

エンドトキシン・ 自然免疫研究 22

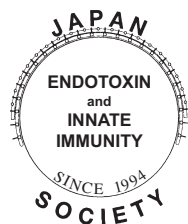
エンドトキシン・自然免疫研究の新たな可能性を求めて

編集

日本エンドトキシン・自然免疫研究会

川原 一芳

長岡 功



エンドトキシン・自然免疫研究 22

—エンドトキシン・自然免疫研究の新たな可能性を求めて—

編集

一般社団法人 日本エンドトキシン・自然免疫研究会

川原 一芳

長岡 功

執筆者一覧（敬称略）

- 狩野 裕考（東北医科薬科大学分子生体膜研究所機能病態分子学教室）
新田 昂大（東北医科薬科大学分子生体膜研究所機能病態分子学教室）
藤居 真優（大阪大学大学院理学研究科天然物有機化学研究室）
樺山 一哉（大阪大学大学院理学研究科天然物有機化学研究室）
下山 敦史（大阪大学大学院理学研究科天然物有機化学研究室）
深瀬 浩一（大阪大学大学院理学研究科天然物有機化学研究室）
Sandro Sonnino (University of Milan・Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine)
鈴木 明身（東北医科薬科大学分子生体膜研究所機能病態分子学教室）
井ノ口仁一（東北医科薬科大学分子生体膜研究所機能病態分子学教室）
Michael Kracklauer (Microcoat Biotechnologie GmbH)
田村 弘志 (LPS コンサルティング事務所)
長岡 功 (順天堂大学医学部生化学・生体防御学講座)
Johannes Reich (Microcoat Biotechnologie GmbH)
土谷 正和 (Charles River, Microbial Solutions)
小田 侑 (東亜ディーケーケー株式会社)
八幡 悟史 (東亜ディーケーケー株式会社)
野田 健一 (東亜ディーケーケー株式会社)
荒川 智 (東亜ディーケーケー株式会社)
名取 威徳 (帝京平成大学薬学部)
石井 絢菜 (千葉大学大学院医学研究院免疫細胞医学)
高見真理子 (千葉大学大学院医学研究院免疫細胞医学)
本橋新一郎 (千葉大学大学院医学研究院免疫細胞医学)
古賀 農人 (防衛医科大学校精神科学講座)
戸田 裕之 (防衛医科大学校精神科学講座)

木下 学 (防衛医科大学校免疫微生物学講座)
吉野 相英 (防衛医科大学校精神科学講座)
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)
諸石 寿朗 (熊本大学大学院生命科学研究部分子酵素化学講座)
若尾 雅広 (鹿児島大学大学院理工学研究科)
林 公子 (Moores Cancer Center, University of California, San Diego)
Cottam B. Howard (Moores Cancer Center, University of California, San Diego)
Carson A. Dennis (Moores Cancer Center, University of California, San Diego)
隅田 泰生 (鹿児島大学大学院理工学研究科)
四釜 洋介 (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)
黒澤 実愛 (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)
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)
竝河 悦子 (慶應義塾大学理工学部化学科)
柏原 瑛美 (慶應義塾大学理工学部化学科)
平田 菜摘 (慶應義塾大学理工学部化学科)
井貫 晋輔 (慶應義塾大学理工学部化学科)
藤本 ゆかり (慶應義塾大学理工学部化学科)
川原 一芳 (関東学院大学理工学部理工学科生命学系)
谷口 千穂 (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)
尾之上 さくら (関東学院大学理工学部理工学科生命学系)
橋本 雅仁 (鹿児島大学理工学域工学系)
川畑 俊一郎 (九州大学大学院理学研究院生物科学部門)
柴田 俊生 (九州大学大学院理学研究院生物科学部門)
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)
熊谷 由美 (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)
栞原 京子 (順天堂大学医学部微生物学講座)
山崎 達也 (愛知医科大学医学部感染・免疫学講座)
高村(赤司) 祥子 (愛知医科大学医学部感染・免疫学講座)

(執筆順)

序

第24回日本エンドトキシン・自然免疫研究会にご発表頂いた諸先生方から、発表内容を主題とする17題の総説原稿を頂き、ここに「エンドトキシン・自然免疫研究22」を発刊することができました。まずは、原稿を執筆頂いた先生方、研究会での全ての発表者の先生方、ご参加頂いた皆様、そして全ての会員の皆様に厚く御礼申し上げます。

第24回日本エンドトキシン・自然免疫研究会は、昨年(2018年)11月30日(金曜)、12月1日(土曜)の2日間にわたって横浜にて開催されました。11月30日のイブニングセミナーではギラン・バレー症候群研究の第一人者である結城伸泰先生から「カンピロバクターのリポオリゴ糖によるギラン・バレー症候群発症機序解明の道のり」という演題で貴重なご講演を賜りました。12月1日は午前中、優秀賞選考セッションで若手研究者の意欲的な講演を拝聴した後、ミニシンポジウムとして、本研究会の重要なテーマの1つであるエンドトキシンの測定法に関する最新的话题を、企業の研究者の皆様に提供して頂きました。午後のシンポジウムでは α ガラクトシルセラミドをとりあげ、この免疫活性を有する糖脂質の基礎から臨床応用までを専門の先生方にご講演頂き、さまざまな角度から議論しました。一般講演では、若手研究者から理事の先生方まで、多くの先生方に最新の研究内容を発表して頂きました。本誌の副題を「エンドトキシン・自然免疫研究の新たな可能性を求めて」とさせて頂きました通り、第24回研究会では、新たな研究の方向を示唆する多くのすばらしい講演が行われました。本誌では全てを網羅することはできませんでしたが、読者の皆様にそのエッセンスはお伝えすることができたと信じています。改めまして、研究会と本誌の発刊にあたって会員の皆様と出版社の皆様のご協力とご支援に深く感謝致します。

エンドトキシン研究はドイツのR. Pfeiffer博士に始まり、すでに100年以上の歴史を持つ伝統ある研究分野ですが、時代と共にいくつかの波があったように思います。近年では、1980年代のリピドAの化学合成によるエンドトキシン活性本体の証明と、20世紀末から21世紀初頭にかけてのトル様受容体(TLR)の研究があげられるかと思えます。いずれも日本人研究者が世界をリードしたことが特筆されます(リピドAの化学合成に関する大阪大学の芝先生、楠本先生達のご活躍については、最近Innate Immunity誌に書かせていただく機会がありました。ぜひご一読下さい。)。残念ながら現在は、TLR発見の高揚感がおさまり、研究面では少し静寂な状況かと思われそうですが、本誌にみられますように新しい研究の芽は随所に生まれ、成長の時を待っています。2020年度にはIEIIS Meetingが神戸で開催されますので、それに向けて、再び世界をリードする研究がわが国から発展していくことを期待します。本誌がその一助になることができれば幸いです。

