

エンドトキシン・ 自然免疫研究 21

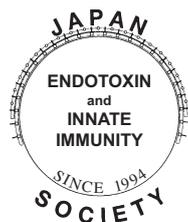
エンドトキシン・自然免疫研究のフロンティアをめざして

編集

日本エンドトキシン・自然免疫研究会

小谷 穰治

長岡 功



エンドトキシン・自然免疫研究 21

—エンドトキシン・自然免疫研究のフロンティアをめざして—

編集

一般社団法人 日本エンドトキシン・自然免疫研究会

小谷 穰治

長岡 功

執筆者一覧（敬称略）

- 齋藤伸一郎（東京大学医科学研究所感染遺伝学）
山崎 達也（愛知医科大学医学部感染・免疫学講座，東京理科大学大学院基礎工学研究科生物工学専攻）
千葉 丈（東京理科大学大学院基礎工学研究科生物工学専攻）
高村(赤司) 祥子（愛知医科大学医学部感染・免疫学講座）
松田 明久（日本医科大学千葉北総病院外科・消化器外科）
宮下 正夫（日本医科大学千葉北総病院外科・消化器外科）
山田真吏奈（日本医科大学千葉北総病院外科・消化器外科）
松本 智司（日本医科大学千葉北総病院外科・消化器外科）
櫻澤 信行（日本医科大学千葉北総病院外科・消化器外科）
川野 陽一（日本医科大学千葉北総病院外科・消化器外科）
関口久美子（日本医科大学千葉北総病院外科・消化器外科）
松谷 毅（日本医科大学消化器外科）
山田 岳史（日本医科大学消化器外科）
吉田 寛（日本医科大学消化器外科）
脇 純平（鹿児島大学大学院理工学研究科）
今大路浩之（香川大学大学院医学研究科）
大藪 まみ（鹿児島大学大学院理工学研究科）
橋口 周平（鹿児島大学大学院理工学研究科）
桑原 知巳（香川大学大学院医学研究科）
橋本 雅仁（鹿児島大学大学院理工学研究科）
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）

植木 智之 (滋賀医科大学外科学講座)
山口 剛 (滋賀医科大学外科学講座)
飯田 洋也 (滋賀医科大学外科学講座)
貝田佐知子 (滋賀医科大学外科学講座)
竹林 克士 (滋賀医科大学外科学講座)
目片 英治 (滋賀医科大学外科学講座)
遠藤 善裕 (滋賀医科大学臨床看護学講座)
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)
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 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)
久富 亮佑 (札幌医科大学医学部微生物学講座)
佐藤耶舞羽 (北海道大学大学院農学研究院応用生命科学部門微生物生理学研究室)
森田 直樹 (産業技術総合研究所生物プロセス研究部門分子生物工学研究グループ)
吹谷 智 (北海道大学大学院農学研究院応用生命科学部門微生物生理学研究室)
佐藤 豊孝 (札幌医科大学医学部微生物学講座)
横田 篤 (北海道大学大学院農学研究院応用生命科学部門微生物生理学研究室)
横田 伸一 (札幌医科大学医学部微生物学講座)
早水 良 (岐阜薬科大学感染制御学研究室)
杉山 剛志 (岐阜薬科大学感染制御学研究室, 岐阜医療科学大学臨床検査学科)
大山 真也 (鹿児島大学大学院理工学研究科)
若尾 雅広 (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)
杜若 祐平 (鹿児島大学大学院理工学研究科)
山口 徹 (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)
Nikunj M. Shukla (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)
隅田 泰生 (鹿児島大学大学院理工学研究科)
森田奈央子 (愛知医科大学医学部感染・免疫学講座)
川原 一芳 (関東学院大学理工学部理工学科生命学系)
菅原 健広 (関東学院大学理工学部理工学科生命学系)
大澤絵美里 (関東学院大学理工学部理工学科生命学系)
滝本 博明 (北里大学理学部生物科学科)
尾之上さくら (関東学院大学理工学部理工学科生命学系)
長岡 功 (順天堂大学医学部生化学・生体防御学講座)
細田 浩司 (順天堂大学医学部生化学・生体防御学講座)
中村 果歩 (順天堂大学医学部生化学・生体防御学講座)
胡 忠双 (順天堂大学医学部生化学・生体防御学講座)
村上 泰介 (順天堂大学医学部生化学・生体防御学講座)
鈴木 香 (順天堂大学医学部生化学・生体防御学講座)

田村 弘志 (LPS コンサルティング事務所)
高橋 徹 (岡山県立大学保健福祉学部)
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分子制御学分野)
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)

(執筆順)

序

第23回日本エンドトキシン・自然免疫研究会を、2017年12月1日(金)・2日(土)にわたって、西宮神社会館(西宮神社内)で開催させていただきました。兵庫県では2011年に兵庫医科大学の筒井ひろ子教授が当番世話人をされて以来6年ぶりでした。実はこのときも共同世話人という肩書を頂いておりましたが、実際には筒井教授がすべてを準備されましたので、私は若干の臨床系の演者をお願いした程度でなんの役にも立っておりませんでした。この度は歴史と伝統ある日本エンドトキシン・自然免疫研究会の主催という教室にとって名誉ある大役を仰せつかり、教室員一同、身の引き締まる思いで学会準備を進めました。

日本エンドトキシン・自然免疫研究会は、元々日本エンドトキシン研究会という名称であり、私が大学院で手術患者の血中エンドトキシン濃度と病態の関連の研究を行っていた頃に、エンドトキシンによる免疫応答の研究を目的として設立された研究会ということで大変興味を持ち入会しました。その後エンドトキシンのレセプターを含む自然免疫のレセプターである Toll-like receptors が発見され、Toll-like receptors を発見した研究者たちがノーベル賞を受賞し、従来不明であった多くの疾患に自然免疫が関連することが明確になるなど、自然免疫が注目され、会の名称を日本エンドトキシン・自然免疫研究会に改名すると記憶しております。本研究会の構成員は、基礎研究者と臨床医療者が半々であり、基礎の先生方と基礎的研究を推進しておられる先生方にとって、“Meet the Expert”, “Bench to Bedside, Bedside to Bench” の貴重な場となっていると認識しております。そこで、先達の努力と志を継承することに加え、エンドトキシン・自然免疫研究のさらなる発展と新しい治療の開拓・確立を願い、「エンドトキシン・自然免疫研究のフロンティアをめざして」をメインテーマとして、基礎研究と臨床の懸け橋となる研究・治療成果を発表していただき、基礎系と臨床系の先生方が情報を交換する場となることを願って計画いたしました。

まず、会場はえべっさんと、足自慢が境内を駆け抜ける神事「福男選び」で有名な西宮神社の会館といたしました。阪神西宮駅の直近で交通の便も良く、境内には多くの樹木が生い茂り、また、結婚式で使われる会場や料理の用意もあり、会員の皆様の懇親の場として大変よい場所と考えました。また、西宮市条例により乾杯は日本酒で執り行うことが決まっておりますので、これも酔うほどに親交が深まるよい条件と考えました。予想通り、1日目の懇親会では各所で話が盛り上がり、写真撮影が始まり、新しい交友ができ、そして研究の情報交換も盛んに行われていたと思います。

研究会では、1日目の夕方に協賛企業の多大なご協力の下にイブニングセミナーを開催することができました。講師は兵庫医科大学の腫瘍免疫制御学特任教授の岡村春樹先生にお願いしました。岡村先生は兵庫医科大学で IL-18 を発見され、以降、IL-18 のかかわる免疫機構を研究されてきました。IL-18 は細胞性免疫やアレルギーでの研究が発展してきましたが、実は私の扱う重症患者の血中濃度も高く、侵襲反応に強力に影響する IL-1 と同じシグナルですので、IL-18 も重症病態の形成にかかわっているとの仮説から、私も岡村先生のご指導を仰ぎながら、大学院生の研究を指導いたしました。この度は、岡村先生の研究成果とならんで苦労話も大変興味深く感銘を受けました。

2日目の本会では、一般演題が15、優秀賞選考セッション2、最優秀賞受賞講演1の合計18演題のご発表をいただきました。最近では専門医プログラムの導入や専門医取得重視の傾向が影響して、臨床に身を置きながら自然免疫など基礎につながる研究をする医師が減っており、臨床系の演題がやや少なかったのですが、どの発表も基礎研究の発展する方向を示すものであり、基礎系の先生方にとってご自身の研究成果の発展形を知り、また今後の研究の方向性を考える参考になったのではないかと思います。一方、基礎系のご発表はどれも凄まじく先進的で、私を含めた臨床系の研究者にとって大変刺激的で勉強になりました。これらの演題の中で、事前の投票により最優秀賞が齋藤伸一郎先生(東京大学医科学研

究所感染遺伝学)に授与されました。また、当日の会場における投票により、優秀賞が松田明久先生(日本医科大学千葉北総病院外科・消化器外科)と、山崎達也先生(愛知医科大学医学部感染免疫学)に、優秀演題賞は早水良先生(岐阜薬科大学薬学部感染制御)、白石宗先生(札幌医科大学医学部微生物学講座)、大山真也先生(鹿児島大学大学院理工学研究科)に授与されました。とはいえ、どの演題の票数も僅差であり、すべてのご発表が素晴らしいと評価されたものと思います。また、ランチョンセミナーでは、これも協賛企業の多大なご協力により、江口豊先生(滋賀医科大学救急集中治療医学講座)に臨床におけるエンドトキシン、DICに関するご自身の研究やその周辺の知見をご講義をいただき、大変勉強になりました。

このたびはお忙しい中、札幌から鹿児島まで全国から多くの皆様方にご参加いただき、また、活発な討議をいただきまことにありがとうございました。会場の議論は白熱し、まさに「THE研究会」という様相で、基礎系と臨床系の研修者が一同に介する本研究会のますますの発展を確信いたしました。

また、私事ですが、本会の準備期間中に兵庫医科大学から神戸大学に異動となり、また兵庫医科大学の職務も非常勤で兼任することとなりました。期せずして兵庫県の2つの医学部の肩書で世話人をさせていただき、研究会の間口が広がったことは良かったと思います。これからは、神戸大学でも研究会への参加を促していこうと考えております。

最後になりましたが、長岡功先生が新理事長となられ、事務局も滋賀医科大学から順天堂大学に移動しました。本研究会は長年理事長を務められてきた前任の谷徹先生のご指導により大きな発展を遂げましたが、長岡新理事長のリーダーシップのもとで、基礎研究と臨床現場の懸け橋となる新たな研究・治療成果を世界に発信し、本研究会がより一層社会に貢献する学術団体へと発展するよう尽力してゆく所存です。今後ともどうかよろしく申し上げます。

2018年10月

第23回日本エンドトキシン・自然免疫研究会

当番世話人代表 小谷 穰治

(神戸大学大学院医学研究科外科系講座 災害・救急医学分野)

も く じ

第 1 章 平成 29 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

Toll-like receptor (TLR) の局在と活性化	齋藤伸一郎	… 1
----------------------------------	-------	-----

第 2 章 平成 29 年度日本エンドトキシン・自然免疫研究会奨励賞・優秀賞

1. インフルエンザウイルス感染に対する中和抗体遺伝子を用いた 予防・治療法の検討	山崎達也	他… 7
2. 脂質メディエーターからみた外科侵襲学の新知見	松田明久	他…12

第 3 章 一般演題

1. <i>Bacteroides fragilis</i> の莢膜多糖画分中の TLR2 活性化物質	脇 純平	他…18
2. キレート剤と界面活性剤によるエンドトキシンの活性低下 (Low Endotoxin Recovery の機序)	土谷正和	…23
3. 潰瘍性大腸炎における Endotoxin Activity Assay (EAA)	清水智治	他…26
4. 結核菌感染マクロファージの一酸化窒素産生制御	松村和典	他…30
5. <i>Lactobacillus gasseri</i> に共通する種特異的なリポテイコ酸の化学構造 【優秀演題賞】	白石 宗	他…35
6. Rho GTPase スクレオチド交換因子による Toll 様受容体シグナルの 制御【優秀演題賞】	早水 良	他…38
7. ピリミドインドール系 TLR4 リガンドの構造活性相関研究 【優秀演題賞】	大山真也	他…42
8. C4b-binding protein (C4BP) による TLR 応答制御機構	高村 (赤司) 祥子	他…47
9. リピド A 脂肪酸転移酵素遺伝子を利用した新しい構造を有する LPS の作出	川原一芳	他…51
10. 宿主細胞の細胞死の調節を介した, cathelicidin ファミリーの 抗菌ペプチド LL-37 の敗血症マウスモデルに対する効果	長岡 功	他…56
11. 一酸化炭素 (CO)/CO 遊離分子の急性肺傷害に対する 治療薬としての可能性	高橋 徹	…61
12. 歯周病における neutrophil extracellular traps 産生と血管内皮細胞の 炎症誘導	多田浩之	他…65

御案内

第1章

平成29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

Toll-like receptor (TLR) の局在と活性化

齋藤伸一郎

東京大学医科学研究所感染遺伝学

Toll-like receptor (TLR) localization and activation

Shin-Ichiroh Saitoh

Division of Innate Immunity, Department of Microbiology and Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

Abstract

Toll-like receptor (TLR) recognizes viral and bacterial specific components to activate immune responses. TLR plays an essential role for a pathogen sensor. TLR can be divided two groups by their localization. One is cell surface TLR which localizes in cell membrane to recognize mainly bacterial cell wall components. The other is nucleic acid-sensing TLRs, which localize in endosome or lysosome in immune cells to recognize viral and bacterial nucleic acids. We have investigated about TLR trafficking to regulate TLR7 activation. First, I want to introduce TLR4 trafficking and activation mechanism as a cell surface receptor which recognizes gram-negative bacterial cell wall component LPS. Second, I want to introduce TLR7 trafficking and activation mechanism as an endo-lysosomal TLR to recognize bacterial and viral RNAs.

Endotoxin and Innate Immunity 21 : 1~6, 2018

Key words : Toll-like receptor 4 (TLR4), Toll-like receptor 7 (TLR7), 2 量体, 1 型インターフェロン, ADP ribosylation factor-like 8b (Arl8b)

はじめに

ウイルスや細菌に特異的な成分を認識して活性化する Toll-like receptor (TLR) は感染のセンサーとしての役割を持つ。TLR はその局在により大きく 2 種類のタイプに分類できる。一つは細胞表面上に発現し主に細菌の膜成分を認識する TLR。そしてもう一つは細胞内のエンドソーム・ライソソームに局在して細菌やウイルスの核酸成分を認識する TLR である。われわれは TLR の細胞内輸送と活性化に関する研究を行ってきた。初めに細胞表面に発現してグラム陰性菌の膜成分 LPS を認識する TLR4 の輸送と活性化について紹介する。次に細胞内のエンドソーム・ライソソームに局在して細菌やウイルスの RNA 成分を認識する TLR7 の輸送と活性化についてわれわれの研究を紹介する。

1. TLR4 の局在と活性化

TLR4 は 1 型膜貫通蛋白質であり小胞体にて合成されると、小胞体に存在するシャペロン分子熱ショック

蛋白質 glycoprotein (gp) 96 と会合する^{1,2)}。加えてわれわれが TLR4 と会合して小胞体に存在しシャペロ的に働くと報告した protein-associated with TLR4 (PRAT4A 別名 Canopy FGF Signaling Regulator 3 : CNPY3) も会合する^{2~4)}。そして TLR4 が受容体として機能できるように立体構造的に問題がないように蛋白質を折りたたむと同時に糖鎖修飾を付加する。さらに TLR4 は MD-2 と会合して、ゴルジ体で更なる糖鎖修飾を受けた後成熟型の TLR4 となり細胞膜表面へと発現する。

細胞表面に発現した TLR4 はリガンドである LPS が MD-2 に会合するまでは TLR4-MD-2 の複合体が 1 量体で存在する。われわれの解析から TLR4-MD-2 は細胞膜表面にて LPS と会合することが明らかとなった⁵⁾。さらに CD14 は LPS と会合するが TLR4-MD-2 と複合体を形成せず、TLR4-MD-2 に LPS を供与する存在であることを示した。われわれは TLR4 の C 末端に GFP, または Flag タグをつけて発現させ、LPS 刺激後に抗 GFP 抗体にて免疫沈降すると TLR4-GFP に

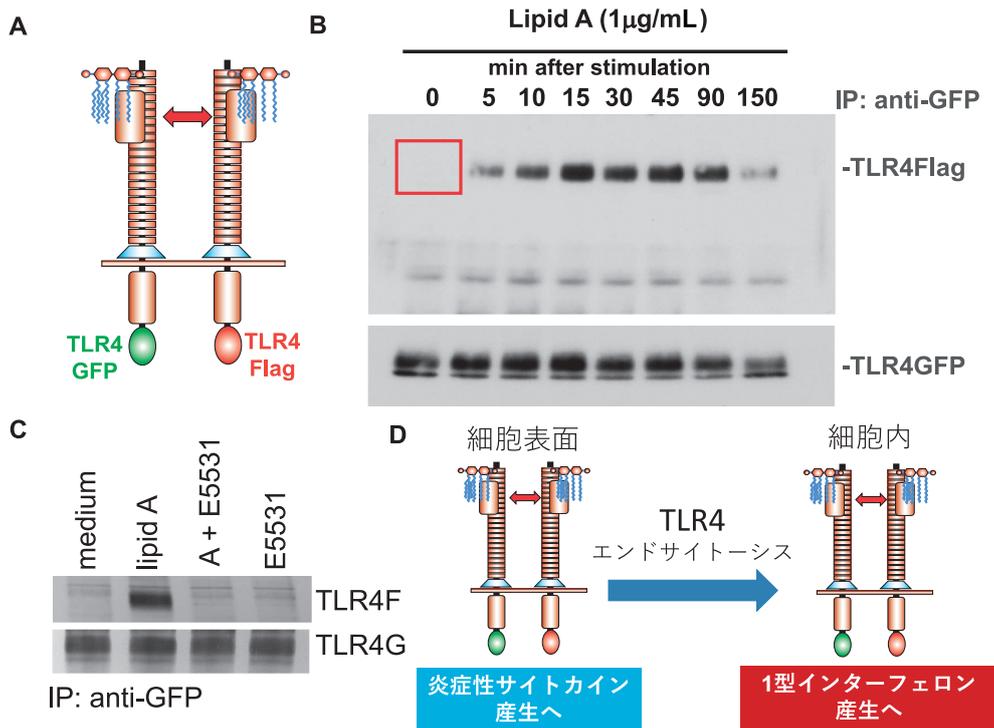


図 1 TLR4 は LPS 刺激により 2 量体を形成して活性化する

A : 細胞に TLR4-GFP と TLR4-Flag を発現させる。B : TLR4-GFP と TLR4-Flag と MD-2 を発現させた細胞を抗 GFP 抗体にて免疫沈降すると TLR4 同士の会合が確認された。C : Lipid A のアンタゴニスト E5531 を加えると TLR4 の 2 量体形成が完全に抑制された。D : 細胞表面上で TLR4 が LPS を認識すると 2 量体を形成して活性化し炎症性サイトカインを産生するためのシグナル伝達を活性化する。その後、TLR4 は細胞内にエンドサイトーシスされてから 1 型インターフェロン産生のためのシグナル伝達を活性化する。

TLR4-Flag が会合することから、TLR4-MD-2 は LPS と会合すると多量体を形成することが明らかとなった (図 1A, B)^{6,7)}。現在では立体構造解析の結果により TLR4-MD-2 が LPS と会合して 2 量体を形成することが明らかになっている^{8,9)}。MD-2 には大きなポケット状のくぼみが存在して LPS がそこにはまる形で会合する¹⁰⁾。さらにわれわれはマウス MD-2 の 126 番目のフェニルアラニン、または 129 番目のグリシンをアラニンに変えた変異体を細胞株に発現させると、TLR4-MD-2 に LPS は会合しているにもかかわらず 2 量体を形成していないことが観察された¹¹⁾。この結果より MD-2 には LPS と会合するだけでなく TLR4-MD-2 が 2 量体形成をする時にも重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

TLR4-MD-2 にはアンタゴニストについての研究が精力的に行われている。そのアンタゴニストの一つ E5531 を加えると LPS の活性中心 lipid A を加えた時に形成される 2 量体形成が認められなくなることを観察した (図 1C)⁶⁾。この結果よりアンタゴニスト E5531 は TLR4-MD-2 の 2 量体形成に作用し、2 量体形成を阻止することでアンタゴニストとして作用しているこ

とが示唆された。さらに Lipid A の前駆体の Lipid IVa はマウスの TLR4-MD-2 にはアゴニストとして作用し、ヒト TLR4-MD-2 とマウス TLR4-ヒト MD-2 にはアンタゴニストとして作用することを報告している。その Lipid IVa で刺激をするとマウスの TLR4-MD-2 は 2 量体形成を誘導するが、ヒト TLR4-MD-2 やマウス TLR4-ヒト MD-2 では 2 量体形成を誘導せず、なおかつ Lipid A 刺激にて誘導する 2 量体形成をほとんど完全に抑制することが観察された⁶⁾。このことよりアンタゴニストの作用が TLR4-MD-2 の 2 量体形成のところに作用しており、MD-2 がアンタゴニストの作用に重要な役割を果たしていることを示唆している。

細胞表面上で LPS を認識して活性化した TLR4-MD-2 は、シグナル伝達分子 Myeloid differentiation primary response 88 (MyD88) と会合して炎症性サイトカイン産生のためのシグナル伝達機構を活性化させる。さらに TRIF-related adaptor molecule (TRAM) と会合して一緒に細胞内にエンドサイトーシスされ、細胞内で 1 型インターフェロン産生へのシグナル伝達の活性化を誘導することを明らかにした¹²⁾。TLR4-MD-2 のエンドサイトーシスを抑制する Dynasore を

加えると1型インターフェロン産生にかかわる Interferon regulatory factor (IRF) 3 のリン酸化が著しく抑制され、1型インターフェロン産生が認められなかった¹³⁾。このように TLR4-MD-2 の局在する場の違いで活性化できるシグナル伝達の種類が変わる (図 1D)。

2. TLR7 の局在と活性化

TLR7 はウイルスや細菌の RNA 成分を認識して活性化する。TLR7 も小胞体にて合成された後に小胞体に存在する uncoordinated 93 homolog B1 (Unc93B1) と会合して COPII 小胞へ移行し、COPII 小胞を介してゴルジ体へ移行する¹⁴⁾。そしてゴルジ体で更なる糖鎖修飾を受け、クラスリンのアダプター分子 AP-4 を介してエンドソーム・ライソソームへ移行することが報告された¹⁴⁾。TLR7 との会合ができない Unc93B1 変異体では、TLR7 が小胞体から出られずエンドソーム・ライソソームへ移行できないことから、Unc93B1 が TLR7 の輸送にかかわっていることが示唆された¹⁵⁾。われわれは TLR7 に対する抗体を作製して TLR7 の細胞内局在を確認したところ、TLR7 はほとんどが Lamp1 または Lamp2 陽性の小胞に存在しており、TLR7 が刺激前からライソソームに存在していることが明らかとなった¹⁶⁾。さらに今まで細胞表面に存在しないといわれていた TLR7 が細胞表面にも発現していることが明らかとなった¹⁶⁾。TLR7 は TLR4 と異なりゴルジ体で糖鎖修飾をされただけでは十分ではなく、未熟な受容体としてゴルジ体を出る。そしてエンドソーム・ライソソームに到達すると、エンドソーム・ライソソームに存在する蛋白質分解酵素の働きにより限定分解される。TLR7 の限定分解される場所は TLR7 の N 末端側の 14 番目と 15 番目のロイシンリッチ繰り返し配列 (Leucine-rich repeat : LRR) の領域の間をつなぐ Z-loop と呼ばれるつなぎ配列の部分で起きる¹⁷⁾。Z-loop の部分で限定分解されても TLR7 の N 末端側はジスルフィド結合で C 末端側と会合しており分子量的にはほとんど変わらない。しかし立体構造的に違いが生まれリガンド結合後に 2 量体を形成できるようになると考えられている^{18,19)}。このように TLR7 は反応の場であるエンドソーム・ライソソームに到達して初めて活性化できるタイプの成熟型 TLR7 となる。このことで移動中の TLR7 が自己の RNA を誤って認識して反応するなどの不必要な活性化を防いでいるものと考えられる。

TLR7 と TLR9 はウイルスや細菌の RNA や DNA 成分を認識するだけでなく、自己の核酸成分をも認識してしまう可能性がある。そのため TLR7 と TLR9 は厳密に制御される必要がある。Unc93B1 を詳細に解析すると N 末端側に TLR7 との会合を調節する領域が存在することが明らかとなった²⁰⁾。Unc93B1 には TLR9 と TLR7 が競合的に結合する関係ができており、野生型の

Unc93B1 は TLR9 を優先的にエンドソーム・ライソソームへ移行させている。Unc93B1 の N 末端領域の 34 番目のアスパラギン酸をアラニンに変えた 1 アミノ酸変異体では TLR7 との会合が強くなり、TLR7 を選択的に反応の場であるエンドソーム・ライソソームへ移行し、反対に TLR9 の移行は抑制された²⁰⁾。このことが TLR7 の反応を増強させる結果となり、この変異のノックインマウスを作製すると全身性の炎症を引き起こした²¹⁾。これらの結果から Unc93B1 は TLR9 と TLR7 の競合的な会合のなかで TLR9 を優先することで TLR7 の輸送を抑制して自己の RNA に対する不必要な活性化を防いでいることが明らかとなった。

3. Arl8b による TLR7 の調節

TLR7 は Unc93B1 と小胞体で会合した後反応の場であるエンドソーム・ライソソームへ移行することが明らかになったが、Unc93B1 には小胞輸送にかかわる機能領域がクラスリンのアダプター分子会合ドメイン以外に存在しない。そのため小胞輸送にかかわる機能的な分子が Unc93B1 に会合して TLR7 を輸送しているものと推測して、Unc93B1 または TLR7 を免疫沈降後に 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 (LC-MS/MS) にかけて解析をした。すると Unc93B1 を免疫沈降した時も TLR7 を免疫沈降した時もどちらにも同定されてきた分子が存在した。それは低分子量 G 蛋白質の ADP ribosylation factor-like 8b (Arl8b) であった²²⁾。樹状細胞、マクロファージや B 細胞で TLR7 と Arl8b は会合が認められた。Arl8b はライソソームに局在する低分子量 G 蛋白質で、ライソソームを中心体から膜方向へ輸送する順行性の輸送にかかわっている。同様の働きをする Rab7a と TLR7 の関係を検討してみると TLR7 は Arl8b と共局在が強く認められているが、Rab7a とは部分的にしか共局在が認められなかった。このことから TLR7 と Arl8b の関係の特異性が示唆された。われわれは Arl8b の遺伝子発現を欠損させたマウス Arl8bGt/Gt マウスを作製して形質細胞様樹状細胞 (pDCs) を解析した。すると野生型の細胞ではライソソームに局在している TLR7 が刺激により微小管上で順行性の移動をするが、Arl8bGt/Gt マウス由来の細胞ではその移動が全く認められなかった²²⁾。Arl8b に会合する分子であり順行性輸送にかかわる pleckstrin homology and RUN domain containing M2 (PLEKHM2 : SifA and kinesin-interacting protein (SKIP)) のノックアウトマウス由来の pDCs でも同様に TLR7 刺激後の TLR7 の動きが全く認められなかった。このことから TLR7 は刺激後に Arl8b と PLEKHM2 を介して微小管上を順行性に移動することが明らかとなった。そしてこれらの遺伝子改変マウス由来の pDCs において TLR7 刺激による 1

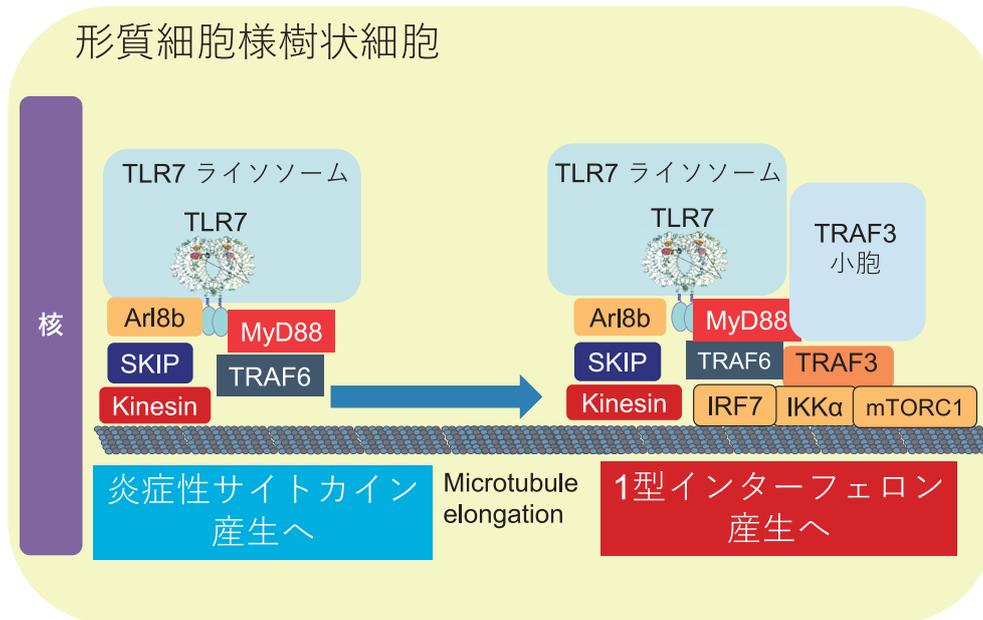


図 2 TLR7 はライソソームに存在し順行性に移動することで 1 型インターフェロン産生を誘導するシグナル伝達を活性化する

TLR7 は刺激を受けると炎症性サイトカインを産生するためのシグナル伝達を活性化。その後微小管上を移動して TRAF3 が存在する小胞に出会い 1 型インターフェロン産生のためのシグナル伝達を活性化させる。

型インターフェロン産生が著しく抑制されていた²²⁾。これらの結果は TLR7 の順行性の移動が 1 型インターフェロンの産生につながることを示唆していた。TLR7 が存在する小胞が移動して到達する場所について検討すると、それは mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) が活性化してリン酸化されている小胞であった。mTORC1 は TLR7 刺激による 1 型インターフェロンの産生に重要な役割を果たす分子であり、mTORC1 の阻害剤により pDCs からの TLR7 依存的な 1 型インターフェロン産生は抑制された。さらに 1 型インターフェロン産生にかかわる TNF receptor-associated factor (TRAF) 3 を免疫沈降すると 1 型インターフェロン産生につながるシグナル伝達分子 IκB kinase α (IKKα) や mTORC1 が会合していることが明らかとなった。mTORC1 はリン酸化されており活性化されていた。そしてこれらの分子の会合は刺激とは関係なく認められた。TRAF3 の上流のシグナル伝達分子である TRAF6 を免疫沈降すると TLR7 刺激により TRAF3 と IRF7 が会合することが観察された。IRF7 は IKKα によりリン酸化されて活性化し、核に移行して 1 型インターフェロン産生を誘導する転写因子である。そして Arl8bGt/Gt マウス由来の pDCs では TLR7 刺激依存的な TRAF6 と TRAF3 の会合が認められなかった²²⁾。これらの結果より TLR7 刺激により TLR7 が存在する小胞が Arl8b 依存的に移動して、TRAF3 と mTORC1 が存在する小胞と出会うことで 1 型インター

フェロンを産生するためのシグナル伝達が始まることを示唆された (図 2)。

4. Arl8b による全身性エリテマトーデスの発症の制御

全身性エリテマトーデス (SLE) は病気の原因がまだ不明の点が多いが、SLE の患者の血中における 1 型インターフェロンの濃度が高いことや、ウイルス性肝炎の患者や悪性の腫瘍の患者の治療による 1 型インターフェロン投与により SLE 様の症状が認められるケースがあることから、1 型インターフェロンが SLE の発症にかかわっていることが推測されている。さらに SLE モデルマウスの実験で 1 型インターフェロンの受容体のノックアウトマウスとの交配により SLE の発症が抑制されることや 1 型インターフェロン受容体に対する抑制抗体の投与で SLE モデルマウスの SLE の発症が抑制されたことから、SLE の発症における 1 型インターフェロンの関与が示唆されている。さらに SLE のモデルマウスである BXS.B. Yaa マウスにおいて Yaa (Y-linked autoimmune acceleration) 変異遺伝子の原因遺伝子は TLR7 であることが報告されている。さらに TLR7 のノックアウトマウスをさまざまな SLE モデルマウスと交配することで、SLE の発症が抑制されていることから SLE 発症における TLR7 の重要性が示唆されている。BXS.B. Yaa マウスにおいて pDCs 除去により SLE の発症が抑制されたことから、SLE の発

症における Arl8b の役割を解明すべく, BXSb. Yaa マウスと Arl8bGt/Gt マウスを交配した。すると SLE の発症が全く認められなかった。さらに 2,6,10,14-tetramethylpentadecane (TMPD) の腹腔投与による SLE の発症モデルにおいても Arl8bGt/Gt マウスにおいて SLE の発症が著しく抑制されることが明らかとなった。これらの結果から Arl8b は SLE の発症にかかわっている重要な分子であることが示唆された。

おわりに

いままでに TLR4 と TLR7 を中心に研究を行ってきた。TLR4 と TLR7 は刺激に伴って移動をすることで炎症性サイトカインへのシグナル伝達と 1 型インターフェロン産生へのシグナル伝達の 2 つの異なるシグナル伝達機構を活性化させることが明らかとなってきた。そして, その TLR7 の移動にかかわる分子 Arl8b を欠損させた場合には 1 型インターフェロンの産生が著しく低下し, SLE の発症が顕著に抑制された。このことから, 細胞内の輸送を制御することで SLE の治療につながる可能性を示唆している。細胞内小胞輸送, そしてそもそも小胞に関してもほとんど明らかになっていない。われわれは詳細に小胞を分類しその機能を明らかにすることで TLR の活性化制御システムを明らかにできたらと考えている。

文 献

- Yang Y, Liu B, Dai J, et al. : Heat shock protein gp96 is a master chaperone for toll-like receptors and is important in the innate function of macrophages. *Immunity* 26 : 215-226, 2007 (doi : 10.1016/j.immuni.2006.12.005)
- Liu B, Yang Y, Qiu Z, et al. : Folding of Toll-like receptors by the HSP90 paralogue gp96 requires a substrate-specific cochaperone. *Nat Commun* 1 : 79, 2010 (doi : 10.1038/ncomms1070)
- Wakabayashi Y, Kobayashi M, Akashi-Takamura S, et al. : A protein associated with toll-like receptor 4 (PRAT4A) regulates cell surface expression of TLR4. *J Immunol* 177 : 1772-1779, 2006
- Takahashi K, Shibata T, Akashi-Takamura S, et al. : A protein associated with Toll-like receptor (TLR) 4 (PRAT4A) is required for TLR-dependent immune responses. *J Exp Med* 204 : 2963-2976, 2007 (doi : 10.1084/jem.20071132)
- 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 (doi : 10.1084/jem.20031076)
- Saitoh S, Akashi S, Yamada T, et al. : Lipid A antagonist, lipid IVa, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization. *Int Immunol* 16 : 961-969, 2004 (doi : 10.1093/intimm/dxh097)
- Saitoh S, Akashi S, Yamada T, et al. : Ligand-dependent Toll-like receptor 4 (TLR4)-oligomerization is directly linked with TLR4-signaling. *J Endotoxin Res* 10 : 257-260, 2004 (doi : 10.1179/096805104225005904)
- 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 (doi : 10.1038/nature07830)
- 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 (doi : 10.1016/j.cell.2007.08.002)
- 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 (doi : 10.1126/science.1139111)
- 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
- Tanimura N, Saitoh S, Matsumoto F, et al. : Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 368 : 94-99, 2008 (doi : 10.1016/j.bbrc.2008.01.061)
- Kagan JC, Su T, Horng T, et al. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol* 9 : 361-368, 2008 (doi : 10.1038/ni1569)
- Lee BL, Moon JE, Shu JH, et al. : UNC93B1 mediates differential trafficking of endosomal TLRs. *Elife* 2 : e00291, 2013 (doi : 10.7554/eLife.00291)
- Kim YM, Brinkmann MM, Paquet ME, et al. : UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* 452 : 234-238, 2008
- Kanno A, Tanimura N, Ishizaki M, et al. : Targeting cell surface TLR7 for therapeutic intervention in autoimmune diseases. *Nat Commun* 6 : 6119, 2015 (doi : 10.1038/ncomms7119)
- Majer O, Liu B, Barton GM : Nucleic acid-sensing TLRs : trafficking and regulation. *Curr Opin Immunol* 44 : 26-33, 2017 (doi : 10.1016/j.coi.2016.10.003)
- Kanno A, Yamamoto C, Onji M, et al. : Essential role for Toll-like receptor 7 (TLR7)-unique cysteines in an intramolecular disulfide bond, proteolytic cleavage and RNA sensing. *Int Immunol* 25 : 413-422, 2013 (doi : 10.1093/intimm/dxt007)
- Tanji H, Ohto U, Motoi Y, et al. : Autoinhibition and relief mechanism by the proteolytic processing of Toll-

- like receptor 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113 : 3012-3017, 2016 (doi : 10.1073/pnas.1516000113)
- 20) Fukui R, Saitoh S, Matsumoto F, et al. : Unc93B1 biases Toll-like receptor responses to nucleic acid in dendritic cells toward DNA- but against RNA-sensing. *J Exp Med* 206 : 1339-1350, 2009 (doi : 10.1084/jem.20082316)
- 21) Fukui R, Saitoh S, Kanno A, et al. : Unc93B1 restricts systemic lethal inflammation by orchestrating Toll-like receptor 7 and 9 trafficking. *Immunity* 35 : 69-81, 2011 (doi : 10.1016/j.immuni.2011.05.010)
- 22) Saitoh SI, Abe F, Kanno A, et al. : TLR7 mediated viral recognition results in focal type I interferon secretion by dendritic cells. *Nat Commun* 8 : 1592, 2017 (doi : 10.1038/s41467-017-01687-x)

第2章

平成29年度日本エンドトキシン・
自然免疫研究会奨励賞・優秀賞

インフルエンザウイルス感染に対する 中和抗体遺伝子を用いた予防・治療法の検討

山崎 達也^{1,2)}, 千葉 丈²⁾, 高村 (赤司) 祥子¹⁾

¹⁾愛知医科大学医学部感染・免疫学講座

²⁾東京理科大学大学院基礎工学研究科生物工学専攻

Neutralizing antibodies induced by gene-based injection have a prophylaxis/therapeutic effect in influenza infection

Tatsuya Yamazaki^{1,2)}, Joe Chiba²⁾, Sachiko Akashi-Takamura¹⁾

¹⁾Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Aichi Medical University

²⁾Department of Biological Science and Technology, Tokyo University of Science

Abstract

Classical passive immunization has provided the benefit to prevent against infectious diseases for over century. Although lots of antibody-drugs have been developed for cancer and autoimmune disease, those against infectious disease are rarely available. Because it has complex reasons including the current availability of antimicrobial drugs, small markets, high costs, and microbial antigenic variation.

