, et al. : Mouse MD-1, a molecule that is physically associated with RP105 and positively regulates its expression. *J Immunol* 161 : 1348-1353, 1998
- 3) Miyake K, Yamashita Y, Hitoshi Y, et al. : Murine B cell proliferation and protection from apoptosis with an

- antibody against a 105-kD molecule : unresponsiveness of X-linked immunodeficient B cells. *J Exp Med* 180 : 1217-1224, 1994
- 4) Xiong X, Liu Y, Mei Y, et al. : Novel Protective Role of Myeloid Differentiation 1 in Pathological Cardiac Remodelling. *Sci Rep* 7 : 41857, 2017
 - 5) Koarada S, Tashiro S, Nagao N, et al. : Increased RP105-Negative B Cells in IgG4-Related Disease. *Open Rheumatol J* 7 : 55-57, 2013
 - 6) Watanabe Y, Nakamura T, Ishikawa S, et al. : The radioprotective 105/MD-1 complex contributes to diet-induced obesity and adipose tissue inflammation. *Diabetes* 61 : 1199-1209, 2012
 - 7) Karper JC, Ewing MM, de Vries MR, et al. : TLR accessory molecule RP105 (CD180) is involved in post-interventional vascular remodeling and soluble RP105 modulates neointima formation. *PLoS One* 8 : e67923, 2013

11. Toll-like receptor 7が1型インターフェロンを産生するにはLFA-1が重要な役割を果たしている

齋藤伸一郎

東京大学医科学研究所感染遺伝学

はじめに

Toll-like receptor (TLR) 7は樹状細胞, マクロファージやB細胞などの免疫担当細胞に発現しており, ウイルスや細菌のRNA成分を認識するセンサーとして働いている。形質細胞様樹状細胞 (pDC) に発現しているTLR7は, インフルエンザ感染時にウイルスのRNA成分を認識して大量の1型インターフェロンを産生することが知られている。pDCは大量に1型インターフェロンを産生することができる特別に分化した細胞で, ウイルスを認識するTLR7とTLR9だけが発現している。ウイルスが感染するとこれらTLRが活性化して1型インターフェロンを大量に産生し, ウイルス防御機構が作動する^{1,2)}。TLR7はこのようにウイルス感染に対する生体防御に有用な役割を果たしている受容体であるが, 最近全身性エリテマトーデス (SLE) モデルマウスの解析からSLEの発症にもかかわっていると報告された^{3,4)}。このSLEの発症においても1型インターフェロンが重要な役割を果たしており, SLEの患者の重篤度と血清の1型インターフェロンの濃度は相関することが知られている。さらにウイルスの防御に重要な役割を果たす細胞であるpDCがSLEのマウスモデルにおいてSLEの発症にかかわっていると報告されている⁵⁾。これらの報告からTLR7を介したpDCからの1型インターフェロンの産生が厳密に制御される必要があることが推測される。しかし, pDCにおけるTLR7の反応調節機構についてはほとんど分かっていない。本稿ではpDCにおけるTLR7の1型インターフェロン産生の調節機構についてわれわれが明らかにしたことを解説する。

1. 細胞間の接着と1型インターフェロンの産生

pDCはウイルス感染において生体防御のため1型インターフェロンを大量に産生する細胞である。そのpDCがB細胞やNK細胞と接着することで1型インターフェロンをより大量に産生することが報告された^{6,7)}。1型インターフェロンの増強にかかわる接着分子についても報告され, LFA-1の作用を抑制する抗体

で1型インターフェロンの産生は抑制された。LFA-1はインテグリンファミリーに属している。LFA-1はCD11aとCD18からなり, CD18はインテグリンベータ2として知られている。われわれはLFA-1の機能を特異的につぶすためCD11aのノックアウト (KO) マウスを解析した。TLR7刺激下でCD11aのノックアウトマウス由来のpDCは炎症性サイトカインであるIL-12は野生型のpDCと同等に産生をするが, 1型インターフェロンであるインターフェロンアルファ (IFN α) の産生は著しく減少していた。pDCは細胞表面にLFA-1だけでなくそのリガンドであるICAM-1とICAM-2を発現していることから, pDC同士の細胞間接着が悪くなったことも観察された。pDCのTLR7を刺激すると刺激後3時間から4時間くらいでpDC同士のaggregationが観察された。しかし, CD11aKO pDCではそのaggregationがほとんど認められなかった。われわれの解析ではTLR7の活性化後にMyD88を介してLFA-1のinside-outシグナル伝達分子として知られているprotein kinase D, そしてRap1が活性化されることが明らかになった。このことからTLR7の活性化により細胞膜上のLFA-1が活性化され, 細胞間同士の接着を強めることが明らかとなった。われわれの解析においてpDCは極性を持っており, 刺激とともにleading edge側が伸長する。その伸長に伴って微小管がleading edge側に強く伸長する。そしてTLR7もleading edge側に移動することが観察された。しかし, LFA-1KO pDCでは微小管の伸長が著しく悪いことが明らかとなった。そしてTLR7のleading edgeへの動きは非常に抑制されていた。このことからTLR7の刺激に伴う移動がIFN α の産生に関与するものと推測した。

2. TLR7に会合する低分子量G蛋白質Arl8bとPLEKHM2を介したTLR7の移動の制御と1型インターフェロンの産生

われわれはLFA-1の解析とは独立して, TLR7に会合する分子でTLR7の機能を制御する分子を同定した。樹状細胞にTLR7やTLR9と会合して小胞体からエンドソーム・ライソソームへの移動にかかわるUNC93b1のC末端にGFPを導入して, 抗GFP抗体で免疫沈降

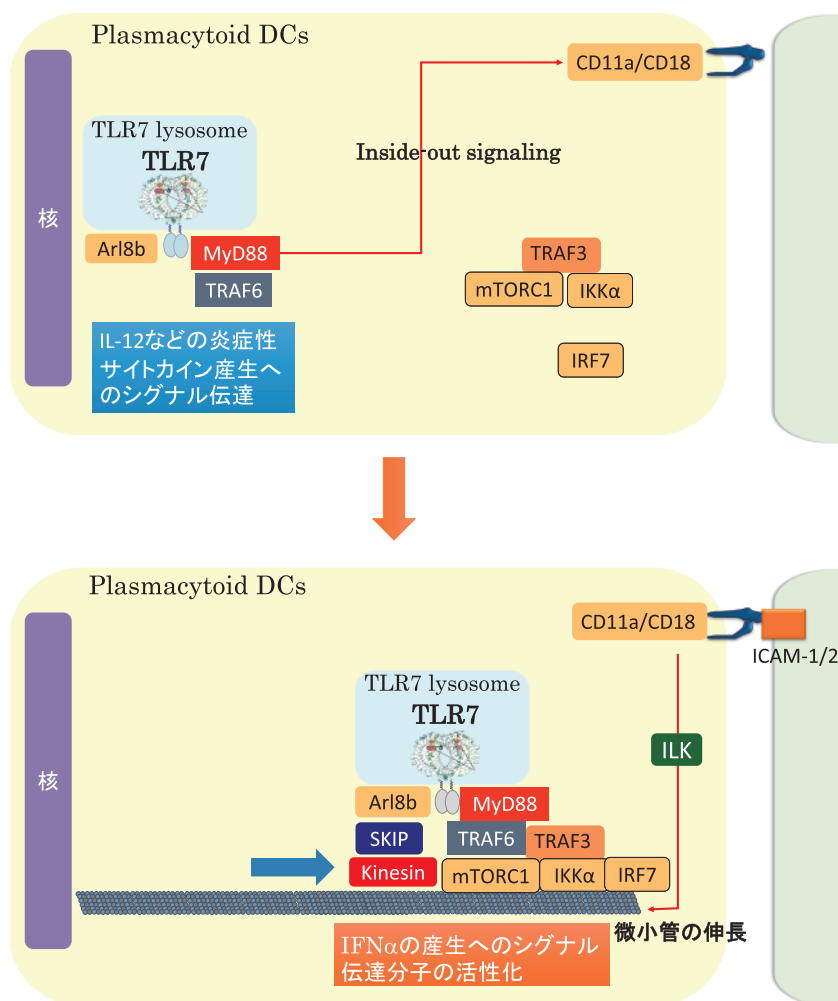


図1 細胞接着がTLR7の順行性の移動を促し、1型インターフェロンの産生を誘導する

刺激前においてTLR7は細胞内全体に存在するが、ほとんどのTLR7は核の近くに局在を示す。しかし、TLR7刺激が入ると炎症性サイトカイン産生に向けてNF- κ Bの活性化などが起こる。そしてさらに、MyD88依存的にinside-outシグナル伝達が活性化し、インテグリンの活性化を誘導する。インテグリンの一つLFA-1が活性化すると、ICAM-1/2と会合して細胞の接着を強く誘導する。細胞間の接着は微小管の極性を持った伸長を起こすことにつながる。それらのシグナルがArl8bを活性化させ、PLEKHM2との会合が促進する。PLEKHM2はキネシンと会合して微小管に会合する。そのことがArl8bに結合しているTLR7を微小管に移動させて順行性の移動を促進させる。TLR7の順行性の移動は細胞内のmTorC1/TRAF3/IKK α の存在する場への移行につながり、TLR7がそのシグナルの場に入ること、IFN α の産生につながるシグナル伝達が起こる。