2019年10月

第24回日本エンドトキシン・自然免疫研究会
当番世話人 川原 一芳
(関東学院大学理工学部理工学科生命学系)

も く じ

第1章 平成30年度日本エンドトキシン・自然免疫研究会奨励賞・優秀賞

- ガングリオシドのアシル鎖構造による Toll-like receptor 4 活性化
制御メカニズム……………狩野裕考 他… 1

第2章 ミニシンポジウム「エンドトキシン測定法の進歩と今後の展望」

1. Low Endotoxin Recovery……………Michael Kracklauer 他… 8
2. エンドトキシン試験で何を測定しているのか
—Low Endotoxin Recovery で考えさせられたこと—……………土谷正和 ……13
3. 生物発光を利用した透析液および透析用水中のエンドトキシン測定……………小田 侑 他…17

第3章 シンポジウム「 α ガラクトシルセラミドの基礎と臨床応用」

1. 海洋天然物と免疫作動性物質～ α -GalCer の基礎について～……………名取威徳 ……21
2. 非小細胞肺癌に対する NKT 細胞免疫療法の開発……………石井絢菜 他…25

第4章 一般演題

1. うつ病の病態における神経炎症仮説と治療ターゲットとしての可能性
【優秀演題賞】……………古賀農人 他…30
2. 新規アジュバントとしての TLR7 リガンド・糖鎖固定化金ナノ粒子の
開発【優秀演題賞】……………山口 徹 他…35
3. IL-29 は口腔粘膜上皮細胞において RIG-I および IFI-16 発現誘導を
介し抗ウイルス活性を増強する【優秀演題賞】……………四釜洋介 他…40
4. Th2 バイアス型脂質改変 CD1d リガンド開発と機能解析……………竝河悦子 他…43
5. *Klebsiella pneumoniae* のミリスチン酸転移酵素遺伝子を利用した
大腸菌リピド A の改変……………川原一芳 他…49
6. 酢酸菌による外膜小胞の産生とその性質……………橋本雅仁 ……54
7. LPS 感受性プロテアーゼ前駆体の自己触媒的活性化における
遷移状態を捕捉する……………川畑俊一郎 他…58
8. *Fusobacterium nucleatum* によるマスト細胞の細胞外トラップ放出と
炎症誘導……………多田浩之 他…63
9. 抗菌ペプチド LL-37 による好中球細胞外小胞（エクトソーム）の
放出を介したマウス敗血症の病態改善……………熊谷由美 他…67
10. コレラ菌抽出物による IgE の不活化とアナフィラキシーの抑制……………山崎達也 他…72
11. ハチ毒 PLA2 の機能と免疫応答への影響……………高村（赤司）祥子 ……79

御案内

第1章

平成30年度日本エンドトキシン・
自然免疫研究会奨励賞・優秀賞

ガングリオシドのアシル鎖構造による Toll-like receptor 4 活性化制御メカニズム

狩野 裕考¹⁾, 新田 昂大¹⁾, 藤居 真優²⁾, 樺山 一哉²⁾,
下山 敦史²⁾, 深瀬 浩一²⁾, Sandro Sonnino³⁾, 鈴木 明身¹⁾, 井ノ口仁一¹⁾

¹⁾東北医科薬科大学分子生体膜研究所機能病態分子学教室, ²⁾大阪大学大学院理学研究科天然物有機化学研究室
³⁾University of Milan · Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine

Acyl-chain structures of gangliosides GM3 species regulate TLR4 signaling

Hiroataka Kanoh¹⁾, Takahiro Nitta¹⁾, Mayu Fujii²⁾, Kazuya Kabayama²⁾,
Atsushi Shimoyama²⁾, Koichi Fukase²⁾, Sandro Sonnino³⁾, Akemi Suzuki¹⁾, Jin-ichi Inokuchi¹⁾

¹⁾Division of Glycopathology, Institute of Molecular Biomembrane and Glycobiology, Tohoku Medical and Pharmaceutical University
²⁾Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University
³⁾Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, University of Milan

Abstract

Innate immune signaling via endogenous TLR4 ligands plays important roles in pathogenesis of metabolic disorders. Recently, we found that ganglioside GM3, one of glycosphingolipids, acts as an endogenous TLR4 modulator. GM3 ganglioside in human serum is comprised of a variety of fatty acids including long-chain (LCFA), very long-chain (VLCFA), and those with modifications such as ω -9 desaturation and α -hydroxylation. VLCFA GM3 synergistically and selectively enhanced TLR4 activation by LPS and HMGB1, and in contrast, LCFA- and unsaturated VLCFA GM3 inhibited TLR4 activation. In metabolic disorders, serum VLCFA GM3 increased, while LCFA GM3 decreased, indicating the proinflammatory shift of GM3 species. VLCFA- and α -hydroxyl GM3 increased in the adipose tissue of obese mice, and the increase was attenuated in TLR4-mutant mice, implying that TLR4 signaling itself is involved in production of VLCFA GM3. Our findings suggest that serum GM3 species modulate TLR4 signaling, and the increase of VLCFA GM3 is a risk factor for TLR4-mediated disease progression.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 1~7, 2019

Key words : Toll-like receptor 4 (TLR4), 慢性炎症, 内因性リガンド, ガングリオシド GM3, スフィンゴ糖脂質

はじめに

自然免疫応答は、病原体に対する宿主防御を介して恒常性の維持に大きく寄与している。一方で、自然免疫応答の慢性持続化、すなわち慢性炎症を生じた場合には、多様な疾患の発症原因となりうる。とくに、Toll-like receptor (TLR) を介した自然免疫応答は、病原体の排除や獲得免疫系の活性化によって生体恒常性の維持に大きく貢献する一方で、がんや自己免疫疾患、メタボリックシンドロームの発症の基盤である慢性炎症の原因となりうるということがわかってきた^{1,2)}。どのようにして、恒常性

維持機構としての自然免疫応答が、疾患発症原因としての慢性炎症反応へと変貌するのか、その分子メカニズムの全容解明と新たな診断法・治療法への応用が大きく期待されている。近年では、その答えの一つとして、生体内で産生される自然免疫応答活性化リガンド、すなわち内因性リガンドによる慢性炎症メカニズムが示唆されている。

