

# C4b-binding protein (C4BP) による TLR 応答制御機構

高村 (赤司) 祥子, 山崎 達也, 森田奈央子

愛知医科大学医学部感染・免疫学講座

## TLR-regulatory system of C4b-binding protein (C4BP)

Sachiko Akashi-Takamura, Tatsuya Yamazaki, Naoko Morita

Microbiology and Immunology, Aichi Medical University, School of Medicine

### Abstract

Complement system, one of the innate immunities, is a strong immune system, which destroys invasive microbes by making a hole in the cell membranes. On the other hands, several proteins inhibit complement system to protect the host cells from the attack. C4b-binding protein (C4BP), one of the inhibitory proteins, constitutively exists at high density called 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in serum. C4BP binds to C4b or C3b and helps the degradation, followed by prevention against the activation of complement system.

Recently, we found that C4BP associates with Toll-like Receptor (TLR) 2, one of the pathogen recognition receptors (PRRs), and regulates the activation response through TLR2. Furthermore, we found that C4BP also binds to TLR4, which was other PRR, and regulates the activation response through TLR4. A competition assay by using two kinds of anti-TLR4 mAb revealed that C4BP prevents an interaction between TLR4/MD-2 and its ligand. These findings indicate that C4BP binds to TLRs on the cell surface and inhibits the interaction between TLRs and the ligands, followed by inhibition of TLR activation.

Here we explain the function of C4BP to affect complement and TLR, which is called the two major immune systems. We also give an outline about a unique other function of C4BP and influence on disease onset.

Endotoxin and Innate Immunity 21 : 47~50, 2018

**Key words :** C4BP, TLR2, TLR4, MTS510, LPS

### はじめに

補体は自然免疫機構の一つであり侵入微生物の細胞膜に穴をあけて破壊する強力な免疫機構である。このような強力な機構が私たち宿主の細胞に作動しないように、血清中に補体制御因子が存在し制御している。この制御因子の一つ、C4b-binding protein (C4BP) は血中に平常時でも 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  という高濃度で存在し、補体の C4b または C3b に結合して分解を助け、補体活性化による宿主への攻撃を防いでいる。最近われわれはこの C4BP が病原体認識機構の一つ、Toll-like Receptor (TLR) 2 に会合して TLR2 を介する活性化反応を制御していることを見出した。さらにその発展として、同様の細胞表面分子である TLR4 にも C4BP が会合して TLR4 を介する活性化を制御していることを見出した。本稿ではこのような補体と TLR という 2 大免

疫機構に影響を及ぼす C4BP の機能や疾患発症への影響などに関して概説する。

### 1. TLR による免疫応答機構

TLR は免疫担当細胞はじめ広く発現している膜貫通タンパクで、病原体構成成分を認識して細胞内に活性化シグナルを誘導する分子である。細胞外領域にはロイシンリッチリピート (LRR) の繰り返し構造があり病原体構成成分の結合・認識部位として機能している。細胞内領域はシグナル活性化を誘導するための Toll/IL-1 receptor (TIR) ドメインから成り立つ。最初はハエで見つかったがヒトにも存在することが判明し、ヒトでは 10 種類の TLR が同定された。

TLR は病原体特有の共通構造を認識する。細菌の細胞壁成分であるリポペプチドを認識する TLR2, TLR1, TLR6 や、グラム陰性桿菌の細胞壁毒素であるリポ多糖

(LPS) を認識する TLR4 は、細胞表面に局在し外から侵入する細菌の認識応答にいち早く対応する。一方で核酸を認識する TLR3, TLR7, TLR9 は細胞内のエンドソーム・ライソソームに局在し、細胞内に侵入してきたウイルスなどの RNA, DNA を認識し排除するため活性化シグナルを誘導する。このように TLR は病原体侵入に素早く対応するため、各侵入経路に応じてそれぞれ適した TLR が局在することもわかってきた。

## 2. TLR 会合分子と免疫応答制御

TLR は前述のように病原体侵入に対し警報を鳴らす危険センサーであるが、この機能によりあらゆる細胞が活性化され過ぎれば、過剰な宿主への攻撃や臓器障害まで引き起こしてしまう。このように重大な機能をもつ TLR には、その機能を制御したり増幅させたりする会合分子が存在するのではないかと、というのがわれわれの研究の出発点である。解析の結果いくつかの会合分子の存在とその機能がわかってきた。MD-2 は TLR4 と会合して LPS の認識受容体として機能する。PRAT4A も TLR4 会合分子として同定したがその後 TLR3 以外のすべての TLR の細胞局在に影響し、また LPS 由来のエンドトキシンショックに必須の分子であることが判明した。このように会合分子の存在が TLR リガンド認識や機能に大きく影響を及ぼす点に着目してきた。