した。さらに、マクロファージを抗TLR7抗体にて免疫沈降することで、UNC93b1やTLR7に会合する分子を液体クロマトグラフィー質量分析法にて同定した。このUNC93b1にもTLR7にも会合していた分子はライソソームに局在する低分子量G蛋白質のADP-ribosylation factor-like 8b (Arl8b)であった⁸⁾。実際にpDCを用いてTLR7を免疫沈降するとArl8bが会合していることが確認され、TLR9とはあまり会合していないこ

とからTLR7に対する特異性が示された。次にArl8bのpDCにおける機能を調べるため、Arl8bの発現を無くする遺伝子改変マウスArl8b GeneTrap (Arl8bGt)マウスを用いて解析した。するとArl8bGtのpDCはTLR7刺激特異的にIFN α の産生が著しく減少した。Arl8bはPLEKHM2と会合することでKinesin-1と会合し、微小管上を順行性に移動する⁹⁾。このようにArl8bはライソソームの順行性の輸送にかかわってい

るとの報告があったため、pDCにおけるTLR7の局在を調べると、TLR7のほとんどはライソソームに局在していた。このことからArl8bGtのpDCにおいて刺激後のTLR7の動向を検討してみると、WTにおいては刺激とともにTLR7が微小管と共局在するにもかかわらず、Arl8bGtではそれがほとんど認められなかった。さらに刺激によるTLR7の移動もArl8bGt pDCではほとんど確認できなかった。そこでPLEKHM2KOマウスを入手しPLEKHM2KOのpDCを解析すると、Arl8bGtと同様にTLR7刺激依存的な微小管への局在もほとんど認められず、TLR7の順行方向への移動もほとんど認められなかった。そしてArl8bGtと同様にTLR7刺激後のIFN α の産生が著しく減少していた。これらの結果からTLR7にArl8bとPLEKHM2が会合することで、TLR7が刺激依存的に順行性に移動してIFN α の産生につながるシグナル伝達が始まることが予想された。TLR7は刺激後TRAF6を活性化させ、炎症性サイトカインのためのシグナル伝達であるNF- κ BやMAP kinaseを活性化する。次にTRAF3やIRF7が活性化されることにより、IFN α の産生が起こる¹⁰⁻¹²。われわれはTLR7刺激後にTRAF6に1型インターフェロン産生にかかわるTRAF3とIRF7が会合してくることを免疫沈降法にて観察した。そして、この現象はArl8bGtのpDCではほとんど観察できなかった。このことから、TRAF6がTRAF3やIRF7と会合してIFN α の産生を誘導するにはArl8bを介したTLR7の移動が重要である可能性が示唆された。最後にインフルエンザウイルスを感染させArl8bGt pDCの反応を調べると、炎症性サイトカインIL-12の産生は野生型と変わらないにもかかわらず、IFN α の産生は著しく低下した。このインフルエンザウイルス感染においても、野生型のpDCではTLR7は微小管と共局在を示し、順行性の移動を確認できた。しかし、Arl8bGtのpDCではTLR7は感染後ほとんど微小管と共局在せず、TLR7の順行性の移動がほとんど観察できなかった。このことからウイルス感染における反応においてもTLR7の順行性の移動がIFN α の産生と結びついていることが示唆された。

おわりに

図1に示すようにわれわれの研究結果をまとめるとTLR7刺激によりMyD88依存的なinside-out signalingの活性化によりLFA-1の活性化をもたらす、pDC同士の接着が起こる。そして、そのことがpDC内の極性をもった微小管の伸長を促し、TLR7に会合しているArl8bがPLEKHM2を介して微小管に会合するようになる。次にTLR7が微小管上を移動してIFN α の産生につながるシグナル伝達分子TRAF3やIRF7と出会う場であるmTorC1が存在するライソソームに順行性

の移行をするということである。pDC、そしてpDCに存在するTLR7やその下流の産生物であるIFN α はウイルスに対する防御に重要な役割を果たしているが、SLEの発症にもかかわるといわれている。そのため、次にわれわれはArl8bとSLEの発症に関して検討したい。

文 献

- 1) Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, et al. : Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303 : 1529-1531, 2004
- 2) Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. : Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303 : 1526-1529, 2004
- 3) Pisitkun P, Deane JA, Difilippantonio MJ, et al. : Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. *Science* 312 : 1669-1672, 2006
- 4) Christensen SR, Shupe J, Nickerson K, et al. : Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity* 25 : 417-428, 2006
- 5) Rowland SL, Riggs JM, Gilfillan S, et al. : Early, transient depletion of plasmacytoid dendritic cells ameliorates autoimmunity in a lupus model. *J Exp Med* 211 : 1977-1991, 2014
- 6) Hagberg N, Berggren O, Leonard D, et al. : IFN- α production by plasmacytoid dendritic cells stimulated with RNA-containing immune complexes is promoted by NK cells via MIP-1 β and LFA-1. *J Immunol* 186 : 5085-5094, 2011
- 7) Ding C, Cai Y, Marroquin J, et al. : Plasmacytoid dendritic cells regulate autoreactive B cell activation via soluble factors and in a cell-to-cell contact manner. *J Immunol* 183 : 7140-7149, 2009
- 8) Khatter D, Sindhwani A, Sharma M : Arf-like GTPase Arl8 : Moving from the periphery to the center of lysosomal biology. *Cell Logist* 5 : e1086501, 2015
- 9) Rosa-Ferreira C, Munro S : Arl8 and SKIP act together to link lysosomes to kinesin-1. *Dev Cell* 21 : 1171-1178, 2011
- 10) Sasai M, Linehan MM, Iwasaki A : Bifurcation of Toll-Like Receptor 9 Signaling by Adaptor Protein 3. *Science* 329 : 1530-1534, 2010
- 11) Hacker H, Redecke V, Blagoev B, et al. : Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 439 : 204-207, 2006
- 12) Oganessian G, Saha SK, Guo B, et al. : Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and-independent antiviral response. *Nature* 439 : 208-211, 2006

12. 黒酢中の自然免疫活性化物質と酢酸菌由来リポ多糖

橋本 雅仁¹⁾, 馬場梨沙子²⁾, 大菌 まみ²⁾, 橋口 周平¹⁾, 隅田 泰生¹⁾
深瀬 浩一³⁾, 藤本ゆかり⁴⁾

¹⁾鹿児島大学理工学域工学系, ²⁾同 大学院理工学研究科
³⁾大阪大学大学院理学研究科, ⁴⁾慶應義塾大学理工学部

はじめに

黒酢は、鹿児島県特産の醸造酢であり、玄米を用いて静置発酵法で製造されることを特徴としている。経験的に黒酢は血液の循環不良による病気の改善、コレステロールや中性脂肪の減少、アトピーやアレルギーの改善に有効であるとされている。同時に、黒酢の科学的な研究も進んでおり、黒酢および抽出成分が抗酸化作用、血圧低下、抗がん作用などを示すことが報告されている。

黒酢は発酵食品であり、麴による糖化、酵母によるアルコール発酵、酢酸菌による酢酸発酵を数週間から数カ月程度で並行複発酵し、その後さらに1年以上の間静置し熟成することで製造される。この際、発酵微生物の多くは死滅するため、黒酢には微生物由来成分が豊富に含まれていると考えられる。しかし、これら黒酢中の微生物由来成分についてはこれまで検討されていない。そこで本稿では、黒酢中の微生物由来成分の免疫学的性質と、黒酢に含まれる酢酸菌由来の成分の性質と構造について述べる。

1. 黒酢中の微生物由来成分の分離と免疫学的性質

黒酢の醸造には、麴カビや酵母といった真菌、乳酸菌などのグラム陽性菌や酢酸菌などのグラム陰性菌が関与している¹⁾。これら微生物の細胞構成成分の一部は、哺乳類の自然免疫系レセプターに認識され、免疫系を調整することが知られている。例えば、グラム陰性菌のリポ多糖 (LPS) は TLR4 に、細菌のリポタンパク質 (LP) は TLR2 に、細菌の DNA は TLR9 に、ペプチドグリカンの部分構造は NOD1/2 にそれぞれ認識される²⁾。そこでまず黒酢に自然免疫レセプター活性化能を持つ成分が含まれているかどうかについて検討した。TLR2, TLR4, TLR9, NOD1, NOD2 を強制発現させた細胞を用いて、凍結乾燥した黒酢の活性を調べたところ、TLR2 および NOD1/2 に対して活性化能を持つことがわかった³⁾。