われわれは、生体内で産生される糖脂質として、セラミドとシアル酸含有糖鎖から構成されるスフィンゴ糖脂質：ガングリオシドに注目した研究をこれまでに展開してきた。ガングリオシドの生理活性を追求するなかで、

血清中や脂肪組織に含まれるガングリオシド GM3 が、TLR4 に対する内因性モジュレーターとして働き、メタボリックシンドロームにおける慢性炎症の原因の一つとなることを見出した。

本稿では、スフィンゴ糖脂質が慢性炎症の惹起や進行に関与する分子メカニズムに焦点をあて、とくにガングリオシド GM3 の役割と、その脂肪酸（アシル）鎖の構造による TLR4 活性化の制御機構について、最新の知見を交えて概説する。

1. Toll-like receptor 4 を介した自然免疫応答と慢性炎症の分子基盤

Toll-like receptor (TLR) および Toll 受容体は、ヒトやマウスといった脊椎動物からショウジョウバエを含む無脊椎動物に至るまで、進化的に広く保存されている^{3,4)}。TLR はヒトでは 10 種類、マウスでは 13 種類が同定されており、ショウジョウバエでは 9 種類の Toll ホモログが存在する。いずれも、共通の生理学的機能として、病原体感染時における自然免疫活性化の起点を担っている。一方で、TLR および Toll 活性化のメカニズムには明瞭な違いがある。それは、ヒト、マウス系の TLR ホモログは、直接的に病原体由来の外因性リガンドを認識して活性化するのに対して、Toll ホモログは、病原体感染などによって生じた内因性リガンドを認識して活性化する点である。進化的に保存された受容体の活性化メカニズムが大きく異なるという点は生物学的に大変興味深く、かつ、後述するように、外因性および内因性リガンドの双方が TLR 活性化に関与できるという点を分子進化的に暗にほのめかしている。

あらためて自然免疫系と疾患との関係に目を向けると、慢性持続的な自然免疫応答の活性化が、がんや自己免疫疾患、メタボリックシンドロームの発症の基盤である慢性炎症の原因となることが明らかとなってきている¹²⁾。とくに、メタボリックシンドロームにおける慢性炎症は、TLR や C-type lectin receptor (CLR) などのパターン認識受容体と、下流の転写因子 NF- κ B の活性化が原因と考えられている^{3~6)}。よく知られているように、TLR4 およびコレセプター分子である myeloid differentiation protein-2 (MD-2)、cluster of differentiation 14 (CD14) の複合体は、外因性の病原体関連分子パターン：PAMPs であるリポ多糖 (LPS) をリガンドとして認識する^{3,4)}。LPS は、主にグラム陰性細菌の細胞壁外膜に由来する糖脂質であり、その炎症惹起活性から内毒素：エンドトキシンと呼ばれる。興味深いことに、その由来や測定法については議論が続いているが、肥満およびメタボリックシンドローム患者において、血清中の総エンドトキシン濃度の上昇が報告されている⁷⁾。

一方、TLR4 に作用するリガンドは生体内にも存在することが、近年明らかとなってきている。High-mobility

group box-1 protein (HMGB1) は、本来は核内タンパク質として機能するが、死細胞の染色体や、メタボリックシンドローム時の肥大化脂肪細胞から細胞外へと放出されることで、TLR4 の内因性リガンドとして機能する^{8,9)}。同様に、肥大化脂肪細胞から放出される遊離脂肪酸や、遊離脂肪酸のキャリアータンパク質として機能する fetuin-A は、メタボリックシンドロームにおける TLR4 活性化に関与することが報告されている^{10,11)}。一方で、遊離脂肪酸それ自体は TLR4 リガンドではないという報告もあり、その実体については議論が続いている¹²⁾。加えて、寒冷刺激によって放出される cold-inducible RNA-binding protein (CIRP)、がん転移に関与する S100A8/9 や serum amyloid A (SAA) も、TLR4 活性化を生じる^{13,14)}。これらの内因性リガンドは、細胞・組織の異常に由来する傷害関連分子パターン：DAMPs、または danger signal, alarmin などとして総称されている。

実際のところ、TLR4 ノックアウトマウスでは、糖代謝異常などのメタボリックシンドロームの症状が大きく緩和されている¹⁰⁾。これらを総括すると、メタボリックシンドロームの発症・進行過程では、多様な外因性・内因性リガンドによる TLR4 活性化が重要な役割を果たしているといえる。

2. ガングリオシドの生合成経路と自然免疫応答への関与

スフィンゴ糖脂質とは、セラミドを脂質構造とする糖脂質を主に指す。セラミドは、セリンとパルミトイル CoA をもとに生合成されたスフィンゴイド塩基と、脂肪酸（アシル鎖）がアミド結合した脂質であり、酵母から動物、植物に至るまで広くみられる。このセラミドへの糖および糖鎖の付加によって、さまざまなスフィンゴ糖脂質が生合成される。

近年では、スフィンゴ糖脂質を介した自然免疫応答の活性化・調節機構が急速に明らかとなりつつある。セラミドへのグルコース付加によって生じるグルコシルセラミド GlcCer は、抗原提示細胞である樹状細胞において、CLR の一つである Mincle の活性化を引き起こす¹⁵⁾。Mincle は、肥満時の脂肪組織で発現量が増加しており、さらに *Mincle*-KO マウスでは、メタボリックシンドロームの症状が緩和されることもわかってきている^{5,16)}。続いて、GlcCer へのガラクトース付加で生成するラクトシルセラミド LacCer は、好中球における自然免疫応答に関与する。LacCer は、細胞膜上で互いに集合した脂質クラスター（脂質マイクロドメイン：後述）を形成する。これが抗酸菌細胞壁の糖脂質リポアラビノマンナン認識に関与し、Src ファミリーチロシンキナーゼ Lyn によるシグナル伝達を介して貪食後の食胞成熟と殺菌機構の活性化に大きく寄与する¹⁷⁾。さらに、LacCer へのガラクトース、N-アセチルガラクトサミン付加で生じるグロ