We firstly demonstrated long-prophylaxis against influenza virus (A/Puerto Rico/8/34, IAV) using plasmids encoding neutralizing IgG monoclonal antibodies. Antibody gene-based injection could induce stable and high expression level of the neutralizing antibodies, which was possible that single inoculation protected the mice against a lethal dose of IAV infection. We proposed that this method could dissolve problems of high cost to the purification, limited supply for pandemic, and the risk of using viral vectors.

We also succeeded to treatment against IAV infection using antibody gene-based injection by hydrodynamics (HD), which was involving rapid inoculation of a large volume of plasmid-DNA solution into mice via the tail vein. HD could rapidly induce the potent level of neutralizing antibodies in the serum within 24 hours. We demonstrated that a single HD completely protected the mice even after a lethal dose of IAV infection. Finally, we also generated other isotypes of antibody-gene to exchange from IgG to IgA, IgM, IgD, and IgE to retain the variable region. The neutralizing IgA was most effective at reducing upper respiratory tract IAV infection. Thus, our passive immunotherapy could provide a new prophylaxis/therapeutic strategy of targeting IAV infection.

Endotoxin and Innate Immunity 21 : 7~11, 2018

Key words : passive immunotherapy, Antibody gene delivery, electroporation, hydrodynamic injection, Influenza virus

はじめに

病原体の感染によって宿主の自然免疫系が活性化され、続いて獲得免疫が誘導される。しかし、それだけでは対処できない感染症も多く存在する。中和抗体そのものを投与する受動免疫法は、それら感染症制御の有効な手段の一つである。その有効性は、北里らの抗毒

素血清療法成功から歴史的に証明されている。しかし、現在認可されている感染症分野の抗体医薬は、RSウイルスを予防するものだけである¹⁾。開発が進まない原因の一つとして、高いコストや効果の維持には複数回投与が必要であることがあげられる。そこで近年、新しい受動免疫法の一つとして、従来のタンパク抗体ではなく“抗体遺伝子”を用いた受動免疫で感染症を予

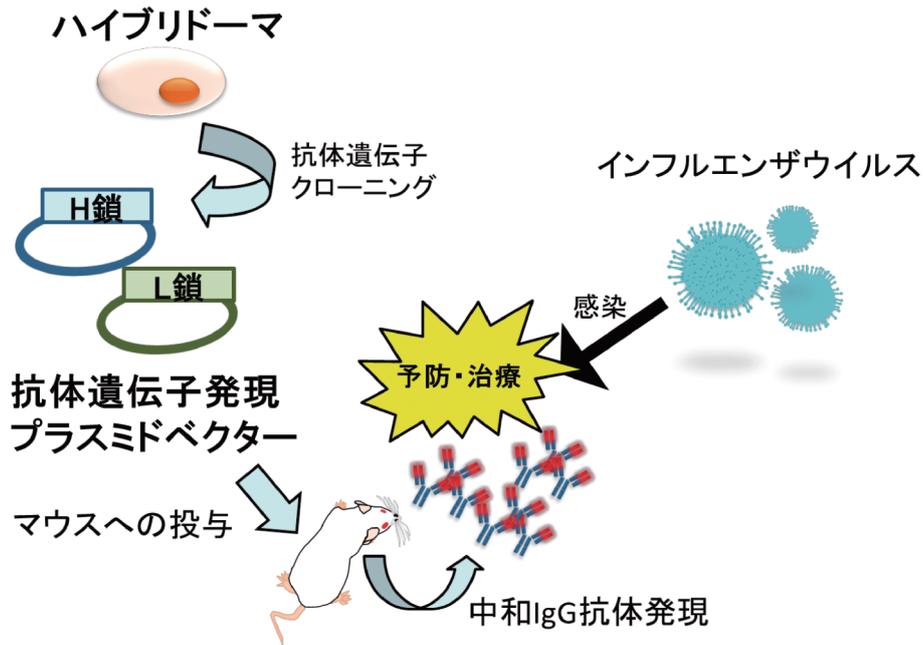


図 1 抗体遺伝子投与によるインフルエンザウイルス感染防御の模式図

インフルエンザウイルス中和 IgG 抗体を産生するハイブリドーマから H 鎖、L 鎖の遺伝子をクローニングし、それぞれ発現プラスミドベクターに組み込んだ。ベクターをマウスに投与し、生体内から発現した中和抗体がインフルエンザウイルスを防御できるか検討した。

防したという研究が報告されている²⁾。本稿では、われわれの研究を中心に、抗体遺伝子を用いた受動免疫法による感染症の制御と課題について概説したい。

1. 抗体遺伝子とは

従来の低分子化合物に比べ、抗体医薬は特異性が高いので効果が強く副作用も低いという特徴がある。それゆえとくに癌や自己免疫疾患の分野で多くの抗体医薬品が開発されている¹⁾。主な抗体医薬品は、大量の培養細胞にタンパク抗体を発現させ、それを精製してつくられている。その製造コストが高いことは課題の一つとなっている³⁾。また通常の抗体をヒトに投与した場合、その半減期は数日間とされている³⁾。つまり効果を持続するためには繰り返し投与する必要がある。それらの課題を解決する方法の一つとして、抗体遺伝子による受動免疫法が研究されている。具体的には、抗体を発現する遺伝子を生体内に投与し、その遺伝子から発現した抗体によって予防や治療効果を得る方法である。抗体遺伝子を用いるメリットとして、タンパク抗体よりも製造コストが安価であることがあげられる。大腸菌で製造するので容易に大量培養・精製が可能でありコストが安価となることが期待される。さらに遺伝子からの持続的な抗体発現を期待できるので、投与回数を減らせることが期待できることもメリットの一つである。

2. 抗体遺伝子投与による感染症予防について

2-1. 非ウイルスベクターによる抗体遺伝子投与

われわれは世界に先がけて、抗体遺伝子の単回投与で約3カ月の長期的なインフルエンザの予防に成功した⁴⁾。まずインフルエンザウイルス中和 IgG 抗体を産生するハイブリドーマから H 鎖遺伝子、L 鎖遺伝子をそれぞれ組み込んだプラスミドベクターを作製した(図1)。そのプラスミドをマウスの大腿筋にエレクトロポレーション法で投与した結果、血中に $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の高濃度の中和抗体が持続的に安定して発現することを確認した。そこで実際に抗体遺伝子投与マウスにウイルスを感染させ、予防効果があるか解析を行った。インフルエンザウイルス感染方法は2種類あり、肺(下気道)感染は致死モデルであり、鼻腔(上気道)感染は粘膜局所の感染モデルである。遺伝子投与後、抗体発現がピークとなる20日目に致死量のウイルスを肺感染させた結果、肺洗浄液中のウイルス価は有意に減少した。また感染による体重減少もみられず、すべてのマウスが生存した。さらに遺伝子投与後130日目にウイルス感染させた場合でも、有意にウイルス価の減少が認められた。これらの結果より、抗体遺伝子による受動免疫は長期的なウイルス感染の予防効果があることが分かった。タンパク抗体の半減期が数日であることを考える

と有効な方法であると言える。さらに非ウイルスベクターを用いたことで、安全性も高い方法であると考えられる。他にプラスミドベクターを用いて抗体遺伝子を投与した報告では、Weinerのグループでデングウイルス、チクングニアウイルスに対する感染予防に成功している^{5,6)}。彼らも、エレクトロポレーション法による抗体遺伝子の単回投与で1カ月以上のチクングニアウイルスの感染予防効果を示している⁶⁾。以上より非ウイルスベクターでも十分な感染予防効果があると考えられる。

2-2. ウイルスベクターによる抗体遺伝子投与

ウイルスベクターを用いた場合、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターに抗体遺伝子を組み込んで発現させている報告が多い²⁾。AAVは、宿主ゲノムに組み込まれず自己複製もしない安全なウイルスベクターとして用いられている。感染細胞で長期的に保持されるので目的の抗体を数カ月～数年にわたり発現させることが可能である⁷⁾。AAVに抗体遺伝子を組み込んでマウスへの単回投与もしくは複数回投与で長期的な予防効果を示している報告は、エイズウイルス(HIV)、インフルエンザウイルス、C型肝炎ウイルス(HCV)、RSウイルス、マラリア、炭疽菌がある²⁾。また、インフルエンザウイルスやHIVなどは抗原変異が激しく、宿主免疫を回避することが問題となっている。そのような変異ウイルスにも効果があるように、各株間の中和エピトープが保存されている中和抗体を発現する遺伝子が用いられている²⁾。

2-3. 抗体遺伝子を組み込むベクターの工夫

抗体遺伝子の発現方法に関して、口蹄疫ウイルス由来の自己開裂ペプチド(2Aペプチド)でH鎖遺伝子とL鎖遺伝子を連結することで、1種類のプラスミドベクターにすることが可能である⁸⁾。遺伝子からはH鎖とL鎖が連結した状態でタンパクが発現し、その後2Aペプチドで自己開裂するため、H鎖、L鎖がそれぞれ独立した構造をとり、最終的に結合して一つの抗体を形成する。よってベクターは1種類となるので、抗体遺伝子の調整もより簡便化される。

3. 抗体遺伝子による感染症治療の検討

3-1. 感染症の治療について

感染症制御のためには新たな治療法開発も重要な課題である。それは、すでに病原体に感染した患者に対してワクチンでは迅速な治療は困難であるからである。インフルエンザでは抗ウイルス薬が治療の中心となっている。薬剤耐性ウイルス出現も問題となっているが、複数のウイルス薬の開発によって、その対策が行われている。2018年には、これまでとは作用機序の異なる

ウイルス薬(商品名:ゾフルーザ)が認可され、さらに治療の選択肢が増えた。また、それまで治療困難であったHCVも、近年認可された抗ウイルス薬により治療効果が飛躍的に上昇した。現在では、ほぼ100%のウイルス排除効果が認められている⁹⁾。このように有効な抗ウイルス薬の開発は、それまで治療困難であった感染症を克服できる可能性がある。

3-2. 抗体遺伝子による感染症治療の意義と戦略

抗ウイルス薬の開発は目覚ましいものがあるが、エボラウイルスや狂犬病ウイルスなどいまだに有効な抗ウイルス薬が開発されていない感染症も多く存在する。低分子化合物による抗ウイルス薬は、膨大な数のスクリーニングにより開発されている。一方で、医薬品全体として上市に至った割合は、低分子化合物では約5%であるのに対し、抗体医薬では約20%であったという報告もされている¹⁰⁾。すでに述べたように抗体医薬は特異性が高く、また自己タンパクであるので副作用は低いことが大きな利点である。以上のことから、抗体医薬で感染症を治療することは、開発効率と治療効果が高いことが期待される。そこでわれわれは、インフルエンザを感染症のモデルとし、抗体遺伝子を用いた受動免疫でインフルエンザを治療できるか検討することにした。

宿主はすでにウイルスに感染しているので、治療において重要なことは即効性である。つまり遺伝子投与後、迅速かつ高レベルの中和抗体を宿主に導入することが重要である。そこでハイドロダイナミクス法という遺伝子導入法を検討した。ハイドロダイナミクス法とは、マウス全血液量とほぼ同量のプラスミド溶液を尾静脈から数秒で投与することで、細胞に水力学的な圧力をかけて一過性に細胞膜に穴をあけ、細胞内に遺伝子を取り込ませる方法である¹¹⁾。主な遺伝子発現組織は肝臓で、短時間に高レベルの遺伝子発現が得られるという特徴がある¹¹⁾。この方法で抗体遺伝子を投与した結果、遺伝子投与後4時間から血中に抗体が検出され始め、24時間後では10 μ g/mL以上の抗体が検出された(図2)¹²⁾。一方で、エレクトロポレーション法では投与後24時間以内においては、有意なレベルで血中に抗体は検出されなかった。これよりハイドロダイナミクス法で抗体遺伝子を投与することで、迅速かつ高レベルの抗体を血中に誘導できることが分かり、インフルエンザの治療効果が期待された。

3-3. 抗体遺伝子による致死性インフルエンザウイルス感染に対する治療

まず致死量のウイルスをマウスに肺感染させ、感染1日後に抗体遺伝子を投与し、さらに感染3日後に肺洗浄液を回収した。肺洗浄液中のウイルス価をプラーク

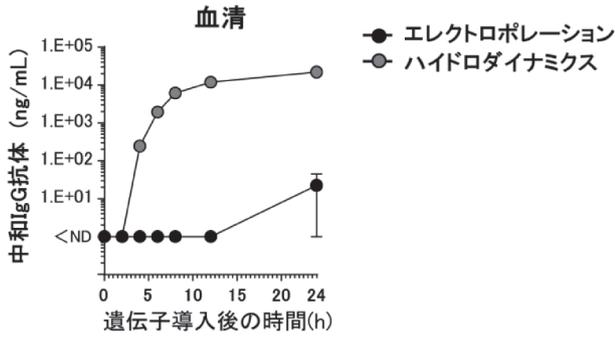


図 2 迅速な遺伝子導入法の検討

図中の方法でマウスに抗体遺伝子を投与した。経時的に血清を採取し、血清中の中和 IgG 抗体レベルを ELISA で定量した。(文献¹²⁾を改変)

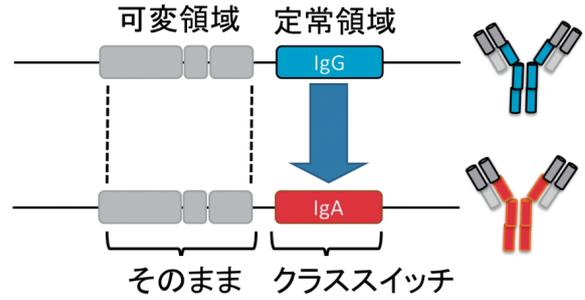


図 4 抗体遺伝子アイソタイプ組み換えの模式図

中和 IgG 抗体の可変領域遺伝子は保存し、定常領域遺伝子のみを他のアイソタイプ遺伝子に組み換えた。

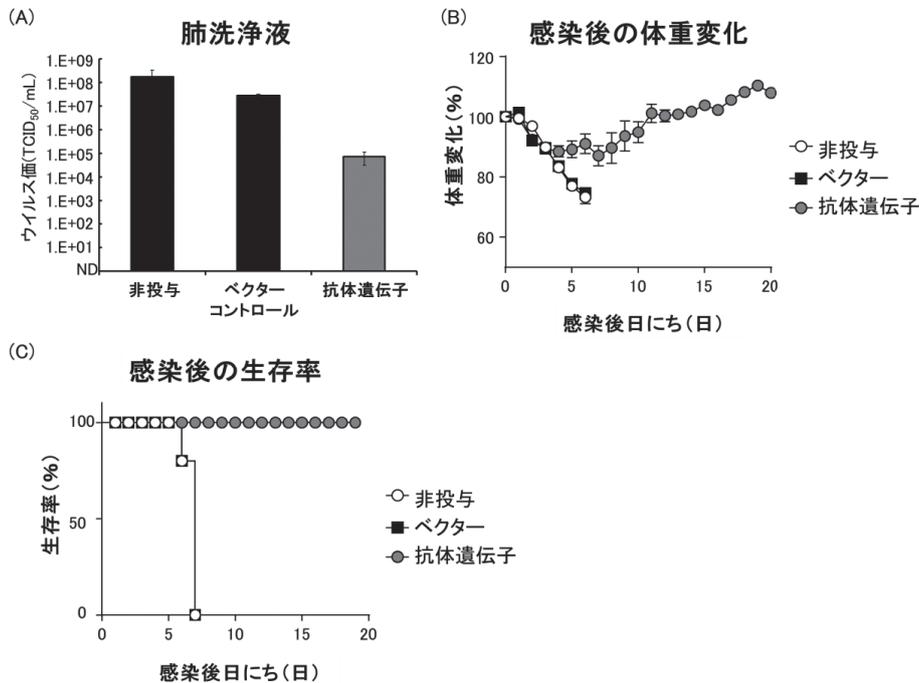


図 3 抗体遺伝子投与によるインフルエンザ（肺感染）の治療

マウスに致死量のインフルエンザウイルスを肺感染させた。感染 1 日後に抗体遺伝子を投与し、感染 3 日後に肺洗浄液中のウイルス価をプラーク法で測定した (A)。また別の群では感染による体重減少 (B) と生存率 (C) をモニタリングした。(文献¹²⁾を改変)

法で解析したところ、抗体遺伝子投与群で有意なウイルス価の減少が認められた (図 3A)¹²⁾。さらにウイルス感染による体重減少と生存率を測定した結果、感染による体重減少は抑制され (図 3B)、生存率も 100%であった (図 3C)¹²⁾。以上より、抗体遺伝子投与によって致死性インフルエンザ (肺感染モデル) の治療が可能であることが示された。

3-4. IgG 抗体遺伝子から他のアイソタイプ抗体遺伝子への組み換え

抗体の種類 (アイソタイプ) は IgG の他に、IgM, IgA, IgD, IgE の 5 種類存在する。抗体医薬や抗体遺伝子研究で用いられている抗体のアイソタイプはすべて IgG である^{1,2)}。よって他のアイソタイプを発現する抗体遺伝子の効果は全く不明である。そこでわれわれは、中和 IgG 抗体の可変領域は保存し、定常領域を他のアイソタイプに組み替えた抗体遺伝子を作製した (図 4)¹²⁾。

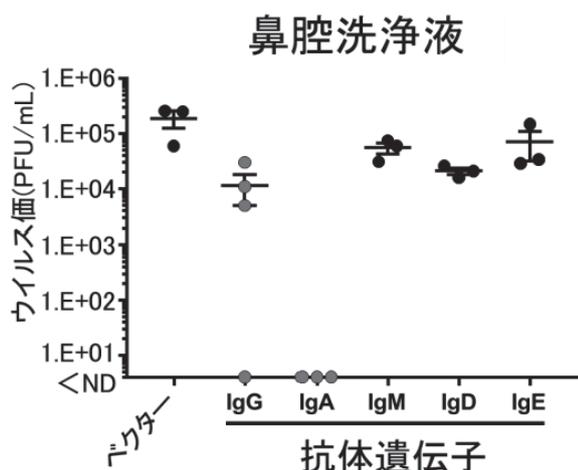


図5 抗体遺伝子投与によるインフルエンザ（鼻腔感染）の治療

マウスにインフルエンザウイルスを鼻腔感染させた。感染8時間後に、各アイソタイプ抗体を発現する抗体遺伝子を投与し、感染3日後に鼻腔洗浄液中のウイルス価をプラーク法で測定した。（文献¹²⁾を改変）

作製した抗体遺伝子をそれぞれハイドロダイナミクス法でマウスに投与した結果、血中にすべてのアイソタイプ抗体の発現を確認できた。つづいてマウスにウイルスを感染させ、治療効果が認められるか解析を行った。まず肺感染モデルにおいて、IgG以外のアイソタイプでは肺洗浄液中の有意なウイルス価の減少は認められなかった。次に鼻腔（上気道）感染モデルでは、IgGに加え、IgA抗体遺伝子を投与した場合でも鼻腔洗浄液中のウイルス価は有意に減少した（図5）¹²⁾。さらにIgA抗体遺伝子では、そのレベルはほぼ検出限界以下のレベルであった。この結果より、ウイルスの鼻腔粘膜感染に対しては、IgA抗体遺伝子の治療効果が高いことが示唆された。インフルエンザウイルスは通常、鼻腔粘膜に感染するので、IgA抗体遺伝子の投与はインフルエンザの治療において有効な方法であると考えられた。

おわりに

中和抗体を投与する受動免疫法は、ワクチンや抗ウイルス薬がない感染症において、予防・治療の両方で効果的であると考えられる。インフルエンザウイルスやHIVでは変異ウイルスにも対応できるように、株間で保存されているエピトープに対する中和抗体のクローニングが盛んに行われている。一方で、抗体医薬のコストや効果の持続性を考慮すると、抗体遺伝子による

受動免疫法は魅力的な方法である。しかし遺伝子治療の大きな課題は、安全に遺伝子を導入する方法の開発である。エレクトロポレーション法やハイドロダイナミクス法ではヒトにおける侵襲性が高いと考えられ、すぐに臨床応用できる治療法とは言い難い。安全でかつ簡便な非侵襲性の遺伝子導入法が開発されれば、われわれの研究も含めて抗体遺伝子研究は、抗体医薬の感染症への応用に大きく貢献できると考えている。

文献

- 1) 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部：これまでに日米欧で認可された抗体医薬品，2018 (<http://www.nih.go.jp/dbcb/mabs.html#m02>)
- 2) Sanders JW, Ponzio TA : Vectored immunoprophylaxis : an emerging adjunct to traditional vaccination. Trop Dis Travel Med Vaccines 3 : 3, 2017
- 3) 関根進 : 抗体医薬の現状と課題. 科学技術動向 103 : 13-25, 2009
- 4) Yamazaki T, Nagashima M, Ninomiya D, et al. : Passive immune-prophylaxis against influenza virus infection by the expression of neutralizing anti-hemagglutinin monoclonal antibodies from plasmids. Jpn J Infect Dis 64 : 40-49, 2011
- 5) Flingai S, Plummer EM, Patel A, et al. : Protection against dengue disease by synthetic nucleic acid antibody prophylaxis/immunotherapy. Sci Rep 5 : 12616, 2015
- 6) Muthumani K, Block P, Flingai S, et al. : Rapid and Long-Term Immunity Elicited by DNA-Encoded Antibody Prophylaxis and DNA Vaccination Against Chikungunya Virus. J Infect Dis 214 : 369-378, 2016
- 7) Yang L, Wang P : Passive immunization against HIV/AIDS by antibody gene transfer. Viruses 6 : 428-447, 2014
- 8) Fang J, Qian JJ, Yi S, et al. : Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide. Nat Biotechnol 23 : 584-590, 2005
- 9) 日本肝臓学会肝炎診療ガイドライン作成委員会 : C型肝炎治療ガイドライン（第6.1版），2018
- 10) 川西徹 : 抗体医薬の現状と展望. 日薬理誌 131 : 102-108, 2008
- 11) Liu F, Song Y, Liu D : Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. Gene Ther 6 : 1258-1266, 1999
- 12) Yamazaki T, Nagashima M, Ninomiya D, et al. : Neutralizing Antibodies Induced by Gene-Based Hydrodynamic Injection Have a Therapeutic Effect in Lethal Influenza Infection. Front Immunol 9 : 47, 2018

脂質メディエーターからみた外科侵襲学の新知見

松田 明久¹⁾, 宮下 正夫¹⁾, 山田真吏奈¹⁾, 松本 智司¹⁾, 櫻澤 信行¹⁾,
川野 陽一¹⁾, 関口久美子¹⁾, 松谷 毅²⁾, 山田 岳史²⁾, 吉田 寛²⁾

¹⁾日本医科大学千葉北総病院外科・消化器外科, ²⁾日本医科大学消化器外科

New insights of surgical host response in view of lipid mediators

Akihisa Matsuda¹⁾, Masao Miyashita¹⁾, Marina Yamada¹⁾, Satoshi Matsumoto¹⁾, Nobuyuki Sakurazawa¹⁾,
Youichi Kawano¹⁾, Kumiko Sekiguchi¹⁾, Takeshi Matsutani²⁾, Takeshi Yamada²⁾, Hiroshi Yoshida²⁾

¹⁾Department of Surgery, Nippon Medical School Chiba Hokusoh Hospital

²⁾Department of Gastrointestinal and Hepatobiliary Pancreatic Surgery, Nippon Medical School

Abstract

Various extrinsic and endogenous mediators are produced and released not only in the local injured and infected foci, but in the systemic circulation after surgical stress and sepsis. Recent progress of lipid research has figured out that lipid mediators have pleiotropic immunological properties and are associated with various disease pathophysiology. Therefore, lipid mediators can play a major role of regulating host responses after surgical stress and sepsis. In this review, we focused on important lipid mediators, including specialized proresolving lipid mediators and lysophospholipids, and discuss the role for surgical host responses from perspectives of clinical application.

Endotoxin and Innate Immunity 21 : 12~17, 2018

Key words : 外科侵襲, 炎症収束, 脂質メディエーター, リゾリン脂質, PCSK9

はじめに

生体は手術, 外傷, 重症感染症などの侵襲を受けると, 障害, 感染を受けた部位のみならず全身からさまざまな生理活性物質(メディエーター)を放出し, 生体の内部環境を回復して生存するための生体反応を起こす。炎症性生体反応は本来, 外的障害に対する生体の生理的な応答反応であり組織修復, 免疫活性化に重要な役割を担っている。しかし, 炎症性生体反応が相対的過剰となると, その生体に有益な反応とは逆に免疫抑制, 臓器障害を惹起し, 病態を悪化させる。

手術侵襲によって惹起されるさまざまな生体反応には, 手術操作による直接的組織破壊による侵襲のみならず, 術中の出血, 循環動態・体温の変動, 麻酔, 輸血などのさまざまな要因が関与しており, 単に鏡視下手術の施行や手術時間といった外科医の目にとまりやすい要因だけで規定されるものではない。したがって, 真に患者に優しい手術(真の意味での低侵襲手術)を行

うためには, 先述の外科医側からみた要素のみではなく, 実際の患者に惹起されている生体反応を十分に知り, さらに理解を深めるための努力が不可欠である。

本稿では, 多彩な生理活性を有し, 数多くの疾患病態に関与することが報告されている脂質メディエーターに注目して, 外科侵襲後の生体反応および, その治療応用への可能性について最新知見も含めて概説する。

1. 脂質メディエーターによる能動的炎症収束機構

急性炎症期では, 血管透過性が亢進して局所に血漿成分が浸出し, 多数の好中球が遊走する。また, 炎症性サイトカインなどの蛋白成分とともに ω 6系多価不飽和脂肪酸であるアラキドン酸(Arachidonic acid: AA)が, シクロオキシゲナーゼによってプロスタグランジン(Prostaglandin: PG)やロイコトリエン(Leukotriene: LT)といった炎症性脂質メディエーターに変換され, 好中球の遊走を促進し, 炎症性変化を増強させる。

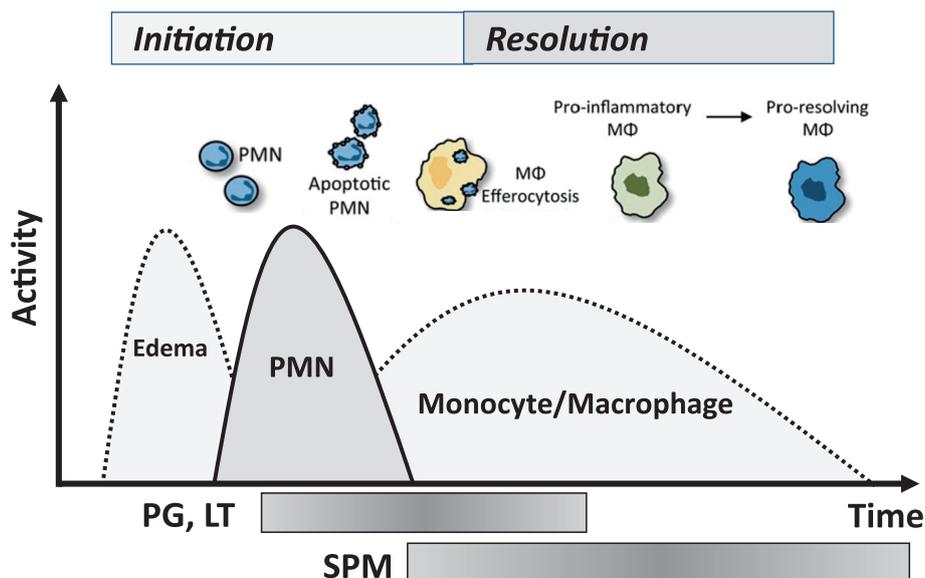


図1 脂質メディエータークラススイッチングによる炎症惹起と能動的炎症収束
 PG: Prostaglandin, LT: Leukotriene, SPM: Specialized proresolving lipid mediator, PMN: Polymorphonuclear neutrophil (文献²⁾を改変)

その後、マクロファージが局所に浸潤し、好中球を貪食し炎症は収束する。これまで、能動的な機序として詳細に解明されてきた炎症惹起に対して、炎症収束は炎症惹起に続く受動的なプロセスとして理解されてきた。

しかし、AAからリポキシゲナーゼを介して産生される代謝産物が、好中球遊走抑制作用を有することが報告され¹⁾、脂質メディエーターによる能動的炎症収束機序の存在が知られるようになった。さらに近年、網羅的リピドミクス解析技術の進歩に伴って ω 3系不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (Eicosapentaenoic acid: EPA) やドコサヘキサエン酸 (Docosahexaenoic acid: DHA) から代謝される分子にも、同様の好中球遊走阻止やマクロファージによる好中球の非炎症誘導性貪食 (エフェロサイトーシス) 作用を有することが報告された。近年、これら能動的炎症収束作用を有する遊離脂肪酸群は、Specialized proresolving lipid mediator (SPM) と総称されている²⁾。SPMは、炎症を惹起するPGやLTの濃度上昇を抑制することが知られており、これら一連の脂質メディエーター依存性の能動的炎症-炎症収束性プロセスはLipid mediator class-switchingと呼ばれている (図1)²⁾。

1-1. SPMの種類とその炎症収束作用

SPMにはAA由来のリポキシシン (Lipoxin: LX) やEPA由来のレゾルビンE系 (Resolvin E1: RvE1 など)、DHA由来のレゾルビンD系 (Resolvin D1: RvD1 など) やプロテクチンD1 (Protectin D1: PD1)、マレシン1 (Malesin1: MaR1) が同定されている (図2)。

マウス敗血症 (盲腸結紮穿孔 (Cecum ligation and

puncture: CLP)) モデルにおいて、レゾルビンD (D1, D2) の投与が、免疫抑制を起こさずに、細菌除去を増強させ死亡率を減少させること^{3,4)}や細菌感染に対するレゾルビンD1あるいはプロテクチンD1投与によって抗生物質の必要投与量の軽減し得たことが報告されている⁵⁾。最近の報告では、レゾルビンD2が持つマクロファージによる細菌貪食能亢進作用は、G蛋白共役受容体 (G protein-coupled receptor: GPCR) であるDRV2を介しProtein kinase AやSTAT3依存的に発現することが報告されている⁶⁾。さらに、ヒト敗血症患者におけるSPMの血中プロファイルが予後や急性肺障害のバイオマーカーとなることが報告されている⁷⁾。

SPMの炎症収束作用で特徴的なのは極めて低濃度で作用することである。同じDHAやEPAを基質とする抗炎症性核内受容体であるPeroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) が抗炎症作用を発揮するのに比較的高濃度 (EC₅₀で10-100 nM) が必要となるのに対して、SPMは低濃度 (EC₅₀でpM~nMレベル) であり、生体内で強力な炎症収束作用を担っていることが考えられる。

1-2. SPM研究の今後の展開と臨床応用

現在、慢性関節リウマチやクローン病などの炎症性腸疾患で臨床応用されている抗炎症作用薬 (ステロイドや抗炎症性サイトカイン抗体薬など) は病勢制御効果を有し頻用されているが、免疫抑制作用による感染症の惹起が問題となっている。SPMは単なる免疫抑制ではなく、むしろ感染症をも制御しうる機能を持つことは特筆すべきであろう。しかし、SPMは容易に酸化

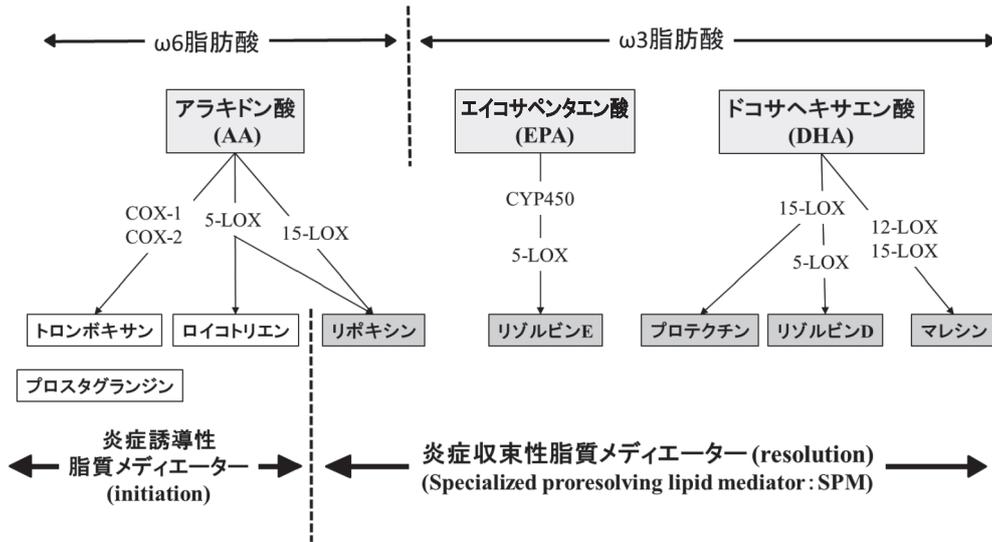


図 2 炎症収束性脂質メディエーター
Specialized proresolving lipid mediator (SPM) とその産生経路。

され他の代謝産物に転換されやすいなどの創薬に向けては乗り越えなければならない課題があるのが現状である。

2. リゾリン脂質メディエーター

リン脂質とは、構造中にリン酸エステル結合を有する脂質の総称である。生体膜を構成する主要な脂質であり、細胞や細胞内小器官を囲む役割を担っている。さらに、シグナル伝達物質としての役割を担うリン脂質をリン脂質メディエーターと呼ぶ。狭義には細胞膜上に存在する特異的受容体を介して生理活性を示すリン脂質を指す。

リン脂質メディエーターにはさまざまなものがあるが、なかでもリゾリン脂質は第2世代の脂質メディエーターと称され、ジアシルリン脂質の2本のアシル基のうち1本が除かれたリン脂質であり、ホスホリパーゼ (Phospholipase) A₂ (PLA₂) により触媒され産生される。これまで、リゾリン脂質はアラキドン酸代謝系の副産物に過ぎず、細胞レベルでみられる作用も界面活性作用によるものと考えられ、それほど注目されていなかった。しかし、近年の遺伝子工学の進歩によりリゾリン脂質の一群が脂質メディエーターとして種々の病態で重要な役割を担っていることが次々と明らかになってきた。リゾリン脂質は、前駆体であるリン脂質に比べ疎水性が低下しており、容易に細胞膜から遊離し受容体に作用しうる。作用後は速やかに脱リン酸化や脱アシル化を受けて除去される。このような性質はリゾリン脂質がメディエーター分子としての機能を獲得してきた大きな要因であると考えられる。