## 3. C4BP による TLR2 応答制御機構

われわれは C4BP が TLR2 の会合分子であることをまず見出した。TLR2 抗体による B 細胞の免疫沈降にて 25 KD に共沈されるタンパクが見つかり、そのアミノ酸配列から C4BP であることが判明した<sup>1)</sup>。実際にマウス C4BP を発現させた細胞において、TLR2 との共沈を認めることができた。次に C4BP が TLR2 へどう影響するか調べるため、TLR2 を介して活性化を誘導する病原体構成成分 Pam3CSK4 による応答を C4BP 欠失マウスにおいて調べたところ、ワイルドタイプマウスと比較して Pam3CSK4 投与 1 時間後の血中の IL-6 量が増加していることが判明した。また C4BP 発現細胞でも解析したところ、非発現細胞と比較して Pam3CSK4 によるサイトカイン産生が抑制されることが明らかとなった。以上より C4BP は TLR2 活性化を制御することが判明した<sup>1)</sup>。そのメカニズムとして TLR2 発現細胞での Pam3CSK4 結合領域を C4BP がブロックしている可能性が考えられたが、それを示すのに適した TLR2 抗体が存在しないため C4BP が TLR2 のどこに結合するのか、証明できなかった。

## 4. C4BP による TLR4 応答制御機構

C4BP は肝臓で作られる血清タンパクであり、炎症時

には発現量が急増することから急性期タンパク質ともいわれている。補体制御因子として同定されたが、ほかに CD40 レセプターを介する B 細胞活性化誘導や、血液凝固制御、アポトーシス細胞除去など多様な機能を有する分子として報告されている<sup>2)</sup>。前述の PRAT4A のように TLR2 のみならずほかの TLR へも影響する可能性を考え、TLR2 同様細胞表面 TLR の代表として TLR4 を、また細胞内 TLR の代表として TLR3 を選び C4BP の影響を両者で比較検討することにした。

まずは TLR4/MD-2 あるいは TLR3 を発現させた HEK293 細胞に、それぞれ C4BP 発現ベクターあるいはコントロールベクターを導入し、おのおののリガンドである LipidA (LPS 活性中心) または Poly (I:C) (二本鎖 RNA) を反応させて、細胞上清中に産生される IL-8 量を ELISA で測定した。TLR4/MD-2 発現細胞では、C4BP 発現によりコントロールに比べ LipidA による明らかな IL-8 量の低下が認められた。一方 TLR3 発現細胞では C4BP の有無で Poly (I:C) による IL-8 量に差は認めなかった<sup>3)</sup>。

次にこれらの細胞で免疫沈降を行い各 TLR と C4BP との共沈を調べたところ、TLR4/MD-2 と C4BP との共沈が認められたのに対して TLR3 と C4BP とでは明らかな共沈は認められなかった<sup>3)</sup>。

さらに TLR4/MD-2 を発現させた HEK293 細胞やマウスマクロファージ由来細胞である RAW264.7 細胞に 293 T での C4BP 発現上清を添加しても、LipidA により産生されるサイトカイン量が抑制されることがわかった。一方、この同じ C4BP 発現上清を、TLR3 を発現させた HEK293 細胞あるいは RAW264.7 細胞に添加しても Poly (I:C) によるサイトカイン産生量に影響はみられなかった。

また各リガンドによる NF- $\kappa$ B 活性化シグナルの強弱を検討したところ、LipidA による活性化シグナルはコントロール上清添加に比べ C4BP 発現上清添加で明らかに減弱することがわかった。一方 Poly (I:C) による活性化シグナルは C4BP 有無で影響はみられなかった。

以上のことから C4BP は TLR4/MD-2 と会合し TLR4/MD-2 応答を制御する一方で、TLR3 とは会合せず TLR3 応答に影響しないことも判明した<sup>3)</sup>。

## 5. C4BP による TLR4/MD-2 応答制御機構

C4BP がどのように LipidA で誘導される TLR4/MD-2 を介した活性化を制御するのか明らかにするために、TLR4 に対する 2 種類のモノクローナル抗体を用いて検討した。TLR4 の N 末端側を認識する Sa15-21、およびより C 末端側で LipidA 結合領域近くを認識する MTS510 である (MTS510 は LipidA が結合している TLR4/MD-2 には結合できない)。TLR4/MD-2 を