黒酢には、有機酸、アミノ酸などの成分が多量に含まれている。そこで黒酢中の自然免疫活性化成分のうち

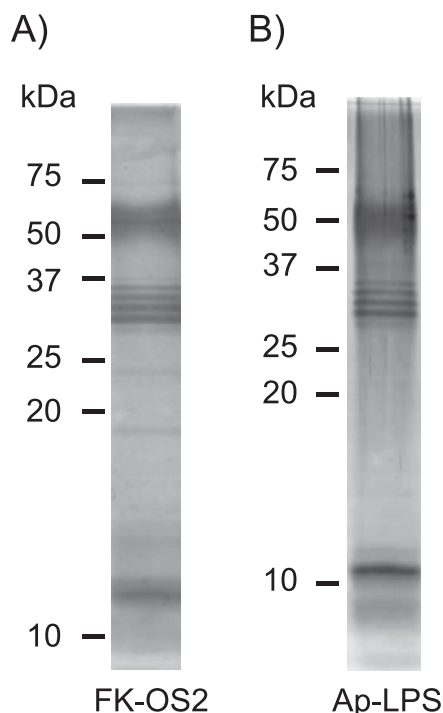
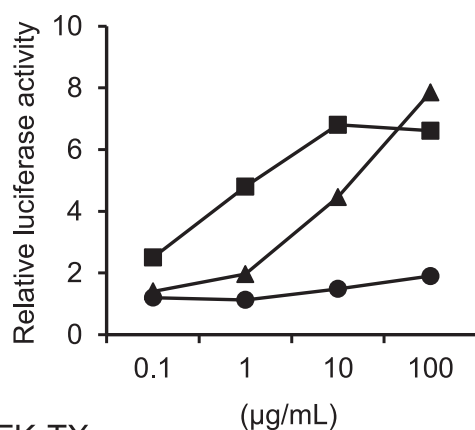


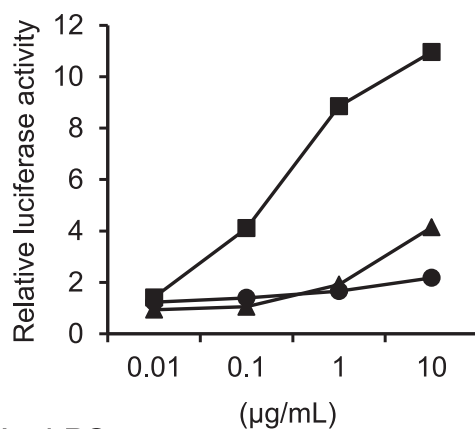
図 1 A: 黒酢疎水性成分 (FK-OS2)
B: *A. pasteurianus* 由来リポ多糖 (Ap-LPS) の SDS-PAGE 泳動像

疎水性の成分に注目して分離を試みた³⁾。まず、オクチルセファロースを用いた疎水性クロマトグラフィーによって黒酢 (900 mL) を分離し、非吸着画分 (FK-OS1; 20.3 g) と吸着画分 (FK-OS2; 1.8 mg) を得た。両画分を SDS-PAGE で分離し過ヨウ素酸銀染色で糖を可視化すると、FK-OS1 はほとんど可視化されなかったものの、FK-OS2 にはラダー状の LPS に特徴的なパターンが存在することがわかった (図 1A)。両画分の活性を検討したところ、TLR2 活性化能は FK-OS2 に濃縮されており (図 2A)、FK-OS1 には存在しないことがわかった。また、FK-OS2 は TLR4 活性化能も有しており、LPS による活性が濃縮によって検出可能になったと考えられた。一方、FK-OS2 画分は NOD1 活性化能を持たないこともわかった。これらの結果は、黒酢中の疎水性成分は TLR2, TLR4 活性化能を有する LPS

A) FK-OS2



B) FK-TX



C) Ap-LPS

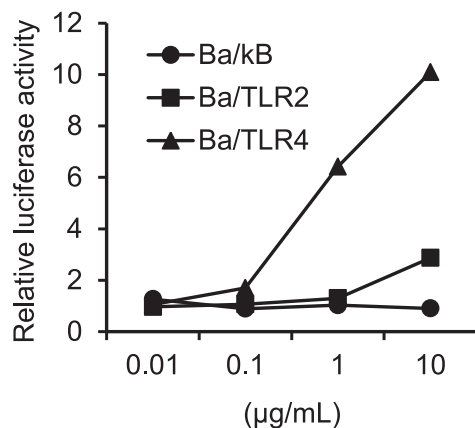


図 2 黒酢中の活性化成分
A: FK-OS2, B: FK-TX, C: Ap-LPS
の TLR 活性化能
活性は NF- κ B 依存的ルシフェラーゼ
アッセイによって検出した。

や LP 様の細菌由来成分であることを示唆している。

ついでトリトン X-114 による二層分配によって黒酢 (400 mL) を抽出し、疎水性の抽出物 (FK-TX; 2.5 mg) を得た。FK-TX は、主に TLR2 活性化能を有しており (図 2B)、LP 様成分が優先して濃縮されたことがわかった。

以上の結果は、黒酢中には発酵微生物由来と考えられる微生物由来自然免疫活性化成分が含まれていることを示している。しかし、黒酢中に含まれる疎水性成分の量は、アミノ酸などの主要成分に比べてごく微量であった。また黒酢の発酵微生物が多様であるため、活性化成分も複数の成分の混合物であったため、単離が困難であり構造決定には至らなかった。

2. 酢酸菌由来 LSP の性質とそのリピド A 構造

LPS は、グラム陰性菌の細胞表層に存在する自然免疫活性化複合糖質である。一般に LPS は、多糖繰り返し構造を持つ O-抗原多糖部分、コアオリゴ糖部分、糖脂質であるリピド A 部分から構成されている⁴⁾。このうちリピド A 部分が活性を持つ最小構造であり、TLR4 に認識されて自然免疫系を活性化することが合成化学的に証明されている。大腸菌などに存在する典型的な構造のリピド A は、強力に TLR4 を活性化することが知られている。一方で、バクテロイデス類縁菌のリピド A は構造の一部が異なっており TLR4 活性化能が弱いことが知られている。黒酢に含まれる LPS は酢酸菌由来であると考えられるため、酢酸菌の LPS の活性と構造を検討し黒酢中の成分と比較することで、その性質を明らかにすることにした。

黒酢中では、*Acetobacter pasteurianus* が酢酸発酵に関与することが知られている。そこで、*A. pasteurianus* NBRC 3283 を供試菌として用いて検討した⁵⁾。菌体を温水フェノール抽出後、粗抽出物をオクチルセファロースを用いた疎水性クロマトグラフィーによって分離し、吸着画分として LPS 画分 (Ap-LPS) を得た。SDS-PAGE の結果、Ap-LPS もラダー状のパターンを示すことがわかった (図 1B)。またこのパターンは、FK-OS2 のものと同様であったことから、黒酢に含まれる LPS 様成分は *A. pasteurianus* 由来の LPS であることが強く示唆された。また、Ap-LPS の TLR4 活性化能は、大腸菌 LPS に比べて 1/100 程度であり (図 2C)、活性が弱いことがわかった。

そこでリピド A の構造について検討した⁵⁾。一般に LPS は弱酸で処理すると LPS 中の糖である Kdo のグリコシド結合が加水分解され、多糖部分とリピド A に分離できる。しかし Ap-LPS は弱酸処理でほとんど加水分解されず、酸に強い構造を持つことがわかった。一部分解されたリピド A を、単糖分析、質量分析、NMR により解析したところ、図 3 に示す新規の構造を持つことがわかった。大腸菌のリピド A と比較すると、リン酸基が存在せず、脂肪酸の鎖長が長いことから、構造の差異が TLR4 に対する低活性の原因であると考えられた。また、グリコシド結合が酸に強い Ko を持つことから、Kdo から Ko への置換が Ap-LPS の耐酸性

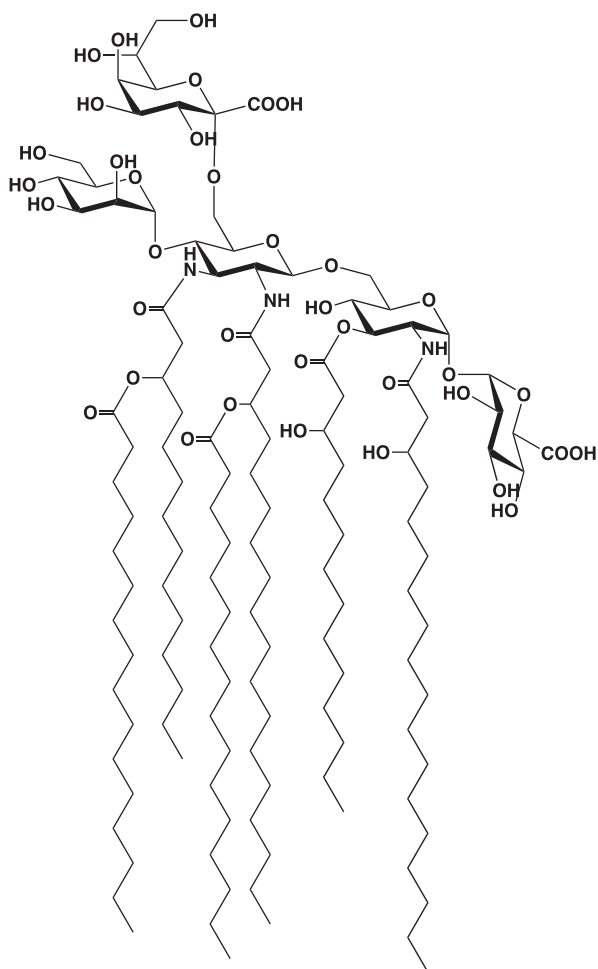


図3 *A. pasteurianus* リピドAの構造

の原因であると推測された。さらに、LPSが黒酢中で1年以上の間安定に存在する理由も、この耐酸性構造が関与している可能性がある。

おわりに

これまで黒酢の生物活性成分としては、アミノ酸や抗酸化物質などが明らかにされてきている。本研究では、それ以外の活性成分として微生物由来自然免疫活性化成分が含まれていることを明らかにした。とくに酢酸菌由来のLPSについては酸性環境下でも長期間構造が維持されるなど特異な構造を持つことも明らかとなった。今後は、黒酢中のLPSなどの成分の黒酢の効能に対する寄与について検討するとともに、LPをはじめその他の成分の構造について明らかにしたい。