2-1. リゾリン脂質メディエーターの種類とその作用

生体内ではさまざまなリゾリン脂質が存在するが、リゾリン脂質は構造上、グリセロールを骨格とするリゾグリセロリン脂質 (リゾホスファチジルコリン (Lysophosphatidylcholine : LPC), リゾホスファチジン酸 (Lysophosphatidic acid : LPA) など) とスフィンゴシンを骨格とするリゾスフィンゴシン脂質 (スフィンゴシン-1-リン酸 (Sphingosine 1-phosphate : S1P) など) に大別される。これらは、細胞膜に存在する特異的なGPCRを介して作用している。

3. リゾホスファチジルコリン (LPC) とその産生経路

LPCは、グリセリン骨格にコリンリン酸と一つのアシル基が結合したリゾリン脂質であり、動脈硬化と深く関係するとされる酸化LDLの主要成分の一つである。LPCは、血液中に約数百μM濃度で存在し、最も豊富なりゾリン脂質である。

血中に存在するLPCは、複数の構成脂肪酸種 (16:0 (40%), 18:2 (20%), 18:1/18:0 (10~15%), 20:4 (10%)) の混合体として存在している。LPCの産生・代謝経路としては、ホスファチジルコリン (Phosphatidylcholine : PC) から分泌型PLA₂やレシチンコレステロールアシル転移酵素 (Lecithin-cholesterol-acyltransferase : LCAT) による加水分解を受けLPCが産生されるとともに、リゾリン脂質アシル転移酵素 (Lysophosphatidylcholine acyltransferase : LPCAT) によりPCに変換される (リモデリング経路 (Land's cycle) と呼ばれる)。また、LPCはリゾホスホリパーゼD/オートタキシン (Autotaxin : ATX) によりリゾホスファチジン酸 (Lysophosphatidic acid : LPA) に変換される。

3-1. LPCの免疫学的作用

LPC 刺激は、血管内皮細胞、単球系細胞などの免疫担当細胞からの接着分子や COX-2 産生、MAPK や NF- κ B の活性化などの炎症性免疫反応を誘導すると報告されてきた⁸⁾。しかし、これらの報告においては、培養系における LPC の使用濃度、脂肪酸種、アルブミンなどの LPC 活性阻害物質、LPC 加水分解酵素などの併存が影響している可能性があり注意を要する。実際、LPC による NF- κ B の活性化は LPC 濃度依存性があり、低濃度の LPC は血管内皮細胞における NF- κ B の活性化を誘導するが、高濃度では逆に抑制することが報告されている⁹⁾。したがって、複雑な生体内では、LPC の生理作用も画一的なものではなく、さらに疾患病態ではその複雑性が増している可能性が高い。

3-2. LPCの侵襲下における作用

Yan ら¹⁰⁾は、マウス CLP モデルによる敗血症において、LPC (18:0) の投与が容量依存的に好中球の H₂O₂ 産生による殺細菌作用を活性化し、TNF- α 、IL-1 β の産生を抑制し、IFN- γ の産生を亢進させることで死亡率を改善させることを報告している。また、Chen ら¹¹⁾は、敗血症に対する LPC 投与による予後改善の機序として、LPC のマクロファージにおける能動的 HMGB1 (high-mobility group box 1) 産生抑制作用が関与していることを報告している。しかし、両報告においても 18:0 以外の LPC 種では、作用する免疫担当細胞に違いがあり、抗炎症ではなく、むしろ炎症性作用を惹起することも報告されており、生体内での LPC 作用の多様性がうかがえる。

これらの LPC による抗炎症作用を報告した検討において、LPC による免疫調節反応は GPCR である G2A を介するものであることが報告されている。

また、ヒト敗血症患者では、血中 LPC 濃度が低下しており、その濃度が細菌性敗血症と非細菌性敗血症との鑑別に有用であること¹²⁾、また、重症度や予後を反映することも報告されている^{13,14)}。すなわち、敗血症などの急性の炎症状態では、LPC は先述の炎症性作用ではなく、G2A を介した抗炎症による beneficial な作用を担っていることが示唆される。

3-3. LPCの消化器術後合併症の予測マーカーとしての意義

鏡視下手術の導入や麻酔法の進歩などの低侵襲治療の普及にもかかわらず、消化器外科術後合併症は依然として一定の頻度で発生し、その要因は前述のごとく多岐にわたる。また、消化器癌手術においては術後合併症の発生が腫瘍学的予後の悪化に関連することも数多くの癌種において報告されている¹⁵⁾。術後合併症発生およびその長期予後悪化を来す要因として、手術侵

襲自体および合併症発生により誘導される過剰な炎症性生体反応からの長期的免疫機能低下があげられている。

われわれは手術侵襲後の生体における過剰な炎症性生体反応および術後合併症発生における LPC の役割に関する検討を行ってきた。待機的消化器外科手術周術期 (全 63 症例) における血中 LPC およびその前駆体である PC、変換酵素である ATX を酵素法、ELISA 法にて測定した。腹腔鏡下胆嚢摘出術を低侵襲群、大腸癌手術を中低侵襲群、食道癌・肝胆膵癌手術を高侵襲群とし、血中 LPC 濃度 (術直後の術前値からの変化率) を見てみると、侵襲度の増加につれて血中 LPC の低下がより顕著となっていた。これは、血中 LPC 濃度が手術侵襲度を評価するバイオマーカーとしての可能性を示唆している。また、大腸癌手術において、術後合併症を認めなかった群と認めた群の比較では、術後合併症を認めた群で有意に術後の血中 LPC が低下していた (図 3A)。術直後の LPC と IL-6 との相関関係を検討したところ、LPC と IL-6 は有意な逆相関を示した (図 3B)。すなわち、非感染性侵襲である手術侵襲後の生体においても血中 LPC は、感染性侵襲である敗血症と同様に低下すること、また、LPC が抗炎症性の免疫調節因子として作用していることが明らかとなった。また、手術侵襲により LPC が低下する機序として、PC は LPC と有意な相関関係を持ち術後に低下すること、ATX は手術前後で変化がないことから、術後の LPC 低下は、PC の細胞膜から血中への遊離の減少が関与している可能性が示唆された¹⁶⁾。以上の結果は、酵素法にて比較的簡便に測定できる血中 LPC 値の術後合併症予測マーカーとしての将来性を期待させるものであった。

4. PCSK9 とは

前駆体タンパク質転換酵素サブチリシン/ケキシン 9 (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9: PCSK9) は、LDL 受容体、アポリポ蛋白 B に続く家族性高コレステロール血症の原因遺伝子として、2003 年に新規に同定された。現在までに PCSK9 に関する解析が進み 10 年足らずで阻害薬が創薬され、2016 年 4 月から本邦でも臨床使用可能となっている。PCSK9 遺伝子の解析からこれまでに多くの遺伝子多型が報告され、そのなかには機能獲得型変異と機能喪失型変異があることが知られている。

細胞外に分泌された PCSK9 は、LDL 受容体の EGF-A ドメインに結合する。この PCSK9-LDL 受容体複合体は細胞内に移動し、最終的にリソソーム内で LDL 受容体が分解される。PCSK9 の機能獲得型変異や血中 PCSK9 濃度が高い場合、LDL 受容体の分解が亢進し高 LDL-C 血症をもたらす。したがって、PCSK9 阻害薬は LDL 受容体の分解を抑制することで治療効果を発揮する。

敗血症などの感染性侵襲下では、Lipopolysacchar-

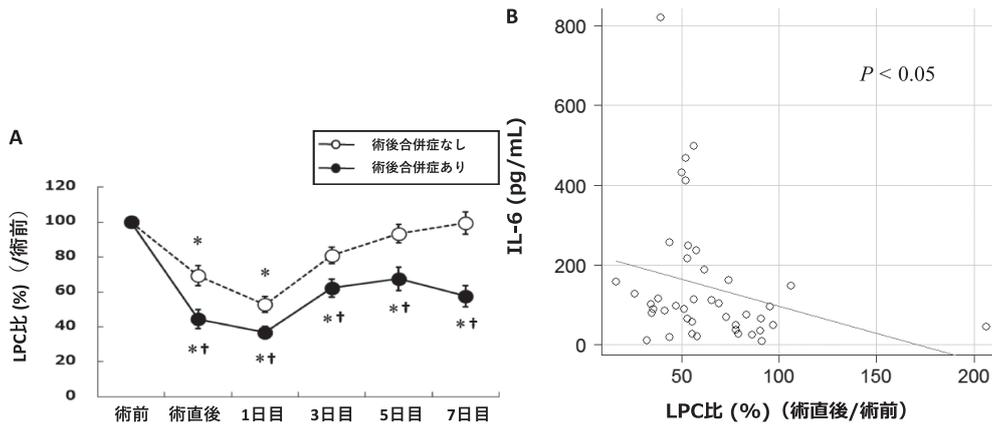


図 3 大腸癌手術症例における手術侵襲後の血中 LPC 値の変動 (A) と血中 IL-6 値との相関 (B)
 平均値 ± 標準誤差 (* $P < 0.05$ vs 術前値, † $P < 0.05$ vs 術後合併症なし群)。(文献¹⁶⁾を改変)

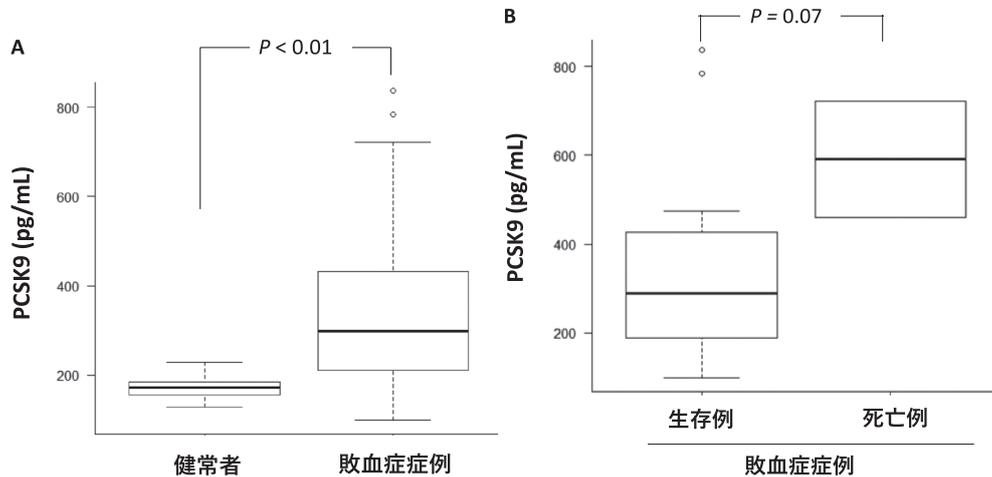


図 4 敗血症症例における血中 PCSK9 値
 A: 健常者との比較, B: 生存例と死亡例の比較
 中央値 ± 25-75 パーセントイル。
 PCSK9: Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9

ide(LPS)や Lipoteichoic acid などの病原体由来脂質が、Toll-like receptors (TLRs) に認識され過剰な炎症性反応が惹起される。これらの病原体由来脂質は、最終的に LDL や VLDL に変換され、肝臓で除去される。この過程にも PCSK9 が関与していることが報告されており、Walley ら¹⁷⁾は、敗血症における PCSK9 の作用を検討している。LPS 投与および CLP モデルにおいて、ノックアウトマウスおよび PCSK9 抗体の投与は wild-type およびコントロールに比べて炎症反応の軽減、死亡率の低下を認めた。当科における敗血症症例の検討では、血中 PCSK9 濃度は健常者に比べて有意に高値であり(図 4A)、死亡例では生存例に比べて高い傾向を認めた(図 4B)。PCSK9 は脂質メディエーターではないが、脂質代謝という観点からの侵襲下の病態解明およ

び治療応用の可能性の大きさを示唆しており大変興味深い。

おわりに

近年、注目されている脂質メディエーターの侵襲時の免疫学的作用を中心に概説するとともに脂質異常症に対して臨床応用されている PCSK9 の侵襲時の生体反応制御の可能性を紹介した。手術侵襲後の生体では、これらの脂質メディエーターが大きく変動することで生体防御のみならず合併症発症、予後悪化にも関与している可能性があるが、本稿で述べてきたようにこれらを検討した研究は極めて少ない。今後、さらなる検討により真の低侵襲外科治療を達成すべく脂質メディエーターをターゲットとした研究が広く展開されるこ

とを期待する。

文 献

- 1) Serhan CN, Hamberg M, Samuelsson B : Lipoxins : novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 81 : 5335-5339, 1984
- 2) Serhan CN, Chiang N, Dalli J, et al. : Lipid mediators in the resolution of inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7 : a016311, 2014
- 3) Spite M, Norling LV, Summers L, et al. : Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. *Nature* 461 : 1287-1291, 2009
- 4) Chen F, Fan XH, Wu YP, et al. : Resolvin D1 improves survival in experimental sepsis through reducing bacterial load and preventing excessive activation of inflammatory response. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33 : 457-464, 2014
- 5) Chiang N, Fredman G, Bäckhed F, et al. : Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements. *Nature* 484 : 524-528, 2012
- 6) Chiang N, de la Rosa X, Libreros S, et al. : Novel Resolvin D2 Receptor Axis in Infectious Inflammation. *J Immunol* 198 : 842-851, 2017
- 7) Dalli J, Colas RA, Quintana C, et al. : Human Sepsis Eicosanoid and Proresolving Lipid Mediator Temporal Profiles : Correlations With Survival and Clinical Outcomes. *Crit Care Med* 45 : 58-68, 2017
- 8) Aoki J, Taira A, Takanezawa Y, et al. : Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. *J Biol Chem* 277 : 48737-48744, 2002
- 9) Sevastou I, Kaffe E, Mouratis MA, et al. : Lysoglycerophospholipids in chronic inflammatory disorders : the PLA₂/LPC and ATX/LPA axes. *Biochim Biophys Acta* 1831 : 42-60, 2013
- 10) Yan JJ, Jung JS, Lee JE, et al. : Therapeutic effects of lysophosphatidylcholine in experimental sepsis. *Nat Med* 10 : 161-167, 2004
- 11) Chen G, Li J, Qiang X, et al. : Suppression of HMGB1 release by stearyl lysophosphatidylcholine : an additional mechanism for its therapeutic effects in experimental sepsis. *J Lipid Res* 46 : 623-627, 2005
- 12) Cho WH, Park T, Park YY, et al. : Clinical significance of enzymatic lysophosphatidylcholine (LPC) assay data in patients with sepsis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31 : 1805-1810, 2012
- 13) Park DW, Kwak DS, Park YY, et al. : Impact of serial measurements of lysophosphatidylcholine on 28-day mortality prediction in patients admitted to the intensive care unit with severe sepsis or septic shock. *J Crit Care* 29 : 882, e5-11, 2014
- 14) Drobnik W, Liebisch G, Audebert FX, et al. : Plasma ceramide and lysophosphatidylcholine inversely correlate with mortality in sepsis patients. *J Lipid Res* 44 : 754-761, 2003
- 15) Matsuda A, Matsumoto S, Seya T, et al. : Does postoperative complication have a negative impact on long-term outcomes following hepatic resection for colorectal liver metastasis? : a meta-analysis. *Ann Surg Oncol* 20 : 2485-2492, 2013
- 16) Matsuda A, Yamada M, Matsumoto S, et al. : Lysophosphatidylcholine as a predictor of postoperative complications after colorectal cancer surgery. *Surg Today*, 2018 (doi : 10.1007/s00595-018-1675-2)
- 17) Walley KR, Thain KR, Russell JA, et al. : PCSK9 is a critical regulator of the innate immune response and septic shock outcome. *Sci Transl Med* 6 : 258ra143, 2014

第3章

一般演題

Bacteroides fragilis の莢膜多糖画分中の TLR2 活性化物質

脇 純平¹⁾, 今大路浩之²⁾, 大菌 まみ¹⁾, 橋口 周平¹⁾, 桑原 知巳²⁾, 橋本 雅仁¹⁾

¹⁾鹿児島大学大学院理工学研究科, ²⁾香川大学大学院医学研究科

TLR2 activating substance in the capsular polysaccharide fraction of *Bacteroides fragilis*

Junpei Waki¹⁾, Haruyuki Nakayama-Imahiji²⁾, Mami Ozono¹⁾, Shuhei Hashiguchi¹⁾, Tomomi Kuwahara²⁾,
Masahito Hashimoto¹⁾

¹⁾Department of Chemistry, Biotechnology, and Chemical Engineering, Kagoshima University

²⁾Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kagawa University

Abstract

Bacteroides fragilis is a member of normal intestinal flora and is known as an opportunistic infectious bacterium causing intraperitoneal abscess or septicemia. It has been shown that the bacterium activates the intestinal innate immune system via Toll-like receptor 2 (TLR2), and the relation with intestinal disease has been drawing attention.

The cell surface of this bacterium is composed of capsular polysaccharide (CPS), lipopolysaccharide (LPS) and lipoprotein (LP). Capsular polysaccharide A (PSA), a type of CPS, is a zwitterionic polysaccharide and is known to induce regulatory T cells in the intestinal tract and inhibit enteritis. In recent years, it has been reported that PSA activates TLR2 which is an innate immune receptor. However, the structure of PSA is largely different from the general recognition structure of TLR2, and the possibility of contamination could be considered. In this study, we separated the PSA fraction from *B. fragilis* and examined the substances involved in TLR2 activation.

B. fragilis cells were subjected to hot water-phenol extraction and followed by hydrophobic chromatography separation to obtain a PSA fraction having the ability to activate TLR2. The fraction was further subjected to SDS-PAGE separation based on their molecular weight. TLR2-stimulating activity was scarcely observed in the high molecular mass area where PSA was present, and high activities were observed in the low molecular mass area. The active substances were found to be proteins because they were digested with proteolytic enzymes. These results indicate that contaminating proteins are substances responsible for TLR2 activation in the PSA fraction derived from *B. fragilis*.

Endotoxin and Innate Immunity 21 : 18~22, 2018

Key words : *Bacteroides fragilis*, Toll-like receptor, capsular polysaccharide, lipopolysaccharide, lipoprotein

はじめに

Bacteroides fragilis は、腸内に常在する偏性嫌気性グラム陰性菌であり、腹腔内膿瘍や敗血症などを引き起こす日和見感染菌として知られている。本菌は、Toll-like receptor 2 (TLR2) を介して腸内の自然免疫系を活性化することが示されており、腸内疾患との関係が目ざされている¹⁾。

本菌の細胞表層は、Capsular polysaccharide (CPS), Lipopolysaccharide (LPS), Lipoprotein (LP) などから構成されている。このうち LP は、以前の研究から

TLR2 リガンドであることが示されており、病原因子の一つと考えられている²⁾。一方、LPS と CPS についても TLR2 リガンドと報告されているが、その活性中心の構造から議論の余地がある。そこで本研究では、CPS に焦点を当てて検討することにした。

B. fragilis の CPS は、他菌にはない多くの種類を合成するという特徴を有している。そのうち 2 種類の polysaccharide A (PSA) と polysaccharide B (PSB) が構造決定されており (図 1), とくに PSA は両性イオン多糖であり、腸管において制御性 T 細胞を誘導し、腸炎を抑制することが報告されている³⁾。また、TLR2 の活性

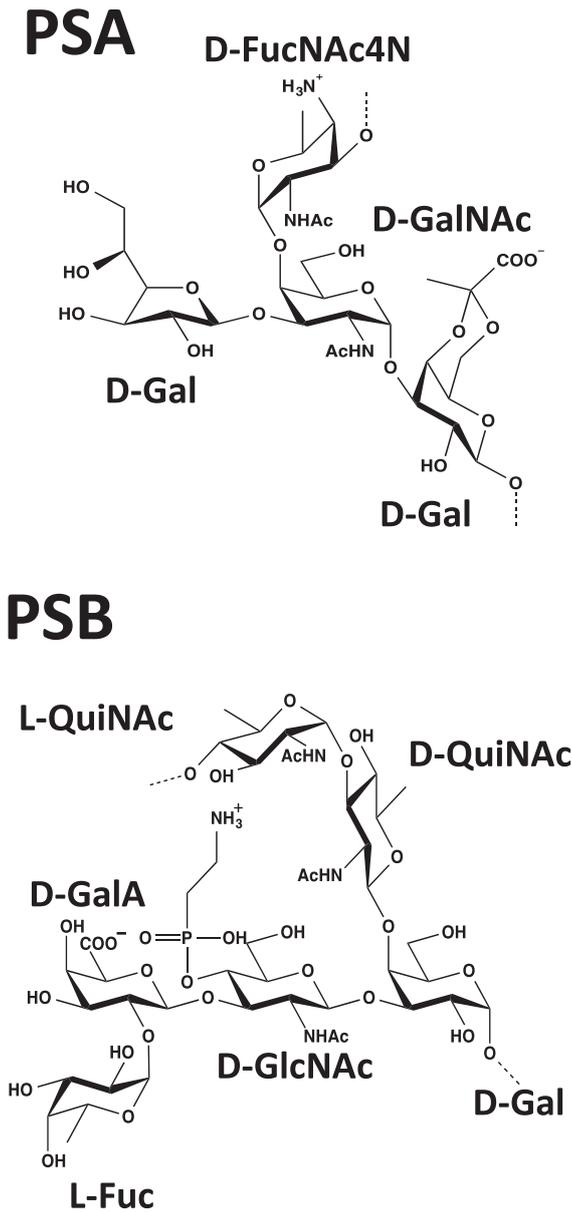


図 1 PSA と PSB の構造

化に参与する可能性も示唆されている^{4,5)}。しかし、PSA の構造は一般的な TLR2 の認識構造と大きく異なっており、夾雑物の混入の可能性が考えられた。そこで本研究では、*B. fragilis* から CPS 画分を分離し、PSA の TLR2 活性化能について検討した。

1. CPS 画分の抽出と分離

B. fragilis は NCTC9343 の野生株 (WT) と PSA 欠損株 (Δ PSA) を用いた。菌体は、リゾチーム、および DNA, RNA 分解酵素で消化後、温水-フェノール法を用いて抽出することで、*B. fragilis* 由来の複合糖質画分を得た。複合糖質画分は、疎水性クロマトグラフィーで分離し、ヘキソースはアントロン硫酸法、リンはモリブデン酸アンモニウム法を用いて、それぞれ比色定量

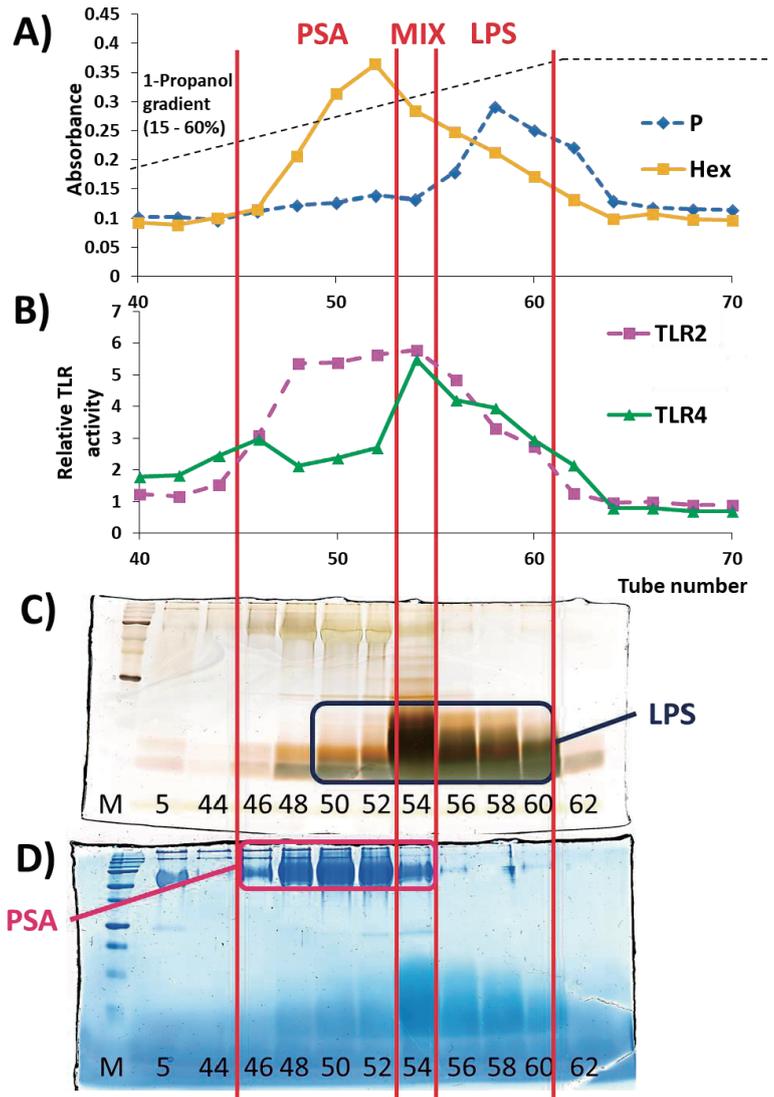


図 2 WT 由来自然免疫活性化物質の分離

をした。

WT では、ヘキソースとリンで異なる溶出曲線を示し、複数の成分が含まれていることが分かった(図 2A)。また、TLR2, TLR4 の強制発現細胞を用いて NF- κ B 活性化能を測定したところ、TLR2 と TLR4 で異なる溶出曲線を示した (図 2B)。そこで、SDS-PAGE で成分を検討した。過ヨウ素酸銀染色、および CBB 染色で可視化した結果、前半に高分子量のバンドが、後半に低分子量のバンドがそれぞれ溶出していることが分かった (図 2C, D)。そこで、これらの結果を基に 3 分画した。このうち一つ目の画分は、アルジトールアセテート法を用いた単糖分析の結果、GalN, Gal が検出され、PSA を主に含んでいることが示唆された。また、3 つ目の画分は TLR4 活性が高いことから LPS を主に含むと考えた。そこで、それぞれを PSA 画分、LPS 画分とした。

また、 Δ PSA においても、同様に分離・画分できた(図 3)。このうち、一つ目の画分は単糖分析の結果、Gal, GluN,

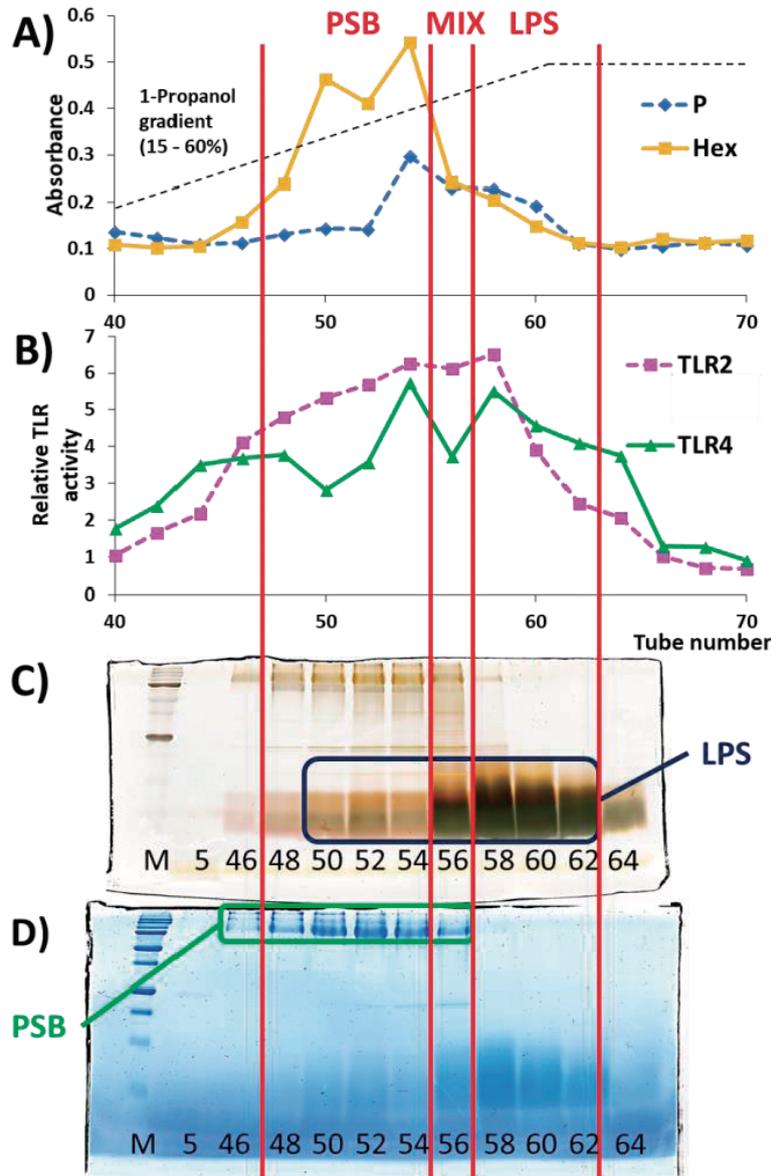


図 3 Δ PSA 由来自然免疫活性化物質の分離

Fuc, QuiN が検出されたため、PSA の代わりに PSB を含んでいることが分かった。そこで、この画分を PSB 画分とした。

2. PSA と PSB の TLR2 活性化能の測定

WT 由来の PSA 画分を SDS-PAGE で分離後、ゲルを均等に切断して破碎し、分子量ごとの TLR2 活性化能を測定した。PSA と思われる高分子側では TLR2 活性化能は低く、15~40 kDa 付近で TLR2 活性化能が高くみられた (図 4A)。

Δ PSA 由来の PSB 画分も同様の操作で TLR2 活性化能を測定した結果、PSB と思われる高分子側では活性が低く、15~40 kDa 付近で活性が高かった (図 4B)。これらの結果は、TLR2 活性化物質は PSA でないことを示している。

3. 酵素消化による TLR2 活性化能測定

15~40 kDa 付近の TLR2 活性化能を有する物質は、LPS または LP の可能性がある。このうち、LPS は TLR4 アゴニストと予想されており、また疎水性クロマトグラフィーで分離しているため、可能性が低い。そこで、LP である可能性が高いと考え、CPS 画分をタンパク質分解酵素である Proteinase K で消化した。分子量別の TLR2 活性化能を測定したところ、WT と Δ PSA とともに活性が低分子側にシフトした (図 5)。

これらの結果は、TLR2 活性化物質がタンパク質性であることを示しており、LP である可能性を強く示唆している。

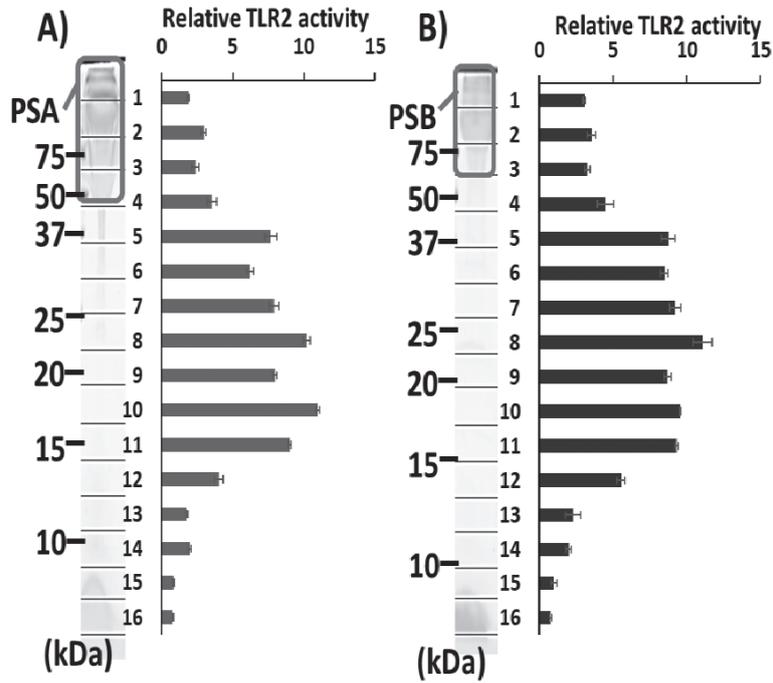


図 4 PSA 画分 (A) と PSB 画分 (B) の TLR2 活性化能

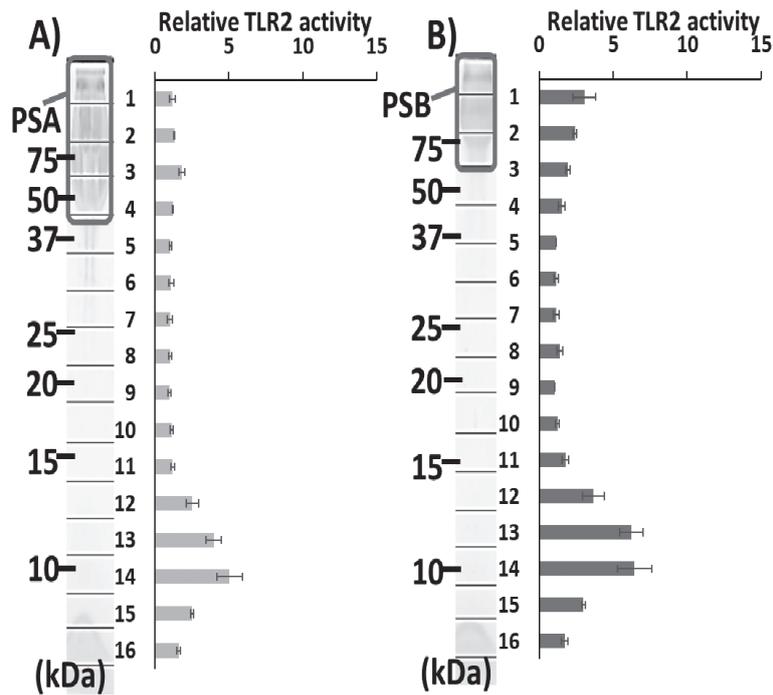


図 5 PSA 画分 (A) と PSB 画分 (B) の酵素消化後の TLR2 活性化能

おわりに

これまで *B. fragilis* の産生する PSA は、TLR2 の活性化に関与する可能性が示唆されてきた。しかし、本研究では *B. fragilis* 由来の PSA が TLR2 活性化に関与しておらず、夾雑しているタンパク質が TLR2 活性化物質であることを明らかにした⁶⁾。

今後は、CPS 画分中に存在するタンパク質の同定と、PSA とタンパク質をそれぞれ分離することで、宿主との免疫調節に関与する真の分子、機構を解明したい。加えて、本タンパク質は、*B. fragilis* の病原因子として機能している可能性もあるため、今後の治療予防への応用を目指していきたい。

文 献

- 1) Mancuso G, Midiri A, Biondo C, et al. : *Bacteroides fragilis*-Derived Lipopolysaccharide Produces Cell Activation and Lethal Toxicity via Toll-Like Receptor 4. *Infect Immun* 73 : 5620-5627, 2005
- 2) Hashimoto M, Eguchi H, Tawaratsumida K, et al. : Identification of a TLR2-stimulating lipoprotein in *Bacteroides fragilis* JCM 11019 (NCTC 9343). *Innate Immun* 19 : 132-139, 2013
- 3) Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL : A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 453 : 620-625, 2008
- 4) Wang Q, McLoughlin RM, Cobb BA, et al. : A bacterial carbohydrate links innate and adaptive responses through Toll-like receptor 2. *J Exp Med* 203 : 2853-2863, 2006
- 5) Round JL, Lee SM, Li J, et al. : The Toll-Like Receptor 2 Pathway Establishes Colonization by a Commensal of the Human Microbiota. *Science* 332 : 974-977, 2011
- 6) Hashimoto M, Waki J, Nakayama-Imahiji H, et al. : TLR2-stimulating contaminants in glycoconjugate fractions prepared from *Bacteroides fragilis*. *Innate Immun* 23 : 449-458, 2017

キレート剤と界面活性剤によるエンドトキシンの活性低下 (Low Endotoxin Recovery の機序)

土谷 正和

Charles River, Microbial Solutions

Decrease of endotoxin activity in solutions containing a chelating agent and a detergent (Mechanism of Low Endotoxin Recovery)

Masakazu Tsuchiya

Charles River, Microbial Solutions

Abstract

Low Endotoxin Recovery (LER) is a phenomenon of endotoxin activity decrease in a matrix containing a chelating agent and a detergent, and is a controversial topic in the biopharmaceutical field. The mechanism of LER is not fully elucidated. When endotoxin in LER solutions was diluted with water, the activity was decreased. The activity was maintained for a long time at 4°C, and was recovered by magnesium dilution and direct addition to the Limulus amoebocyte lysate (LAL). The size of endotoxin in LER solution was not changed after the activity was decreased. Considering these results, a new LER mechanism was proposed. A chelating agent removes divalent cations from the surface of endotoxin aggregates, and endotoxin molecules on the surface of the aggregates are replaced with detergent molecules. The reduction of the surface area of endotoxin aggregates causes decrease of the endotoxin activity to the LAL.