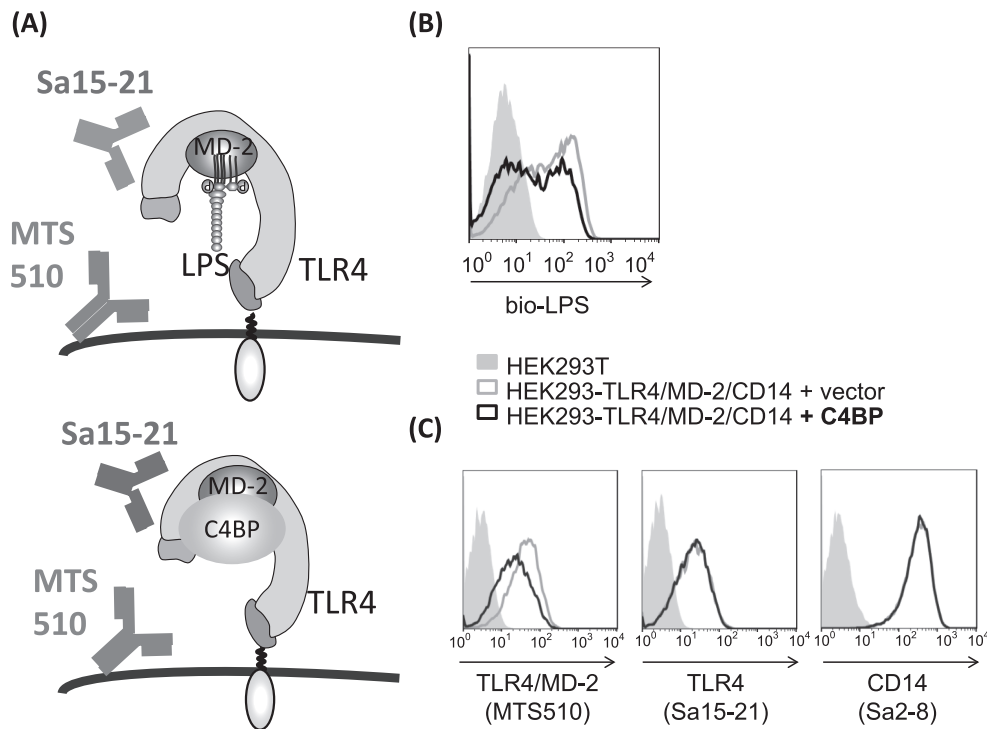


図 1 C4BP は TLR4 の LPS 結合領域近くに会合することで TLR4/MD-2 応答を制御している

TLR4/MD-2 を発現させた HEK293 細胞に C4BP 発現ベクターあるいはコントロールベクターを発現させてビオチン化 LPS あるいはおのおのの抗体での染色レベルを比較した。(B) ビオチン化した LPS を両者の細胞に加えて LPS の結合度合を、ストレプトアビジン標識抗体を用いてフローサイトメトリーで調べたところ、コントロールベクター発現細胞 (灰色) と比較して C4BP 発現細胞 (黒色) のほうで明らかな低下を認めた。(C) Sa15-21 での染色レベルは両者の細胞に差がみられなかったが、MTS510 での染色レベルは C4BP 発現細胞 (黒色) のほうで明らかな低下を認めた。(A) C4BP は MTS510 の結合領域、すなわち LPS 結合領域近くの TLR4 に結合することで LPS の TLR4 への結合を抑制し、TLR4/MD-2 活性化を制御していることが考えられた (文献<sup>3)</sup>, Fig6. より引用改変)。

発現させた HEK293 細胞に C4BP 発現ベクターあるいはコントロールベクターを導入しおのおのの抗体での染色レベルを比較したところ、Sa15-21 での染色レベルは両者の細胞に差がみられなかったが、MTS510 での染色レベルはコントロールベクター導入細胞と比べ C4BP 発現細胞で明らかな低下を認めた。またビオチン化した LPS を両者の細胞に加えて LPS の結合度合を調べたところ、こちらも C4BP 発現細胞で明らかな低下を認めた (図 1)。以上より C4BP は MTS510 の結合領域、すなわち TLR4 の LPS 結合領域近くに結合することで LPS の TLR4 への結合を抑制し、TLR4/MD-2 活性化を制御していることが推測された<sup>3)</sup>。

## 6. ヒト C4BP の特性と疾患への影響

C4BP はヒトでは 500 KD と分子量が大変大きな血漿糖タンパク質であり、7つの  $\alpha$  鎖と一つの  $\beta$  鎖とで成り立つ八つ手のような構造をとる分子である。C4BP

は動物種で構造が異なり、たとえばマウスでは  $\alpha$  鎖を構成するドメイン数がヒトで 8 つに対し 6 つだったり、 $\beta$  鎖がなかったりする。補体カスケードの進行に伴い C4bC2a, C4b2a3b などの複合体が形成され転換酵素として機能する必要があるが、C4BP は C4b 分解を促進したり  $\alpha$  鎖で C4b や C3b に結合したりして複合体形成を阻止する。初めに TLR2 抗体で共沈してきた C4BP は、培養液中に存在したウシ胎児血清由来の C4BP が切れたもので、アミノ酸配列では  $\alpha$  鎖の Complement Control Protein (CCP) 1 ドメインと同定されこの部分は補体の C4b に結合するドメイン CCP1~3 に含まれる部分でもあった<sup>2)</sup>。