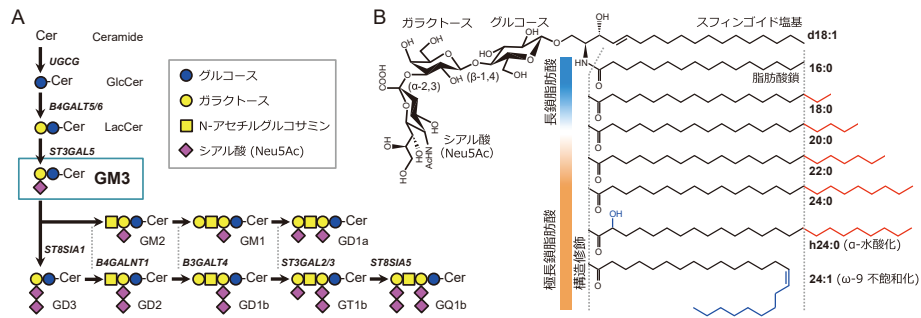


図 1 A: ガングリオシド生成経路, B: 血清 GM3 分子種の脂肪酸鎖長・構造修飾

ボ系スフィンゴ糖脂質 Gb3 および Gb4 は、血管内皮細胞やマクロファージにおける TLR4 活性化制御に関与することが報告されている^{18,19)}。

加えて、LacCer を前駆体とするスフィンゴ糖脂質としてよく知られているのは、シアル酸の付加によって生じるガングリオシドである (図 1A)。GM3 は、LacCer に α 2,3 結合でシアル酸が付加した最もシンプルなガングリオシドであり、ほとんどのガングリオシドの前駆体となる。GM3 は、ヒトおよびマウスの脂肪組織や筋肉、ヒト肝臓および血清中など、末梢組織で主に発現するガングリオシドである^{20~23)}。一方、さらなる糖鎖付加を受けたガングリオシド (GM1, GD1a/b, GT1b, GQ1b など) は、対照的に脳・中枢神経系で発現している。これらのガングリオシドに対する自己抗体の発現は、ギランバレー症候群などの重篤な疾患の原因となりうる²⁴⁾。脂肪細胞における GM3 の発現は、組織マクロファージに由来する炎症性サイトカイン TNF- α や IL-1 β の刺激によって誘導されている^{25,26)}。肥満時には、脂肪組織へのマクロファージ浸潤が生じ、炎症性サイトカイン産生による慢性炎症を介して、インスリン抵抗性を呈することが良く知られている^{1,2)}。食欲抑制ホルモンであるレプチンの欠損によって肥満・メタボリックシンドロームを呈する *ob/ob* マウスや、高脂肪食によって誘導された肥満モデルマウスの脂肪組織ではマクロファージ浸潤・慢性炎症が生じるが、実際に内臓脂肪組織における GM3 の発現量と GM3 合成酵素 (*GM3S*, *St3gal5*) の遺伝子発現を調べると、それらが大幅に亢進している^{25,26)}。一般に、GM3 などのスフィンゴ糖脂質は、細胞膜上で互いに集合したクラスター、すなわち、脂質マイクロドメインと呼ばれるシグナル伝達プラットフォームを形成する²⁰⁾。GM3 の発現によって、細胞膜上におけるインスリン受容体の拡散速度が影響を受け、シグナル伝達効率が大きく制限されることでインスリン抵抗性を生じることが、生細胞分子イメージング法によって示唆されている²⁷⁾。反対に、グルコシルセラミド合成酵素阻害薬である D-PDMP や Genz-123346 を用いて、GM3 の合成を阻害すると、脂肪細胞におけるインスリン抵抗性が解除される^{25,28)}。興味深いのは、*GM3S*-KO マウスにおいては、

全身のインスリン感受性が改善するだけでなく、肥満による慢性炎症も大きく緩和されていることである^{26,29)}。このことは、インスリン抵抗性よりも上流で、GM3 を介した慢性炎症メカニズムが存在することを示唆している。メタボリックシンドロームに関連する TLR4 リガンドには、肥満時に脂肪組織中の発現量や血清中への分泌量が増加する特徴があり、上述のように GM3 もその特徴を満たしている。そこで、実際に GM3 が TLR4 を介して自然免疫応答を活性化する可能性を検討することにした。

3. ガングリオシド分子種の脂肪酸構造を介した TLR4 活性化制御機構

ここで重要なのは、脂肪組織や血清中に存在する GM3 には、同じ糖鎖を持ちながら、異なるセラミド構造を持つ多様な分子種が存在している点である。とくに、スフィンゴシンと脂肪酸からなるセラミド構造のうち、脂肪酸鎖の鎖長 (長鎖脂肪酸 [16:0, 18:0, 20:0]、極長鎖脂肪酸 [22:0, 23:0, 24:0]) と構造修飾 (α -水酸化 [h24:0]、 ω -9 不飽和化 [24:1]) について、それらの組み合わせによる幅広い多様性がみられる (図 1B)。興味深いことに、これらの GM3 分子種の血清中発現パターンが、メタボリックシンドロームの発症過程で変動することはわかってきたが³⁰⁾、一方で各分子種の生理活性とその変動の意義は不明のままであった。

そこで、ヒト末梢血由来単球における自然免疫応答を指標に、代表的な GM3 分子種 (16:0, 18:0, 20:0, 22:0, 24:0, h24:0, 24:1) の生理活性を検討した (図 2A)。その結果、ヒト TLR4/MD-2 複合体を介した炎症性サイトカイン産生に対して、長鎖脂肪酸の GM3 分子種 (16:0, 18:0) は抑制的に作用し、一方、極長鎖脂肪酸の GM3 分子種 (22:0, 24:0, h24:0) は TLR4 活性化を強く促進することがわかった³¹⁾。一方で、極長鎖脂肪酸でも、不飽和化を受けた GM3 分子種 (24:1) は、TLR4 に対して抑制的に作用した。興味深いことに、これらの作用は、LPS や Lipid-A, HMGB1 などの TLR4 リガンドに対して選択的に生じ、そのほかの TLR リガンドに対しては影響を及ぼさないことがわかった。ま