Endotoxin and Innate Immunity 21 : 23~25, 2018

Key words : Low Endotoxin Recovery, リムルス試薬, エンドトキシン, キレート剤, 界面活性剤

はじめに

現在、医薬品業界で問題となっている 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)}。LER は米国医薬品食品局 (FDA) も注目しており³⁾、業界内では議論も活発に行われているが、その機序については十分に明らかにされていない。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おり^{4,5)}、筆者もその影響に関する動力学的な解析を報告している^{6,7)}。今回、LER 溶液の希釈方法によってその活性が異なる現象を発見し、その結果より LER の機序を推定した。

1. 希釈方法の違いによる LER 溶液中のエンドトキシン活性への影響

典型的な LER 溶液として、10 mM クエン酸ナトリウム、0.05% ポリソルベート 20 (PS20) を含む生理食塩水を用い、図 1 に示す 3 種類の方法 (DAM, WDM, MDM) でエンドトキシン活性を測定した。200 EU/mL の米国標準エンドトキシン (RSE) を添加した LER 溶液の活性は、25°C で 30 分後、WDM で 25% であったのに対し、DAM および MDM では 67% の活性を維持していた。4°C 保存では、4 時間後でも、DAM および MDM で 99% および 109% の活性を示したのに対し、WDM では 11% の活性となった。4°C 保存では、RSE の活性は DAM および MDM でよく保存され、15 日後でも 145% および 112% の活性を示した。この時、WDM では 0.06% の活性しか示さなかった。

エンドトキシン試験において一般的に使用される水

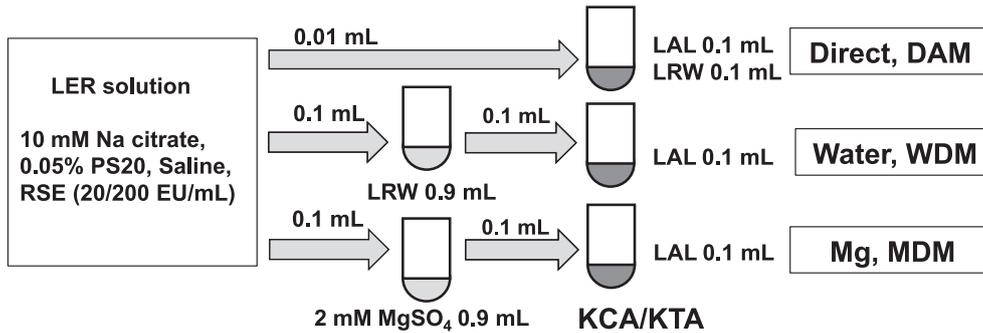


図 1 3種類の希釈方法

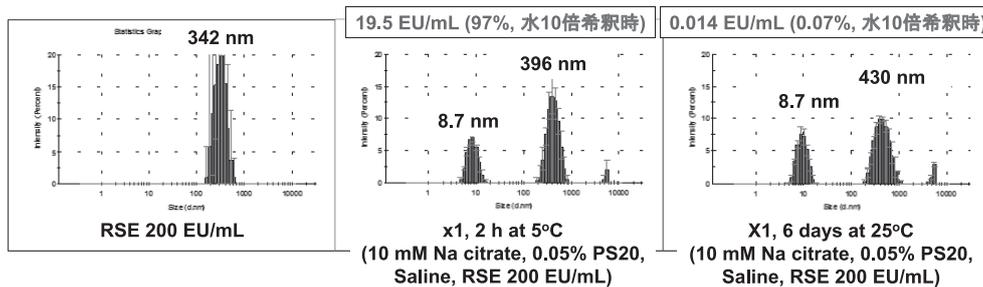


図 2 LER 溶液中の RSE 粒子分布の変化

活性が異なるにもかかわらず、LER 溶液中に RSE と同程度 (300~400 nm) のピークが観察された。

希釈である WDM と試料を直接リムルス試薬 (LAL) に添加する DAM では、その反応液の組成は同じとなることから、反応液が LAL の活性化に及ぼす影響の程度は同じはずである。それにもかかわらず、LER 溶液中の RSE 活性では、DAM と WDM で違いが認められた。この原因として、RSE 活性が水で希釈されることにより低下した場合と、試料を直接 LAL に添加したときに RSE 活性が上昇した場合の 2 つの可能性が考えられる。しかし、室温では、DAM でも RSE 活性が低下すること、MDM でも DAM と同様の挙動が認められることから、水で希釈された時に RSE 活性が低下している可能性が高い。すなわち、LER 溶液中の RSE 活性は、とくに低温では、長期にわたり維持されており、これを水で希釈すると活性が低下すると考えられる。

2. LER におけるエンドトキシン粒子の大きさの変化

LER の機序として、2 価イオンをキレート剤で奪われて不安定になったエンドトキシンミセルが界面活性剤で分散されて活性が低下するという機構が提唱されている⁴⁾。今回、種々の条件で保存した LER 溶液中の RSE について、動的光散乱式分布測定装置 (DLS, Malvern 社製 Zetasizer Nano ZS) を用いてその粒子分布を測定した。その結果、LER 溶液中の RSE の粒子分布は、低温で 2 時間保存した場合および室温で 6 日間

保存した場合とも、約 300~400 nm のピークが認められた。活性は低温保存で 97% 保存されていたのに対し、室温 6 日後では 0.07% となっていた (図 2)。RSE 水溶液のピークが同様のサイズに認められることから、エンドトキシンミセルが分散して活性のない小粒子になるというモデルは、この観察結果を説明しにくいと思われた。

3. LER の機序

データを踏まえて、エンドトキシン凝集体のサイズがあまり変わらないにもかかわらず、その活性が低下する LER の機序を考える必要がある。可能性の一つとして、下記の機序が考えられる (図 3)。

キレート剤がエンドトキシン凝集体表面の 2 価金属イオンを奪う。これだけでは、エンドトキシン凝集体の崩壊や分散は起こらない。界面活性剤はエンドトキシンに対して大過剰であるため、エンドトキシン凝集体の表面にあるエンドトキシン分子と入れ替わる。入れ替わったエンドトキシン分子は界面活性剤と小さいミセルを作る。一方、エンドトキシン凝集体の表面に入った界面活性剤は、エンドトキシンの表面積を減らし、これが活性低下の原因となる。凝集体の大きさは、エンドトキシン分子と界面活性剤分子が入れ替わるだけなので、あまり変わらない。エンドトキシン凝集体内部の 2 価イオンはキレート剤の影響を受けにくく、

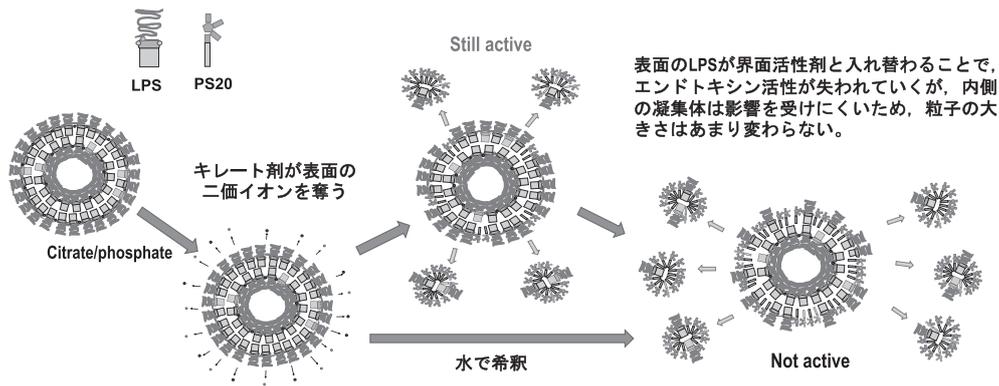


図 3 データから推定される LER の機序

凝集体の崩壊は非常に遅い。

おわりに

LER で活性の低下したエンドトキシンの生体への影響は、現在のところ不明である。このエンドトキシンは、リムルス試薬に対する比活性が低く、発熱性などの急性の生物活性は発現しないと思われる。ただ、LER 条件下のエンドトキシンが分解されるとは考えにくいことから、エンドトキシンの分子自体はそのまま溶液内に残っていると思われる。このような状態のエンドトキシンが生体に及ぼす影響については、これまで研究されたことがなく、測定されたこともない。将来的には、このような状態のエンドトキシンの研究が必要と思われる。その意味で、LER の機序を明らかにすることは有意義と考えられるが、その機序は十分に明らかにはなっていない。今回、これまでの実験結果を基に、実験結果を説明できる機序を提起した。すなわち、キレート剤によって 2 価の金属イオンを失ったエンドトキシン凝集体の表面のエンドトキシン分子が界面活性剤分子と入れ替わり、活性を発現できるエンドトキシンの表面積が減少するというものである。今後、LER 条件下のエンドトキシンの状態について、さらにデータが発表され、活性低下の機序が明らかにされる

ことが期待される。

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 amoebocyte 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 : Kinetic analysis of low endotoxin recovery. PDA J Pharm Sci Technol 71 : 478-487, 2017
- 7) 土谷正和 : Low Endotoxin Recovery (LER) における影響因子. “エンドトキシン・自然免疫研究 20” 隅田泰生, 長岡功編. 医学図書出版, 2017, pp19-21

潰瘍性大腸炎における Endotoxin Activity Assay (EAA)

清水 智治¹⁾, 小幡 徹¹⁾, 園田 寛道¹⁾, 三宅 亨¹⁾, 植木 智之¹⁾,
山口 剛¹⁾, 飯田 洋也¹⁾, 貝田佐知子¹⁾, 竹林 克士¹⁾, 目片 英治¹⁾,
遠藤 善裕²⁾, 谷 徹³⁾, 谷 眞至¹⁾

¹⁾滋賀医科大学外科学講座, ²⁾同 臨床看護学講座, ³⁾同 バイオメディカル・イノベーションセンター

Endotoxin activity assay (EAA) in patients with ulcerative colitis

Tomoharu Shimizu¹⁾, Toru Obata¹⁾, Hiromichi Sonoda¹⁾, Toru Miyake¹⁾, Tomoyuki Ueki¹⁾, Tsuyoshi Yamaguchi¹⁾,
Hiroya Iida¹⁾, Sachiko Kaida¹⁾, Katsushi Takebayashi¹⁾, Eiji Mekata¹⁾, Yoshihiro Endo²⁾, Tohru Tani³⁾, Masaji Tani¹⁾

¹⁾Department of Surgery, Shiga University of Medical Science

²⁾Department of Clinical Nursing, Shiga University of Medical Science

³⁾Biomedical Innovation Center, Shiga University of Medical Science

Abstract

Ulcerative colitis (UC) is an idiopathic and chronic inflammatory disorder of the colonic mucosa. Damage to epithelial barrier function due to ulceration and colitis leads to increased permeability of the intestine. This barrier loss causes increased uptake of luminal antigens such as endotoxin (ET). We evaluated ET levels detected by Endotoxin activity assay (EAA) in patients with UC. We measured EAA 8 cases (refractory UC 6 and cancer/dysplasia UC 2) of UC required surgical treatments. Various clinicopathological parameters were reviewed. The severity of UC was evaluated by Seo's index. Pre-operative EAA was 0.14 in patients with cancer/dysplasia UC and 0.4 in patients with refractory UC. EAA levels increased according to severity of UC, mild 0.095, moderate 0.39, severe 0.42 without statistical significance. There was a significantly positive relationship between EAA and Seo's index (Spearman's rank correlation coefficient 0.8333, $p=0.0102$). EAA appeared to be useful biomarker to evaluate patients' severity with UC. Large scale study need to clarify the significance of EAA in patients with UC.

Endotoxin and Innate Immunity 21 : 26~29, 2018

Key words : EAA, UC, 重症度, バイオマーカー, 好中球

はじめに

潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis : UC) は大腸の粘膜にびらんや潰瘍ができる原因不明の炎症性疾患である。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。われわれは、ESP 法による ET 測定が UC 患者の重症度評価として利用できる可能性について報告した¹⁾。ET の評価法の一つとして Endotoxin Activity Assay (EAA) がある。EAA はヒト好中球の ET に対する活性酸素産生能を測定する方法である²⁾。UC の病勢の進展には、活性化好中球が関与しており、顆粒球吸着療法が治療法として用いられている³⁾。今回、われわれは、

UC 患者の EAA の検討を行った。

1. EAA の測定原理

EAA は、全血を用いて血中の ET 活性を特異的なモノクローナル抗体で測定する試薬である。血中 ET と抗 LPS モノクローナル抗体が結合し免疫複合体が形成され、これに補体が結合しオプソニン化される。好中球はオプソニン化によって貪食されやすくなった免疫複合体を取り込むことが刺激となって活性酸素を産生する。産生された活性酸素は試薬に含まれるルミノールと反応し化学発光として検出される (図 1)。測定結果は、EAA は ET の存在により血中の好中球が産生する活性酸素の量を、好中球の活性酸素産生能の最大値に対する比として計算する。コントロール (Tubel) は

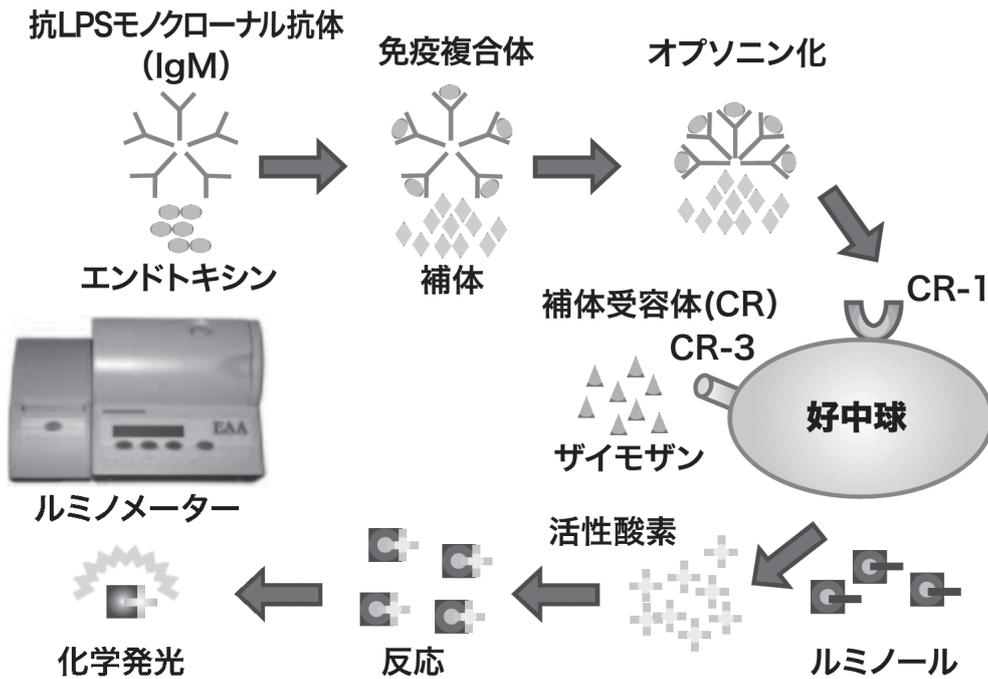


図 1 Endotoxin Activity Assay (EAA) の原理 (メーカー資料より引用)

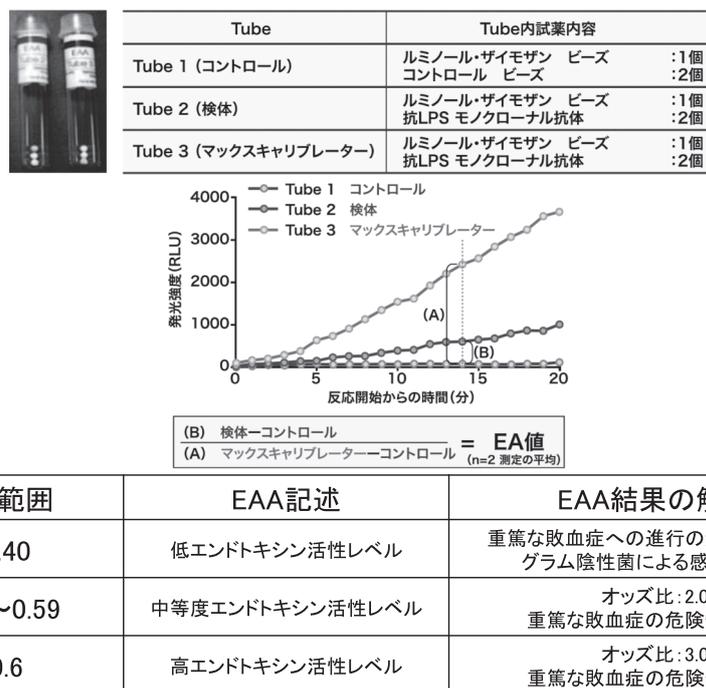


図 2 EAA の測定値の解釈 (メーカー資料より引用)

抗 ET 抗体を含まず、検体に含まれる好中球自体の非特異反応を測定し、これをベースラインとして示す。検体 (Tube2) には、抗 ET 抗体が加えられ検体中の ET 活性を測定する。マックスキャリブレーター (Tube3) には抗 ET 抗体のほかに過剰の ET が添加され、被験者の好中球が示す最大活性酸素産生反応を測定する。EA 値は検体 (Tube2) の発光値をマックス

キャリブレーター (Tube3) から得られる最大化学発光値で除した値として算出される (図 2)。

2. UC 患者での測定

外科治療を必要とした 8 人の UC 患者 (癌/Dysplasia 2 名、難治例 6 例) にて術前の EAA の値と臨床病理学的因子、UC の患者重症度は Seo's index 150>軽症、

表 1 患者背景

	UC	
	癌/dysplasia	難治性
患者数	2	6
性別 (男:女)	2:0	3:3
年齢 (歳)	46.5 (36~57)	40.5 (23~52)
身長 (cm)	169 (164.3~175.2)	160 (154~170)
体重 (kg)	54.5 (51.3~57.7)	45.5 (39~59.9)
BMI (kg/m ²)	18.9 (18.8~19.0)	16.6 (15.8~23.5)
術前ヘモグロビン値 (g/dL)	13.4 (11.9~15.1)	10.4 (8.6~12.3)
術前アルブミン値 (g/dL)	3.65 (3.2~4.1)	3.0 (1.9~3.7)
PNI	41.4 (39.6~43.3)	34.3 (26.0~45.5)
Seo's index	138.6 (122.4~154.7)	223.2 (123.1~259)
赤沈値 (mm/h)	7.1 (4.2~10)	15.6 (9~77.5)
術前プレドニン投与量 (mg/day)	5 (0~10)	25 (10~30)
ステロイド使用	1/2	6/6
免疫調整薬	1/2	2/6
免疫抑制薬	1/2	6/6
分子標的薬	0/2	3/6
手術時間 (min)	515 (467~564)	495 (375~601)
出血量 (mL)	195.5 (134~257)	125 (84~755)
腹腔鏡下手術	2/2	6/6
術後在院日数 (日)	29 (25~33)	19 (12~134)
術後合併症	1/2	2/6

BMI : Body mass index, PNI : prognostic nutritional index

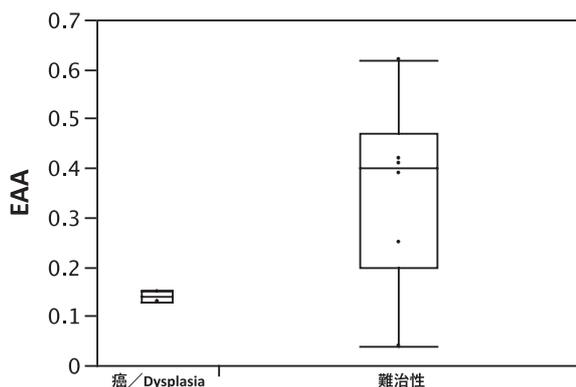


図 3 UC の手術適応と EAA

Wilcoxon 検定 : 癌/dysplasia vs. 難治性 $p = 0.1824$

150 ≤ 中等症, 220 ≤ 重症として評価した。

患者背景因子では, 難治性 UC 患者の方が BMI, 術前ヘモグロビン値, 術前アルブミン値, Prognostic nutritional index (PNI) が低値の傾向にあり, Seo's index

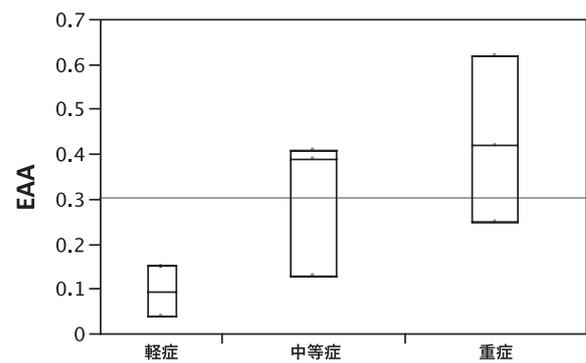


図 4 UC の重症度と EAA

Kruskal-Wallis 検定 : $p = 0.1512$

は高値の傾向にあった。ステロイドや免疫抑制薬, 分子標的薬の使用頻度も高かった (表 1)。

手術前 EAA 値 (中央値) は, 癌/Dysplasia 症例で 0.14, 難治例で 0.4 と難治例で高い傾向にあった (図 3)。また, UC の術前の重症度である Seo's index で分類す

ると術前 EAA 値は軽症 0.095, 中等症 0.39, 重症 0.42 と中等症以上で高値となる傾向にあった (図 4)。術前 EAA 値と Seo's index は有意な正の相関 (Spearman の順位相関係数 0.8333, $p=0.0102$) を認めた。

3. UC と EAA

現在, EAA は, 国内では研究試薬として使用が可能である。これまでに UC 患者での EAA 活性の報告はされていない。EAA 自体は, ET を測定するために開発されたが, 患者の好中球活性を利用して測定することを原理としている。

UC の病態には, 好中球の異常活性化が関与しているとされており, 顆粒球吸着療法や白血球除去療法が UC の治療法の一つとして確立されている。EAA が UC の患者の状態を反映することは容易に想像される。今回の検討では症例数が少なく, 統計学的な有意差を検出することはできなかったが, 難治性 UC では EAA が高値を示し, 患者の重症度に応じて EAA の上昇傾向があった。今後, 症例を積み重ねることにより, UC のさまざまな治療効果の評価指標となる可能性が考えられる。

おわりに

EAA と UC の関連の可能性について報告した。今後, 多数症例での検討を行うことが必要であると考ええる。

謝 辞

本研究の一部は JSPS 科研費 JP6K10536 の助成を受けたものです。

文 献

- 1) 清水智治, 小幡徹, 赤堀浩也, 他: 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. “エンドトキシン・自然免疫研究 20” 隅田泰生, 長岡功編. 医学図書出版, 2017, pp22-24
- 2) 池田寿昭, 小野聡, 須田慎吾, 他: ICU における重症患者の EAA (endotoxin activity assay) 値. “エンドトキシン・自然免疫研究 18” 長岡功, 谷徹, 横地高志編. 医学図書出版, 2015, pp47-54
- 3) 馬場重樹, 西田淳史, 森田幸弘, 他: 血球成分除去療法の臨床寛解予測因子に関する検討. 日アフエレス会誌 35: 98-100, 2016

結核菌感染マクロファージの一酸化窒素産生制御

松村 和典¹⁾, 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⁾順天堂大学医学部微生物学講座

Regulation of nitric oxide production in *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages

Kazunori Matsumura¹⁾, Teruo Kirikae^{1,2)}

¹⁾Department of Infectious Diseases, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine

²⁾Department of Microbiology, Juntendo University School of Medicine

Abstract

Peroxiredoxin 1 (PRDX1) is an antioxidant that detoxifies hydrogen peroxide and peroxynitrite. Compared with wild-type (WT) mice, Prdx1-deficient (*Prdx1*^{-/-}) mice showed increased susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Infection with Mtb led to significantly shorter mean postinfection (p. i.) survival in *Prdx1*^{-/-} (80.8 ± 10.0 days) than in WT mice (143.4 ± 17.5 days). The numbers of viable Mtb in the lungs at 9 weeks p. i. were 10-fold higher in *Prdx1*^{-/-} than in WT lungs. Histological examinations showed auramine-rhodamine-stained Mtb was present predominantly in the alveolar sacs of *Prdx1*^{-/-} lungs, but few lesions were observed in WT lungs. IFN- γ -activated *Prdx1*^{-/-} bone marrow-derived macrophages (BMDMs) did not kill Mtb effectively. Nitric oxide (NO) production levels were lower, and arginase activity and arginase 1 (Arg1) expression levels were higher in IFN- γ -activated *Prdx1*^{-/-} than WT BMDMs after Mtb infection. An arginase inhibitor, N^o-hydroxy-nor-arginine, restored antimicrobial activity and NO production in IFN- γ -activated *Prdx1*^{-/-} BMDMs after Mtb infection. At 9 wk p. i., Arg1 mRNA levels were significantly higher in the lungs of *Prdx1*^{-/-} than WT mice. These results suggest that PRDX1 contributes to host defenses against Mtb. PRDX1 positively regulates NO production by suppressing *Arg1* expression in macrophages infected with Mtb.

Endotoxin and Innate Immunity 21 : 30~34, 2018

Key words : 結核菌, マクロファージ, NO, ペルオキシレドキシシン, アルギナーゼ

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、高アルギニン(L-arginine:L-arg)濃度で培養したマクロファージにおいて、インターロイキン(Interleukin:IL)-4が一酸化窒素(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ことを報告した²⁾。本稿では、結核菌に対する宿主

の自然免疫において重要なマクロファージの活性酸素・窒素産生機構に触れ、活性酸素の代謝制御が変化することで抗結核能に影響が出ることを紹介する。さらに、今回、われわれが見出した、宿主タンパク質PRDX1の結核菌感染マクロファージNO産生への寄与について述べる。

1. 結核菌感染マクロファージによる活性酸素・窒素産生

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、肺胞マクロファージ、好中球、単球、あるいは樹状細胞などの貪食細胞に捕捉される。結核菌を捕捉したマクロファージは、炎症性サイトカインを産生し、かつ、

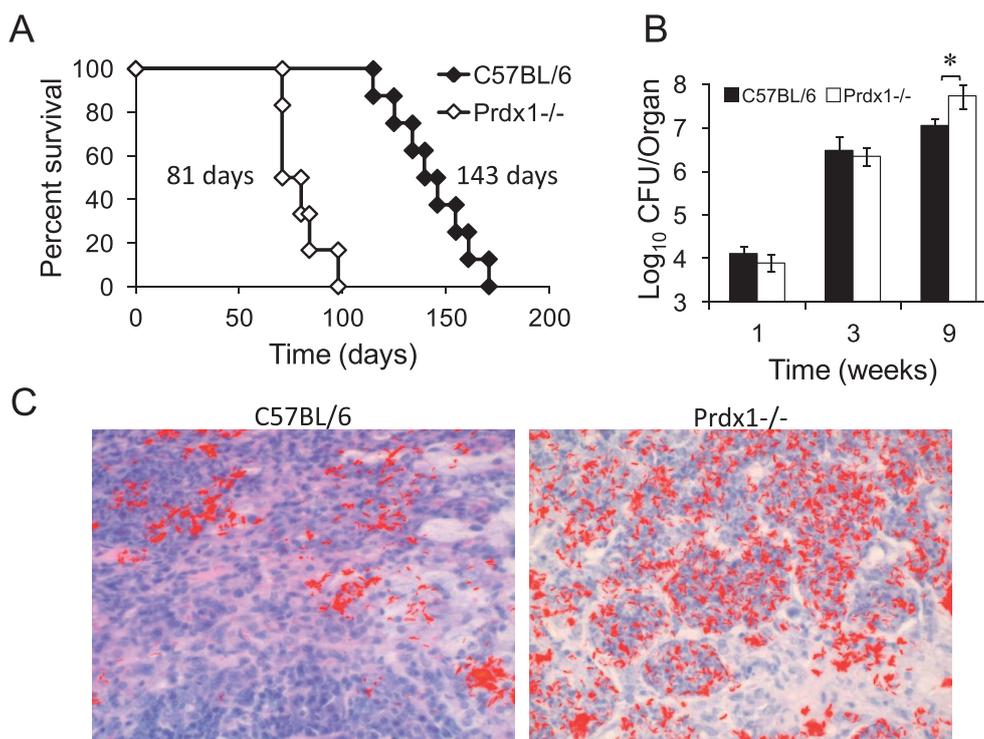


図 1 *Prdx1*^{-/-}マウスの結核感受性

- A : 結核菌感染 *Prdx1*^{-/-}マウスの生死観察 C57BL/6 マウス (◆) および *Prdx1*^{-/-}マウス (◇) 各 10 匹に、結核菌 Erdman 株を 2×10^6 個、尾静脈より感染させ生死観察を実施した。平均生存日数を図中に示した。P<0.05。
- B : 結核菌感染 *Prdx1*^{-/-}マウスの肺中生菌数推移 C57BL/6 マウス (■) および *Prdx1*^{-/-}マウス (□) 各 6 匹に A と同様の条件で結核菌を感染させた。感染 1・3・9 週後に肺を採材し、破碎液を、平板培地に播いた。3~4 週間後、コロニーを計測し、生菌数を推定した。* : P<0.05。
- C : 結核菌感染 *Prdx1*^{-/-}マウスの肺切片染色像 各マウスに A と同様の条件で結核菌を感染させ、感染 9 週後に肺を採材し、ホルマリン固定後切片を 2 枚ずつ作製し、1 枚を H & E 染色し、もう 1 枚をオーラミン・ローダミン染色した。各染色切片を撮影し、画像を合成した。

抗原提示することで、CD4 陽性 T 細胞を 1 型ヘルパー T (Type 1 helper T : Th1) 細胞に分化させる³⁾。Th1 細胞が産生するインターフェロン (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。活性化マクロファージは、NADPH オキシダーゼおよび NO 合成酵素 NO synthase (NOS) 2 により、活性酸素や活性窒素を産生する⁴⁾。活性酸素には、スーパーオキシド、過酸化水素、一重項酸素、ヒドロキシラジカルなどが含まれる。一方、活性窒素には、NO およびその派生物であるペルオキシナイトライトなどが含まれる。活性酸素は、マクロファージなど貪食細胞が産生する主要な殺菌分子として知られているが、NADPH オキシダーゼ構成遺伝子を欠損したマウスは、野生型 Wild-type (WT) マウスと比較して、結核感受性に差を認めない報告がある⁵⁾こと、また、結核菌が、活性酸素を消去する抗酸化酵素を産生している⁶⁾ことから、活性酸素の抗結核への寄与は不明である。一方、NOS2 遺伝子

ノックアウト (*Nos2*^{-/-}) マウスは、WT マウスと比較して、生存日数が著しく減少するなど結核感受性が高く⁷⁾、*Nos2*^{-/-}マクロファージも、WT マクロファージと比較して、結核菌殺菌能低下が報告されており⁸⁾、抗結核への寄与が明らかとなっている。

2. 活性窒素の代謝と結核感受性への影響

NOS2 遺伝子変異だけでなく、活性窒素の代謝変化も、抗結核に影響を与えることが知られている。NOS2 は、アルギニン NO とシトルリンに分解するが、アルギナーゼ Arginase (ARG) も同じアルギニンを基質として、尿素とオルニチンに分解する。アルギナーゼには、主に細胞質に局在する ARG1 とミトコンドリアに局在する ARG2 の二種類がある。そのうち ARG1 は、活性化マクロファージの NO 産生を低下させることが報告されている⁹⁾。また、マクロファージ特異的に ARG1 を欠損したマウスに結核菌を感染させると、WT

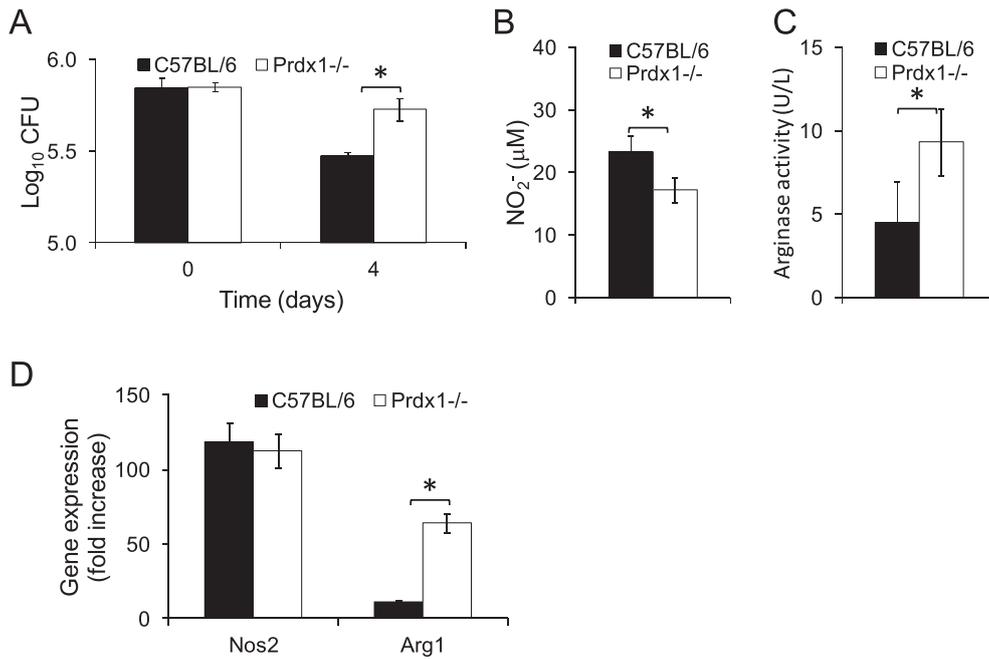


図 2 *Prdx1*^{-/-}マクロファージの一酸化窒素産生能と結核菌殺菌能

- A: *Prdx1*^{-/-}マクロファージ内の結核菌生菌数推移 C57BL/6 (■) および *Prdx1*^{-/-} (□) マウスから骨髓由来マクロファージを調整し, 10 pg/mL IFN- γ で活性化, 結核菌 Erdman 株を細胞 1 個に対して菌が 5 個入るように感染させた。感染 4 日後, 細胞破砕液を平板培地に播いた。3~4 週間後, コロニー数を測定し, 生菌数を推定した。
- B: 結核菌感染 *Prdx1*^{-/-}マクロファージの NO 産生 図 2 (A) の結核菌感染 4 日後の培養上清を回収し, 含まれる NO 濃度を Griess 法で測定した。
- C: 結核菌感染 *Prdx1*^{-/-}マクロファージのアルギナーゼ活性 図 2 (A) の結核菌感染 4 日後の細胞破砕液を用いてアルギナーゼ活性を測定した。
- D: 結核菌感染 *Prdx1*^{-/-}マクロファージの遺伝子発現 図 2 (A) の結核菌感染 4 日後の細胞から全 RNA を回収し, *Nos2* と *Arg1* について, 定量 PCR を実施した。内部コントロールとして GAPDH を用い, 相対的発現量を示した。(A~D) * : $P < 0.05$ 。

マウスと比較して, 活性化マクロファージの NO 産生が増加し, 肺の生菌数は低下した¹⁰⁾。

3. PRDX1 の結核菌感染マクロファージ NO 産生への寄与

ペルオキシレドキシシン (Peroxi-redoxin: PRDX) は, チオレドキシシンを電子供与体として利用し, 過酸化水素の消去を行う抗酸化酵素であり, バクテリアから動物, 植物に至るほとんどの生物で見出されているタンパク質である¹¹⁾。大きさは 25 kDa で, 細胞内では多量体を形成するが, 二量体の時は抗酸化酵素として機能し, 十量体の時は分子シャペロンとして機能すると考えられている¹²⁾。

PRDX1 は, 主に細胞質に局在する PRDX で, ほとんどの組織で発現が認められ, 活性酸素の代謝に影響を与える酵素である¹²⁾。ヘリコバクター・ピロリによる酸化損傷, 鉄ニトリロ三酢酸投与による腎臓障害, プレオ

マイシン投与による肺炎などに対して, PRDX1 の抗酸化機能による防御効果を示唆する結果が報告されている¹²⁾。

抗酸化酵素やシャペロンとしての機能だけではない, 異なる機能も持つことが知られている。すなわち, オゾン照射による肺の急性炎症を増加させること¹²⁾や, 虚血再灌流障害を起こすような脳卒中の場合, ネクローシス細胞から放出された PRDX1 が炎症を惹起することで脳障害を悪化させること¹²⁾, さらに, 組換え PRDX1 が Toll-like receptor (TLR) 4 と結合し, 炎症を正に制御することも報告されている¹²⁾。

われわれは, PRDX1 が, ARG1 発現を抑制することで NO 産生を正に制御し, 抗結核に貢献していることを見出した¹³⁾。われわれは当初, PRDX1 が抗酸化酵素であることから, 細胞から PRDX1 を失うことによって, 結核菌感染による活性酸素産生が増大し, 抗結核能が増強することを想定していた。ところが, PRDX1