C4BP はこのように補体活性を制御するだけでなく、凝固系を亢進させる作用もある。C4BP は  $\beta$  鎖で抗凝固タンパクであるプロテイン S (PS) と結合し血漿中のフリーの PS 濃度を減少させる<sup>4)</sup>。活性化プロテイン C (APC) は PS 存在下で凝固因子を分解し、トロンピン

生成の阻害や抗凝固・血栓防止へ向かわせるが、PSがC4BPと結合しているところのAPCによる分解ができず、凝固系の亢進や血栓症の発症につながる。このようにC4BPは会合分子PSを通じて間接的に凝固促進に向かわせる機能がある。

またC4BP-PS複合体はアポトーシスやネクローシスに陥った死細胞に結合し、補体の古典経路の出発点であるC1qやCRPの死細胞への結合を抑制したり、膜侵襲複合体の作動を抑えることで補体活性化を抑制する。これにより死んだ細胞が補体の活性化や炎症反応を惹起することなくマクロファージなどにより静かに貪食されクリアランスされることを可能にしている<sup>2)</sup>。

さらにはC4BPは積極的に免疫担当細胞の活性化を抑制する機能があることも報告されている。Olivarらはヒト樹状細胞に、 $\alpha$ 鎖7つ $\beta$ 鎖一つの通常のC4BPや $\beta$ 鎖のないC4BPなどさまざまなアイソフォームのC4BPをヒトの血漿や293T発現系を用いて精製して添加しLPS刺激による活性化を調べたところ、 $\beta$ 鎖のないC4BPを発現させた場合に活性化マーカー発現やサイトカイン産生を抑制できることを報告している<sup>5)</sup>。われわれはマウスの系でLPS応答抑制を示したが、マウスC4BPは前述のようにヒトの通常のC4BPと異なり $\beta$ 鎖が存在せず $\alpha$ 鎖のドメイン数も異なるため、このような構造的な違いも影響しているかもしれない。

なおC4BPはわれわれ宿主細胞の保護のみならず、侵入してきた微生物の保護にも役立っている。さまざまな細菌のみならずウイルスや真菌などもC4BPに結合してオプソニン化を免れたり補体の攻撃から逃れたりしてC4BPによる恩恵を受けている。

## おわりに

このように血漿中の巨大タンパク、C4BPはいろいろな分子に結合してさまざまな反応に影響し続けている。LPS投与後のC4BPの血漿濃度の変遷をラットで調べると、LPS投与直後から4~5時間後までは減少するが、

その後徐々に濃度が上昇し24時間後には減少時の4倍以上に上昇しており、おそらくLPS刺激で産生されたIL-6などにより肝臓でのC4BP合成能が高まり濃度上昇に至ったと推測される<sup>6)</sup>。このように濃度が上昇したC4BPは炎症を終焉させるターミネーターとして機能していると推測される。最近C4BPの遺伝子多型が非定型的溶血性尿毒症症候群(aHUS)や妊娠中に問題となる不育症などの原因に関与している可能性も示唆されている<sup>2)</sup>。C4BPの機能は補体やTLR応答に限らず広く生命活動全般にわたる制御機構につながる可能性がある。

## 文 献

- 1) Morita N, Yamai I, Takahashi K, et al.: C4b binding protein negatively regulates TLR1/2 response. *Innate Immun* 23: 11-19, 2017
- 2) Ermert D, Blom AM: C4b-binding protein: The good, the bad and the deadly. Novel functions of an old friend. *Immunol Lett* 169: 82-92, 2016
- 3) Morita N, Yamazaki T, Murakami Y, et al.: C4b-binding protein negatively regulates TLR4/MD-2 response but not TLR3 response. *FEBS Lett* 591: 1732-1741, 2017
- 4) Hayashi T, Suzuki K: LPS-Toll-Like Receptor-Mediated Signaling on Expression of Protein S and C4b-Binding Protein in the Liver. *Gastroenterol Res Pract* 2010: 2010 (doi: 10.1155/2010/189561)
- 5) Olivar R, Luque A, Naranjo-Gómez M, et al.: The  $\alpha_7\beta_0$  isoform of the complement regulator C4b-binding protein induces a semimature, anti-inflammatory state in dendritic cells. *J Immunol* 190: 2857-2872, 2013
- 6) Kishiwada M, Hayashi T, Yuasa H, et al.: Regulatory mechanisms of C4b-binding protein (C4BP) alpha and beta expression in rat hepatocytes by lipopolysaccharide and interleukin-6. *J Thromb Haemost* 6: 1858-1867, 2008