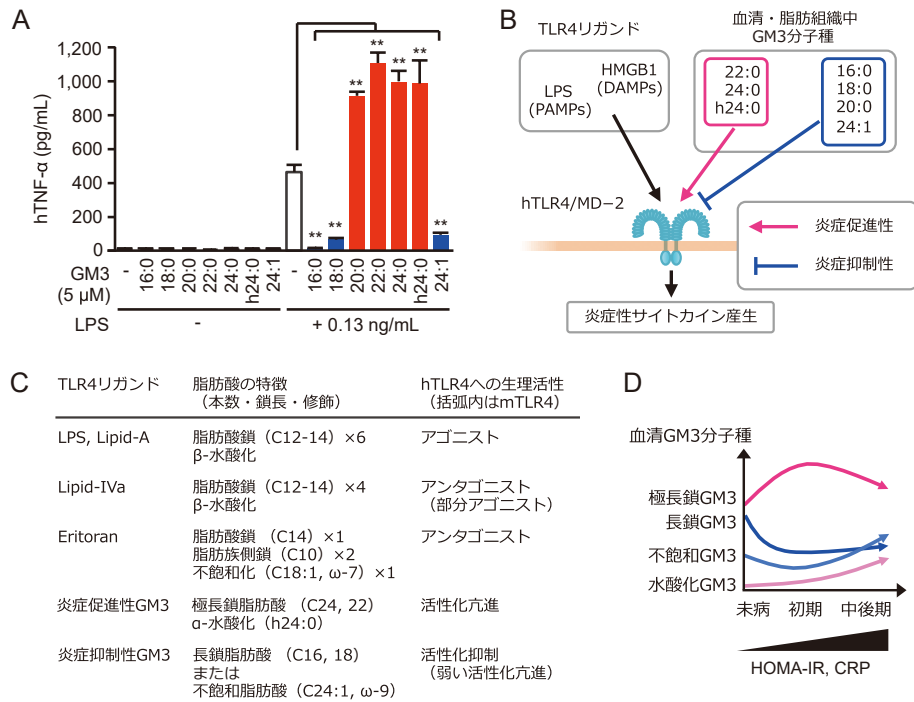


図 2 A : GM3 分子種による TLR4 活性化制御, B : GM3 分子種によるヒト TLR4/MD-2 活性化への作用 (模式図), C : LPS および GM3 分子種の構造活性相関, D : メタボリックシンドローム発症過程における血清 GM3 分子種の挙動 (模式図)

た, GM3 単独では活性化・抑制作用を示さず, TLR4 リガンドの存在下で初めて, 活性化制御を示す点も特徴的であった。これらを総括すると, GM3 分子種は, その脂肪酸構造に依存して炎症抑制性と炎症促進性を併せ持つ, TLR4 選択的な内因性モジュレーターであると考えられる (図 2B)。

加えて, マウス TLR4/MD-2 複合体を介した自然免疫応答に対しても, GM3 分子種の生理活性を検討した。極長鎖脂肪酸の GM3 分子種については, ヒトの場合と同様に TLR4 活性化を強く促進した。一方で, 長鎖脂肪酸や不飽和脂肪酸の GM3 分子種では, ヒト TLR4 に対するような抑制性はみられず, TLR4 活性化を弱く促進した。すなわち, マウス TLR4 に対しては, GM3 分子種全体が炎症促進性を持つこと, その生理活性がアシル鎖長に比例して増大することがわかった。

これまでに, グロボ系スフィンゴ糖脂質 Gb3/Gb4 も, ヒト, マウス TLR4/MD-2 に対して活性化制御を行うことが報告されている¹⁸⁾。とくに, 糖尿病性腎症においては, 極長鎖脂肪酸をもつ Gb3 分子種を介した TLR4/MD-2 の活性化と, それに伴う慢性炎症が示唆された¹⁹⁾。この場合でも, 極長鎖 Gb3 は TLR4 リガンド選択的に活性化の促進を生じた。これらの報告や今回の結果を合わせると, 一部のスフィンゴ糖脂質による脂肪酸鎖長を介した自然免疫応答制御は, TLR4 とその周辺の調節因子に対して選択性を持っていることがうかがえる。

4. LPS と ganglioside 分子種における脂肪酸構造-活性相関の比較

前述した GM3 分子種の生理活性や, ヒトとマウスにおける作用の違いはなぜ生じ, どのようにして TLR4/MD-2 による GM3 認識機構と関係しているのだろうか。LPS が TLR4 リガンドとして作用する場合, 糖鎖構造は TLR4 が, 脂肪酸構造は MD-2 が, それぞれ認識する^{32,33)}。さらに LPS では, 脂肪酸構造の多様性と生理活性の変化について多くの報告がある³⁴⁻³⁹⁾。LPS のコア構造である Lipid-A は, 6 本の脂肪酸を持ち, ヒト・マウスの TLR4/MD-2 に対してともにアゴニストとして作用する (図 2C)。一方, Lipid-A の前駆体である Lipid-IVa は, 4 本の脂肪酸を持ち, ヒト TLR4/MD-2 ではアンタゴニストとして, マウス TLR4/MD-2 では部分アゴニストとして作用する (図 2C)。そして, 上記の生理活性と脂肪酸数の相関性は, MD-2 の生物種に依存しており, マウス TLR4/ヒト MD-2 キメラ複合体に対しては, ヒト TLR4/MD-2 複合体と同様に, Lipid-IVa による抑制効果がみられる。さらに, Lipid-IVa アナログである TLR4 阻害薬 eritoran は, MD-2 への結合を介した阻害効果に関与する不飽和脂肪酸 (18:1, ω7) を持つ⁴⁰⁾ (図 2C)。この二重結合部位で, 不飽和脂肪酸鎖は 180° 反転しつつ MD-2 の疎水性ポケットに結合しており, 見かけの鎖長の短縮と結合力 (疎水性) の増大を同時に達成していると考えられる。

GM3 は、グルコース、ガラクトース、シアル酸からなる糖鎖と、異なる脂肪酸構造を含むセラミド部分を持つ点で、すなわち糖脂質自体の性質で LPS とよく類似している。したがって、MD-2 が GM3 の脂肪酸構造の認識に関与する可能性は十分に考えられる。そこで、マウス TLR4/MD-2 複合体、ヒト TLR4/MD-2 複合体、そしてマウス TLR4/ヒト MD-2 からなるキメラ複合体を用いて、GM3 16:0 の生理活性を比較検討した。その結果、マウス TLR4/ヒト MD-2 キメラ複合体に対しても、ヒト TLR4/MD-2 複合体と同様に、GM3 16:0 は抑制的に作用した。すなわち、脂肪酸構造にもとづく GM3 の生理活性は、MD-2 に依存することがわかった。この結果は、もう一つの重要な側面として、GM3 が脂質膜上から TLR4 を制御する可能性に加え、LPS と同様に糖脂質リガンドとして MD-2 を介して TLR4 に作用する可能性を示唆している。Native-PAGE 法などを用いた TLR4/MD-2 複合体（細胞外ドメイン）と GM3 分子種の相互作用解析によっても、GM3 と TLR4/MD-2 の相互作用や、TLR4/MD-2 複合体の二量体化・多量体化と考えられる分子量の増大が確認できた。上記のような GM3 分子種でみられた生理活性と脂肪酸鎖長・修飾の関係性、MD-2 への依存性は、Lipid-A/IVa や eritoran の場合と良く類似しており（図 2C）、脂質構造の大きさによる TLR4 の活性化制御機構は、糖脂質性のリガンド間において保存されていると考えられる。