文 献

- 1) Murooka Y, Nanda K, Yamashita M : Rice vinegars. In "Vinegars of the world." eds Solieri I, Giudici P, Springer-Verlag, Milan, Italy, 2009, p121-133
- 2) Kawai T, Akira S : Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34 : 637-650, 2011
- 3) Hashimoto M, Obara K, Ozono M, et al. : Separation and characterization of the immunostimulatory components in unpolished rice black vinegar (kurozu). *J Biosci Bioeng* 116 : 688-696, 2013
- 4) Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, et al. : Bacterial endotoxin : molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J* 8 : 217-225, 1994
- 5) Hashimoto M, Ozono M, Furuyashiki M, et al. : Characterization of a Novel D-Glycero-D-talo-oct-2-ulosonic acid-substituted Lipid A Moiety in the Lipopolysaccharide Produced by the Acetic Acid Bacterium *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283. *J Biol Chem* 291 : 21184-21194, 2016

13. ピリミドインドール骨格を有する TLR4 リガンドの構造改変と構造活性相関解析

若尾 雅広¹⁾, 杜若 祐平¹⁾, Alast Ahmadiiveli²⁾, 馬場 暁士¹⁾, 大山 真也¹⁾, 新地 浩之¹⁾, Michael Chan²⁾, 林 公子²⁾, Howard B. Cottam²⁾, Dennis A. Carson²⁾, 隅田 泰生¹⁾

¹⁾鹿児島大学大学院理工学研究科, ²⁾カリフォルニア大学サンディエゴ校ムーアがんセンター

はじめに

Toll 様受容体 (Toll-like receptors : TLRs) は, 代表的なパターン認識受容体 (pattern recognition receptor : PRRs) の一つで, ウイルスやバクテリアなどの病原体に特徴的な分子パターン (pathogen-associated molecular patterns : PAMPs) や, 自己細胞の損傷・壊死によって生じる分子パターン (damage-associated molecular patterns : DAMPs) を認識することによって, 自然免疫, 獲得免疫, 炎症反応を誘導する^{1,2)}。ヒトでは TLR1 から TLR10 の 10 種類が, マウスでは TLR1 から TLR9, TLR11 から TLR13 の 12 種類がこれまでに見つかっており, TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 は細胞表層に, TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 は細胞内の小胞体, エンドソームに存在している。それぞれ TLR は特定の分子構造を認識することが知られており, TLR2, TLR4, TLR6 は病原体の細胞壁成分の PAMPs を, TLR7, TLR9 は, 病原体由来の核酸成分の PAMPs を認識する。DAMPs については, 細胞表層成分が TLR2, TLR4 によって, 細胞やミトコンドリア由来の核酸成分が TLR7, TLR9 によって認識される。近年, TLR4 においては, 特定の天然有機化合物や合成化合物が TLR4 を活性化することが見出されており, これらを活用した炎症反応の分子機構解明や, がんやウイルスに対する免疫療法の開発などが注目されている。本稿では, TLR4 リガンドに焦点をあて, 最近の研究について概説する。

1. TLR4 の機能

TLR4 は, 主として樹状細胞などの自然免疫担当細胞の細胞表層やエンドソームに存在する。通常, アクセサリータンパク質であるミエロイド分化因子-2 (myeloid differential factor-2 : MD-2) と複合体を形成しており, 細菌の外膜成分であるリポ多糖 (LPS) やリピド A などの PAMPs を認識することによって免疫系を活性化する³⁻⁵⁾。TLR4 の活性化は, CD14 依存的または CD14 非依存的なリガンド/TLR4/MD-2 複合体の形成と二量体化を経て, アダプタータンパク質である TI-

RAP-MyD88 を介する経路, または TRAM-TRIF を介する経路で起こり, 炎症性サイトカインまたは I 型インターフェロンの産生を促進する (図 1)^{4,6)}。TLR4 の活性化は, 炎症反応を誘導する一方で, 抗がん作用や抗ウイルス作用, 獲得免疫において重要な働きを持つことから, TLR4 リガンドを利用した抗ウイルス療法や抗がん療法の開発が検討されている。

2. TLR4 リガンド

2-1. リピド系 TLR4 リガンド

グラム陰性細菌の細胞表層を構成する LPS やリピド A は TLR4 のリガンドとして働く。LPS がエンドトキシンの活性本体⁷⁾であることが見出されて以来, これまでにさまざまなリピド A 誘導體, 類縁体が合成されている^{8,9)}。構造活性相関研究では, リピド A の脂質成分や, リン酸部位などの構造改変によって, TLR4 のアゴニスト活性, アンタゴニスト活性を有するリピド系 TLR4 リガンドが見出されている。アゴニスト活性には, 抗腫瘍作用や免疫賦活作用などの有用な作用がみられることから, TLR4 リガンドを用いたがん治療, ワクチン療法が検討されている。がん治療では, 現在のところよい成果は得られていないが, がんワクチン療法では, モノホスホリリピド A (MPLA)¹⁰⁾が, 子宮頸癌ワクチンなどのアジュバントとして現在使用されている。一方, アンタゴニスト活性を有するリピド系 TLR4 リガンドでは, いまだ治療法が確立していない敗血症治療などへの応用が検討されている。

2-2. 非リピド系 TLR4 リガンド

近年, 天然有機化合物, 漢方薬成分, 合成化合物ライブラリーを用いたスクリーニングによって, オピオイド類¹¹⁾やポリフェノール類¹²⁾, 4-アミノキノザリン類¹³⁾, ネオセプチン類¹⁴⁾などの化合物に TLR4 活性化能が見出されている。これらの非リピド系 TLR4 リガンドは, リピド系 TLR4 リガンドとは異なり, CD14 を介さず MD-2 と結合して TLR4 のシグナル調節を行う。アゴニスト活性をもつ化合物は, リピド系 TLR4 アゴニストと同様に, がん治療, ワクチン療法への応用が検討さ

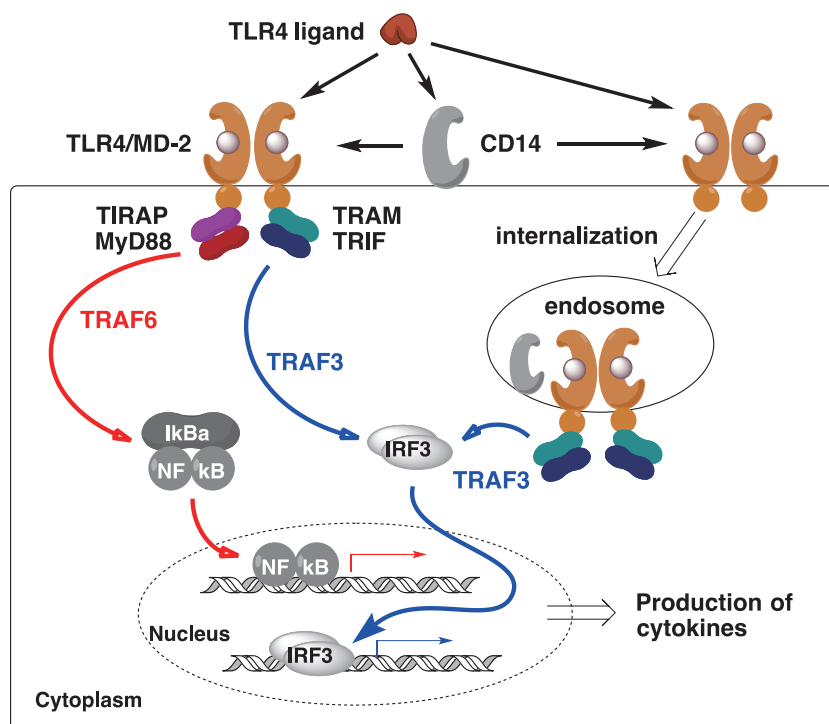


図1 TLR4のシグナル伝達経路

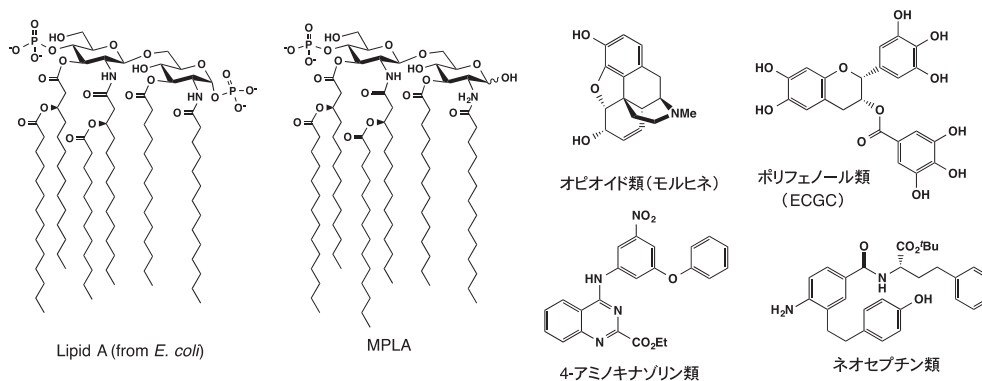


図2 TLR4リガンドの構造

れており、水溶性に乏しい脂質成分を含まないことから、製剤化においても注目されている。一方、オピオイド類においては、中枢神経系の炎症反応に関与し、神経障害性疼痛をはじめとする難治性の神経免疫疾患への関与が示唆されており、オピオイド類を用いた中枢神経系におけるTLR4シグナルの機能解析が進められている。