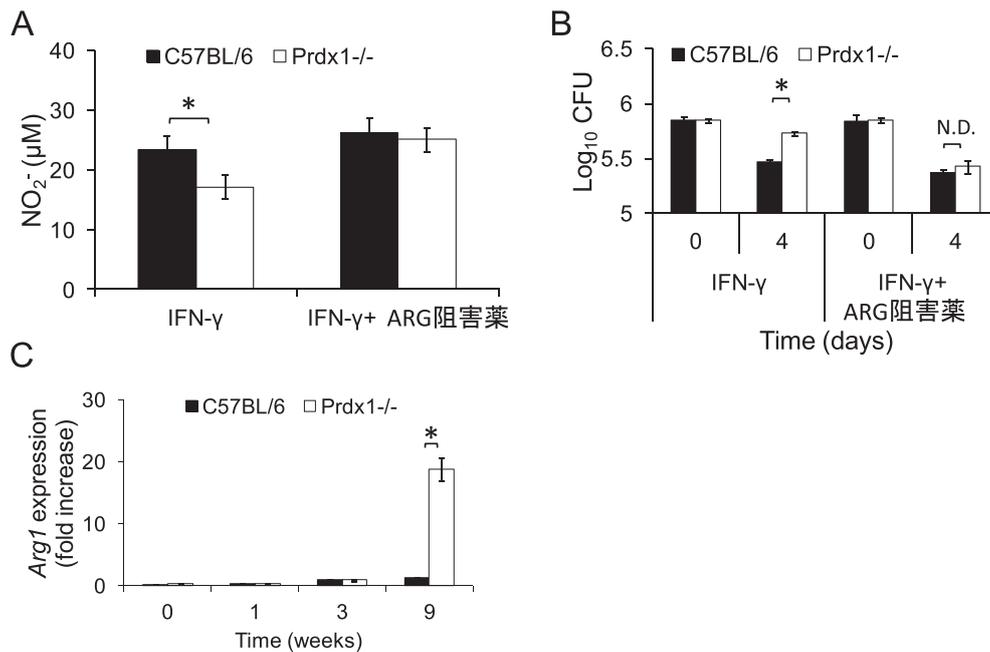


図 3 結核菌感染マクロファージおよびマウス内での PRDX1 による Arg1 発現抑制

- A: 結核菌感染 *Prdx1*^{-/-}マクロファージの NO 産生に対するアルギナーゼ (ARG) 阻害薬の影響 C57BL/6 (■) および *Prdx1*^{-/-} (□) マウスの骨髄由来マクロファージに, 図 2 (A) と同様の条件で結核菌を感染させ, 同時に ARG 阻害薬を添加し, 感染 4 日後, 図 2 (B) と同様の方法で培養上清中に含まれる NO 濃度を測定した。
- B: 結核菌感染 *Prdx1*^{-/-}マクロファージの結核菌殺菌能に対する ARG 阻害薬の影響 各マクロファージに, 図 2 (A) と同様の条件で結核菌を感染させ, 同時に ARG 阻害薬を添加し, 図 2 (A) と同様の方法で生菌数を測定した。
- C: 結核菌感染 *Prdx1*^{-/-}マウスの肺中遺伝子発現の推移 各マウスに図 1 (A) と同様の条件で, 結核菌に感染させ, 感染 0・1・3・9 週後に肺を採材し, 全 RNA を抽出, Arg1 の発現を定量 PCR で測定した。内部コントロールとして GAPDH を用い, 相対的発現量を示した。(A~C) *: P<0.05。

ノックアウト (*Prdx1*^{-/-}) マウスに結核菌を感染させたところ, WT マウスと比較して, 結核抵抗性が低下した (図 1)。そこで *Prdx1*^{-/-}マウスから骨髄由来マクロファージ Bone marrow-derived macrophage (BMDM) を調整し, IFN- γ で活性化し, 結核菌を感染させたところ, WT マウスから調整した BMDM と比較して, ARG1 の発現が誘導され, NO 産生が低下し, 結核菌の生菌数が増加した (図 2)。また, ARG 阻害薬により, IFN- γ 活性化 *Prdx1*^{-/-} BMDM の NO 産生が回復し, 結核菌の生菌数も低下した (図 3)。さらに, 結核菌感染 *Prdx1*^{-/-}マウスの肺で ARG1 発現が誘導されていたことを見出した (図 3)。以上の結果から, PRDX1 は, 結核菌が感染した IFN- γ 活性化マクロファージにおいて, ARG1 の発現を抑制することで, NO 産生を正に制御し, 結核殺菌能を向上させていることが示唆された。

おわりに

抗酸化酵素 PRDX1 が NO 産生を抑制する ARG1 の発現を阻害することで, 抗結核に寄与していることが

明らかとなった。PRDX1 はどのようにして ARG1 の発現を抑制しているのだろうか。活性酸素消去剤を IFN- γ 活性化 *Prdx1*^{-/-} BMDM の培養液に添加して, 結核菌を感染させても, NO 産生量や抗結核能には, とくに変化がみられず, PRDX1 の抗酸化酵素機能との関連は見出せなかった¹³⁾。したがって, 抗酸化酵素以外の PRDX1 の機能が関与しているものと思われる。また, IL-4 やレチノイン酸は, ARG1 を発現誘導させるが, IFN- γ 活性化 *Prdx1*^{-/-} BMDM に結核菌を感染させても, IL-4 やレチノイン酸によって発現誘導される ARG1 以外の遺伝子発現はみられなかった¹³⁾。そのため, IL-4 やレチノイン酸が直接かかわる可能性は低いものと思われる。さらに, *Prdx1*^{-/-} BMDM をそれぞれ IFN- γ で活性化する, あるいは, 結核菌を感染させるだけでは ARG1 は誘導されない¹³⁾。よって, BMDM を IFN- γ で活性化し, かつ, 結核菌を感染させたときのみ, 未知の因子により ARG1 発現が誘導されることになり, PRDX1 は未知の機能により ARG1 発現誘導を阻害すると考えられる。これら未知の ARG1 発現誘導

因子, および, PRDX1 の未知の機能を同定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) 松村和典, 切替富美子, 切替照雄 : 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. “エンドトキシン・自然免疫研究 20” 日本エンドトキシン・自然免疫研究会編. 2017, pp46-49
- 3) Flynn JL, Chan J : Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 19 : 93-129, 2001
- 4) Ehrt S, Schnappinger D : Mycobacterial survival strategies in the phagosome : defence against host stresses. *Cell Microbiol* 11 : 1170-1178, 2009
- 5) Jung YJ, LaCourse R, Ryan L, et al. : Virulent but not avirulent *Mycobacterium tuberculosis* can evade the growth inhibitory action of a T helper 1-dependent, nitric oxide synthase 2-independent defense in mice. *J Exp Med* 196 : 991-998, 2002
- 6) Voskuil MI, Bartek IL, Visconti K, et al. : The response of *Mycobacterium tuberculosis* to reactive oxygen and nitrogen species. *Front Microbiol* 2 : 105, 2011
- 7) MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, et al. : Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 : 5243-5248, 1997
- 8) Ehrt S, Schnappinger D, Bekiranov S, et al. : Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon- γ and *Mycobacterium tuberculosis* : signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. *J Exp Med* 194 : 1123-1140, 2001
- 9) Rutschman R, Lang R, Hesse M, et al. : Cutting Edge : Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. *J Immunol* 166 : 2173-2177, 2001
- 10) 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
- 11) Wood ZA, Schröder E, Robin Harris J, et al. : Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 28 : 32-40, 2003
- 12) Ishii T, Warabi E, Yanagawa T : Novel roles of peroxiredoxins in inflammation, cancer and innate immunity. *J Clin Biochem Nutr* 50 : 91-105, 2012
- 13) Matsumura K, Iwai H, Kato-Miyazawa M, et al. : Peroxiredoxin 1 contributes to host defenses against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 197 : 3233-3244, 2016

Lactobacillus gasseri に共通する種特異的なリポテイコ酸の化学構造

白石 宗¹⁾, 久富 亮佑¹⁾, 佐藤耶舞羽²⁾, 森田 直樹³⁾, 吹谷 智²⁾,
佐藤 豊孝¹⁾, 横田 篤²⁾, 横田 伸一¹⁾

¹⁾札幌医科大学医学部微生物学講座

²⁾北海道大学大学院農学研究院応用生命科学部門微生物生理学研究室

³⁾産業技術総合研究所生物プロセス研究部門分子生物工学研究グループ

A unique species-specific structure of lipoteichoic acid common to *Lactobacillus gasseri*

Tsukasa Shiraishi¹⁾, Ryosuke Kutomi¹⁾, Yamaha Sato²⁾, Naoki Morita³⁾, Satoru Fukiya²⁾, Toyotaka Sato¹⁾,
Atsushi Yokota²⁾, Shin-ichi Yokota¹⁾

¹⁾Department of Microbiology, Sapporo Medical University School of Medicine

²⁾Laboratory of Microbial Physiology, Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University

³⁾Bioproduction Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

Abstract

The lipoteichoic acid (LTA) is a specific polymer on Gram-positive bacterial cell surfaces, and is not found in Gram-negative bacterial cells. LTA is an amphipathic anionic polymer typically comprised of poly-glycerophosphate (GroP) linked to glycolipid of cell membrane. In general, hydroxyl groups of GroP residues in polymer region are often substituted by D-alanine and/or carbohydrates. Glycolipid anchor typically comprises diglycosylglycerolipid containing two acyl groups. On the other hand, structural variation on species- or strain-level has been observed in degree of polymerization, substitution ratio of the GroP repeating unit, and numbers of carbohydrate and acyl groups in glycolipid moiety. However, structural information has not sufficiently accumulated to discuss unity and diversity of LTA structures.

We determined chemical structure of LTA derived from seven strains of *Lactobacillus gasseri*, an intestinal lactic acid bacterium. All strains shared common structure. Polymer chain comprised poly-GroP with partial substitution with D-alanine. Glycolipid anchor contained novel tetrasaccharide structure and two or three acyl groups. The three acyl group-containing glycolipid anchor is characteristic LTA structure in lactic acid bacteria, including *Lactobacillus* genus, *Lactococcus* genus and *Leuconostoc* genus. The tetrasaccharide structure has not been reported in other Gram-positive bacterial LTA. In conclusion, the tetrasaccharide-containing glycolipid anchor is unique and species-specific LTA structure in *L. gasseri*.

Endotoxin and Innate Immunity 21 : 35~37, 2018

Key words : *Lactobacillus gasseri*, リポテイコ酸, 乳酸菌, 糖脂質, 構造多様性

はじめに

リポテイコ酸 (lipoteichoic acid : LTA) は, グラム陽性細菌の細胞膜に局在する糖とリン酸から構成されるポリマーである。典型的な LTA は, グリセロールとリン酸 (GroP) を繰り返し単位とするポリマー部位と, 2糖と 2 残基のアシル基で構成される糖脂質 (アンカー糖脂質) 部位から成り (図 1A), アンカー糖脂質部位を

介して細胞膜にアンカーしている。一方でその化学構造は, 菌種および菌株レベルで多様性のあることが示唆されているが, 個々の菌種内における構造情報はいまだ不足しており, LTA を理解するためにはより多くの構造情報を蓄積する必要がある。LTA には, さまざまな生理学的な役割が報告されているほか, 宿主との相互作用においても細胞接着や免疫応答に関与すると考えられており, 構造の違いによって機能が異なる可

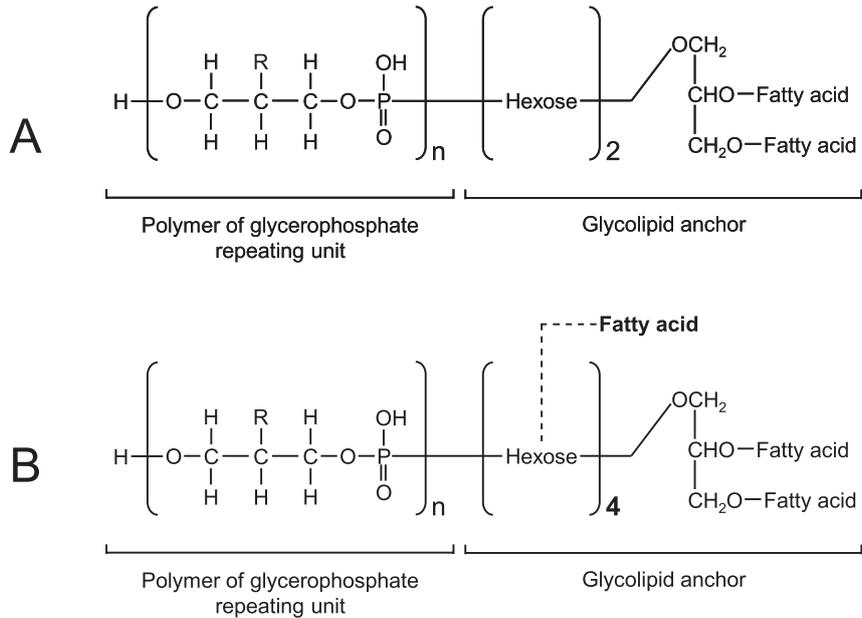


図 1 LTA の構造

A : 一般的な LTA, B : *L. gasseri* JCM 1131^T の LTA, R : 水酸基, D-アラニン残基, ヘキソース残基など (*L. gasseri* では水酸基と D-アラニン残基のみ)

能性が言及されている¹⁾。これまで 11 属 53 種 91 株において LTA の完全構造が報告されているが²⁾、このうち約 80% は病原性を有する細菌であり、乳酸菌のような有用細菌の LTA の構造情報は多くない。そこでわれわれは、ヒト腸内の優勢乳酸菌である *Lactobacillus gasseri* の JCM 1131^T の LTA 構造を解析して、本菌株に他の細菌にはみられていない新奇の構造として 4 糖から成るアンカー糖脂質構造を報告した^{3,4)} (図 1B)。本稿では、この 4 糖のアンカー糖脂質の *L. gasseri* における分布について概説する。

1. *L. gasseri* における LTA のポリマー部位の構造

7 株の *L. gasseri* を用いて LTA の構造解析を行った。7 株は、それぞれ分離源が異なる 3 株 [JCM 1131^T (ヒト腸管), JCM 1130 (ヒト糞便), JCM 5814 (ニワトリ糞便)] とヒト腔由来臨床分離株 4 株 (VLG1, VLG2, VLG3, VLG4) を使用した。ポリマー部位は¹H-NMR 分析によって解析した。すべての菌株において GroP を繰り返し単位としたポリマーを主鎖として、グリセロール残基の 2 位の水酸基に部分的に D-アラニンが置換した構造が認められた。ポリマー鎖長は菌株間で大きな違いはみられなかったが、D-アラニン置換率は菌株ごとに異なり、最大で 55%, 最小で 17% だった (表 1)。LTA における D-アラニン残基の存在は、宿主への免疫刺激能に重要な化学構造であるとの報告もあり⁵⁾、置換率の違いによって同一菌種内でも個々の菌株の免疫刺

表 1 *L. gasseri* 種 7 株の GroP ポリマー部位の D-アラニン置換率とポリマー鎖長

Strains	Ratio of D-alanine substitution (%)	Average number of repeating unit
JCM 1131 ^T	55	22 to 33
JCM 1130	55	11 to 17
JCM 5814	53	10 to 15
VLG1	17	10 to 15
VLG2	45	14 to 21
VLG3	40	15 to 22
VLG4	24	11 to 16

激能の強さが異なる可能性も考えられる。一方でこの置換率は、生育条件により変化することや⁶⁾、グリセロールと D-アラニンのエステル結合が不安定で分解を受けやすいことから、LTA の調製による影響の可能性も否定できない。置換率の差については今後より慎重な検討が必要である。また、置換基として、他の菌種では D-アラニンの他にグルコースや N-アセチルグルコサミンなどが知られているが *L. gasseri* では D-アラニンによる置換のみが確認された。

2. *L. gasseri* における LTA のアンカー糖脂質部位の構造

アンカー糖脂質部位の構造は、98% (v/v) 酢酸処理 (100°C, 3h) によって GroP ポリマーを選択的に分解して、その有機溶媒可溶性画分をアンカー糖脂質標品と

して MALDI-TOF MS によって解析した。さらに、アンカー糖脂質標品を 20% (w/v) アンモニア処理 (室温, 12h) によって脱アシル化して, その水溶性画分をアンカー糖標品として MALDI-TOF MS によって解析した。その結果, 4 糖構造と, 3 残基と 2 残基のアシル基置換がすべての菌株に共通して確認された。4 糖構造は他菌種の LTA には報告がなく, *L. gasseri* に特異的で, この種に共通した構造と考えられる。3 残基のアシル基置換は, *Lactobacillus* 属, *Lactococcus* 属, *Leuconostoc* 属といった典型的な乳酸菌にのみ認められる共通の構造である^{2,4)}。属レベルで異なる細菌間で共通する構造が典型的な乳酸菌に存在することは興味深い。

おわりに

本稿では, *L. gasseri* に共通する種特異的なリポテイコ酸の化学構造を紹介した。LTA は, 菌種および菌株レベルで構造多様性があると考えられているが, これまで報告された構造情報を整理すると, 同一菌種内で複数株の LTA の構造が明らかになっている例は少ない。今回われわれは, 7 株の *L. gasseri* を用いて種特異的な構造を明らかにしたが, 同様の規模で LTA の構造が比較された菌種は, *Bacillus subtilis* (10 株) と *Listeria monocytogenes* (6 株) のみである。*B. subtilis* においては, 1 残基のアシル基置換を有するアンカー糖脂質部位をもつ LTA が共通して認められている^{2,7)}。また, *L. monocytogenes* では, 6 株中 5 株でアンカー糖脂質部位に 2 残基のアシル基をもつホスファチジン酸の置換が認められ, 1 分子の LTA に計 4 残基のアシル基を有する構造が報告されている^{2,7)}。これらは非常に特徴的で種特異的な構造と考えられる。一方で他菌種では, 同一種内の複数菌株での構造情報はまだまだ十分ではない。解析された菌株数は少ないものの, 特徴的な LTA の構造が *Clostridioides (Clostridium) difficile*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus sanguinis* などでも報告されている^{2,7)}。

L. gasseri は, 腸内や口腔内, 膣などから分離され, ヒトとかかわりが深い乳酸菌である。本菌種において

Lactobacillus 属を含む他の乳酸菌とは異なる菌種特異的な構造が発見されたことから, LTA を介した細菌と宿主との相互作用において, その化学構造を知ることが重要であると考えられる。LTA の構造活性相関を明らかにするためには, 構造情報のさらなる蓄積と, 宿主との相互作用の詳細な評価の両輪が必要であり, 今後この分野の進展に期待したい。

文献

- 1) Ryu YH, Baik JE, Yang JS, et al. : Differential immunostimulatory effects of Gram-positive bacteria due to their lipoteichoic acids. *Int Immunopharmacol* 9 : 127-133, 2009
- 2) Shiraishi T, Yokota S, Fukiya S, et al. : Structural diversity and biological significance of lipoteichoic acid in Gram-positive bacteria : focusing on beneficial probiotic lactic acid bacteria. *Biosci Microbiota Food Health* 35 : 147-161, 2016
- 3) Shiraishi T, Yokota S, Morita N, et al. : Characterization of a *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T lipoteichoic acid with a novel glycolipid anchor structure. *Appl Environ Microbiol* 79 : 3315-3318, 2013
- 4) 白石宗, 横田伸一, 吹谷智, 他 : 腸内乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T のリポテイコ酸に認められた新奇構造. “エンドトキシン・自然免疫研究 18” エンドトキシン・自然免疫研究会編, 医学図書出版, 2015, pp79-81
- 5) Grangette C, Nutten S, Palumbo E, et al. : Enhanced antiinflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 : 10321-10326, 2005
- 6) Li M, Lai Y, Villaruz AE, et al. : Gram-positive three-component antimicrobial peptide-sensing system. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 : 9469-9474, 2007
- 7) 白石宗, 横田伸一, 吹谷智, 他 : リポテイコ酸の構造多様性から見える乳酸菌の特徴. *JATAFF ジャーナル* 5 : 26-32, 2017

Rho グアニンヌクレオチド交換因子による Toll 様受容体シグナルの制御

早水 良¹⁾, 杉山 剛志^{1,2)}

¹⁾岐阜薬科大学感染制御学研究室, ²⁾岐阜医療科学大学臨床検査学科

Regulation of Toll-like receptor signal transduction by Rho guanine nucleotide exchange factors

Ryo Hayami¹⁾, Tsuyoshi Sugiyama^{1,2)}

¹⁾Laboratory of Microbiology and Immunology, Gifu Pharmaceutical University

²⁾Department of Medical Technology, Gifu University of Medical Science

Abstract

Toll-like receptors (TLRs) trigger innate immune responses by recognizing microbe-associated molecular patterns such as lipopolysaccharides and nucleic acids. However, overactivation or dysregulation of TLR system may lead to exaggerated inflammation and host tissue injury. TLR signaling can be controlled by other intracellular signaling, including Rho GTPases and RhoGEFs signaling. Knowledge of the molecular mechanisms underlying cross-talk of TLR and other signaling pathways can, therefore, be used for tailored therapeutic approaches to regulate local and temporal host immunity. In this review, we will focus on RhoGEFs which affect TLR signal transduction, and further we will discuss about the mechanisms of the cross-talk between TLRs and RhoGEFs. Future interests in this research field include establishing mechanistic understanding of TLRs and RhoGEFs cross-talk. This may furthermore open up novel therapeutic options for inflammatory or autoimmune diseases.

Endotoxin and Innate Immunity 21 : 38~41, 2018

Key words : TLR, RhoGEF, TRIF, MyD88, Rho GTPase

はじめに

Toll 様受容体 (TLR) はリポ多糖体 (LPS) や核酸、細菌の鞭毛構成タンパク質などといった微生物関連分子パターンを認識することで免疫応答を誘導する。近年、TLR シグナルを標的とした疾患治療の研究が世界各国で進んでおり¹⁾、また TLR シグナルにはさまざまな細胞内シグナル経路とのクロストークがあることが明らかとなってきている²⁾。

TLR シグナルは、細胞内アダプター分子の利用によって MyD88 依存的経路と TRIF 依存的経路に分けられる。TLR3 以外の TLR には細胞内ドメインに MyD88 が会合し、この経路によって主に転写因子 NF- κ B が活性化される。一方、TLR3 および TLR4 には TRIF が会合し、この経路によって NF- κ B とともに IRF-3 が活性化される。NF- κ B の活性化は炎症性サイト

カインやケモカインの発現を誘導し、IRF-3 はインターフェロン関連遺伝子群の発現を誘導する。

Rho ファミリー低分子量 G タンパク質 (Rho GTPase) はアクチン骨格制御を介して細胞の運動性、極性、増殖を制御する分子であり、ヒトでは RhoA, Rac1, Cdc42 など 20 種が報告されている³⁾。Rho GTPase は不活性型である GDP 結合型と活性型である GTP 結合型の状態をとり、Rho グアニンヌクレオチド交換因子 (Rho guanine nucleotide exchange factors : RhoGEFs) が活性型への変換を、Rho GTPase 活性化タンパク質 (Rho GTPase activating proteins : RhoGAPs) が不活性型への反応を活性化することにより 2 つの状態が制御されている (図 1)。

RhoGEF は構造的な特徴から Dbl ファミリーと Dock ファミリーの 2 つのファミリーに分類され、ヒトには前者が 70 種、後者が 11 種あるとされている³⁾。これら

早水 良 岐阜薬科大学感染制御学研究室 〒 501-1196 岐阜県岐阜市大学西 1-25-4

TEL : 058-230-8100 FAX : 058-230-8140 E-mail : 136027@gifu-pu.ac.jp

杉山 剛志 岐阜医療科学大学臨床検査学科 〒 501-3892 岐阜県関市市平賀字長峰 795-1

TEL : 0575-22-9401 FAX : 0575-23-0884

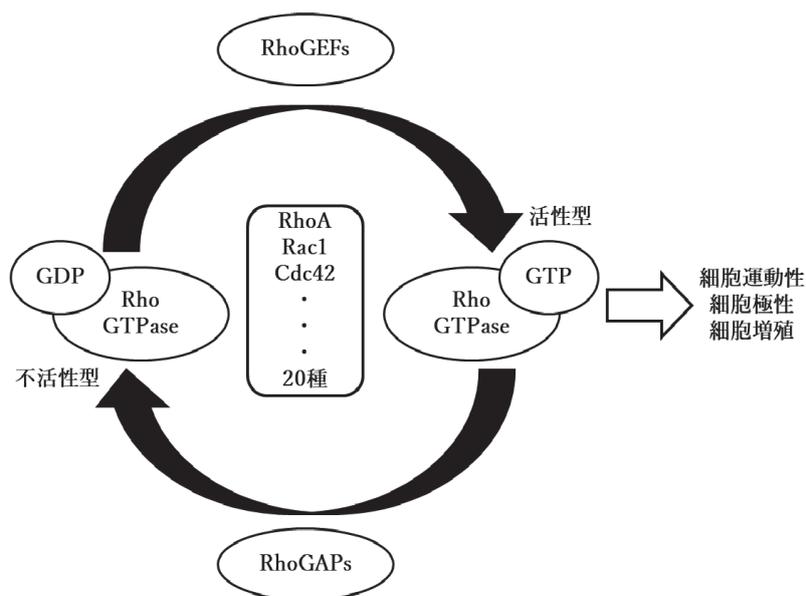


図 1 Rho GTPase の活性制御

の RhoGEF は臓器や細胞種で発現量が異なり、また G タンパク質共役型受容体 (GPCR) や Integrin³⁾, VEGF 受容体⁴⁾, Eph 受容体⁵⁾ などからのシグナルによって活性化状態が変化することが報告されている。したがって、ある特定の RhoGEF の活性を制御することは、その RhoGEF の下流のシグナルを臓器や細胞種特異的に制御することにつながると考えられる。

RhoGEF の TLR シグナルへの影響についてはいくつかの報告があるが、80 種を超える RhoGEF のうちわずか数種に過ぎず、その影響の作用メカニズムの解明もいまだ十分とはいえない。

1. TLR シグナルに影響を与える RhoGEF

Vav1 は血球系細胞に発現するがん原遺伝子として発見され、その後 Rac1 などの Rho GTPase を活性化することが明らかになった RhoGEF である³⁾。Vav1 は TLR9 リガンドである CpG DNA 刺激によってリン酸化され、このリン酸化を抑制すると CpG DNA 刺激による細胞応答が抑制されると報告されている⁶⁾。

AKAP13 (ARHGEF13) は A キナーゼアンカータンパク質ファミリーに属する足場タンパク質であり、RhoA を活性化する RhoGEF である³⁾。AKAP13 は免疫細胞および腸管上皮細胞に発現し、TLR2 シグナルに影響すると報告されている⁷⁾。また、AKAP13 のノックダウンによって TLR2 刺激による NF- κ B 活性化が抑制され、さらに AKAP13 の GEF 活性ドメインへの変異導入によって NF- κ B 活性化が低下することから、下流の Rho GTPase の活性化の関与が示唆される。

GEF-H1 (ARHGEF2, KIAA0651) は RhoA や Rac1 を活性化する RhoGEF で、微小管に結合して活性が調

節される⁸⁾。GEF-H1 は LPS 刺激によって発現が増加し、RhoA の活性化を介して LPS 刺激による NF- κ B の活性化および IL-8 の産生を増強する⁸⁾。

以上のように、TLR リガンド刺激による細胞応答に対するいくつかの RhoGEF の影響が報告されているが、RhoGEF が活性化する Rho GTPase はさまざまであり、RhoGEF が直接的に TLR シグナル分子と相互作用するのか、Rho GTPase やさらにその下流の分子が関与するのかなど、そのメカニズムについては不明な点が多い。そこでわれわれは、TLR の細胞内アダプター分子である MyD88 または TRIF と RhoGEF を発現プラスミドによって細胞内で過剰発現させ、TLR シグナルに影響する RhoGEF のスクリーニングを行った。その結果、いくつかの RhoGEF が TLR シグナルを増強することを見出しているため、以下に紹介する。

2. KIAA0915 による TRIF 依存的シグナル増強作用

KIAA0915 は神経細胞や血管平滑筋細胞に発現がみられ、RhoA を活性化する RhoGEF である。われわれは KIAA0915 が TRIF 依存的 IFN- β プロモーターの活性化を増強することを見出し、そのメカニズムの一端を明らかにしている (図 2)。

KIAA0915 を TRIF とともに発現させると KIAA0915 の発現量依存的に IFN- β プロモーターの活性化が増強される。また、TRIF を細胞内アダプター分子に持つ TLR3 および TLR4 を細胞に発現させ、それぞれのリガンドで刺激した際に誘導される IFN- β プロモーターの活性化も同様に、KIAA0915 の発現量依存的に増強されることから、細胞内での KIAA0915 の発現量また

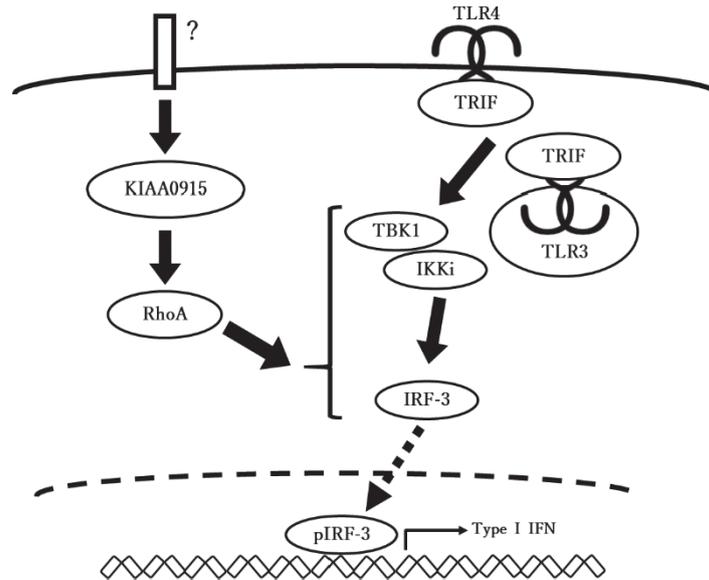


図 2 KIAA0915 による TRIF 依存的シグナル増強機構

は活性化状態によって TLR3 および TLR4 刺激による TRIF 依存的経路の活性化が影響を受けることが示唆される。

TRIF 依存的経路では下流のキナーゼ、TBK1 および IKKi の活性化を介して転写因子 IRF-3 がリン酸化することによって IFN- β プロモーターの転写が開始されるが、TBK1 または IKKi を細胞に発現させた際に誘導される IFN- β プロモーターの活性化も、TRIF を発現させた場合と同様に KIAA0915 の発現量依存的に活性化が増強される。しかし、活性化 IRF-3 でリン酸化されるセリンおよびスレオニンの 5 つの残基をアスパラギン酸 (D) に置換した活性型変異体、5D-IRF-3 の発現によって誘導される IFN- β プロモーターの活性化は KIAA0915 の発現に影響されない。さらに、TLR3 または TLR4 刺激による IRF-3 のリン酸化は、KIAA0915 を発現させると発現量依存的に増強される。以上の結果から、KIAA0915 は TLR3 または TLR4 シグナルによる IRF-3 のリン酸化を増強することによって IFN- β プロモーターの活性化を増強することが示唆される。また、この活性化増強作用は KIAA0915 による RhoA の活性化を介することが示唆されている。

3. PLEKHG ファミリー RhoGEF による TLR シグナル増強作用

PLEKHG (pleckstrin homology and RhoGEF domain containing G) ファミリー RhoGEF のうち、われわれは FLJ00018 (ARHGEF42, PLEKHG2) および KIAA0599 (ARHGEF43, PLEKHG3) の TLR シグナル増強作用を見出している。

FLJ00018 は MyD88 依存的な NF- κ B の活性化を増強するが、TRIF 依存的な IFN- β プロモーターの活性

化は増強しない。この MyD88 依存的シグナル増強作用には FLJ00018 の Rho GTPase を活性化するドメインが必要で、Rac1 の関与が示唆されている。

KIAA0599 は TRIF 依存的な IFN- β プロモーターの活性化を増強する。この増強作用は KIAA0915 とは異なり、5D-IRF-3 を細胞に発現させた際の活性化も増強する。また、この増強作用には KIAA0599 による Rho GTPase 活性化は関与しないことが示唆されている。

これらの PLEKHG ファミリー RhoGEF による TLR シグナル増強作用は他の RhoGEF とは異なるものと考えられ、今後詳細な検討を行う予定である。

4. KIAA0362 による TLR シグナル増強作用

KIAA0362 (ARHGEF14, Dbs) は TRIF 依存的な IFN- β プロモーターの活性化を増強し、TRIF による IRF-3 依存的なプロモーターの活性化だけではなく、TRIF 依存的な NF- κ B 依存的プロモーターの活性化も増強する。また、KIAA0599 と同様に、5D-IRF-3 を細胞に発現させた際の活性化も増強する。さらに、IRF-3 依存的なプロモーターの活性化増強には下流の Rho GTPase である Rac1 の活性化が必要であるが、NF- κ B 依存的プロモーターの活性化増強には Rac1 の活性化は関与しないという結果が得られており、KIAA0362 による TLR シグナル制御はさらに複雑な機構によることが示唆される。

おわりに

TLR シグナルは両刃の剣であり、病原体の侵入に対して自然免疫系を活性化して感染防御に働くが、過剰に活性化すれば炎症性疾患や自己免疫疾患を引き起こ

す。逆に、これらの疾患治療のために TLR シグナル全般を抑制すれば易感染性を惹起する。臓器や細胞種特異的に存在する他のシグナル経路とのクロストークは、TLR シグナルを適切に制御できる可能性を秘める。今後、さらに多様な RhoGEF について検討し、TLR シグナルとのクロストークおよびそのメカニズムを明らかにしていきたい。

文 献

- 1) Hennessy EJ, Parker AE, O'Neill LA : Targeting Toll-like receptors : emerging therapeutics? *Nat Rev Drug Discov* 9 : 293-307, 2010
- 2) Brown J, Wang H, Hajishengallis GN, et al. : TLR-signaling networks : an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *J Dent Res* 90 : 417-427, 2011
- 3) Cook DR, Rossman KL, Der CJ : Rho guanine nucleotide exchange factors : regulators of Rho GTPase activity in development and disease. *Oncogene* 33 : 4021-4035, 2014
- 4) Kusahara S, Fukushima Y, Fukuhara S, et al. : Arhgef15 promotes retinal angiogenesis by mediating VEGF-induced Cdc42 activation and potentiating RhoJ inactivation in endothelial cells. *PLoS One* 7 : e45858, 2012
- 5) Margolis SS, Salogiannis J, Lipton DM, et al. : EphB-Mediated Degradation of the RhoA GEF Ephexin5 Relieves a Developmental Brake on Excitatory Synapse Formation. *Cell* 143 : 442-455, 2010
- 6) Stovall SH, Yi AK, Meals EA, et al. : Role of vav1- and src-related Tyrosine Kinases in Macrophage Activation by CpG DNA. *J Biol Chem* 279 : 13809-13816, 2004
- 7) Shibolet O, Giallourakis C, Rosenberg I, et al. : AKAP13, a RhoA GTPase-specific Guanine Exchange Factor, Is a Novel Regulator of TLR2 Signaling. *J Biol Chem* 282 : 35308-35317, 2007
- 8) Guo F, Tang J, Zhou Z, et al. : GEF-H1-RhoA signaling pathway mediates LPS-induced NF- κ B transactivation and IL-8 synthesis in endothelial cells. *Mol Immunol* 50 : 98-107, 2012

ピリミドインドール系 TLR4 リガンドの構造活性相関研究

大山 真也¹⁾, 若尾 雅広¹⁾, Alast Ahmadiiveli²⁾, 杜若 祐平¹⁾, 山口 徹¹⁾,
 新地 浩之¹⁾, Michael Chan²⁾, Nikunj M. Shukla²⁾, 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

The study on structure-activity relationship of pyrimidoindoles TLR4 ligands

Shin-ya Oyama¹⁾, Masahiro Wakao¹⁾, Alast Ahmadiiveli²⁾, Yuhei Kakitsubata¹⁾, Toru Yamaguchi¹⁾, Hiroyuki Shinchi¹⁾,
 Michael Chan²⁾, Nikunj M. Shukla²⁾, Tomoko Hayashi²⁾, Howard B. Cottam²⁾, Dennis A. Carson²⁾, Yasuo Suda¹⁾

¹⁾Department of Chemistry, Kagoshima University

²⁾Moore's Cancer Center, University of California

Abstract

Toll-like receptors (TLRs) are a family of type I membrane proteins, classified to pattern recognition receptors (PRR). TLRs are expressed in cell surface or endosomal compartment of immune cells. TLRs are activated by recognition of pathogen specific components called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Signal of TLRs induces the innate immune response and adaptive immune response. Therefore, TLRs play important roles in host defense system against viral or bacterial infection. In human, 10 kinds of TLR (TLR1 to TLR10) have been found. Each TLR recognizes different PAMP; lipoprotein for TLR1/6 and TLR2/6; nucleic acid components for TLR3, -7, -8, and -9; lipopolysaccharide (LPS) for TLR4. TLRs are also activated by the specific endogenous danger signal (called damage-associated molecular pattern, DAMPs) produced by damaged tissue, which is thought to cause various chronic inflammatory diseases. On the other hand, low molecular weight TLR ligands have been found from natural and synthetic compounds, those can be candidates for development of chemical probes and drugs. In this review, focusing on TLR4, we describe recent progress in exploring TLR4 ligands with agonistic or antagonistic activity and our recent study on the structure-activity relationship of pyrimido [5,4-b] indole derivatives.