5. GM3 分子種の脂肪酸鎖長・構造修飾の変化と疾患発症への関与

では、どのようにして GM3 分子種の脂肪酸構造の変化がメタボリックシンドロームの発症や進行とかかわるのだろうか。そこで、メタボリックシンドロームの発症過程における血清 GM3 分子種の発現量を質量分析法によって測定し、その発現変動パターンを解析した（図 2D）。自然免疫応答に対する生理活性をもとに GM3 分子種を分類すると、長鎖 GM3 分子種（16:0, 18:0, 20:0）は炎症抑制性、極長鎖 GM3 分子種（22:0, 24:0, h24:0）は炎症促進性であり、極長鎖不飽和 GM3 分子種（24:1, h24:1）は炎症抑制性と考えられる。その結果、炎症抑制性の GM3 分子種（16:0, 18:0）は、未病の肥満や初期メタボリックシンドロームにおいて急激に減少していた。反対に、炎症促進性の GM3 分子種（22:0, 23:0, 24:0, h24:0）は大きく増加していた。とくに、水酸化極長鎖 GM3 h24:0 は、肥満の指標である BMI、腹囲、そして慢性炎症の指標かつ炎症性サイトカイン IL-6 の代替マーカーである CRP と、強く正の相関を示した。また、より重度の肥満・メタボリックシンドロームでは、肥満時に増加した極長鎖 GM3 が減少に転じ、代わりに不飽和化極長鎖 GM3（22:1, 24:1, h24:1）の発現が増加した。これらを総括すると、肥満やメタボ

リックシンドローム発症初期においては、GM3 分子種の炎症促進性シフトに伴って慢性炎症が生じていると考えられる。重症期では、極長鎖脂肪酸の不飽和化によって、GM3 の炎症促進性を抑える機構が働いていると考えられる。さらに、肥満モデルマウス（*ob/ob* マウス、および高脂肪食負荷マウス）の内臓脂肪組織についても GM3 分子種を解析した。その結果、水酸化極長鎖 GM3 分子種が大きく増加していた。おそらく、ヒト血清中の水酸化極長鎖 GM3 の増加は、内臓脂肪組織における GM3 分子種の変化が反映された可能性がある。これらに加え、内臓脂肪組織における水酸化極長鎖 GM3 の増加は、TLR4 の機能欠損変異体（C3H/HeJ）マウスにおいて緩和されていた。したがって、炎症促進性 GM3 の発現増加は、その受容体である TLR4 を介した炎症性サイトカイン産生に一部依存していると考えられる。

6. GM3 分子種の脂肪酸鎖長・構造修飾の制御メカニズム

ガングリオシドの生合成メカニズムは、スフィンゴイド塩基、脂肪酸、そしてシアル酸を含む糖鎖に至るまで、幅広い生体関連因子の生合成・代謝経路に依存している。それゆえ、GM3 分子種の発現量を制御する分子メカニズムは、極めて複雑であると予想される。GM3 分子種全体の発現量にかかわる GM3 合成酵素（*GM3S*, *St3gal5*）の発現量は、前述のように、組織マクロファージに由来する炎症性サイトカイン TNF- α や IL-1 β の刺激によって制御されている^{25,26)}。一方で、脂肪酸鎖長の制御にかかわる因子としては、これまでに脂肪酸伸長酵素 ELOVL が知られている。とくに、*Elovl3-KO* マウスや *Elovl6-KO* マウスでは、肥満によるメタボリックシンドロームの進行が緩和されることが知られている^{42,43)}。ELOVL6 は長鎖脂肪酸 16:0 を 18:0 へ、ELOVL3 は 18:0 を 20:0 に伸長する反応を担っており、極長鎖脂肪酸の前駆体の生合成に関与している。野生型と比べて *Elovl6-KO* マウスの脂肪酸組成は、18:0 から 24:0 において減少しており、マウス TLR4 に対する主要な炎症促進性 GM3 分子種が減少している可能性が考えられる。加えて、炎症反応の後期では、脂肪酸の不飽和化が生じ、自然免疫応答の終息に不可欠であることが報告されている⁴⁴⁾。これは、GM3 においても、重症期の不飽和 GM3 の増加として反映されていると考えられる。一方、水酸化修飾は、水酸化による水溶性の増大が血清中への GM3 分泌量に影響する可能性や、 α -酸化経路を介した極長鎖脂肪酸の分解亢進との関連性が考えられる⁴⁵⁾。さらには、肥満時に生じる、セラミド合成酵素 CerS2/6 の発現変化や β -酸化経路の障害も、GM3 分子種のバランスの変化に関与する可能性がある^{46,47)}。CerS2/6 には、長鎖脂肪酸と極長鎖脂肪酸の選択性に違いがあり、それらの発現バランスによってセラミドの脂肪酸組成が制御され

うる。これらの分子メカニズムと GM3 分子種変化との関連を解明するには、セラミドから GM3 に至るまでの網羅的な分子種発現解析と遺伝子発現解析が必要であり、今後の進展が期待される。このように、GM3 分子種は複雑な発現メカニズムを有していると予想されるが、一方で、多くの因子に依存するという事は、多くの調節点を持つことに他ならない。GM3 分子種の発現調節メカニズムは、さまざまなストレスや脂質代謝の変化を受け取り、それを TLR4 経路の自然免疫応答へと反映させることが可能なシステムであるのかもしれない。その破綻が、恒常性維持機構としての自然免疫応答を、疾患発症原因である慢性炎症へと導くというのは、想像に難くないと思われる。

おわりに

今回、ガングリオシド GM3 と TLR4、そして肥満やメタボリックシンドロームの病態に焦点をあて、ガングリオシドの脂肪酸鎖による自然免疫応答の制御機構について概説した。TLR4 を介した慢性炎症は、多様な炎症性疾患やがんの発症にも深く関与しており、全身を循環する血清 GM3 分子種の発現変動パターンと、さまざまな疾患との関連性が今後示されるかもしれない。一方で、GM3 分子種と LPS が同時に TLR4/MD-2 に作用したときに、どのような活性化複合体を形成し、どのようなシグナル伝達様式をとるのかは不明なままである。加えて、血清中への極長鎖 GM3 分子種の分泌様式や TLR4 への提示メカニズムについても詳細な解析が期待される。今後は、構造生物学的手法や、生細胞イメージング手法を取り入れたアプローチによって、GM3 分子種のアシル鎖構造がどのようにして TLR4/MD-2 複合体に提示・認識され、その活性化制御を行っているのかを解明していきたい。