3. ピリミドインドール系TLR4リガンド

われわれの研究グループでは、ハイスループットスクリーニングの結果、ピリミドインドール骨格を持つ1Z65および1Z105がTLR4アゴニスト活性を有することを見出している(図3)¹⁵⁾。これまでの構造活性相関研究では、2位のチオアセトアミド基部分、3位のN-

フェニル基部分の構造がTLR4アゴニスト活性において重要であること、また5位のN-メチル基の有無が細胞毒性に影響することが報告されている。またTLR4/MD-2複合体の結晶構造を用いた分子モデリングでは、ピリミドインドール骨格のベンゼン環部位が、TLR4との相互作用に重要であることが示唆されている(図4)。われわれは、さらなるアゴニスト活性の向上を目指し、これまでに調べられていないピリミドインドール部位の構造活性相関について検討しており¹⁶⁾、本節では、ベンゼン環を持たないピロロピリミジン誘導体の設計と合成、ドッキングシミュレーションならびに生物活性について述べる。

3-1. ピロロピリミジン誘導体の設計と合成

設計・合成したピロロピリミジン誘導体を図5に示す。置換基 R¹ においては、メチル基の有無によって細胞毒性が変わることから、ヒドリド体ならびにメチル化体の合成を行った。また置換基 R², R³ においては、置換基効果を調べるため、無置換体 (2A61, 2A164), ジメチル体 (2A38, 2A96), シクロヘキシル体 (2A59, 2A157), シクロヘプチル体 (2A212, 2A228) を設計した。これらの誘導体は、市販の2-シアノケトン類または3-アミノピロール-2-カルボン酸類を出発化合物とし、ピリミジン骨格を形成させた後、チオアセトアミド側鎖の導入を行ってピロロピリミジン類を合成した。

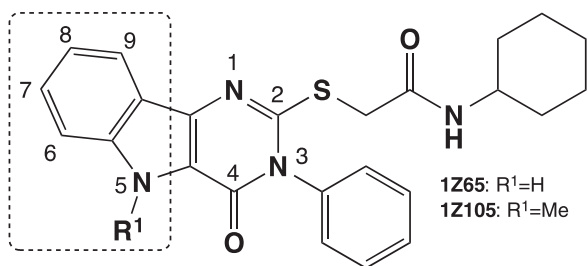


図3 ピリミドインドール系 TLR4 リガンド

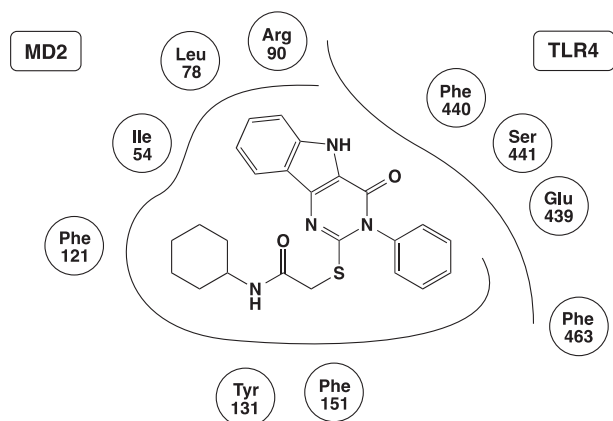


図4 ピリミドインドール系 TLR4 リガンドの分子モデリングによる解析

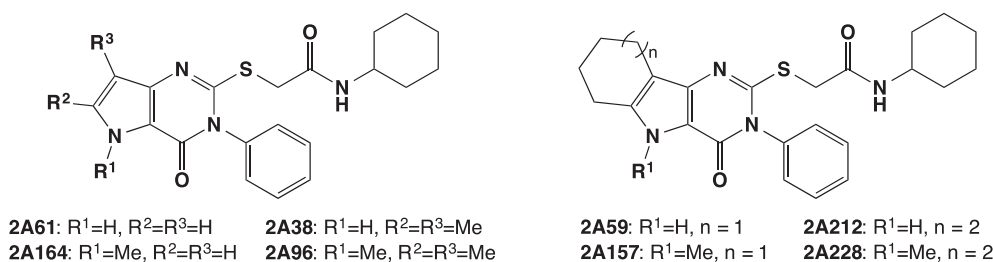


図5 ピロロピリミジン誘導体の設計

3-2. ピロロピリミジン誘導体のドッキングシミュレーション

設計・合成したピロロピリミジン誘導体のドッキングシミュレーションは、MOE (Molecular Operating Environment) を用いて行った。結晶構造には、マウス由来またはヒト由来の LPS/TLR4/MD-2 複合体の結晶構造 (PDB, マウス: 5IJJ, ヒト: 3FXI) を用い、リガンド分子である LPS を除去後、TLR4/MD-2 複合体の最適化を行って計算に使用した。結合サイトの選定は Site Finder を用い、ドッキング実験は Dock を用いて行った。ドッキング実験の結果を表1に示す。1Z65, 1Z105 では、リガンド/TLR4/MD-2 複合体形成が予想される良好なドッキングスコアが得られた。ベンゼン環を持たない誘導体 2A61, 2A164 においては、スコアが増大することから、親和性の低下が予想される。一方、置換基を有する 2A39, 2A95, 2A59, 2A157, 2A212, 2A228 においては、置換基が大きくなるにしたがいスコアが減少することから、疎水性の向上に伴い親和性が向上すると予想される。

表1 合成した TLR4 リガンドのドッキングシミュレーション

Compound	DS ^a to hTLR4 ^b /MD-2 (kcal/mol)	DS ^a to mTLR4 ^c /MD-2 (kcal/mol)
1Z65	-7.62	-7.29
1Z105	-7.95	-7.67
2A61	-7.38	-7.10
2A164	-7.75	-7.55
2A39	-7.60	-7.54
2A95	-7.95	-7.60
2A59	-7.94	-7.69
2A157	-8.19	-7.90
2A212	-8.15	-8.09
2A228	-8.31	-8.31

^aDS: Docking score, ^bhTLR4/MD-2: human TLR4/MD-2 complex (PDB: 3FXI), ^cmTLR4/MD-2: mouse TLR4/MD-2 complex (PDB: 5IJJ).

3-3. ピロロピリミジン誘導体の生物活性評価

合成したピロロピリミジン誘導体の生物活性については、マウス TLR HEK Blue 細胞を用いた分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP) アッセイによる予備的な活性試験を行った。その結果、無置換体 (2A61, 2A164) では、TLR4 の活性化がみられなかったが、ジメチル体 (2A38, 2A96)、シクロヘキシル体 (2A59, 2A157)、シクロヘプチル体 (2A212, 2A228) においては、TLR4 の活性化がみられることがわかった。よりかさ高く疎水性の高いシクロヘプチル体では、1Z105 に類似する活性がみられることから、1Z105 のベンゼン環部位への疎水基の導入は、TLR4/MD-2 複合体の形成に優位であると考えられる。さらなる生物活性評価とピリミドインドール系 TLR4 リガンドの構造活性相関解析は今後の課題である。

おわりに

ピリミドインドール系 TLR4 リガンドの構造活性相関解析では、アゴニスト活性において、ピリミドインドール骨格のベンゼン環部位の疎水性が重要であることがわかった。この部位でのさらなる構造最適化は、より高い活性を持つ TLR4 リガンドの創製につながる。また、アゴニスト活性やアンタゴニスト活性など、シグナル選択的に作用する TLR4 リガンドを見出すことができれば、TLR4 を標的とした抗ウイルス療法や抗がん療法への応用が期待できる。