Endotoxin and Innate Immunity 21 : 42~46, 2018

Key words : TLR4, アゴニスト, ピリミドインドール, 構造活性相関, 免疫

はじめに

Toll 様受容体 (Toll-like receptor : TLR) はパターン認識レセプター (pattern recognition receptor : PRR) に分類される膜貫通型タンパク質で、樹状細胞などの免疫担当細胞の細胞表面またはエンドソームに局在する。TLRs はウイルスや細菌、菌類などの病原体に特徴的な分子パターン (pathogen-associated molecular patterns : PAMPs) を認識することで、自然免疫を活性化し獲得免疫を誘導することから、病原菌やウイルスなどの感染に対する宿主の防御機構において重要な役割を担う^{1,2)}。TLR は、ヒトにおいては、これまでに TLR1 から TLR10 の 10 種類が、マウスにおいては、

TLR1 から TLR9, TLR11 から TLR13 の 12 種類が発見されており、それぞれが異なる PAMPs を特異的に認識する。すなわち、TLR1/2, TLR2/6, はリポ蛋白質類, TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 は核酸成分, TLR4 はリポ多糖 (lipopolysaccharide : LPS) が天然のリガンドである。近年、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) が TLR の内在性リガンドとして、また特定の構造を有する天然化合物や合成化合物が TLR の低分子リガンドとして働くことが報告されている。DAMPs は、リュウマチなどのさまざまな炎症性自己免疫疾患に関与することが示唆されており³⁾、その分子機構の解明が注目されている。一方、特定の構造を有する天然

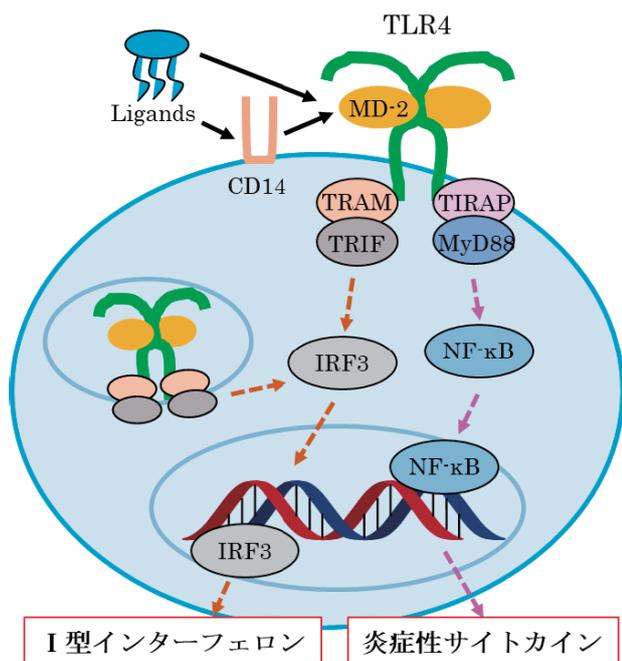


図 1 TLR4 のシグナル伝達

化合物や合成化合物などの低分子リガンドは、免疫制御分子として活用できることから、がんや感染症、自己免疫疾患などに対する薬剤開発において注目されている。本稿では、TLR4 リガンドに焦点をあて、最近の研究について紹介する。

1. TLR4 とシグナル伝達

TLR4 は、主として単球、マクロファージ、樹状細胞

などの免疫系細胞の細胞表層やエンドソームに発現しており、アクセサリタンパク質のミエロイド分化因子-2 (myeloid differentiation protein-2: MD-2) と複合体を形成している。LPS 中のリポド A 部分が MD-2 に認識されると、TLR4 のヘテロ (LPS/MD-2/TLR4) 二量体形成を誘導し、TLR4 のシグナルを活性化する⁴⁾。TLR4 のシグナルは、アダプタータンパク質である TIRAP-MyD88 を介して、または TRAM-TRIF を介して伝達され、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誘導する⁵⁾ (図 1)。TLR4 の活性化は、炎症反応を引き起こす一方で、獲得免疫を誘導できることから、がんや感染症などの免疫療法においては、TLR4 の機能を制御できるリガンド開発が重要となっている。

2. TLR4 リガンド

2-1. 天然由来の TLR4 リガンド

LPS は最初に発見された TLR4 リガンドである。LPS の活性中心がリポド A であることが明らかにされて以来⁶⁾、種々のグラム陰性菌からアゴニスト活性、アンタゴニスト活性を有するリポド A 成分が見出されている。アゴニスト活性とアンタゴニスト活性は、リポド A 成分のリン酸基などの極性官能基の有無やアシル鎖の数、鎖長、動物種によって異なる⁷⁾。糖脂質以外の TLR4 リガンドとしては、中国、インドの伝統的医学で用いられる漢方類、薬草類から TLR4 リガンドが見つかっている⁸⁾。図 2 に例を示す。ウコンに含まれるポリフェノール化合物である①クルクミンは、MyD88 経路

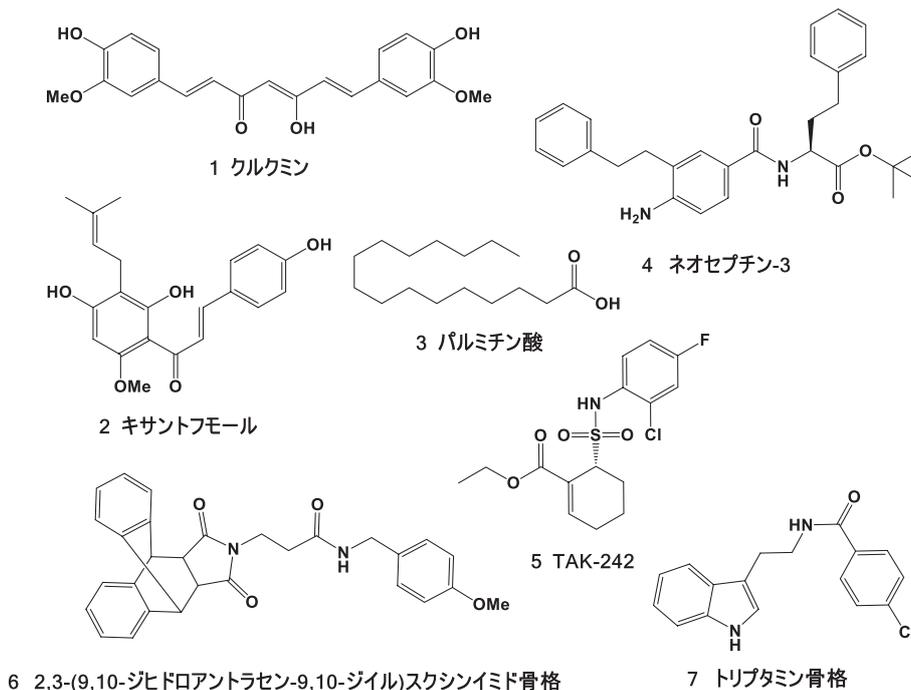


図 2 TLR4 リガンドの構造

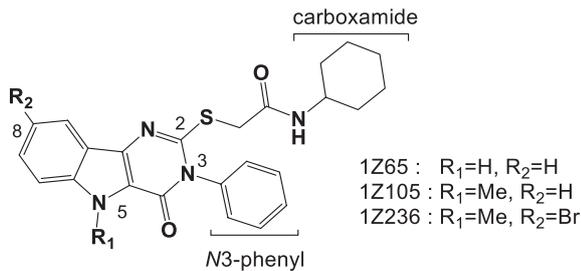


図 3 ピリミドインドール系 TLR4 リガンド

を阻害することで強力な抗炎症作用を示す⁹⁾。また、ビール原料のホップに含有されるフラボノイド化合物である②キサントフモールは抗炎症作用を示すことで知られている。最近の研究では、抗炎症作用が TLR4 のアンタゴニスト作用に起因することがわかった¹⁰⁾。一方、Liang らは、動植物由来の油脂に豊富に含まれるパルミチンの代謝物である③パルミチン酸が MD-2 に結合して TLR4 を慢性的に活性化するので、肥満心筋症に関与することを報告している¹¹⁾。このように、近年数多くの TLR4 リガンドが発見されており、化合物の作用機序や疾患との関連性が明らかになりつつある。作用特異的な TLR4 リガンドの探索は、がんや感染症に対する免疫療法において重要であり、見出されているリガンドは創薬研究のリード化合物として、また TLR4 の作用を調べるための分子プローブとして期待される。

2-2. 化学合成された TLR4 リガンド

糖脂質系 TLR4 リガンドでは、リピド A の糖構造や脂質構造の改変によって、さまざまな誘導体や類縁体が合成されている。近年、化合物ライブラリーを用いた TLR4 リガンド探索も検討されており、Beutler らは、リピド A と全く構造の異なる低分子 TLR4 アゴニストとして④ネオセプチンを見出している¹²⁾。武田薬品工業株式会社により見出された TLR4 リガンドである⑤ TAK-242 は、糖脂質類とは作用機構が異なり、MD-2 には結合せず TLR4 の細胞内ドメインに作用する¹³⁾。また最近の計算化学の進展に伴い、*in silico* でのスクリーニングも検討されている。Prymula らは TLR4/MD-2 の X 線結晶構造解析のタンパク質構造を用いたバーチャルスクリーニングにより、2,3-(9,10-ジヒドロアントラセン-9,10-ジイル) スクシンイミド骨格をもつ化合物⁶¹⁴⁾およびトリプタミン骨格をもつ化合物⁷¹⁵⁾を見出している。これらの化合物はアゴニスト活性を有しており、化合物 6 は、ヒト TLR4 HEK Blue 細胞を用いた分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP) アッセイで、子宮頸がんワクチンアジュバントとして臨床利用されている MPLA と類似したアゴニスト活性を示す。これらの合成された TLR4 リガンドにおいて

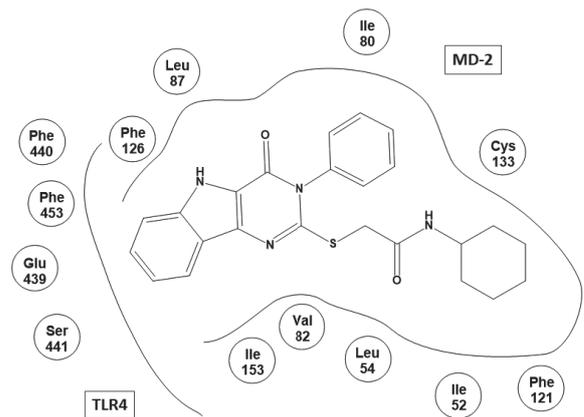


図 4 分子モデリング

も、天然由来のリガンドと同様、がんや感染症などの治療薬の開発や、作用機構を理解するためのプローブとしての活用が期待される。

3. ピリミドインドール系 TLR4 リガンド

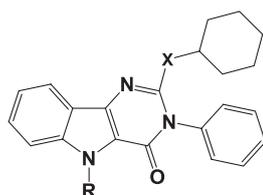
われわれのグループでは、ハイスループットスクリーニングにより、低分子 TLR4 リガンドとしてピリミドインドール骨格を有する 1Z65, 1Z105 を見出している¹⁶⁾ (図 3)。これらのリガンドは、CD-14 欠損細胞でも活性を保っていたので、CD-14 非依存的に TLR4 に作用すると考えられている。これまでの構造活性相関研究において、1Z105 骨格のカルボキシアミド部位と N3 のフェニル基の疎水性が活性に重要であること、また、N5 のメチル基が細胞毒性の低減に寄与すると考えられている。また、分子モデリングではこれらのリガンドが MD-2 の疎水性ポケットに結合し、TLR4 と相互作用することが示唆された (図 4)。

TLR4 の活性化には MD-2 との結合が重要であることから、われわれは、アゴニスト活性の向上を目指し、1Z105 のさらなる構造活性相関解析を行った¹⁷⁾。本項では、① 2-チオアセトアミド部位の改変、② インドール部位の 8 位置換基の改変、の 2 つの構造改変について、誘導体の合成および生物活性評価について述べる。

3-1. 2-チオアセトアミドの構造改変と生物活性評価

合成した 2-チオアセトアミド誘導体の構造を図 5 に示す。まず、TLR4 活性化に対するチオアルキル鎖の影響を調べるため、硫黄原子を酸素または窒素原子に置換した誘導体 8, 9, 10 を合成した。またチオアセトアミド基の鎖長の影響を調べるため、アルキル鎖長の異なる誘導体 11, 12 を合成した。

合成した 2-チオアセトアミド誘導体をマウスまたはヒト TLR4 HEK Blue 細胞を用いた分泌型 SEAP アッセイならびにマウス骨髄由来樹状細胞 (mBMDC) を用



- 8: R=Me, X=-OCH₂CONH-
 9: R=Me, X=-NHCH₂CONH-
 10: R=Me, X=-NH(CH₂)₂CONH-
 11: R=H, X=-S(CH₂)₂CONH-
 12: R=H, X=-S(CH₂)₃CONH-

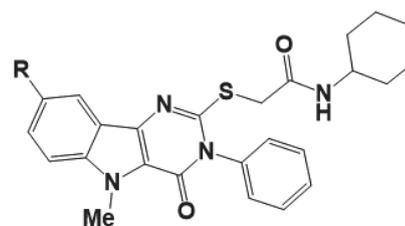
図 5 2-チオアセトアミド誘導体の構造

いたインターロイキン-6 (IL-6) の産生誘導能により評価した。その結果、合成したすべての誘導体において TLR4 の活性化が消失することがわかった。以上から、1Z105 の硫黄原子ならびにアルキル鎖は MD-2 との疎水性ポケットへの結合に重要であることを示した。

3-2. 8 位誘導体の合成と生物活性評価

合成した 8 位置換体を図 6 に示す。これらの置換体は、8 位のプロモ基をもつ 1Z236 を用いて、ボロン酸類との Suzuki-Miyaura カップリング、または末端アルキン類との Sonogashira カップリングにより調製した。エチニル基をもつアルキン体 17 については、アジド化合物との Huisgen 反応を行ってトリアゾール置換体 27, 28 へ誘導した。

合成した 8 位置換体の TLR4 アゴニスト活性は、先と同様に TLR4 HEK Blue 細胞または mBMDC を用いた IL-6 産生誘導能を指標に評価した。その結果、8 位に疎水性官能基を有する置換体 13, 16, 19, 25 において優位にアゴニスト活性が向上することがわかった (表 1, 2)。しかし、より高い疎水性官能基を有する置換体 4 については活性が消失した。一方、8 位に親水性官能基を有する置換体においては、アゴニスト活性が減少 (置換体 23, 26) または消失 (置換体 21, 24) することがわかった。これらの結果より、8 位への適度な大きさをもつ疎水基の導入は、TLR4/MD-2 複合体の



- 13: R=Ph
 14: R=Bi-Ph
 15: R=α-naphthyl
 16: R=β-naphthyl
 17: R=C≡CH
 18: R=C≡CTMS
 19: R=C≡C-cyclopropyl
 20: R=C≡C-cyclohexyl
 21: R=C≡C-CH₂OH
 22: R=C≡C-Ph
 23: R=C≡C-2-methoxyphenyl
 24: R=C≡C-4-methoxyphenyl
 25: R=C≡C-3-thiophenyl
 26: R=C≡C-2-pyridyl
 27: R=1-phenyl-1-H-1,2,3-triazole
 28: R=1-cyclohexyl-1-H-1,2,3-triazole

図 6 合成した 8 位置換体

形成に優位に働くと考えられる。一方、より高い疎水性官能基、水素結合能を有する官能基の導入は、TLR4/MD-2 複合体の形成に不利に働くと考えられる。

以上のように、われわれは、ピリミドインドール系 TLR4 リガンドのさらなる構造最適化を行い、これまでに見出されていた 1Z105 よりも高いアゴニスト活性を有するピリミドインドール系リガンド 13, 16, 19, 25 を見出した。アゴニスト活性をもつ化合物については今後アジュバント活性の評価が課題である。一方、TLR4 の活性制御においては、アンタゴニストの開発も重要なことから、アンタゴニストの探索も課題である。

おわりに

TLR4 は炎症反応、自然免疫、獲得免疫の誘導に働く。近年、慢性的な TLR4 の活性化は、リュウマチなどの自己免疫疾患や、神経系疼痛に関与すると考えられている。TLR4 の生体機能は十分に解明されていないため、TLR4 リガンドは、その機能解析ツールとして活用できる。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 リガンドの創製は、

表 1 アリール置換体の生物活性評価

Compd	R	mTLR4 ^a		hTLR4 ^a		mBMDC	
		EC ₅₀ ^b (μM)		IL-6 ^c		MTT ^d	
1Z105	H	3.17±0.65	8.26±1.76	100	106		
1Z236	Br	2.45±0.99	3.58±0.92	120	63		
13	Ph	0.82±0.03	0.43±0.08	123	93		
14	Bi-Ph	>10	>10	0	23		
15	α-naphthyl	2.58±0.07	2.12±0.59	80	102		
16	β-naphthyl	2.01±0.25	0.92±0.20	137	84		

^a: TLR4 トランスフェクト HEK293 細胞 SEAP アッセイにて評価, ^b: 50%効果濃度 (μM), ^c: 化合物 5 μM で処理したときの IL-6 の産生量 化合物 1 の産生量 (6.4±1.0 ng/mL) 標準化, ^d: 5 μM の化合物で処理したときの mBMDC 細胞の細胞生存率

表 2 アルキン置換体, トリアゾール置換体の生物活性評価

Compd	R	mBMDC
		EC ₅₀ (nM) ^a
1Z236	Br	152
17	-C ≡ CH	N. D. ^b
18	-C ≡ CTMS	122
19	-C ≡ C-cyclopropyl	22
20	-C ≡ C-cyclohexyl	118
21	-C ≡ C-CH ₂ OH	>1,000
22	-C ≡ C-phenyl	171
23	-C ≡ C-2-methoxyphenyl	435
24	-C ≡ C-4-methoxyphenyl	>1,000
25	-C ≡ C-3-thiophenyl	37
26	-C ≡ C-2-pyridyl	280
27	1-phenyl-1-H-1,2,3-triazole	>1,000
28	1-cyclohexyl-1-H-1,2,3-triazole	>1,000

^a: 50%効果濃度 (nM), ^b: Not Determined

TLR4 を標的とした抗ウイルス療法や抗がん療法への応用, 自己免疫疾患などの治療薬開発につながると期待される。

謝 辞

本研究の一部は, 「[知]の集積と活用」による研究開発モデル事業」の支援を受けて行われました。

文 献

- 1) Akira S, Takeda K : Toll-like receptor signalling. *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) Abdollahi-Roodsaz S, Joosten LA, Roelofs MF, et al. : Inhibition of Toll-like receptor 4 breaks the inflammatory loop in autoimmune destructive arthritis. *Arthritis Rheum* 56 : 2957-2967, 2007
- 4) 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
- 5) Kawasaki T, Kawai T : Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol* 5 : 461, 2014
- 6) Westphal O, Lüderitz O : Chemische Erforschung von lipopolysacchariden gram-negativer Bakterien. *Angew Chem* 66 : 407-417, 1954
- 7) Steimle A, Autenrieth IB, Frick JS : Structure and

function : Lipid A modifications in commensals and pathogens. *Int J Med Microbiol* 306 : 290-301, 2016

- 8) Peri F, Calabrese V : Toll-like receptor 4 (TLR4) modulation by synthetic and natural compounds : an update. *J Med Chem* 57 : 3612-3622, 2014
- 9) Gradisar H, Keber M, Pristovsek P, et al. : MD-2 as the target of curcumin in the inhibition of response to LPS. *J Leukoc Biol* 82 : 968-974, 2007
- 10) Peluso MR, Miranda CL, Hobbs DJ, et al. : Xanthohumol and related prenylated flavonoids inhibit inflammatory cytokine production in LPS-activated THP-1 monocytes : Structure-activity relationships and in silico binding to myeloid differentiation protein-2 (MD-2). *Planta Med* 76 : 1536-1543, 2010
- 11) Wang Y, Qian Y, Fang Q, et al. : Saturated palmitic acid induces myocardial inflammatory injuries through direct binding to TLR4 accessory protein MD2. *Nat Commun* 8 : 13997, 2017
- 12) 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
- 13) Ii M, Matsunaga N, Hazeki K, et al. : A Novel Cyclohexene Derivative, Ethyl (6R)-6-[N-(2-Chloro-4-fluorophenyl) sulfamoyl] cyclohex-1-ene-1-carboxylate (TAK-242), Selectively Inhibits Toll-Like Receptor 4-Mediated Cytokine Production through Suppression of Intracellular Signaling. *Mol Pharmacol* 69 : 1288-1295, 2006
- 14) Honegr J, Malinak D, Dolezal R, et al. : Rational design of novel TLR4 ligands by in silico screening and their functional and structural characterization *in vitro*. *Eur J Med Chem* 146 : 38-46, 2018
- 15) Honegr J, Dolezal R, Malinak D, et al. : Rational Design of a New Class of Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Tryptamine Related Agonists by Means of the Structure- and Ligand-Based Virtual Screening for Vaccine Adjuvant Discovery. *Molecules* 23 : 102, 2018
- 16) 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
- 17) 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. *J Med Chem* 60 : 9142-9161, 2017

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¹⁾。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¹⁾。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²⁾。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³⁾。

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³⁾。

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- κ 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³⁾。

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

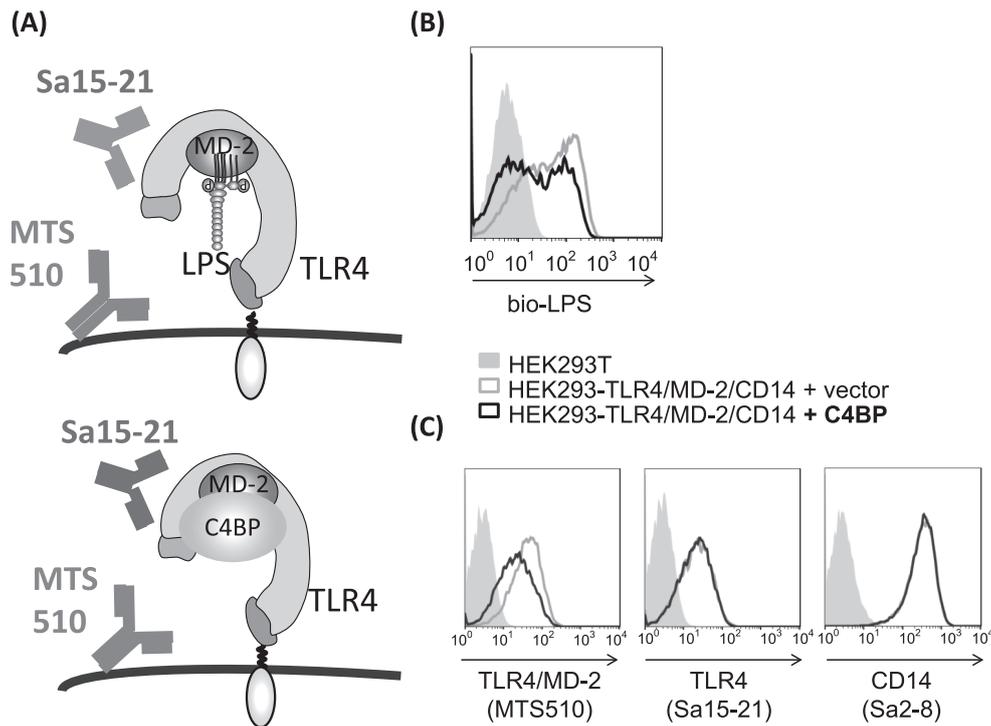


図 1 C4BP は TLR4 の LPS 結合領域近くに会合することで TLR4/MD-2 応答を制御している

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³⁾, 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³⁾。

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 α 鎖と一つの β 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 α 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、 β 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 α 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 α 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²⁾。

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 β 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⁴⁾。活性化プロテイン C (APC) は PS 存在下で凝固因子を分解し、トロンビン

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²⁾。

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、 α 鎖7つ β 鎖一つの通常のC4BPや β 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、 β 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⁵⁾。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 β 鎖が存在せず α 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⁶⁾。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²⁾。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

リピド A 脂肪酸転移酵素遺伝子を利用した 新しい構造を有する LPS の作出

川原 一芳¹⁾, 菅原 健広¹⁾, 大澤絵美里¹⁾, 滝本 博明²⁾, 尾之上さくら¹⁾

¹⁾関東学院大学理工学部理工学科生命学系, ²⁾北里大学理学部生物科学科

Production of LPS with novel structure using fatty acid transferase genes for lipid A biosynthesis

Kazuyoshi Kawahara¹⁾, Takehiro Sugawara¹⁾, Emiri Osawa¹⁾, Hiroaki Takimoto²⁾, Sakura Onoue¹⁾

¹⁾Department of Biosciences, College of Science and Engineering, Kanto Gakuin University

²⁾Department of Biosciences, School of Science, Kitasato University

Abstract

Lipid A is known to exhibit various immunostimulating activities, and acyloxyacyl structure formed by 3-hydroxy and non-polar fatty acids is important for the activity. Although the relationship between the activity and the acyloxyacyl structure has been precisely investigated using chemically synthesized lipid A, modifications of lipid A by genetic methods have not been much attempted. In the present study, the double-knockout mutant of *Escherichia coli* with disrupted lauroyl- and palmitoyltransferase genes (KGU0377) was constructed, and transformed with palmitoyltransferase gene from *Salmonella* (*pagP*) or from *Campylobacter jejuni* to obtain strains KGU0431 and KGU0441, respectively. The mutant produced the lipid A without acyloxyacyl structure, showed slower growth at 37°C, and was very sensitive to polymyxin B. The transformant KGU0431 could grow as rapid as the wild-type strain and showed the partially restored resistance to polymyxin B. Another transformant KGU0441 also showed the similar recovery of polymyxin B resistance, but its growth was still slower than the wild-type strain. Mass spectrometric analysis revealed that KGU0431 produced considerable amount of penta-acylated lipid A with palmitic acid. On the other hand, KGU0441 produced a small amount of hexa-acylated lipid A with palmitic and myristic acids. The IL-6 inducing activity of KGU0377 LPS was much weaker than that of the wild-type strain, as expected, and the activity of LPS from the transformants was at the same level as that of KGU0377 or only slightly restored. The present study showed the possibility to produce lipid A with novel structures using various acyltransferases from other bacteria.

Endotoxin and Innate Immunity 21 : 51~55, 2018

Key words : リピド A, 脂肪酸転移酵素遺伝子, 質量分析, IL-6 産生誘導活性, 大腸菌

はじめに

リポポリサッカライド (LPS) 分子が示すさまざまな免疫活性は、その脂質部分であるリピド A が担っていることはよく知られている¹⁾。不思議なことに、LPS 研究の初期からよく研究されてきた腸内細菌科、なかでも大腸菌のリピド A が他のグラム陰性細菌と比べて最も高い免疫活性を示すことがわかっている。リピド A の化学構造、とくに脂肪酸の炭素鎖、結合位置と免疫活性の相関については、大阪大学の研究グループが 1980 年代に化学合成の手法を用いて、国内外の研究者との共同研究において明らかにしている^{2~4)}。脂肪酸に関し

ては大腸菌リピド A のリピド A 構造を頂点として、脂肪酸炭素鎖が変化することにより活性は低下すること、および非還元末端側のグルコサミン (GlcN) の 2 位と 3 位に結合した 3-ヒドロキシミリスチン酸 (3-OH-C_{14:0}) の水酸基に結合した飽和脂肪酸が作るアシロキシアシル構造がとくに重要であることが証明された。一方、同時期に米国の Raetz らにより解明された大腸菌リピド A の生合成経路においては、これらのアシロキシアシル構造は生合成後半に、ラウリン酸 (C_{12:0}) 転移酵素、およびミリスチン酸 (C_{14:0}) 転移酵素により、この順番で各脂肪酸が生合成中間体に転移され、完成した 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (Kdo) とリピド A の

複合体 (LPS の最小単位) が細胞質膜の内側からペリプラズム側に運搬されることが明らかになっている^{5,6)}。またこれらの生合成研究の一環として、上記の脂肪酸転移酵素遺伝子を破壊した変異株が作製可能であることも示された⁷⁾。

リピド A の構造、免疫活性、生合成に関するこれらの知見から、生合成後半にはたらく脂肪酸転移酵素遺伝子の破壊と他菌種の脂肪酸転移酵素遺伝子の導入により、新規のアシロキシアシル構造を有する人工的なリピド A (LPS) が作出できることは容易に想像されるが、これまでそのような方向性の研究は意外に少なかった。そこでわれわれはまず、数種類の脂肪酸転移酵素遺伝子破壊株を作製し、そのうちアシロキシアシル構造をほとんど有しないリピド A を産生する変異株を用いて、外来遺伝子の導入により人工的リピド A を持つ LPS の作出を試み、そのような LPS が示すサイトカイン産生活性を野生型 LPS と比較した。

1. 脂肪酸転移酵素遺伝子破壊株の作製

生合成に必須な遺伝子を欠損した変異株は致死的になるため、作製不可能な場合、あるいは温度感受性変異株として作製する必要がある場合も想定されるが、リピド A 脂肪酸転移酵素に関しては既報^{7,8)}により多重変異株を含むさまざまな変異株の作製が可能であることが示されていたので、われわれも相同組換えの手法を用いて変異株の作製を試みた。大腸菌 BL21 株のリファンピシン耐性株を親株 (KGU0107 株) として、前述の $C_{12:0}$ 転移酵素遺伝子 (*lpxL*)、 $C_{14:0}$ 転移酵素遺伝子 (*lpxM*)、および外膜に存在して、完成後の LPS にパルミチン酸 ($C_{16:0}$) を転移する $C_{16:0}$ 転移酵素遺伝子 (*crcA*) をそれぞれクローニングし、それらの遺伝子の中央にカナマイシンなどの薬剤耐性遺伝子を挿入した。これらの遺伝子を自殺プラスミド (培養条件により容易に脱落可能なプラスミド) に組込んで親株に導入し、正常遺伝子と破壊遺伝子が置き換わった株を選択した。変異株の選択においては、できるだけ正常な生育を示すコロニーを釣菌するよう心掛けた。その結果、良好な生育を示す遺伝子破壊変異株を得ることができた。このうち *lpxL* と *crcA* を破壊した二重変異株を KGU0377 株とした。

2. 二重変異株への $C_{16:0}$ 転移酵素遺伝子の導入と LPS 脂肪酸組成の変化

大腸菌リピド A には本来 $C_{16:0}$ がほとんど存在しないため、変化を検出しやすい。そこで、作製した二重変異株 (KGU0377) に、ベクタープラスミドに連結した他の菌種の $C_{16:0}$ 転移酵素遺伝子を導入し、LPS 中の $C_{16:0}$ 量の変化を分析することにした。 $C_{16:0}$ 転移酵素遺伝子としては、第一にサルモネラの *pagP* 遺伝子が候補にあ

げられた。 $C_{16:0}$ 転移酵素 *PagP* は腸内細菌科を始めとする多くのグラム陰性菌にみられる酵素で、外膜に存在し、 $C_{16:0}$ をリン脂質からリピド A の還元末端側 GlcN の 2 位に結合した 3-OH- $C_{14:0}$ の水酸基に転移する酵素である⁹⁾。サルモネラではリピド A をヘプタアシル型とすることにより、マクロファージ内での殺菌に抵抗性を示す病原因子の一種と考えられているが、おそらく本来の役割は、生育環境に合わせて外膜の疎水性を調節することであると思われる。同様の酵素は大腸菌では *CrcA* と呼ばれており、普段はほとんどはたっていないが、他の脂肪酸転移酵素遺伝子の破壊に伴い機能するため、この遺伝子 (*crcA*) も破壊した株が上記の二重変異株である。

次に候補にあがった転移酵素が、*Campylobacter jejuni* の $C_{16:0}$ 転移酵素遺伝子である。*C. jejuni* のリピド A は糖の基本骨格が GlcN ではなく 2,3-ジアミノグルコース (GlcN3N) から成り立っており、この糖の 2 位、3 位のアミノ基に 3-OH- $C_{14:0}$ が結合し、さらに非還元末端側の糖に結合した 3-OH- $C_{14:0}$ に $C_{16:0}$ が 2 分子結合している。したがって、この菌の *lpxL* (大腸菌の $C_{12:0}$ 転移酵素遺伝子 *lpxL* と相同性を有する遺伝子) を用いて二重変異株リピド A の変化を調べることとした。

おのおのの $C_{16:0}$ 転移酵素遺伝子を通常の pUC 系ベクタープラスミドに連結して KGU0377 株に形質転換法で導入し、LPS の脂肪酸組成変化を調べた。その結果、*pagP* を導入した KGU0431 株、および *C. jejuni* の *lpxL* 相同遺伝子を導入した KGU0441 株ともに、 $C_{16:0}$ の相対量が増加したことがわかった。しかし、KGU0441 株の $C_{16:0}$ 増加量はそれほど顕著なものではなかった。

なお、二重変異株である KGU0377 株 LPS の脂肪酸については、 $C_{12:0}$ 、 $C_{16:0}$ に加えて、 $C_{14:0}$ も減少していることが確認できた。これは、 $C_{14:0}$ 転移酵素 *LpxM* が、 $C_{12:0}$ が所定の位置に存在する分子を特異的に基質として使用するからではないかと考えられる。したがって、KGU0377 株は 3-OH- $C_{14:0}$ のみを含むリピド IV_A 型のリピド A を持っており、外来脂肪酸転移酵素導入の宿主としては理想的なものであることが判明した。

3. 生育速度および薬剤に対する感受性の変化

野生株 (KGU0107)、二重変異株 (KGU0377)、*pagP* 導入株 (KGU0431)、*C. jejuni* の *lpxL* 導入株 (KGU0441) の生育速度を比較したところ、野生株と比べて KGU0377 株では 37°C での振盪培養における生育速度が遅くなり、定常期に達する時間が約 4 時間から約 8 時間に変化した。これに対して、*pagP* を導入した KGU0431 株では親株とほぼ同じ生育を示すことがわかった。一方、KGU0441 株の生育速度は KGU0377 株

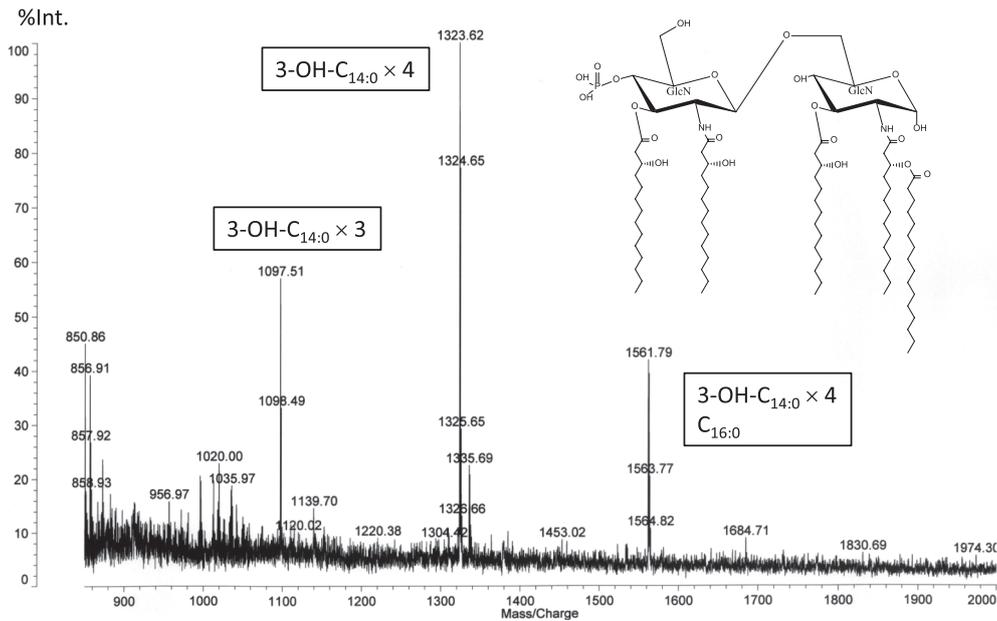


図 1 KGU0431 株由来脱リン酸化リポド A の MALDI-TOF マスペクトル
Negative mode で陰イオン $[M-H]^-$ を検出。

と同様であった。これに対して、30°Cでは、KGU0377株と KGU0441株も野生株および KGU0431株に匹敵する生育速度を示した。

ポリミキシン B に対する感受性試験においては、KGU0377株は親株に比べてはるかに感受性であった (MIC 値がそれぞれ 400 ng/mL と 25 ng/mL) が、KGU0431株と KGU0441株では MIC 値が 100 ng/mL まで回復した。さらに、腸管にも存在する可能性があるデオキシコール酸についても生育阻害濃度を調べた。その結果、野生株と KGU0431株では 0.75% で阻害がかけられ始めるのに対して、KGU0377株と KGU0441株ではわずか 0.01% で阻害がみられた。