文 献

- Hotamisligil GS : Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature* 542 : 177-185, 2017
- Lumeng CN, Saltiel AR : Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest* 121 : 2111-2117, 2011
- Moresco EM, LaVine D, Beutler B : Toll-like receptors. *Curr Biol* 21 : R488-R493, 2011
- Kawai T, Akira S : Toll-like receptors and their cross-talk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34 : 637-650, 2011
- Tanaka M, Ikeda K, Suganami T, et al. : Macrophage-inducible C-type lectin underlies obesity-induced adipose tissue fibrosis. *Nat Commun* 5 : 4982, 2014
- Baker RG, Hayden MS, Ghosh S : NF- κ B, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab* 13 : 11-22, 2011
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. : Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56 : 1761-1772, 2007
- Harris HE, Andersson U, Pisetsky DS : HMGB1 : A multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nat Rev Rheumatol* 8 : 195-202, 2012
- Guzmán-Ruiz R, Ortega F, Rodriguez A, et al. : Alarmin high-mobility group B1 (HMGB1) is regulated in human adipocytes in insulin resistance and influences insulin secretion in β -cells. *Int J Obes (Lond)* 38 : 1545-1554, 2014
- Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, et al. : TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116 : 3015-3025, 2006
- Pal D, Dasgupta S, Kundu R, et al. : Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat Med* 18 : 1279-1285, 2012
- Lancaster GI, Langley KG, Berglund NA, et al. : Evidence that TLR4 Is Not a Receptor for Saturated Fatty Acids but Mediates Lipid-Induced Inflammation by Reprogramming Macrophage Metabolism. *Cell Metab* 27 : 1096-1110, 2018
- Qiang X, Yang WL, Wu R, et al. : Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) triggers inflammatory responses in hemorrhagic shock and sepsis. *Nat Med* 19 : 1489-1495, 2013
- Hiratsuka S, Watanabe A, Sakurai Y, et al. : The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nat Cell Biol* 10 : 1349-1355, 2008
- Nagata M, Izumi Y, Ishikawa E, et al. : Intracellular metabolite β -glucosylceramide is an endogenous Mincle ligand possessing immunostimulatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 114 : E3285-E3294, 2017
- Ichioka M, Suganami T, Tsuda N, et al. : Increased expression of macrophage-inducible C-type lectin in adipose tissue of obese mice and humans. *Diabetes* 60 : 819-826, 2011
- Nakayama H, Kurihara H, Morita YS, et al. : Lipoarabinomannan binding to lactosylceramide in lipid rafts is essential for the phagocytosis of mycobacteria by human neutrophils. *Sci Signal* 9 : ra101, 2016
- Kondo Y, Ikeda K, Tokuda N, et al. : TLR4-MD-2 complex is negatively regulated by an endogenous ligand, globotetraosylceramide. *Proc Natl Acad Sci USA* 110 : 4714-4719, 2013
- Nitta T, Kanoh H, Inamori KI, et al. : Globo-series glycosphingolipids enhance Toll-like receptor 4-mediated inflammation and play a pathophysiological role in diabetic nephropathy. *Glycobiology* 29 : 260-268, 2019

- 20) Inokuchi J, Inamori KI, Kabayama K, et al. : Biology of GM3 ganglioside. *Prog Mol Biol Transl Sci* 156 : 151-195, 2018
- 21) Go S, Go S, Veillon L, et al. : Altered expression of ganglioside GM3 molecular species and a potential regulatory role during myoblast differentiation. *J Biol Chem* 292 : 7040-7051, 2017
- 22) Wentworth JM, Naselli G, Ngui K, et al. : GM3 ganglioside and phosphatidylethanolamine-containing lipids are adipose tissue markers of insulin resistance in obese women. *Int J Obes (Lond)* 40 : 706-713, 2016
- 23) Senn HJ, Orth M, Fitzke E, et al. : Gangliosides in normal human serum. Concentration, pattern and transport by lipoproteins. *Eur J Biochem* 181 : 657-662, 1989
- 24) Yuki N, Hartung HP : Guillain-Barré syndrome. *N Engl J Med* 366 : 2294-2304, 2012
- 25) Tagami S, Inokuchi Ji J, Kabayama K, et al. : Ganglioside GM3 participates in the pathological conditions of insulin resistance. *J Biol Chem* 277 : 3085-3092, 2002
- 26) Nagafuku M, Sato T, Sato S, et al. : Control of homeostatic and pathogenic balance in adipose tissue by ganglioside GM3. *Glycobiology* 25 : 303-318, 2015
- 27) Kabayama K, Sato T, Saito K, et al. : Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 : 13678-13683, 2007
- 28) Zhao H, Przybylska M, Wu IH, et al. : Inhibiting glycosphingolipid synthesis improves glycemic control and insulin sensitivity in animal models of type 2 diabetes. *Diabetes* 56 : 1210-1218, 2007
- 29) Yamashita T, Hashiramoto A, Haluzik M, et al. : Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 : 3445-3449, 2003
- 30) Veillon L, Go S, Matsuyama W, et al. : Identification of Ganglioside GM3 Molecular Species in Human Serum Associated with Risk Factors of Metabolic Syndrome. *PLoS One* 10 : e0129645, 2015
- 31) Kanoh H, Nitta T, Go S, et al. : Homeostatic and pathogenic roles of GM3 ganglioside molecular species in TLR4 signaling in obesity. *EMBO J* (in revision)
- 32) 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
- 33) Ohto U, Fukase K, Miyake K, et al. : Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 109 : 7421-7426, 2012
- 34) Mueller M, Lindner B, Kusumoto S, et al. : Aggregates are the biologically active units of endotoxin. *J Biol Chem* 279 : 26307-26313, 2004
- 35) Akashi S, Nagai Y, Ogata H, et al. : Human MD-2 confers on mouse Toll-like receptor 4 species-specific lipopolysaccharide recognition. *Int Immunol* 13 : 1595-1599, 2001
- 36) 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
- 37) 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
- 38) Wang MH, Feist W, Herzbeck H, et al. : Suppressive effect of lipid A partial structures on lipopolysaccharide or lipid A-induced release of interleukin 1 by human monocytes. *FEMS Microbiol Immunol* 2 : 179-185, 1990
- 39) Galanos C, Lehmann V, Lüderitz O, et al. : Endotoxic properties of chemically synthesized lipid A part structures. Comparison of synthetic lipid A precursor and synthetic analogues with biosynthetic lipid A precursor and free lipid A. *Eur J Biochem* 140 : 221-227, 1984
- 40) 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
- 41) Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, et al. : Role of the Toll-like receptor 4/NF- κ B pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27 : 84-91, 2007
- 42) Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, et al. : Crucial role of a long-chain fatty acid elongase, Elovl6, in obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 13 : 1193-1202, 2007
- 43) Zadavec D, Brolinson A, Fisher RM, et al. : Ablation of the very-long-chain fatty acid elongase ELOVL3 in mice leads to constrained lipid storage and resistance to diet-induced obesity. *FASEB J* 24 : 4366-4377, 2010
- 44) Oishi Y, Spann NJ, Link VM, et al. : SREBP1 Contributes to Resolution of Pro-inflammatory TLR4 Signaling by Reprogramming Fatty Acid Metabolism. *Cell Metab* 25 : 412-427, 2017
- 45) Hama H : Fatty acid 2-Hydroxylation in mammalian sphingolipid biology. *Biochim Biophys Acta* 1801 : 405-414, 2010
- 46) Raichur S, Wang ST, Chan PW, et al. : CerS2 haploinsufficiency inhibits β -oxidation and confers susceptibility to diet-induced steatohepatitis and insulin resistance. *Cell Metab* 20 : 687-695, 2014
- 47) Turpin SM, Nicholls HT, Willmes DM, et al. : Obesity-induced CerS6-dependent C16 : 0 ceramide production promotes weight gain and glucose intolerance. *Cell Metab* 20 : 678-686, 2014