文 献

- 1) Akira S, Takeda K : Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol* 4 : 499-511, 2004
- 2) Bianchi ME : DAMPs, PAMPs and alarmins : all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81 : 1-5, 2007
- 3) 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
- 4) Kobayashi M, Saitoh S, Tanimura N, et al. : Regulatory roles for MD-2 and TLR4 in ligand-induced receptor clustering. *J Immunol* 176 : 6211-6218, 2006
- 5) Park BS, Song DH, Kim HM, et al. : The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458 : 1191-1195, 2009
- 6) Yamamoto M, Takeda K, Akira S : TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol Immunol* 40 : 861-868, 2004
- 7) Westphal O, Lüderitz O : Chemische Erforschung von lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien. *Angew Chem* 66 : 407-417, 1954
- 8) Wang X, Smith C, Yin H : Targeting toll-like receptors with small molecule agents. *Chem Soc Rev* 42 : 4859-4866, 2013
- 9) Peri F, Calabrese V : Toll-like receptor 4 (TLR4) modulation by synthetic and natural compounds : an update. *J Med Chem* 57 : 3612-3622, 2014
- 10) Mata-Haro V, Cekic C, Martin M, et al. : The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science* 316 : 1628-1632, 2007
- 11) Wang X, Loram LC, Ramos K, et al. : Morphine activates neuroinflammation in a manner parallel to endotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 109 : 6325-6330, 2012
- 12) Youn HS, Lee JY, Saitoh SI, et al. : Suppression of MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways of Toll-like receptor by (-)-epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea. *Biochem Pharmacol* 72 : 850-859, 2006
- 13) Nour A, Hayashi T, Chan M, et al. : Discovery of substituted 4-aminoquinazolines as selective Toll-like receptor 4 ligands. *Bioorg Med Chem Lett* 24 : 4931-4938, 2014
- 14) Wang Y, Su L, Morin MD, et al. : TLR4/MD-2 activation by a synthetic agonist with no similarity to LPS. *Proc Natl Acad Sci USA* 113 : E884-E893, 2016
- 15) Chan M, Hayashi T, Mathewson RD, et al. : Identification of substituted pyrimido [5,4-b] indoles as selective toll-like receptor 4 ligands. *J Med Chem* 56 : 4206-4223, 2013
- 16) Chan M, Kakitsubata Y, Hayashi T, et al. : Structure-activity relationship studies of pyrimido [5,4-b] indoles as selective Toll-like receptor 4 ligands. submitted to *J Med Chem*

14. 糖脂質 α -GalCer を基盤とした脂質改変型 CD1d リガンドの創製研究

井貫 晋輔¹⁾, 相羽 俊彦^{1,2)}, 平田 菜摘¹⁾, 柏原 瑛美¹⁾, 喜多 俊介³⁾
前伸 勝実³⁾, 深瀬 浩一²⁾, 藤本ゆかり¹⁾

¹⁾慶應義塾大学理工学部化学科, ²⁾大阪大学大学院理学研究科, ³⁾北海道大学大学院薬学研究院

はじめに

脂質抗原の提示を担う CD1d は樹状細胞などに存在し T 細胞の分化, 活性化を制御することが知られている。CD1d は糖脂質リガンドと結合すると, ナチュラルキラー T (NKT) 細胞上の T 細胞抗原受容体 (TCR) に認識され, IFN- γ などの Th1 サイトカインや, IL-4 などの Th2 サイトカインを含むさまざまなサイトカイン産生を誘導する¹⁾。これらのサイトカインは免疫応答のバランス制御にかかわっており, 制御を可能とする CD1d リガンドの創製は重要な研究課題である。これまでの研究において, CD1d リガンドの構造によって, 誘導されるサイトカインの量やバランスを制御可能であることが報告されている²⁾。既知の CD1d リガンドとしては海洋天然物を基盤に開発された糖脂質 α -GalCer (KRN7000)³⁾ や OCH⁴⁾ が知られている (図 1)。 α -GalCer は INF- γ や IL-4 を強力に誘導することが知られており, 現在, 頭頸部腫瘍に対する iNKT 細胞免疫療法 (先進医療 B) に用いられている。一方, OCH は IL-4 選択的なりガンドであり, 多発性硬化症やクローン病に対する治療薬として, 臨床試験が行われている。これまでの α -GalCer の構造活性相関研究により CD1d に対するリガンド結合様式の解明が精力的に進められてきたが²⁾, CD1d の疎水性ポケットにおける脂質リガンド認識機構の詳細な解析はあまり行われていない。本稿では, α -GalCer の長鎖脂肪酸部位の変換によるサイトカイン誘導活性制御に焦点をあて, これまでに報告されている脂質改変型 α -GalCer 誘導体を概説するとともに, われわれの最近の知見を紹介する。

1. 脂質改変型 CD1d リガンド

α -GalCer は, ガラクトース部位, スフィンゴシン部位, 長鎖脂肪酸部位からなる糖脂質であり, NKT 細胞を介して, 強力なサイトカイン誘導能を有することが知られている。これまでに, いくつかのグループによって, α -GalCer の長鎖脂肪酸部位の構造変換によりサイトカインの誘導量やバランスが変化することが報告されている (図 1)。Goff らは α -GalCer と比較して短い

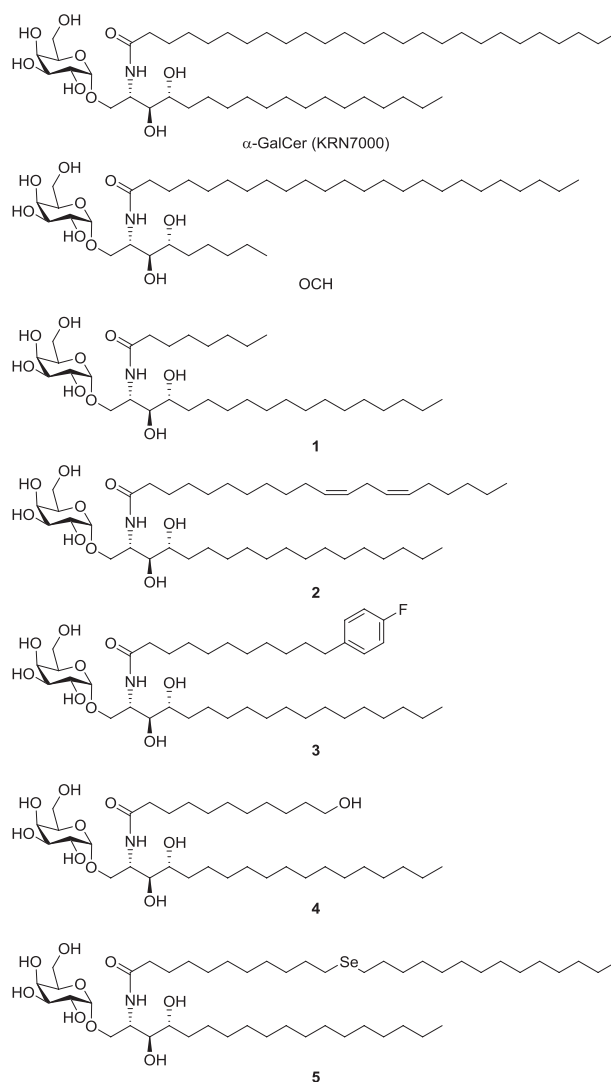


図 1 α -GalCer (KRN7000) およびその誘導体の構造

脂肪酸部位を有するリガンドを用いた場合, IL-4 選択的なりガンドを示すことを報告している (1)⁵⁾。Yu らは, 脂肪酸部位に不飽和結合を導入すると IL-4 選択的なりガンドとなることを見出している (2)⁶⁾。また Im らは, これらの Th2 選択性の発現は, リガンドの細胞内挙動の違いによって制御されていると報告している⁷⁾。Fujio らは, Ar 基を脂肪酸末端に有

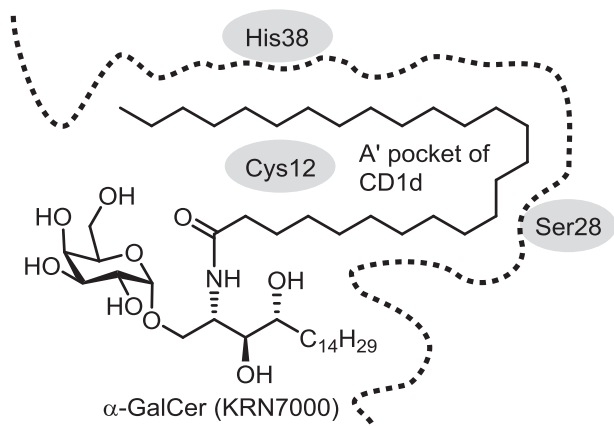


図2 CD1dの疎水性ポケット

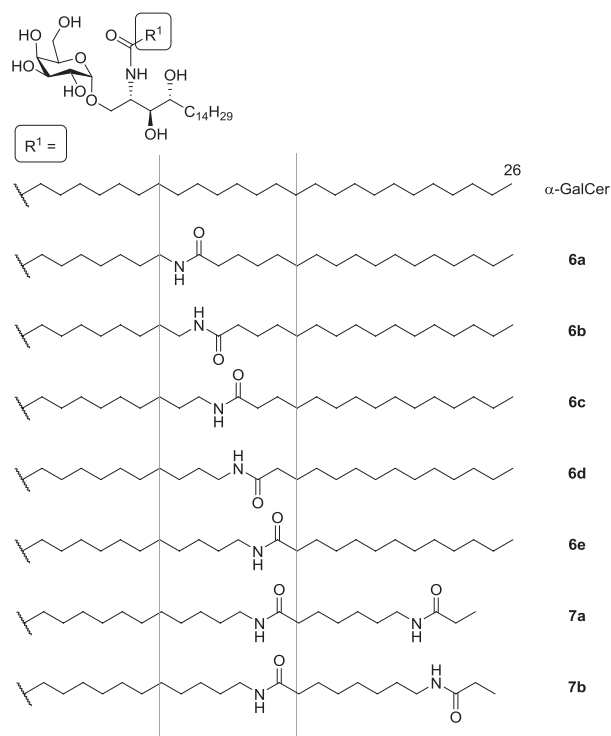
するリガンドがIFN- γ などのTh1サイトカイン選択的な活性を示すことを報告するとともに(3)⁸⁾, CD1dとの結合親和性の高さとTh1サイトカイン選択的との間に相関関係があることを明らかにしている^{9,10)}。Limらは、脂肪酸末端に水酸基を有するリガンドを用いると、 α -GalCerと比較して活性は低下するもののサイトカイン誘導活性を保持することを報告している(4)¹¹⁾。また最近、Hossainらは、セレン原子を脂肪酸に導入した α -GalCer誘導体がTh1サイトカイン選択的誘導活性を示すことを報告している(5)¹²⁾。このように長鎖脂肪酸部位の構造変換が誘導されるサイトカインの量やバランスに影響を与えることが明らかとなっているが、詳細な誘導メカニズムなどの知見は限られており、現在も解析が進められている。