4. C_{16:0} 転移酵素遺伝子導入株リポド A の質量分析

他菌種の C_{16:0} 転移酵素遺伝子を導入した 2 株 (KGU0431, KGU0441) の LPS から 0.1 M 塩酸による加水分解 (100°C, 30 分) で還元末端側 GlcN の 1 位のリン酸基が脱離した脱リン酸化リポド A を調製し、Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) により質量分析を行った。その結果、図 1 に示したように、KGU0431 株の脱リン酸化リポド A は m/z 1561.8 に明瞭なピークを示し、3-OH-C_{14:0} 4 分子に加えて C_{16:0} を含むペンタアシル型リポド A が相当量合成されていることが明らかになった。転移された C_{16:0} の結合位置については、詳細な質量分析の結果、予想通り還元末端側の 2 位の 3-OH-C_{14:0} に結合していることが確認された。一方、KGU0441 株の脱リン酸化リポド A では図 2 に

示したように、C_{14:0} あるいは C_{16:0} を含むペンタアシル型リポド A の小ピーク、および C_{14:0}, C_{16:0} を含むヘキサアシル型リポド A と思われる m/z 1771.9 の小ピークが検出された。C. jejuni のリポド A 生合成については、大腸菌とは異なり、これまで知られていなかった転移酵素により非還元末端側の 3' 位に先に C_{16:0} が転移され、その後 LpxL に相同な酵素によって 2' 位にもう 1 分子の C_{16:0} が転移されることが最近報告されている¹⁰⁾。このため現段階では、検出されたヘキサアシル型リポド A がどのような経路で合成されたかを推定するのは難しいが、恐らく 2' 位に C_{16:0} が転移された後、大腸菌本来の LpxM (KGU0377 株では LpxM は正常) により C_{14:0} が 3' 位に転移されたものと推測した。

5. IL-6 産生誘導活性の比較

親株と変異株の LPS による IL-6 産生誘導活性を、ヒト由来 U937 細胞、およびマウス由来 RAW264.7 細胞を用いて測定した。U937 細胞は 100 nM の PMA を加えて培養した後、LPS で刺激した。RAW264.7 細胞は付着細胞を回収し、測定に用いた。LPS 刺激後 6 時間培養し、産生された IL-6 をサンドイッチ ELISA 法で定量した。

その結果、図 3 に示したように、野生株と KGU0377 株の活性には明瞭な差がみられた。これに対して、KGU0431 株の LPS は KGU0377 株 LPS に比べるとわずかに強い活性を示した。とくに、RAW264.7 細胞では有意な差 (P < 0.05) がみられた。一方、KGU0441 株 LPS に関しては細胞により異なる結果が得られた。U937 細胞を用いた場合は、KGU0377 株および

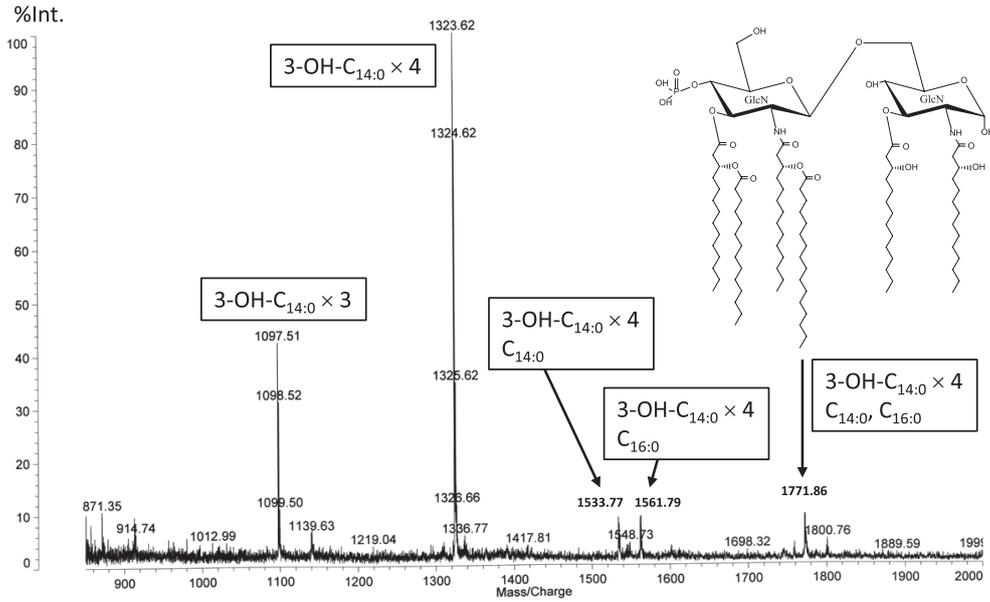


図 2 KGU041 株由来脱リン酸化リポド A の MALDI-TOF マススペクトル
Negative mode で陰イオン $[M-H]^-$ を検出。

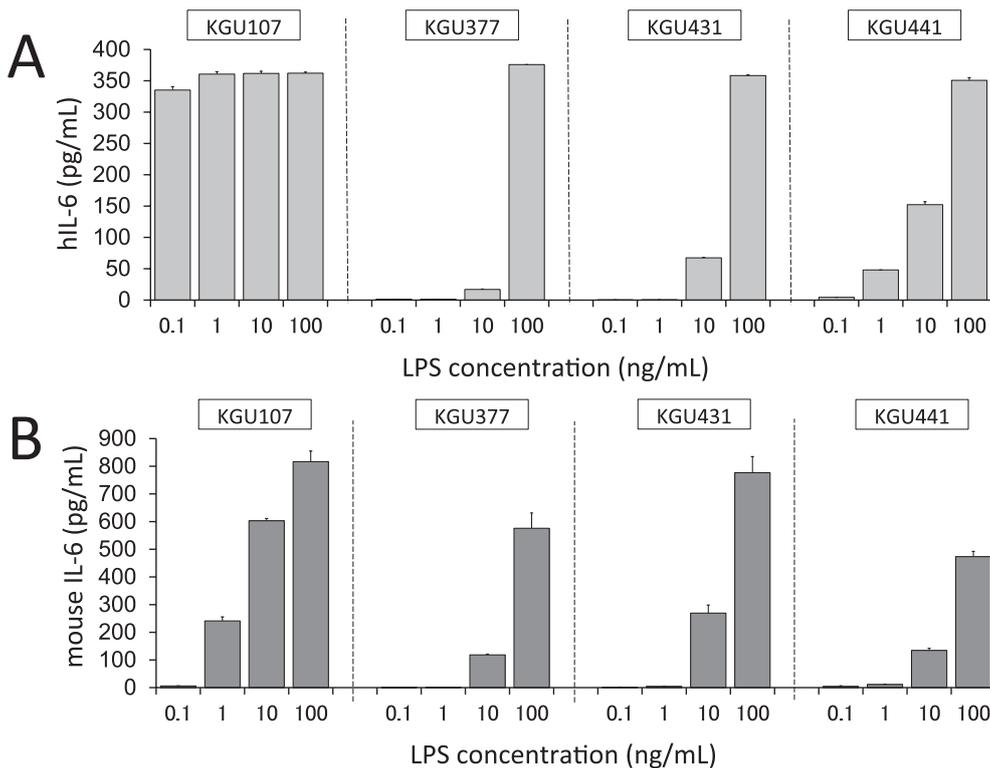


図 3 野生株および変異株由来 LPS による IL-6 産生誘導活性

A: ヒト由来 U937 細胞を使用。B: マウス由来 RAW264.7 細胞を使用。

KGU0431 株 LPS と比べて、明らかに強い活性が得られたが、RAW264.7 細胞に対しては KGU0431 株 LPS よりも活性が弱いことがわかった。野生株 LPS との比較では、KGU0431 株、KGU0441 株ともに明らかに弱く、生育速度や薬剤感受性において $C_{16:0}$ 転移酵素遺伝子の

導入によりかなりの回復がみられたのとは異なる結果となった。すなわち、外膜での機能に比べて、LPS 受容体によるリポド A の構造認識はより厳密であることが示された。

おわりに

これまでリピド A 生合成の後半にはたらく脂肪酸転移酵素の破壊変異株について、いくつかの報告がみられたが、それらの変異株では通常温度 (37°C) における顕著な生育阻害がみられる場合が多かった。しかし、われわれが作製した二重変異株 (KGU0377 株) は 37°C においても野生株の半分程度の生育を示し、30°C では野生株と遜色ない生育を示すことから、有用な変異株ということができる。われわれの結果と同様に、比較的良好な生育を示す変異株も最近報告されている¹¹⁾ ため、リピド A 生合成の不具合を補完する何らかの変異、あるいは適応が起こり、生育良好な株が取得できるものと思われる。現段階では、変異株の種類も少なく、得られた新規リピド A も 2 種類のみであるが、今後、変異株と導入する遺伝子の組合せを検討することにより、さまざまなリピド A が作出できると考えられる。これらの新規 LPS について、アジュバントなどへの有効な利用も期待される。

謝 辞

本研究に携わった多くの関東学院大学工学部、理工学部の学生の皆様に感謝致します。また、IL-6 産生活性測定法に関して、適切なアドバイスを頂いた松浦基博博士に深謝いたします。

文 献

- 1) Alexander C, Rietschel ET : Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* 7 : 167-202, 2001
- 2) Imoto M, Yoshimura H, Kusumoto S, et al. : Total synthesis of lipid A, active principle of bacterial endotoxin. *Proc Jpn Acad Sci* 60 : 285-288, 1984
- 3) Galanos C, Lüderitz O, Rietschel ET, et al. : Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur J Biochem* 148 : 1-5, 1985
- 4) Homma JY, Matsuura M, Kanegasaki S, et al. : Structural requirements of lipid A responsible for the functions : a study with chemically synthesized lipid A and its analogues. *J Biochem* 98 : 395-406, 1985
- 5) Raetz CR, Whitfield C : Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71 : 635-700, 2002
- 6) Whitfield C, Trent MS : Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. *Annu Rev Biochem* 83 : 99-128, 2014
- 7) Clementz T, Bednarski JJ, Raetz CR : Function of the *htrB* high temperature requirement gene of *Escherichia coli* in the acylation of lipid A : HtrB catalyzed incorporation of laurate. *J Biol Chem* 271 : 12095-12102, 1996
- 8) Vorachek-Warren MK, Ramirez S, Cotter RJ, et al. : A triple mutant of *Escherichia coli* lacking secondary acyl chains on lipid A. *J Biol Chem* 277 : 14194-14205, 2002
- 9) Bishop RE, Gibbons HS, Guina T, et al. : Transfer of palmitate from phospholipids to lipid A in outer membranes of gram-negative bacteria. *EMBO J* 19 : 5071-5080, 2000
- 10) Rubin EJ, O'Brien JP, Ivanov PL, et al. : Identification of a broad family of lipid A late acyltransferases with non-canonical substrate specificity. *Mol Microbiol* 91 : 887-899, 2014
- 11) Schilling B, Hunt J, Gibson BW, et al. : Site-specific acylation changes in the lipid A of *Escherichia coli* *lpxL* mutants grown at high temperatures. *Innate Immun* 20 : 269-282, 2014

宿主細胞の細胞死の調節を介した, cathelicidin ファミリーの 抗菌ペプチド LL-37 の敗血症マウスモデルに対する効果

長岡 功¹⁾, 細田 浩司¹⁾, 中村 果歩¹⁾, 胡 忠双¹⁾, 村上 泰介¹⁾,
鈴木 香¹⁾, 田村 弘志²⁾

¹⁾順天堂大学医学部生化学・生体防御学講座, ²⁾LPS コンサルティング事務所

Effect of antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 on septic mouse model via the modulation host cell death

Isao Nagaoka¹⁾, Hiroshi Hosoda¹⁾, Kaho Nakamura¹⁾, Zhongshuang Hu¹⁾,
Taisuke Murakami¹⁾, Kaori Suzuki¹⁾, Hiroshi Tamura²⁾

¹⁾Department of Host Defense and Biochemical Research, Juntendo University School of Medicine

²⁾Laboratory Program Support (LPS) Consulting Office

Abstract

LL-37 is the only known member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides in humans. In addition to its broad spectrum of antimicrobial activities, LL-37 can modulate various inflammatory reactions. We previously revealed that LL-37 improves the survival of a murine cecal ligation and puncture (CLP) sepsis model. In the present study, we elucidated the mechanism for the protective action of LL-37 using the CLP model, focusing on the effect of LL-37 on the release of neutrophil extracellular traps (NETs). The results indicated that the intravenous administration of LL-37 suppressed the increase of damage-associated molecular patterns, DAMPs (such as histone-DNA complex and HMGB1) as well as IL-1 β , TNF- α and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-1) in plasma and peritoneal fluids. Interestingly, LL-37 significantly suppressed the decrease of mononuclear cell number in blood, and the increase of polymorphonuclear cell (neutrophil) number in the peritoneal cavity during sepsis. Moreover, LL-37 reduced the bacterial burdens in blood and peritoneal fluids. Notably, LL-37 increased the level of NETs (myeloperoxidase-DNA complex) in plasma and peritoneal fluids. In addition, we confirmed that LL-37 induces the release of NETs from neutrophils, and NETs possess the bactericidal activity. Together, these observations suggest that LL-37 improves the survival of CLP septic mice by possibly suppressing the inflammatory responses as evidenced by the inhibition of the increase of cytokines, soluble TREM-1 and DAMPs (host cell death) and the alteration of inflammatory cell numbers, and the bacterial growth via the release of NETs with the bactericidal activity.

Endotoxin and Innate Immunity 21 : 56~61, 2018

Key words : NETs, 敗血症, 抗菌ペプチド, 好中球, 細胞死

はじめに

LL-37 はヒト cathelicidin ファミリーに属する抗菌ペプチドであり, 抗菌作用の他に, 炎症反応を調節する作用を有している^{1~4)}。一方, 好中球が活性化されると, NETosis という細胞死を介して, DNA, ヒストン, 顆粒タンパク質から成る網状構造物である NETs (neutrophil extracellular traps) を放出するが, NETs も抗

菌作用と炎症反応調節作用を有している^{5,6)}。われわれは以前, LL-37 を盲腸結紮穿孔 (cecal ligation and puncture : CLP) による敗血症モデルのマウスに静脈内投与すると, 生存率が改善することを報告している⁷⁾。そこで本研究では, LL-37 の CLP モデルに対する作用メカニズムを解明するために, NETs に注目して, CLP モデルの腹腔浸出液および血液における炎症性サイトカイン, DAMPs (damage-associated molecular pat-

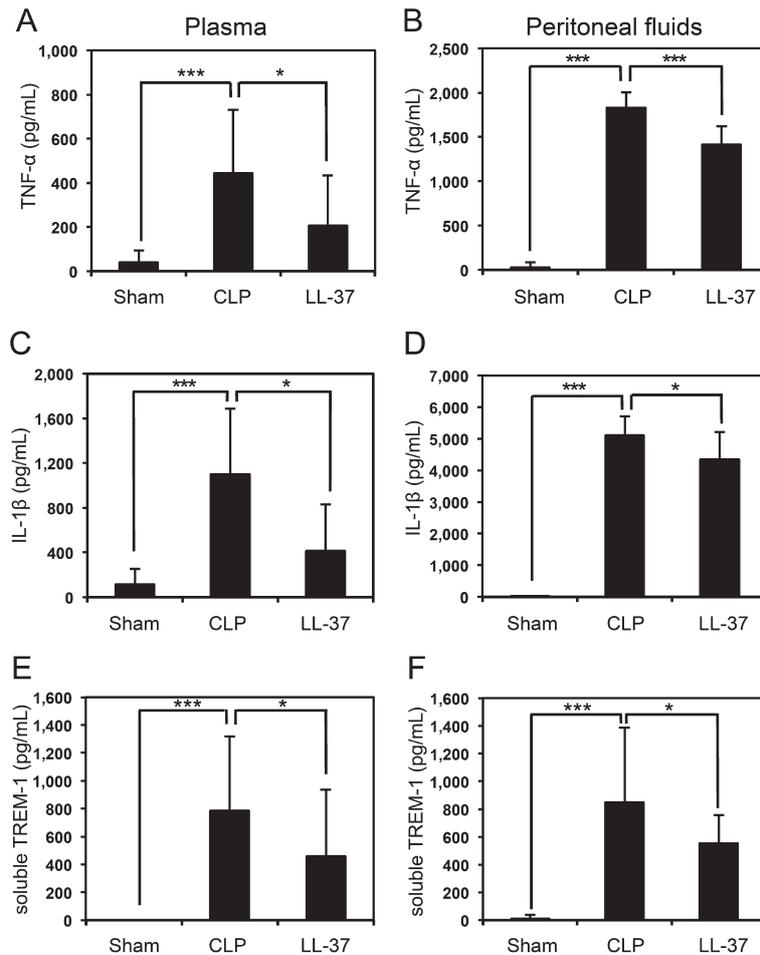


図 1 サイトカインと TREM-1 に及ぼす LL-37 投与の効果
*P<0.05, ***P<0.001

terns), 細菌数に及ぼす LL-37 の効果を検討した。

1. 炎症性サイトカインと TREM-1 に及ぼす LL-37 の効果

雄性の BALB/c マウスを用いて CLP モデルを作成した (CLP 群)^{7,8)}。LL-37 投与群では, CLP の直前に LL-37 (2 μg/mouse) を尾静脈投与した。また, Sham 群では開腹手術のみを行い, CLP を行わなかった。CLP 施行 20 時間後に, PBS (phosphate-buffered saline) 4 mL を腹腔内に注射して腹腔浸出液を回収した。また, 心臓からヘパリン採血を行い, 血漿を調製した。腹腔浸出液と血漿における炎症性サイトカイン TNF-α, IL-1β (eBioscience) および炎症反応増強分子 TREM-1 (triggering receptors expressed on myeloid cells)⁹⁾ (R & D) の定量を, ELISA キットを用いて行った。

CLP 誘発敗血症マウスの血漿と腹腔浸出液における, 炎症性サイトカイン TNF-α, IL-1β と炎症反応増強分子 TREM-1 に及ぼす LL-37 投与の効果を検討した。その結果, CLP によって, 血漿 (図 1A, C, E) と腹腔浸出液 (図 1B, D, F) において TNF-α, IL-1β,

TREM-1 の濃度が Sham 群に比べて有意に増加したが, LL-37 の投与によって, それらの増加が有意に抑制された。

2. DAMPs に及ぼす LL-37 の効果

腹腔浸出液と血漿における HMGB1 (high mobility group box protein¹⁾ (Shino-Test) とヒストン-DNA 複合体 (Cell Death Detection ELISA, Roche) を DAMPs として ELISA キットを用いて定量した。

CLP 敗血症マウスの血漿と腹腔浸出液における, HMGB1 とヒストン-DNA 複合体に及ぼす LL-37 投与の効果を検討した。その結果, CLP によって血漿 (図 2A, C) と腹腔浸出液 (図 2B, D) において DAMPs である HMGB1 とヒストン-DNA 複合体の濃度が Sham 群に比べて有意に増加したが, LL-37 の投与によって, それらの増加が有意あるいは顕著に抑制された。

3. 白血球に及ぼす LL-37 の効果

腹腔浸出液と血液における白血球の数と種類は, 白血球を Türk 染色し, 血球算定盤を用いて単核細胞と多

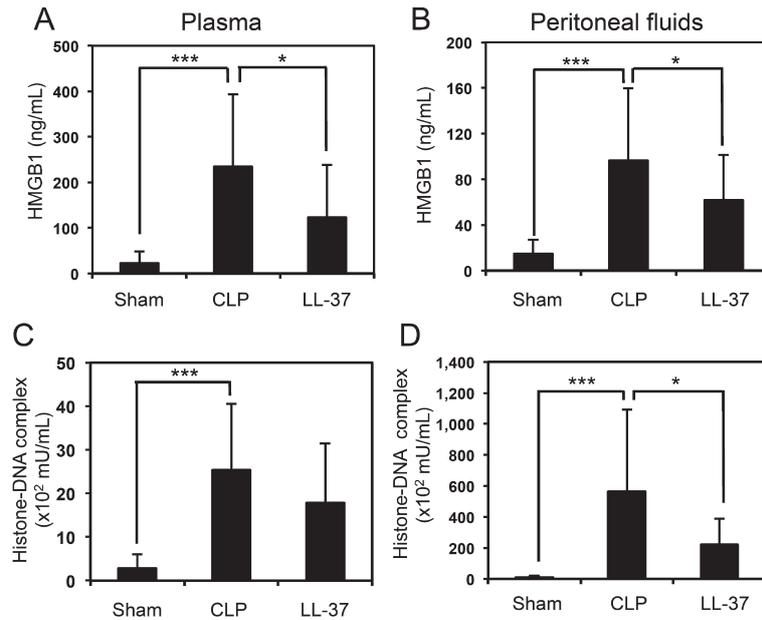


図 2 DAMPs に及ぼす LL-37 投与の効果

*P<0.05, ***P<0.001

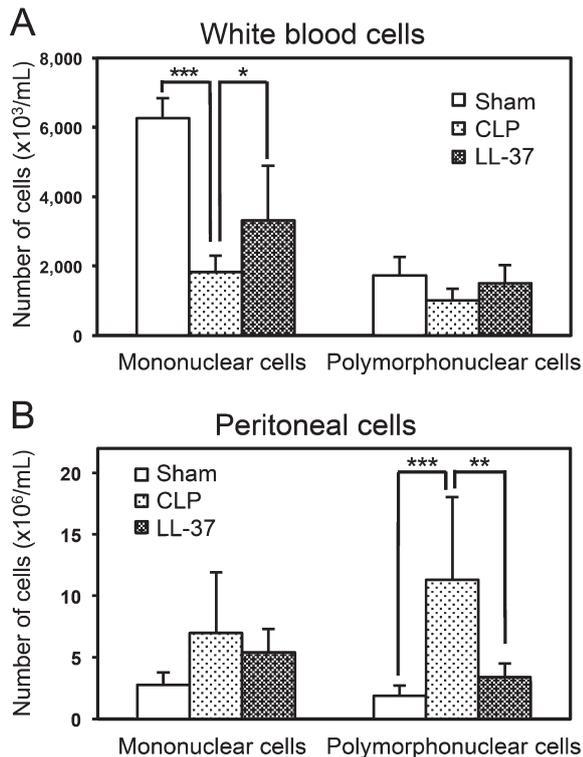


図 3 白血球に及ぼす LL-37 投与の効果

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

形核白血球を算定した。

CLP 誘発敗血症マウスの血液と腹腔浸出液における白血球の数と種類に及ぼす LL-37 投与の効果を検討した。その結果、CLP によって血液中の単核細胞（主にリンパ球）が Sham 群に比べて有意に減少したが、LL-

37 の投与によって、その減少が有意に抑制された（図 3A）。一方、CLP によって腹腔浸出液中の多形核白血球（主に好中球）が Sham 群に比べて有意に増加したが、LL-37 の投与によって、その増加が有意に抑制された（図 3B）。

4. 細菌数に及ぼす LL-37 の効果

腹腔浸出液と血液における細菌数を、トリプトソーヤ寒天培地を用いたコロニー形成法で定量した。すなわち、腹腔浸出液と血液を PBS で希釈し、寒天培地に塗布し、37°C、20 時間培養した後にコロニー数をカウントした。

CLP 誘発敗血症マウスの血液と腹腔浸出液における細菌数に及ぼす LL-37 投与の効果を検討した。その結果、CLP によって血液（図 4A）と腹腔浸出液（図 4B）において細菌数が Sham 群に比べて有意に増加したが、LL-37 の投与によって、それらの増加が有意に抑制された。

5. NETs に及ぼす LL-37 の効果

腹腔浸出液と血漿における NETs を myeloperoxidase (MPO)-DNA 複合体として ELISA 法で定量した。すなわち、キャプチャー抗体として抗 MPO 抗体 (R & D)、2 次抗体としてペルオキシダーゼ標識した抗 DNA 抗体 (Roche) を用いて MPO-DNA 複合体を検出した。

CLP 誘発敗血症マウスの血漿と腹腔浸出液における NETs に対する LL-37 投与の効果を検討した。その結果、興味深いことに、Sham 群の血漿中に恒常的に NETs が検出され、CLP によってそのレベルが有意に

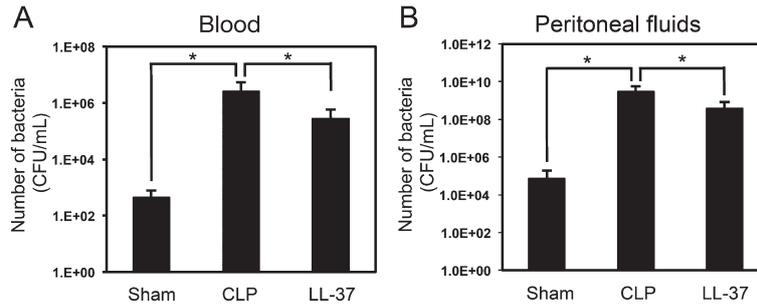


図 4 細菌数に及ぼす LL-37 投与の効果
*P<0.05

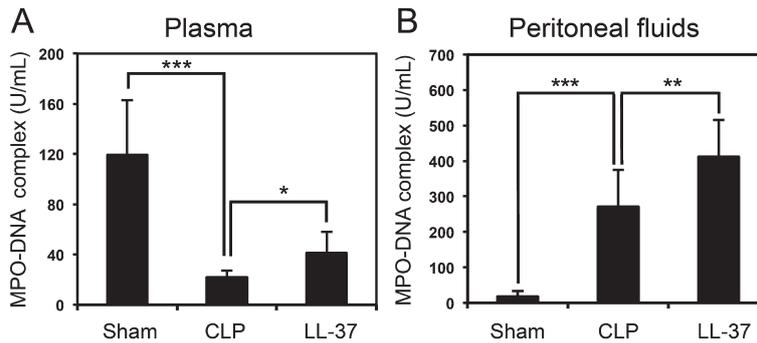


図 5 NETs に及ぼす LL-37 投与の効果
*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

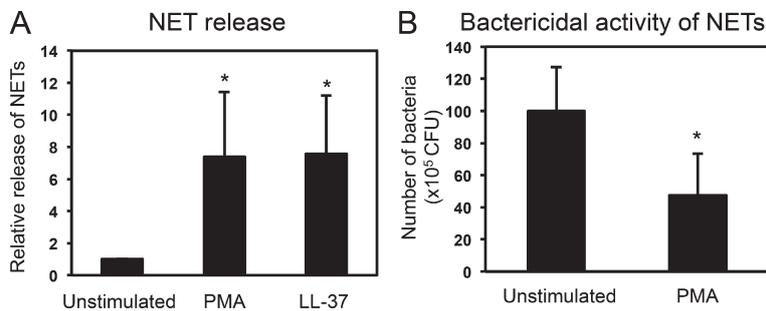


図 6 刺激による好中球からの NETs 放出と NETs を含む好中球上清の抗菌作用
*P<0.05

低下したが, LL-37 を投与することによってそのレベルが有意に上昇した (図 5A)。一方, 腹腔浸出液については, Sham 群に比べて, CLP によって NETs のレベルが有意に上昇し, さらに LL-37 投与によってそのレベルが有意に上昇した (図 5B)。

6. LL-37 による NETs の放出と NETs の抗菌作用

好中球をマウスの骨髓細胞から Percoll 密度勾配遠心法により調製し, 100 nM PMA (phorbol myristate acetate) あるいは 5 μM LL-37 で 37°C, 4 時間刺激して, NETs を放出させた。その後, NETs の DNA を DNase I 処理によって限定分解し¹⁰⁾, NETs を上清として回収

し, 前述の方法で定量した。また, 回収された NETs を LB 培地中で *E. coli* (10⁷細胞) と室温で 15 分間培養し, トリプトソーヤ寒天培地を用いてコロニーを形成させ, NETs の抗菌作用を定量した。

好中球は種々の刺激に反応して NETs を放出するので, LL-37 刺激によって好中球が NETs を放出するかどうかをマウス骨髓細胞から調製した好中球を用いて検討した。その結果, ポジティブコントロールの刺激として用いた PMA と同様に LL-37 によって, 好中球から NETs が, 未刺激細胞に比べて有意に多く放出されることがわかった (図 6A)。

さらに, NETs の抗菌作用を, PMA 刺激によって得られた好中球上清と大腸菌を培養して検討したところ,

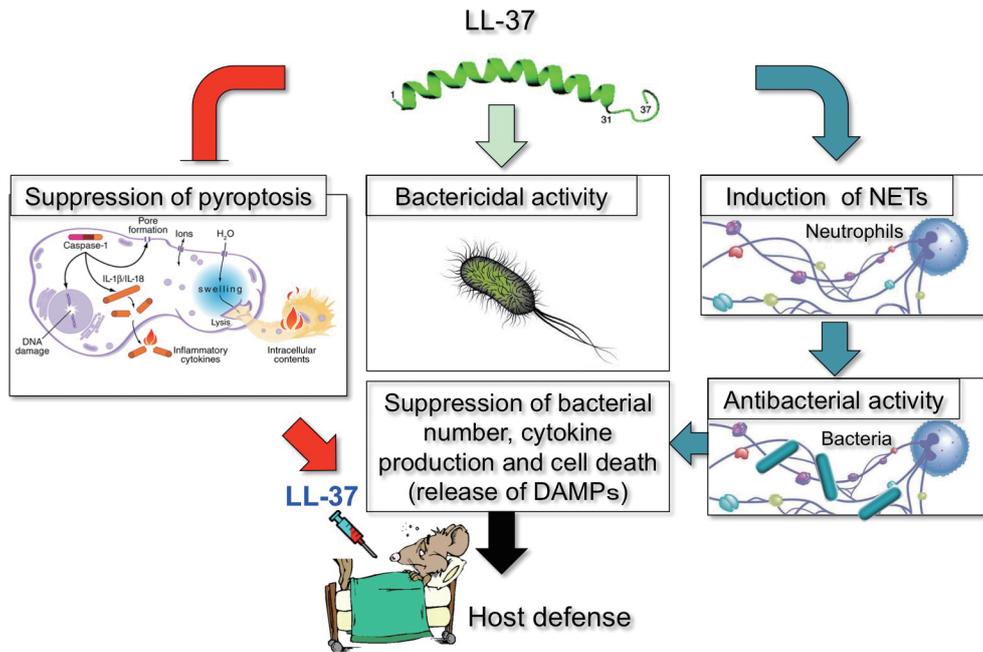


図 7 LL-37の好中球 NETs の誘導とマクロファージピロトーシスの抑制を介した、CLP 敗血症モデルに対する効果

未刺激好中球の上清に比べて、NETsを含むPMA刺激好中球の上清の方が、大腸菌の増殖を有意に抑制することがわかった(図6B)。

おわりに

LL-37はヒトにおける唯一のcathelicidinファミリーの抗菌ペプチドであるが、幅広い抗菌作用の他に炎症反応を調節する作用を有する¹⁻⁴)。われわれは、以前、LL-37がCLP敗血症マウスの生存率を向上することを報告している⁷)。そこで、本研究では、LL-37のCLP敗血症マウスに対する作用メカニズムを解明するために、NETsに注目して、マウスの腹腔浸出液および血液における炎症性サイトカイン、DAMPs、細菌数に対するLL-37の効果を評価した。その結果、LL-37の投与によって、腹腔浸出液および血漿中のIL-1 β およびTNF- α などの炎症性サイトカイン、炎症反応増強分子であるTREM-1のCLPによる増加が抑制された。さらに、LL-37の投与によって、HMGB1やヒストン-DNA複合体のようなDAMPs、および細菌数のCLPによる増加が抑制された。また、LL-37の投与によって、CLPによる白血球の変化(数と種類)が抑制された。さらに興味深いことに、LL-37の投与によって、腹腔浸出液および血漿中のNETsレベルが増加した。また、すでに報告されているように^{5,11})、LL-37が好中球からのNETsの放出を誘導すること、およびNETsを含む好中球の培養上清が抗菌作用を有することが確認された。

IL-1 β およびTNF- α などの炎症性サイトカインは敗血症の病態を反映するマーカーとして知られてい

る¹²)。また、TREM-1は好中球や単球・マクロファージの細胞膜に存在し、炎症反応の増強にかかわる分子として知られており、膜型のTREM-1がmetalloproteinaseによって切断された可溶性(soluble)TREM-1は敗血症のマーカーになるとされている⁹)。さらに、HMGB1やヒストン-DNA複合体のようなDAMPsは宿主細胞の細胞死にともなって細胞外に放出され、敗血症の病態に深くかかわっている¹³)。本研究において、LL-37を敗血症マウスに投与すると、細菌数とともに、上記の敗血症関連分子の増加が抑制されることがわかった。

一方、NETsはDNA、ヒストン、顆粒タンパク質から成る網状構造物であり、細菌をDNAの網状構造で捉え、さらに、ヒストン、顆粒タンパク質の抗菌作用によって細菌を死滅させる⁵)。興味深いことに本研究において、LL-37を敗血症マウスに投与すると、NETsがさらに増加することがわかった。

以上の結果から、CLP誘発敗血症マウスにおいて、LL-37はそれ自身の抗菌作用とともに、抗菌作用を有するNETsの放出を誘導し、細菌増殖を抑制し、炎症性サイトカイン、TREM-1、DAMPsなどの敗血症関連分子の増加を抑制し、敗血症の病態を改善することによって、生存率を向上させるという可能性が、作用機序の一つとして考えられる¹⁴) (図7)。

一方、敗血症の病態では、さまざまな細胞死がかかわっており、われわれは、IL-1 β などの炎症性サイトカインを放出して炎症を増強する細胞死である、マクロファージのピロトーシスをLL-37がCLPモデルにお

いて抑制することをすでに報告している⁷⁾。したがって, LL-37 は CLP 敗血症モデルにおいて, 好中球の NETs の放出を誘導する一方で, マクロファージのピロトーシスを抑制するという, 少なくとも2つのメカニズムによって, 敗血症モデルにおいて防御的に働く可能性が考えられる (図7)。

文 献

- 1) Dürr UH, Sudheendra US, Ramamoorthy A : LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochem Biophys Acta* 1758 : 1408-1425, 2006
- 2) Nagaoka I, Kuwahara-Arai K, Tamura H, et al. : Augmentation of the bactericidal activities of human cathelicidin CAP18/LL-37-derived antimicrobial peptides by amino acid substitutions. *Inflamm Res* 54 : 66-73, 2005
- 3) Nagaoka I, Tamura H, Hirata M : An antimicrobial cathelicidin peptide, human CAP18/LL-37, suppresses neutrophil apoptosis via the activation of formyl-peptide receptor-like 1 and P2X₇. *J Immunol* 176 : 3044-3052, 2006
- 4) 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 : 1338-1347, 2016
- 5) Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. : Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303 : 1532-1535, 2004
- 6) Papayannopoulos V, Zychlinsky A : NETs : a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol* 30 : 513-521, 2009
- 7) Hu Z, Murakami T, Suzuki K, et al. : Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 inhibits the pyroptosis of macrophages and improves the survival of polybacterial septic mice. *Int Immunol* 28 : 245-253, 2016
- 8) Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, et al. : Cecal ligation and puncture. *Shock* 24 (Suppl. 1) : 52-57, 2005
- 9) Charles PE, Noel R, Massin F, et al. : Significance of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 elevation in patients admitted to the intensive care unit with sepsis. *BMC Infect Dis* 16 : 559, 2016
- 10) Yoo DG, Floyd M, Winn M, et al. : NET formation induced by *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates measured as release of myeloperoxidase-DNA and neutrophil elastase-DNA complexes. *Immunol Lett* 160 : 186-194, 2014
- 11) Neumann A, Berends ET, Nerlich A, et al. : The antimicrobial peptide LL-37 facilitates the formation of neutrophil extracellular traps. *Biochem J* 464 : 3-11, 2014
- 12) Pinsky MR : Dysregulation of the immune response in severe sepsis. *Am J Med Sci* 328 : 220-229, 2004
- 13) Kang JW, Kim SJ, Cho HI, et al. : DAMPs activating innate immune responses in sepsis. *Ageing Res Rev* 24 (Pt A) : 54-65, 2015
- 14) Hosoda H, Nakamura K, Hu Z, et al. : Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 induces NET formation and suppresses the inflammatory response in a mouse septic model. *Mol Med Rep* 16 : 5618-5626, 2017

一酸化炭素 (CO)/CO 遊離分子の急性肺傷害に対する治療薬としての可能性

高橋 徹

岡山県立大学保健福祉学部

Carbon monoxide (CO)/CO-releasing molecule (CORM) is a therapeutic target against acute respiratory distress syndrome induced by hemorrhagic shock and resuscitation (HSR)

Toru Takahashi

Faculty of Health and Welfare Science, Okayama Prefectural University

Abstract

HSR incites pulmonary inflammation that leads to acute respiratory distress syndrome (ARDS). However, there have been no definitive pharmacological therapies against ARDS. CO is a toxic gas due to the generation of carboxyhemoglobin (COHb). However, trace amount of CO is endogenously produced by the enzymatic reaction of heme oxygenase-1 (HO-1) that is induced by oxidative stress to confer protection against various inflammatory disorders. Recent studies have indicated that low dose of CO exerts potent cytoprotective effects on inflammatory organ damage in animal models by its anti-inflammatory property. We also demonstrated that CO inhalation at 250 ppm ameliorated HSR-induced pulmonary injury in rats. However, this dose of CO increased blood COHb level to approximately 20% that may be toxic to humans. Very recently, to overcome the disadvantage, CORMs have been developed by coordinating CO with a transition metal carbonyl complexes. Among various types of CORMs, CORM-3, a water-soluble CORM, spontaneously liberated and deliver CO to various tissues under physiological condition through intravenous administration. We found that CORM-3 treatment mitigated HSR-induced lung injury without any increase in blood COHb levels through its anti-inflammatory property. We propose that CO/CORMs are possible pharmacological agent to treat ARDS.