2. アミド基を有する脂質改変型CD1dリガンドの開発

このような背景のもと、われわれは α -GalCerの長鎖脂肪酸部位の構造展開を基に、NKT細胞を介したサイトカイン誘導制御を可能とする新規CD1dリガンドの創製を目指すとともに、CD1dの脂質結合部位におけるリガンド認識機構の解明とその制御を目的として、研究に着手した¹³⁾。

2-1. リガンドデザイン

糖脂質やリン脂質など生体関連脂質分子は、主に糖やリン酸基などの親水性ヘッドグループと長鎖アルキル基などの疎水性領域から構成されている。長鎖アルキル基などは、脂質認識タンパク質中の非極性アミノ酸から構成される疎水性ポケットによって疎水性相互作用を介して認識される。しかしながら、いくつかの脂質認識タンパク質において、これらの疎水性ポケット中の限定的な領域に、極性アミノ酸を見出すことができる。疎水性領域における水素結合はタンパク質表面などの親水性領域における水素結合と比較し、より

図3 アミド基を有する α -GalCer誘導体

安定な結合を形成することが報告されているが^{14,15)}, 脂質認識において疎水性ポケット中の親水性アミノ酸残基に着目して、水素結合形成を狙う試みは限られている。われわれは、これらの親水性残基に着目し、水素結合形成可能なリガンドをデザインすることを計画した。これまでに報告されているCD1d- α -GalCer複合体のX線結晶構造(PDB:3G08)¹⁶⁾を精査した結果、 α -GalCerの長鎖アルキル基との相互作用領域である疎水性ポケット(A'pocket)中に、限定した範囲で存在する水素結合可能な親水性領域(Ser28およびCys12, His38周辺部)を見出した(図2)。われわれは親水性領域に対して水素結合などを介して相互作用可能なアミド基を α -GalCerの脂肪酸部位に導入することを計画した(図3)。そこで、CD1dのSer28との相互作用が予想される部位近傍にアミド基を導入した5数種のリガンド(6a-e)を合成した。またCys12, His38との相互作用を意図したリガンド(7a, 7b)も併せて合成した。

2-2. 生物活性評価

活性評価としては、CD1dタンパク質とNKTハイブリドーマ(2E10)¹⁷⁾を用いたサイトカイン誘導能評価を最初に行った(APC-free assay)¹⁸⁾。すなわち、CD1dをプレートに固定化し、各リガンドを加えた後、NKTハイブリドーマを加え、誘導されるサイトカイン(IL-2)の量を定量した(図4a, 4b)。リガンド6a, 6bは α -GalCerと比較し、ほぼ同等のサイトカイン誘導能を示

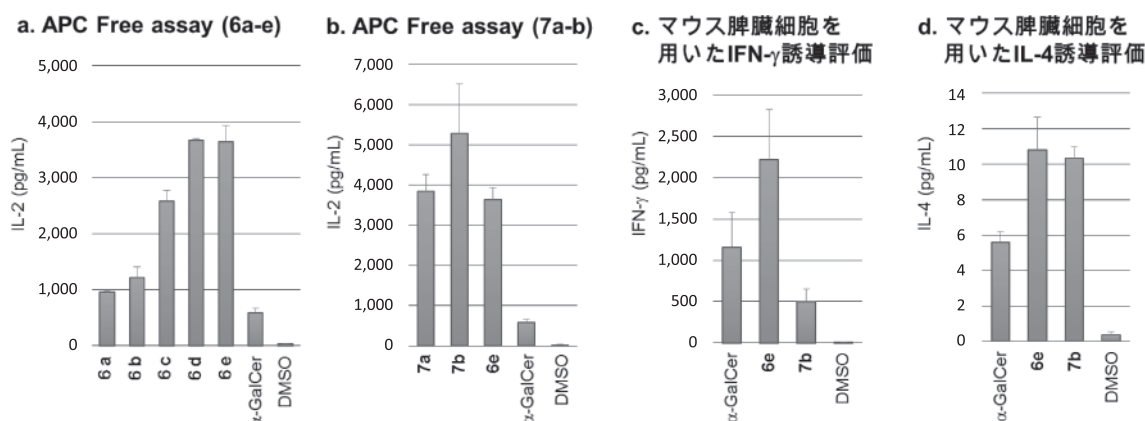


図 4 NKT ハイブリドーマ (2E10 cell) と CD1d タンパク質を用いた APC Free assay, マウス (C57BL/6NCrSlc) 脾臓細胞を用いたサイトカイン (IFN- γ , IL-4) 誘導評価

した。一方, 6c を用いた場合, 活性が向上した。さらに 6d, 6e は, より高いサイトカイン誘導を示した。このように, アミド基の導入位置が活性発現に大きな影響を与えることから, CD1d タンパク質とリガンド間の特定の相互作用が示唆された。また, 2つのアミド基を有する 7a, 7b を用いて活性評価を行った結果, 7b において活性が向上した。

続いて 6e, 7b に関して, マウス脾臓細胞を用いたサイトカイン誘導評価を行った (図 4c, 4d)。本評価系では, NKT 細胞, CD1d を発現する樹上細胞など, 複数種の細胞が混在する脾臓細胞にリガンドを添加し, 誘導されるサイトカイン INF- γ および IL-4 の量を定量した。6e は, α -GalCer と比較して, INF- γ と IL-4 ともに誘導能が向上した。一方で, 7b は, INF- γ の誘導能は低下したが, IL-4 の誘導能は向上した。リガンド 7b の IL-4 選択性発現メカニズムの詳細な解析は今後の課題である。

おわりに

われわれは, CD1d の脂質認識部位に存在する特定の極性アミノ酸残基が, 親和性向上のための新たな作用点となることを見出した。本結果は単純な構造変換により脂質リガンドの活性向上が可能であることを示しており, 脂質認識タンパク質に対する高親和性リガンド設計に重要な指針を与えると期待される。また, これら CD1d リガンドは, 自己免疫疾患などの治療薬や, ワクチンアジュバントとしての展開が期待される。

文 献

- 1) Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB : Invariant natural killer T cells : an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol* 13 : 101-117, 2013
- 2) Laurent X, Bertin B, Renault N, et al. : Switching

invariant natural killer T (iNKT) cell response from anticancerous to anti-inflammatory effect : molecular bases. *J Med Chem* 57 : 5489-5508, 2014

- 3) Morita M, Motoki K, Akimoto K, et al. : Structure-activity relationship of alpha-galactosylceramides against B16-bearing mice. *J Med Chem* 38 : 2176-2187, 1995
- 4) Miyamoto K, Miyake S, Yamamura T : A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Science* 413 : 531-534, 2001
- 5) Goff RD, Gao Y, Matther J, et al. : Effects of lipid chain lengths in α -galactosylceramides on cytokine release by natural killer T cells. *J Am Chem Soc* 126 : 13602-13603, 2004
- 6) Yu KO, Im JS, Molano A, et al. : Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acyl variants of alpha-galactosylceramides. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 : 3383-3388, 2005
- 7) Im JS, Arora P, Bricard G, et al. : Kinetics and cellular site of glycolipid loading control the outcome of natural killer T cell activation. *Immunity* 30 : 888-898, 2009
- 8) Fujio M, Wu D, Garcia-Navarro R, et al. : Structure-based discovery of glycolipids for CD1d-mediated NKT cell activation : tuning the adjuvant versus immunosuppression activity. *J Am Chem Soc* 128 : 9022-9023, 2006
- 9) Liang PH, Imamura M, Li X, et al. : Quantitative microarray analysis of intact glycolipid-CD1d interaction and correlation with cell-based cytokine production. *J Am Chem Soc* 130 : 12348-12354, 2008
- 10) Li X, Fujio M, Imamura M, et al. : Design of a potent CD1d-binding NKT cell ligand as a vaccine adjuvant. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 13010-13015, 2010
- 11) Lim C, Kim JH, Baek DJ, et al. : Design and Evaluation

- of ω -Hydroxy Fatty Acids Containing α -GalCer Analogues for CD1d-Mediated NKT Cell Activation. ACS Med Chem Lett 5 : 331-335, 2014
- 12) Hossain MI, Hanashima S, Nomura T, et al. : Synthesis and Th1-immunostimulatory activity of α -galactosylceramide analogues bearing a halogen-containing or selenium-containing acyl chain. Bioorg Med Chem 24 : 3687-3695, 2016
- 13) Inuki S, Aiba T, Hirata N, et al. : Isolated Polar Amino Acid Residues Modulate Lipid Binding in the Large Hydrophobic Cavity of CD1d. ACS Chem Biol 11 : 3132-3139, 2016
- 14) Schmidtke P, Luque FJ, Murray JB, et al. : Shielded hydrogen bonds as structural determinants of binding kinetics : application in drug design. J Am Chem Soc 133 : 18903-18910, 2011
- 15) Gao J, Bosco DA, Powers ET, et al. : Localized thermodynamic coupling between hydrogen bonding and microenvironment polarity substantially stabilizes proteins. Nat Struct Mol Biol 16 : 684-690, 2009
- 16) Sullivan BA, Nagarajan NA, Wingender G, et al. : Mechanisms for glycolipid antigen-driven cytokine polarization by V α 14i NKT cells. J Immunol 184 : 141-153, 2010
- 17) Nyambayar D, Iwabuchi K, Hedlund E, et al. : Characterization of NKT-cell hybridomas expressing invariant T-cell antigen receptors. J Clin Exp Hematop 47 : 1-8, 2007
- 18) Zeissig S, Olszak T, Melum E, et al. : Analyzing antigen recognition by Natural Killer T cells. Methods Mol Biol 960 : 557-572, 2013

生体防御機能研究に!

精製のグレードにより二種類の製品を用意

- **フェノール抽出品** … Westphal法(フェノール抽出法)による抽出品
- **超遠心品** … フェノール抽出品をさらに超遠心で2回精製した製品

ラインナップ

- *E. coli* O26、O55、O86a、O103、O111、O113、O127、O150、O157
- *Campylobacter jejuni* Penner O:19
- *Salmonella typhimurium*, minnesota1114、R595
- *Proteus vulgaris* OX2、OX19、mirabilis OXK
- *Helicobacter pylori* GU2、CA2
- *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277
- *Pseudomonas aeruginosa* PA01
- *Berdetella pertussis* Tohama

LPSの受託生産と販売

弊社では、LPSの抽出・精製サービスを行っております。
ご希望の方は弊社または弊社代理店営業員までご連絡ください。

	コードNo.	品名	容量※
超遠心品	126-06331	Lipopolysaccharide, from <i>B. pertussis</i> Tohama	2mg
	121-05161	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O26	5mg
	128-05171	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O55	5mg
	222-01901	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O86a	5mg
	126-05471	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O103	5mg
	125-05181	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O111	5mg
	124-06251	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O113	5mg
	122-05191	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O127	5mg
	121-06261	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O150	5mg
	129-05461	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O157	5mg
	229-01911	Lipopolysaccharide, from <i>H. pylori</i> GU2	2mg
	120-05871	Lipopolysaccharide, from <i>H. pylori</i> CA2	2mg
	120-06351	Lipopolysaccharide, from <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	2mg
	129-05961	Lipopolysaccharide, from <i>P. aeruginosa</i> PA01	5mg
	126-05971	Lipopolysaccharide, from <i>S. typhimurium</i>	5mg
	124-05651	Lipopolysaccharide, from <i>S. minnesota</i> 1114	5mg
121-05661	Lipopolysaccharide, from <i>S. minnesota</i> R595	5mg	
フェノール抽出品	128-05671	Lipopolysaccharide, from <i>C. jejuni</i> Penner O:19	5mg
	120-05131	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O26	25mg
	127-05141	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O55	25mg
	125-05201	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O111	25mg
	124-05151	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O127	25mg
	124-05271	Lipopolysaccharide, from <i>P. vulgaris</i> OX2	25mg
	121-05281	Lipopolysaccharide, from <i>P. vulgaris</i> OX19	25mg
	128-05291	Lipopolysaccharide, from <i>P. mirabilis</i> OXK	25mg

※凍結乾燥品

ご購入に際し製品情報(適用法規・保管条件など)のご確認は、当社総合カタログおよび検索サイト(siyaku.com)をご参照ください。

和光純薬工業株式会社

本社：〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号
 東京本店：〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目4番1号
 営業所：北海道・東北・筑波・藤沢・東海・中国・九州

問い合わせ先

フリーダイヤル：0120-052-099 フリーファックス：0120-052-806

URL：http://www.wako-chem.co.jp

E-mail：labchem-tec@wako-chem.co.jp

御 案 内

日本エンドトキシン・自然免疫研究会

日本エンドトキシン・自然免疫研究会は、エンドトキシン研究の基礎、臨床、治療研究から応用までの広い領域の研究者が参加、発表、情報交換を行える研究会組織とする主旨のもと、平成6年11月に「日本エンドトキシン研究会」として発足しました。平成22年10月に「一般社団法人 日本エンドトキシン・自然免疫研究会」として法人化され、現在に至っています。定期研究会は年1回開催され、特別講演、シンポジウム、研究発表など、会員の情報交換、親睦を図っています。

第23回研究会は、平成29年12月に兵庫医科大学救急・災害医学講座 主任教授 小谷 穰治先生が当番世話人で西宮神社会館にて開催されます。

研究会会員は正会員、賛助会員で構成され、機関誌「エンドトキシン・自然免疫研究（年1回出版）」がweb上で閲覧できます。

毎年、50歳未満の研究会会員を対象に「日本エンドトキシン・自然免疫研究会奨励賞・最優秀賞」を設け、エンドトキシン・自然免疫研究に関する学術および技術の進歩に貢献したと認められる業績に対して表彰を行なっています。また、40歳未満の会員の定期研究会当日の発表を対象として「日本エンドトキシン・自然免疫研究会奨励賞・優秀賞」を審査・表彰しております。

入会を希望される方（年会費：正会員5,000円、大学院・学部学生は減免申請により3,000円、賛助会員100,000円）は下記事務局までご連絡下さい。

日本エンドトキシン・自然免疫研究会 事務局
〒113-8421 東京都文京区本郷2-1-1
順天堂大学医学部生化学第二講座 内
TEL：03-5802-1033 FAX：03-3813-3157
E-mail：jeiis@juntendo.ac.jp

「Innate Immunity」

日本エンドトキシン・自然免疫研究会の公式英文雑誌であった「Journal of Endotoxin Research」は「Innate Immunity」に雑誌名が変更されました。「Innate Immunity」は、国際エンドトキシン・自然免疫学会（IEIIS：International Endotoxin and Innate Immunity Society；<http://ieiis.org/Home>）の公式ジャーナルであり、エンドトキシンをはじめ、自然免疫など広い分野の論文を受け付けています。また、エンドトキシンについて優れた総説も魅力的です。現在、「Innate Immunity」のインパクトファクターは2.342（JCR Science Edition 2016）とレベルの高い雑誌です。本研究会の役員からEditorial Boardが選任されています。詳しい情報は、ウェブサイト（<http://ini.sagepub.com>）をご覧ください。

Editor-in-Chief：Dr. Otto Holst, Professor and Head of the Division of Structural Biochemistry at the Research Center Borstel.

索引

ア

アジュバント 1
アポトーシス 31

イ

I型インターフェロン 54

エ

炎症 31
エンドトキシン試験法 20

カ

潰瘍性大腸炎 22
カルジオリピン 17

ケ

形質細胞様樹状細胞 (pDC) 54

コ

構造活性相関 3
好中球 43

サ

酢酸菌 57

シ

歯周病 43
歯周病関連細菌 43

セ

精巢 31

ソ

相乗的増強効果 17

ナ

内因性リガンド 18
ナチュラルキラー T (NKT) 細胞 64

ハ

敗血症 22

フ

腹腔鏡下大腸全摘術 22

ヘ

ヘリコバクター・ピロリ 15

ホ

ポルフィロモナス・ジンジバリス 15

マ

マクロファージ 46

メ

免疫調節作用 15

ユ

遊離ヘム 25

ラ

ライディッヒ細胞 31

リ

リピド A 1,15,58
リボ多糖 57
リポタンパク質 57
リムルス試薬 (LAL) 19

ル

類洞内皮細胞 7

ワ

ワクチン 3

A

α -GalCer 64

ADP-ribosylation factor-like 8b (Arl8b) 55

B

Bach1 25

C

cathelicidin 7

CD1d 64

E

ESP 22

H

Heme Oxygenase-1 (HO-1) 25

I

IFN α 54

IL-18 17

iNKT 細胞免疫療法 64

interleukin (IL)-18 31

Interleukin (IL)-4 46

L

L-arginine 46

LFA-1 54

LL-37 7

Low Endotoxin Recovery (LER) 19

M

MD-1 50

MPL 3

N

Neutrophil extracellular traps (NETs) 43

Nitric oxide synthase 2 46

P

PLEKHM2 55

R

RP105 50

T

TLR 1

Toll like receptor 4 15

Toll-like receptor (TLR) 7 54

エンドトキシン・自然免疫研究 20

—自然免疫における化学生物学の貢献—

平成 29 年 10 月 31 日 第 1 版発行

発 行 日本エンドトキシン・自然免疫研究会

〒 113-8421 東京都文京区本郷 2-1-1

順天堂大学医学部生化学第 2 講座内

TEL : 03-5802-1033 FAX : 03-3813-3157

編 集 隅田 泰生 長岡 功

製 作 医学図書出版株式会社

代表者 鈴木 文治

東京都文京区本郷 2-29-8 大田ビル

〒 113-0033 電話 (03)3811-8210 (代)

FAX (03)3811-8236