Endotoxin and Innate Immunity 21 : 62~65, 2018

Key words : ARDS, CORM-3, HO-1(Heme Oxygenase-1), CO, HSR (Hemorrhagic shock and resuscitation)

はじめに¹⁾

出血性ショックでは蘇生に成功しても過度な炎症反応から急性肺傷害 (Acute Respiratory Distress Syndrome: ARDS) に陥ることがある。ARDS に対する治療法として肺保護換気などの支持療法は存在するが、効果的な薬物療法はいまだ確立していない。近年、有毒ガスとして扱われる一酸化窒素、硫化水素、一酸化炭素 (CO) が、酵素反応により、生体内で微量ではあるが産生され、細胞保護的に働くことから、医療用ガスとしての応用の可能性が示唆されている。これらのガスのうち、CO は抗炎症作用を有することから、ARDS の治療薬としての可能性が考えられている。本稿では、CO

の性質について概説した後、われわれが作成した出血性ショック蘇生後 ARDS モデルに対して CO がもたらした治療効果について、最近、開発された CO 遊離分子を用いた研究成果を交えて述べる。

1. 一酸化炭素 (CO) の毒性²⁾

CO は、有機物の不完全燃焼によって生じる有毒ガスである。CO は酸素に比べてヘモグロビンに対する親和性が 200~250 倍高いことから、CO を吸入するとただちに CO-ヘモグロビン (COHb) が形成される。また、ヘモグロビンの一部が CO によって占拠されると酸素 (O₂)-ヘモグロビンから O₂ の遊離が阻害される。これらの効果によって組織は低酸素症に陥る。ヒトの血中

の COHb レベルは、喫煙や自動車の排ガスなど大気汚染がない状況では 0.1~1% である。しかし、CO ガスを誤って吸入することにより COHb レベルが 20% を超えると、めまい、頭痛などの中毒症状が現れ、50~80% になると意識障害を来し死に至る。

2. CO 生成酵素 : Heme Oxygenase-1 の ARDS に対する細胞保護作用³⁾

CO は有毒ガスであるが、生体内で微量に産生されている。すなわち、ヘモグロビン、ミオグロビンなどのヘム蛋白の補欠分子族であるヘムが分解される過程でその分解の律速酵素である heme oxygenase (HO) によって生成される。HO の誘導型のアイソザイムである HO-1 は基質であるヘムのみならず種々の酸化ストレスによって誘導される。誘導された HO-1 は ARDS モデルを含む種々の炎症・酸化ストレスによる臓器障害の動物モデルに対して抗炎症作用、抗アポトーシス作用を介して細胞保護効果を示すことが報告されている。私たちは雄性 SD ラット (体重: 380~420 グラム) に対して、出血性ショック (平均血圧 30 mmHg/1 時間) に陥らせた後、蘇生を行うと肺の炎症反応が増強し ARDS が発生することを報告した。このモデルに、ヘムにアミノ酸のアルギニンを結合させて静脈内投与を可能にした Heme arginate を投与し肺に HO-1 を誘導したところ、肺の炎症反応が抑制され、肺傷害が軽減することを見出した。

3. 細胞内情報伝達物質としての低濃度 CO¹⁾

CO は上述したように、有毒ガスであるが、極低濃度では細胞内情報伝達物質として機能する。極低濃度 CO は、細胞内情報伝達系に作用し、血管拡張作用、抗細胞増殖作用、抗炎症作用、抗アポトーシス作用を示す。このうち、ARDS の治療に深く関与すると考えられる抗炎症作用と抗アポトーシス作用のメカニズムについて述べる。

3-1. CO の抗炎症作用¹⁾

CO は mitogen activated protein kinase (MAPK) を活性化させて抗炎症作用を現す。すなわち、LPS 刺激マクロファージに対して CO は p38 MAPK を介して抗炎症作用を示す。また、p38 MAPK 以外に、CO の抗炎症作用には Toll-like receptor (TLR) 経路の抑制、NADPH oxidase シグナルの抑制、PPAR- γ の活性化が関与していることが明らかとなっている。さらに、最近、CO は NLRP3-inflammasome 経路を抑制して抗炎症作用を示すことも報告された。

3-2. CO の抗アポトーシス作用¹⁾

CO はさまざまな細胞情報伝達系を介して抗アポ

トーシス作用を現す。TNF- α による細胞死に対しては p38 MAPK や NF- κ B シグナル経路を介して抗アポトーシス作用を示す。また、酸素ストレスに対する抗アポトーシス作用には STAT3 や phosphatidylinositol-3-kinase/Akt 経路および NADPH oxidase による ROS 産生抑制、Fas によるアポトーシス経路抑制の関与が報告されている。

4. 低濃度 CO 吸入による ARDS の改善効果

4-1. 出血性ショック蘇生前後の CO 吸入が蘇生後急性肺傷害に及ぼす保護効果⁴⁾

私たちが作成した出血性ショック蘇生後 ARDS は、組織障害度スコア (うっ血、浮腫、出血、細胞浸潤の 4 項目のスコアの総計) と肺浮腫の指標である Lung Wet/Dry 比の有意な上昇によって定量的にも確かめられた。また、炎症性転写因子である NF- κ B と AP-1 の活性、および炎症性メディエーターである TNF- α と iNOS の発現がともに上昇しており、肺組織の好中球浸潤度と Myeloperoxidase (MPO) 活性も増加がみられた。本モデルに出血性ショックの前 1 時間および後に 3 時間、250 ppm の CO を吸入させると、組織障害度スコアの改善、Lung Wet/Dry 比の有意な低下、炎症性転写因子活性および炎症性メディエーターの発現の抑制が認められ、好中球浸潤度や MPO 活性も低下していた。出血性ショック後 ARDS に対する蘇生前後の 250 ppm の CO 吸入は、転写因子活性の抑制による炎症性メディエーターのダウンレギュレーションを介して、炎症細胞浸潤を抑制して肺保護効果をもたらすと考えられた。

4-2. 蘇生後急性肺傷害に対する CO 吸入の治療効果⁵⁾

私たちは、ショック蘇生前後の CO 吸入が出血性ショック蘇生後 ARDS を軽減することを明らかにしたが、より臨床的な応用方法を考える場合、生体侵襲が加わった後に CO を吸入させることがより現実的である。そこで、私たちは、ショック蘇生後にのみ 250 ppm の CO を 3 時間吸入させて、ARDS に対する治療効果を検証した。その結果、CO は蘇生後投与でも肺傷害スコア、肺水腫の指標である Wet/dry 比を低下させた。また、肺組織の TNF α mRNA, iNOS mRNA レベルも減弱させ、アポトーシス細胞数の有意な減少も認められた。さらに、CO 吸入によって抗炎症性サイトカイン IL-10 の発現は有意に増加していた。以上より CO 吸入は抗炎症作用を介して蘇生後 ARDS に対して治療効果を示すことが示唆された。

5. CO 遊離分子の ARDS に対する保護作用

5-1. CO 遊離分子¹⁾

蘇生後 ARDS に対して治療効果を示す CO 濃度は 250 ppm と著しく低く、ラットでは、動脈血ガス分析で低酸素血症、代謝性アシドーシスを呈さず、組織学的にも低酸素状態に陥らなかった。しかし、血中 COHb 濃度は約 20% とラットでは何ら中毒症状を示さなかったが、このレベルの血中 COHb 濃度はヒトでは中毒症状を引き起こす可能性がある。近年、この CO ガスの毒性を回避するために、遷移性金属のカルボニル化合物が化学的 CO 供与体：CO 遊離分子 (CO releasing molecules: CORMs) として開発された。CORMs には構造によっていくつかの種類があり、CORM-1, CORM-2 は疎水性である。一方、CORM-3 は親水性であり、緩衝液に溶解すると溶液中にただちに CO を遊離する。すなわち、CO 吸入と異なり、血液 COHb 値を上昇させることなく、組織内に CO を運搬できることが CORMs の利点である。

5-2. CORMs の細胞保護作用¹⁾

CO 吸入と同様に CORMs は抗炎症作用を示すことが報告されている。CORMs は LPS 刺激によるマクロファージの炎症性サイトカインの産生を抑制する。また、血管内皮に対しては LPS 刺激による炎症反応と酸化ストレスを減弱させる。In vivo においても CORMs の抗炎症作用が報告されている。敗血症、熱傷マウスにおいて、CORMs の投与は NF- κ B の活性化、ICAM-1 の発現、白血球の浸潤の抑制を介して、全身性炎症反応を低下させる。また、CORMs の敗血症に対する保護効果には、Nrf2/AKT 経路を介するミトコンドリアの新生促進が関与することも報告されている。

5-3. CORM-3 の蘇生後 ARDS に対する保護作用

私たちは、蘇生後 ARDS モデルに対して蘇生終了直後に CORM-3 (4 mg/kg) を尾静脈より投与し、肺傷害にたいする効果を検討した。その結果、CORM-3 の投与によりうっ血、浮腫、細胞浸潤、出血で評価した組織障害スコアの著しい改善が認められた。また、それを裏付ける形で肺 wet/dry および気管支肺胞洗浄液の蛋白濃度が低下していた。また、炎症性メディエーターである TNF- α , iNOS, IL-1 β , MIP-2 の肺での発現も抑制されていた。一方、抗炎症性サイトカインである IL-10 の発現レベルは CORM-3 投与により上昇が認められた。さらに、TUNEL 陽性細胞数とカスパーゼ-3 の発現により、CORM-3 のアポトーシスに及ぼす影響を検討したところ、両指標とも CORM-3 投与により、有意な減少が認められた。以上より、CORM-3 は抗炎症・抗アポトーシス作用を介して蘇生後 ARDS を改善

することが示唆された。なお、CORM-3 の投与は出血性ショック蘇生モデルの血行動態、COHb レベルを含む動脈血ガス分析値に何ら悪影響を与えなかった。

6. ARDS 患者に対する CO 吸入の臨床試験⁶⁾

現在、米国で ARDS 患者に対する CO 吸入の第 1 相臨床試験が行われている。この試験の目的は Sepsis による気管挿管中の ARDS 患者に対する CO 吸入の安全性を評価することで、COHb レベル 6~8% を目安として 100 ppm または 200 ppm の CO 吸入を行う。主要評価項目は CO 吸入にともなう副作用であり、2 次評価項目として SOFA score, P/F ratio, 急性肺傷害スコア, ICU 滞在日数, 在院日数, 血漿の炎症マーカー, 肺胞上皮細胞傷害, 臓器障害マーカー, 筋肉のミトコンドリア新生のバイオマーカーが設定されている。

まとめ (図 1)

CO は有毒ガスであるが、HO のヘム分解反応によって体内で微量産生されており、誘導型の HO-1 は出血性ショック蘇生後 ARDS に対して肺保護的に働く。また、出血性ショック蘇生モデルへの低濃度 CO 吸入、CORM-3 の蘇生後投与は、ともに抗炎症作用・抗アポトーシス作用を介して蘇生後 ARDS を改善した。250 ppm の CO 吸入は血中 COHb レベルをヒトで有害効果をもたらすレベルまで上昇させたが、ラットに対して副作用はなかった。一方、CORM-3 の投与は血中 COHb レベルを上昇させることなく、CO 吸入と同等の ARDS 軽減効果をもたらした。ARDS に対する決め手となる治療法がない現在、米国で Septic ARDS に対する第 1 相臨床試験が行われている。良い結果が得られて第 2 相試験に進むことが待たれる。

謝 辞

本研究の遂行に多大なご支援を頂いた岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 麻酔・蘇生学講座の皆様へ深謝致します。

文 献

- 1) Ryter SW, Choi AM : Carbon monoxide : present and future indications for a medical gas. Korean J Intern Med 28 : 123-140, 2013
- 2) Gorman D, Drewry A, Huang YL, et al. : The clinical toxicology of carbon monoxide. Toxicology 187 : 25-38, 2003
- 3) Takahashi T, Shimizu H, Morimatsu H, et al. : Heme Oxygenase-1 is an Essential Cytoprotective Component in Oxidative Tissue Injury Induced by Hemorrhagic Shock. J Clin Biochem Nutr 44 : 28-40, 2009
- 4) Kanagawa F, Takahashi T, Inoue K, et al. : Protective effect of carbon monoxide inhalation on lung injury

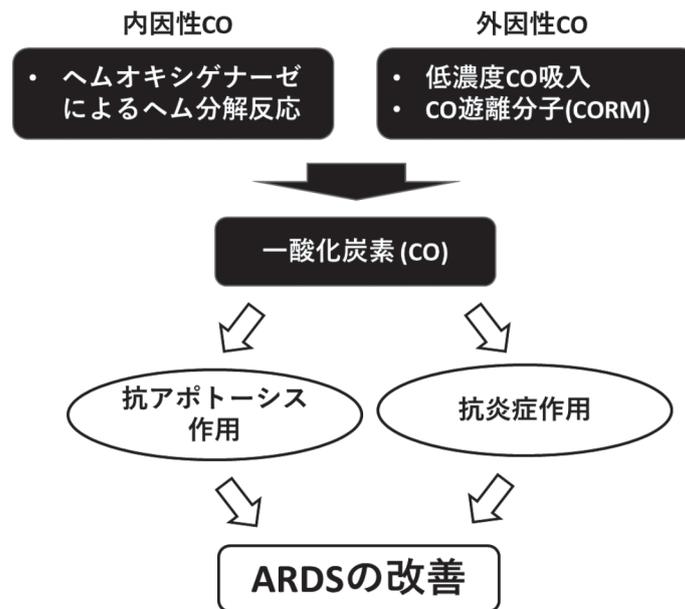


図 1 CO/CORMs の ARDS に対する治療薬としての可能性

after hemorrhagic shock/resuscitation in rats. J Trauma 69 : 185-194, 2010

5) Kawanishi S, Takahashi T, Morimatsu H, et al : Inhalation of carbon monoxide following resuscitation

ameliorates hemorrhagic shock-induced lung injury. Mol Med Rep 7 : 3-10, 2013

6) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02425579>

歯周病における neutrophil extracellular traps 産生と血管内皮細胞の炎症誘導

多田 浩之¹⁾, 西岡 貴志²⁾, 松下 健二³⁾, 尾之上さくら⁴⁾, 川原 一芳⁴⁾

¹⁾東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座口腔分子制御学分野, 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, ⁴⁾関東学院大学理工学部理工学科生命学系

Periodontal bacteria-induced neutrophil extracellular traps enhances proinflammatory responses in human endothelial cells

Hiroyuki Tada¹⁾, Takashi Nishioka²⁾, Kenji Matsushita³⁾, Sakura Onoue⁴⁾, Kazuyoshi Kawahara⁴⁾

¹⁾Division of Oral Immunology, Tohoku University Graduate School of Dentistry

²⁾Division of Oral Diagnosis, Tohoku University Graduate School of Dentistry

³⁾Department of Oral Disease Research, National Center for Geriatrics and Gerontology

⁴⁾Department of Biosciences, College of Science and Engineering, Kanto Gakuin University

Abstract

In the inflammatory disease chronic periodontitis, the periodontium is exposed to a high density and diversity of periodontal bacteria. Neutrophils are the first line of defense in the periodontium. Circulating neutrophils adhere to endothelial cells by adhesion molecules, such as $\beta 2$ -integrin, following their migration across endothelial cells into the inflamed periodontium. Endothelial cell-derived developmental endothelial locus-1 (Del-1) acts as a negative regulator of neutrophil extravasation that inhibits $\beta 2$ -integrin-dependent adhesion to vascular endothelial cells. Neutrophil extracellular traps (NETs) are extracellular web-like DNA structures that contain bactericidal substances such as histones, human neutrophil elastase, and cathelicidin antimicrobial peptides. NETs are produced by many bacterial species, but it remains unknown whether the development of periodontal disease is due to periodontal bacteria-induced NET production. *Fusobacterium nucleatum* is a Gram-negative anaerobic bacterium associated with periodontal disease. We examined the effects of *F. nucleatum*-induced NET stimulation on the induction of Del-1 in human endothelial cells. A transendothelial migration assay was performed to evaluate the number of transmigrated neutrophils. Stimulation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) with *F. nucleatum*-infected NET fragments enhanced the transendothelial migration of neutrophils. Furthermore, the Del-1 production induced by HUVECs was attenuated in NET fragments-primed cells. Thus, *F. nucleatum*-induced NETs may enhance neutrophil extravasation in a manner dependent on the attenuation of Del-1 production in endothelial cells. This study suggests that NETs are associated with the pathogenesis of periodontal disease.

Endotoxin and Innate Immunity 21 : 66~69, 2018

Key words : 歯周病, Neutrophil extracellular traps, *Fusobacterium nucleatum*, Developmental endothelial locus-1, 血管内皮細胞

はじめに

歯周病は 30 歳以上の成人の約 8 割が罹患する歯周病関連細菌による感染症である。歯周病罹患者の歯周ポケットでは、歯周病関連細菌がバイオフィルムを形成することに伴って好中球を主とする免疫担当細胞が集

積し、慢性炎症が引き起こされることで歯周組織が破壊され、最終的に歯の喪失に至る。自然免疫における好中球の新たな感染防御機構である neutrophil extracellular traps (NETs) が慢性炎症性疾患の病態形成にかかわることが示唆されている。デンタルプラーク中や炎症歯肉でも NETs の産生が確認されているが、歯周

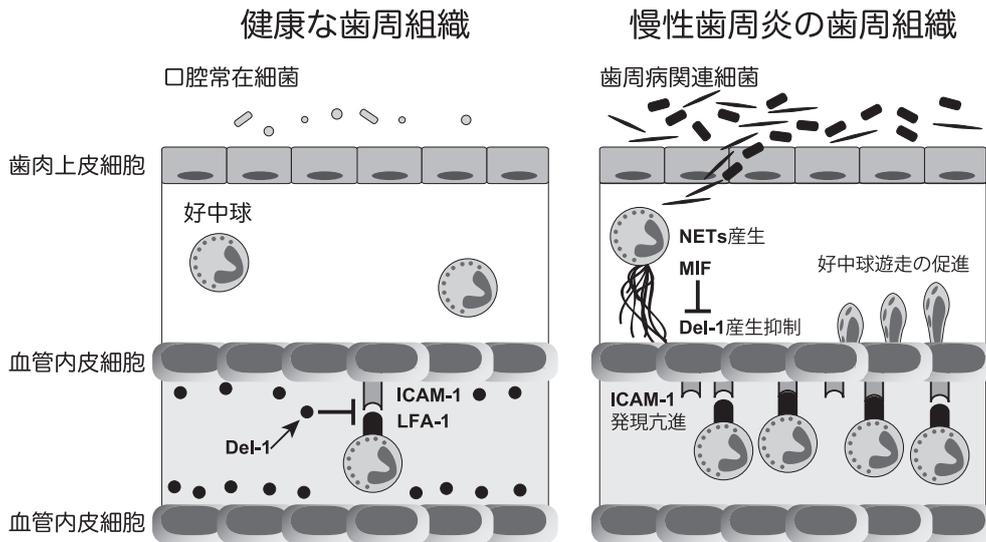


図 1 慢性歯周炎の歯周組織では NETs により血管内皮細胞に炎症反応が誘導される

病の病態形成において NETs は感染防御に働くのか歯周炎を増悪させるかについては十分に明らかにされていない。歯周炎が重度になると歯肉溝を形成する粘膜上皮に潰瘍が生じ、歯肉から出血することで歯周ポケット内の歯周病関連細菌や炎症性メディエーターが糖尿病や心臓・循環器疾患といった他臓器の疾患に影響を及ぼすことに関心が寄せられている。本稿では歯周病関連細菌の感染による好中球の NETs 産生と血管内皮細胞への影響について、われわれの知見を中心に概説したい。

1. NETs による炎症反応の誘導

粘膜組織の自然免疫では、好中球が病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns : PAMPs) を Toll-like receptor などで認識することにより、抗菌ペプチド、活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) や炎症性サイトカインの産生が誘導される。ところが、好中球を PMA で刺激するとネクロシスやアポトーシスと異なる形態の細胞死が誘導される研究成果¹⁾を機に、好中球は NETosis という新規の細胞死に陥ることで NETs を放出することが明らかにされた²⁾。NETs はクロマチン線維から成る網状構造物で構成され、捕捉した病原微生物を NETs に結合するヒストン、好中球エラスターゼ、ミエロペルオキシダーゼ、抗菌ペプチドや炎症性サイトカインにより破壊する感染防御機構である。

2. NETs による血管の組織障害

NETs による病原体の破壊は重度の感染症において重要な役割を担う一方、NETs の慢性的な産生は臓器障害や細胞死を誘導し、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の炎症性疾患を増悪さ

せ、糖尿病における創傷治癒を遅延させることが明らかにされている。その原因として、NETs に含まれる多様な殺菌性分子が組織障害を引き起こすことが示唆されている。NETs に結合する dsDNA、ミエロペルオキシダーゼや MMP-9 は、血管内皮細胞を障害するほか³⁻⁵⁾、ヒストンによる血管内皮細胞の障害は敗血症における DIC の病態形成にかかわる⁶⁾。また、炎症組織に集積した NETs からヒストンが血液性に遊離することで遠隔臓器に障害を引き起こすことも指摘されている^{7,8)}。歯周病の歯肉組織に集積した好中球は NETs を産生することが示唆されていることから、歯周ポケット内に蓄積された NETs が血行性に全身の他臓器を障害する可能性が危惧される。

3. 歯周病原細菌感染による NETs 産生と血管内皮細胞の炎症誘導

われわれは、慢性歯周炎の病態形成に深くかかわる歯周病関連細菌を選択し、ヒト好中球からの NETs 産生能について比較検討したところ、*Fusobacterium nucleatum* に対して好中球は高い NETs 産生誘導を示した。*F. nucleatum* は慢性歯周炎罹患者の歯周ポケットから高頻度で検出されるグラム陰性偏性嫌気性桿菌で、ヒトでは口腔および腸管に常在する。*F. nucleatum* は宿主細胞ならびに他の細菌種と強い共凝集能を持つことから、バイオフィーム形成において中心的な役割を担う。また、*F. nucleatum* による好中球からの ROS 産生は、慢性歯周炎の代表的な病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* よりも高いことが示されており⁹⁾、ROS は細胞質における NETs 形成のプロセスに必須の分子であることから、*F. nucleatum* は好中球からの NETs 産生を強く誘導することが示唆される。そこで、*F. nucleatum* 刺激によりヒト好中球から産生された

NETsが血管内皮細胞に炎症反応を誘導する可能性について、好中球による血管内皮細胞間隙遊走 (trans-endothelial migration) を指標として検討した。*F. nucleatum* 刺激により好中球から産生されたNETsをDNase I処理で分離し、Transwellフィルター上に単層培養したヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を同NET分画で刺激後、HUVECの細胞間隙を通過した好中球数を測定した。その結果、HUVECをNET分画で刺激すると遊走した好中球数が著明に亢進した。

次に、NETsによる血管内皮細胞を介する好中球遊走の亢進作用にかかわる分子機序について、血管内皮細胞に発現する developmental endothelial locus-1 (Del-1) に着目した。Del-1は血管内皮細胞から構成的に分泌される分子であり、LFA-1を介する好中球と血管内皮細胞の接着を拮抗阻害することで好中球の血管外遊走を調節する¹⁰⁾。Eskanらによると、若年マウスの歯肉組織では血管内皮細胞からDel-1が産生されるため歯肉組織への好中球遊走は調節されているが、高齢マウスの歯肉組織ではIL-17A産生が亢進することで血管内皮細胞からのDel-1産生が抑制され、歯肉組織への好中球遊走が亢進し慢性炎症に至ることが示唆されている¹¹⁾。そこで、HUVECからのDel-1産生におけるNETsの影響について検討した結果、HUVECをNETsで刺激するとDel-1産生が減少することが示された。NETsによるHUVECのDel-1産生抑制にかかわる分子について、NETsに結合する各種サイトカインを網羅的に解析した結果、*F. nucleatum* 感染により産生されたNETsには macrophage migration inhibitory factor (MIF) が著明に結合し、好中球を*F. nucleatum*由来LPSで刺激するとMIF mRNA発現が亢進することが明らかとなった。MIFは、TNF- α 、IFN- γ やIL-1 β などの炎症性サイトカイン産生を誘導し¹²⁾、アテローム性動脈硬化症、関節リウマチや炎症性腸疾患といった慢性炎症性疾患を増悪させる¹³⁾。そこで、NETsによるtransendothelial migrationの亢進作用にMIFがかかわる可能性について、HUVECをMIFアンタゴニストISO-1で処理したNETsで刺激した結果、transendothelial migrationの亢進が著明に抑制された。また、HUVECからのDel-1産生もISO-1処理NETsでは抑制された。他方、NETsにはHUVECのICAM-1発現を著明に亢進させる作用があることも明らかとなった。以上の結果から、歯周病関連細菌により好中球から産生されたNETsは血管内皮細胞を活性化し、Del-1産生抑制やICAM-1発現亢進を誘導することで好中球の細胞接着を促進させ、血管における炎症反応が増悪することが示唆された。今後、NETsによる血管内皮細胞の障害作用について、NETsに結合するミエロペルオキシダーゼ、好中球エラスターゼ、ヒストンやヌクレオソームなどの分子に着目して検討する必要

がある。

おわりに

歯周病は2型糖尿病や動脈硬化症など全身疾患の病態形成にかかわることが指摘され、そのメカニズムとして歯周病関連細菌による菌血症や歯周炎による炎症性メディエーターの関与が示唆されているが、十分に解明されていない点も多い。慢性歯周炎の歯周ポケットには好中球が多量に集積し、歯周病関連細菌の感染に常時暴露されていることから、NETsの恒常的な供給源であることが推察される。NETsによる血管内皮細胞の炎症誘導は、歯周ポケットに蓄積したNETsが血行性に全身へ拡散する可能性が想定され、歯周病を予防することの重要性は今後高まることが考えられる。

文 献

- 1) Takei H, Araki A, Watanabe H, et al. : Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *J Leukoc Biol* 59 : 229-240, 1996
- 2) Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. : Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303 : 1532-1535, 2004
- 3) Gloude NJ, Khandelwal P, Luebbering N, et al. : Circulating dsDNA, endothelial injury, and complement activation in thrombotic microangiopathy and GVHD. *Blood* 130 : 1259-1266, 2017
- 4) Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, et al. : Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One* 7 : e32366, 2012
- 5) Carmona-Rivera C, Zhao W, Yalavarthi S, et al. : Neutrophil extracellular traps induce endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus through the activation of matrix metalloproteinase-2. *Ann Rheum Dis* 74 : 1417-1424, 2015
- 6) Xu J, Zhang X, Pelayo R, et al. : Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med* 11 : 1318-1321, 2009
- 7) Chaput C, Zychlinsky A : Sepsis : the dark side of histones. *Nat Med* 15 : 1245-1246, 2009
- 8) Abrams ST, Zhang N, Manson J, et al. : Circulating histones are mediators of trauma-associated lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 187 : 160-169, 2013
- 9) Wright HJ, Chapple IL, Matthews JB, et al. : *Fusobacterium nucleatum* regulation of neutrophil transcription. *J Periodontol Res* 46 : 1-12, 2011
- 10) Choi EY, Chavakis E, Czabanka MA, et al. : Del-1, an endogenous leukocyte-endothelial adhesion inhibitor,

- limits inflammatory cell recruitment. *Science* 322 : 1101-1104, 2008
- 11) 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
- 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 : 399-410, 2006

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24回研究会は、平成30年11月30日、12月1日に関東学院大学・理工学部 教授 川原一芳先生が当番世話人で、ホテルメルパルク横浜（30日）および関東学院大学・関内メディアセンター（1日）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及び技術の進歩に貢献したと認められる学術および技術の業績に対して表彰を行っています。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と自然免疫学会（IEIIS：International Endotoxin and Innate Immunity Society；<http://ieiis.org/Home>）のOfficial Journal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2.312（JCR Science Edition 2017）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, Associate Professor and Head of the Division of Structural Biochemistry at the Research Center Borstel.

エンドトキシン・自然免疫研究 21

—エンドトキシン・自然免疫研究のフロンティアをめざして—

平成 30 年 11 月 21 日 第 1 版発行

発 行 一般社団法人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 小谷 穰治 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

弛まぬ努力、限りなき探求心



YASHIMA GROUP

本 社 〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7丁目7番18号
彩都バイオヒルズセンター
TEL (072)640-1260 FAX (072)640-1271
堺営業所 〒592-8333 大阪府堺市西区浜寺石津町西1丁4番20号
TEL (072)244-1368 FAX (072)244-4055
京 阪 奈 〒574-0057 大阪府大東市新田西町3番10号
営 業 所 TEL (072)870-2711 FAX (072)870-2710

和 歌 山 〒640-8303 和歌山県和歌山市鳴神746-3番地
営 業 所 TEL (073)473-5951 FAX (073)474-0453
神 戸 〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町1丁目5番地
営 業 所 神戸キメックセンタービル8階
TEL (078)306-1739 FAX (078)306-1751
大 阪 工 場 〒574-0057 大阪府大東市新田西町3番10号
TEL (072)871-3751 FAX (072)872-5840

<http://www.yashimachem.co.jp>

血漿分画製剤(血液凝固阻止剤)

特定生物由来製品・処方箋医薬品 (注意-医師等の処方箋により使用すること)

薬価基準収載

献血 **ノンスロン**[®] 500注射用 1500注射用

生物学的製剤基準〈乾燥濃縮人アンチトロンビンⅢ〉



■ 効能・効果、用法・用量、
使用上の注意(禁忌)等
については、添付文書を
ご参照ください。——

製造販売元 (資料請求先)
 **日本製薬株式会社**
〒104-0044 東京都中央区明石町8番1号

販売
 **武田薬品工業株式会社**
〒540-8645 大阪市中央区道修町四丁目1番1号

2016年9月作成 (K)

善意と医療のかけ橋

善意の献血による血液製剤を通じ
高い倫理観と使命感をもって人びとの健康に貢献します



血漿分画製剤(液状・静注用免疫グロブリン製剤)

献血ヴェノグロブリン®H5%静注

0.5g/10mL・1g/20mL・2.5g/50mL・5g/100mL・10g/200mL

(生物学的製剤基準 ポリエチレングリコール処理免疫グロブリン) **献血**

血漿分画製剤[静注用免疫グロブリン製剤(液状)]

献血ポリグロビン®N5%静注

0.5g/10mL
2.5g/50mL
5g/100mL

献血ポリグロビン®N10%静注

2.5g/25mL
5g/50mL
10g/100mL

生物学的製剤基準[pH4処理酸性免疫グロブリン] **献血**

血漿分画製剤(血液凝固阻止剤)

ノイアート®静注用 500単位・1500単位

(生物学的製剤基準 乾燥濃縮人アンチトロンビンⅢ) **献血**

血漿分画製剤

**クロスエイトMC静注用 250単位・500単位
1000単位・2000単位**

生物学的製剤基準[乾燥濃縮人血液凝固第Ⅷ因子] **献血**

血漿分画製剤

**献血アルブミン5%静注 5g/100mL [JB]
12.5g/250mL**

**献血アルブミン25%静注 5g/20mL [ベネシス]
12.5g/50mL**

(生物学的製剤基準 人血清アルブミン) **献血**

**献血アルブミン20%静注 4g/20mL [JB]
10g/50mL**

赤十字アルブミン25%静注 12.5g/50mL

薬価基準収載 **特定生物由来製品** **処方箋医薬品** (注意-医師等の処方箋により使用すること)

※効能・効果、用法・用量、禁忌・原則禁忌を含む使用上の注意等については、添付文書をご参照ください。

製造販売元
一般社団法人
JB 日本血液製剤機構

2016年12月作成

[資料請求先]

日本血液製剤機構 くすり相談室 〒105-6107 東京都港区浜松町2-4-1 医療関係者向け製品情報サイト <http://www.jbpo.or.jp/med/di/>

明日をもっとおいしく

meiji



糖質の吸収が緩やかな流動食

明治インスロー
Inslow[®]
 糖質調整流動食

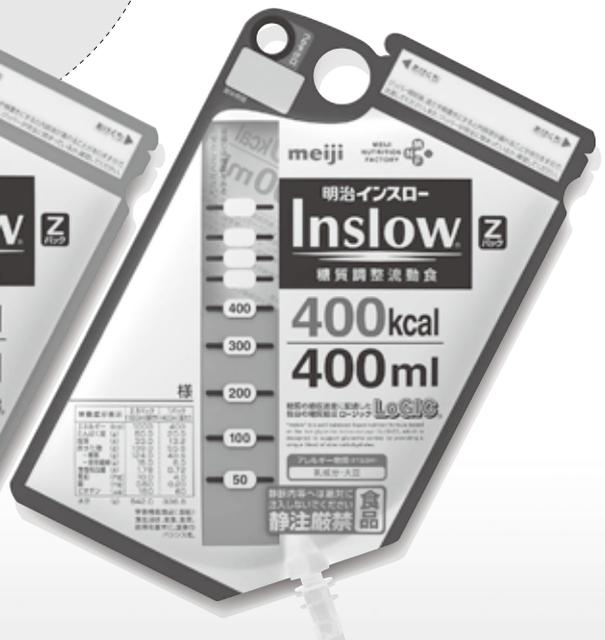
LoGIC[®]
 糖質の吸収速度に配慮した
 独自の糖質組成



200kcal/200ml



Zパック300K
300kcal/300ml



Zパック400K
400kcal/400ml

1.0kcal/ml <マロンフレーバー>

<商品についてのお問い合わせ先>

明治 お客様相談センター 9:00~17:00 月~金曜日(祝日も営業)※土・日・年末年始は休業

0120-201-369

明治ニュートリションインフォ

検索

株式会社 明治

安全と医療機器をともにお届けします

ISO 9001 認証登録

YAYOI
Corporation

医療機器・病院設備全般・SPDシステム
血管内治療用デバイス・整形外科関連製品
内視鏡関連製品・透析関連製品・ME機器管理



株式会社

やよい

■本社/〒670-0936 姫路市古二階町3番地
Tel:079(224)5151(代) Fax:079(224)2024

- | | |
|----------|-------------|
| ■ 姫路営業所 | □ アンギオ事業部 |
| ■ 神戸営業所 | □ 人工臓器事業部 |
| ■ 阪神営業所 | ■ 物流センター |
| ■ 大阪営業所 | ■ SPDセンター兵庫 |
| ■ 大阪南営業所 | □ SPDセンター大阪 |
| □ 津営業所 | □ 神戸SPDセンター |

■はISO 9001:2008の認証登録事業所です

ホームページ <http://www.kk-yayoi.co.jp>



NFACTOR

ペプチドベースの窒素源を用いる
適切な栄養管理を提案します。



Peptamen® AF

ペプタメン エーエフ

Peptamen® Standard

ペプタメン スタンダード

早期の集中的な栄養管理から
中・長期の継続的な栄養管理までカバーする
ペプタメンシリーズ



NestléHealthScience

NOURISHING PERSONAL HEALTH

ネスレ日本株式会社
ネスレ ヘルスサイエンス カンパニー

〒140-0002 東京都品川区東品川2-2-20
<http://www.nestlehealthscience.jp/>

循環管理を ボリュームステータスで 評価する



ClearSight



FloTrac



Edwards Oximetry
CV Catheter



Swan- Ganz Catheter

販売名／承認・認証番号
EV1000 クリティカルケアモニター／22300BZX00363
フロートラック センサー／21700BZY00348
エドワーズオキシメトリーCVカテーテル／22800BZX00169
スワンガンツ・サーモダイリュション・カテーテル (CCO/CEDV)／22800BZX00144

製造販売元 エドワーズライフサイエンス株式会社
本社：東京都新宿区西新宿6丁目10番1号 Tel.03-6894-0500 edwards.com/jp
© 2016 Edwards Lifesciences Corporation. All rights reserved. EW2016092



Edwards