第2章

ミニシンポジウム

「エンドトキシン測定法の進歩と今後の展望」

Low Endotoxin Recovery

Michael Kracklauer¹⁾, Hiroshi Tamura^{2,3)}, Isao Nagaoka³⁾, Johannes Reich¹⁾

¹⁾Microcoat Biotechnologie GmbH

²⁾LPS (Laboratory Program Support) Consulting Office

³⁾Department of Host Defense and Biochemical Research, Juntendo University Graduate School of Medicine

Abstract

Endotoxin in the bloodstream presents a severe health risk already in small doses. Thus endotoxin tests are extremely important and mandatory for release of parenteral administered drugs. For detection of endotoxin, Limulus-based methods are the gold standard. Many Drug Products however cause interference with such detection methods. Very often this interference can be overcome by dilution, but not in the case of Low Endotoxin Recovery (LER). Excipients used for drug product formulations like citrate buffer in combination with polysorbates or even the active pharmaceutical ingredient itself are able to cause LER. This effect leads to failure in determination of correct endotoxin contaminations. A controversial discussion about the relevance of LER and the setup of these studies is ongoing. Here we present a review of the molecular mechanism behind LER and the factors that influence this effect. The importance of standardized protocols for LER studies to produce comparable results is summarized and an outlook for dedicated sample treatments that are able to overcome the LER effect is given.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 8~12, 2019

Key words : Endotoxin, Lipopolysaccharide, Low endotoxin recovery, Masking, Limulus amoebocyte lysate

1. Endotoxin detection

In 1894, Richard Friedrich Pfeiffer reported fever-causing reactions upon intravenous injections. 100 years ago, it was discovered that substances released by dead bacteria were the cause of these fever reactions¹⁾. Today it is known that these substances originate from the outer cell membrane of Gram-negative bacteria or cyanobacteria and belong to the family of Lipopolysaccharides (LPS)²⁾. Even low doses of LPS entering the bloodstream cause a systemic inflammatory response that leads to various pathophysiological effects such as endotoxin shock, tissue injury and even death³⁾. In particular, the lipid A part of the endotoxin complex is responsible for the endotoxic effect. Thus, the importance of adequate LPS detection methods became apparent very quickly. In 1912, the Rabbit Pyrogen Test (RPT) was introduced to the British Pharmacopoeia after the discovery that the use of injectables can cause fever.

A major step in the detection of endotoxin was the observation of specific coagulation of the blood of the horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) after exposure

to bacterial LPS⁴⁾. Based on this finding the limulus Amoebocyte lysate (LAL) test, also called Bacterial Endotoxin Test (BET), was developed and found its way into the US Pharmacopeia (USP) and other Pharmacopoeias. The reaction of the horseshoe crab coagulation system is initiated already at very low LPS concentrations of pico to nano gram⁴⁾. Three kinds of serine proteases (Factor C, Factor B) and a gel-forming protein (Procoagulase) are involved in the LPS mediated cascade. The Factor C activated by LPS activates Factor B. The proclotting enzyme is then converted to clotting enzyme by the activated Factor B⁵⁾. The clotting enzyme is cleaving specifically two peptide bonds in coagulogen, which leads to an insoluble coagulin gel⁶⁾. An additional cascade induced by activation of Factor G through β -Glucans activates the clotting enzyme⁷⁾. Efforts to replace the LAL based assay have led to the development of the Recombinant factor C (rFC) assay. Apart from protecting the natural source, the rFC assay lacks Factor G—and therefore the false positive activation by β -Glucans—leading to a higher specificity than LAL based assays. By the constant use and increasing quantity of horseshoe crabs needed in

order to produce LAL lysate, and the observation of decreasing horseshoe crab populations and a risk to be one of extinction threatened species the importance of rFC methods is even more important⁸⁾.

Endotoxin testing on pharmaceutical products is regulated by pharmacopoeias and the techniques for BET are harmonized in Europe, United States and Japan. They are described in US Pharmacopoeia (USP) Chapter 85, European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) Chapter 2.6.14 and Japanese Pharmacopoeia (JP) Chapter 4.01^{9~11)}. Today Limulus-based methods are the Gold-standard for endotoxin detection but interference can cause inconsistent results.

2. Difference between test and sample interference

In case of test interference, the enzymatic reaction of the Limulus detection system is inhibited or enhanced. The most common interferences are caused by inappropriate pH, unbalanced divalent cation concentration, serine protease, serine protease inhibitors, and non-specific LAL activation. In most of these cases the best attempt to overcome test interference is dilution. Over 90% of these interfering factors are concentration dependent and can be solved by dilution with water. Pretreatment procedures to eliminate the disturbing factor followed by dilution can reduce these interferences further¹²⁾. Nevertheless, not all inabilities of endotoxin detection can be solved by these treatments. Especially Low Endotoxin Recovery (LER) cannot be overcome by dilution of the sample. The term "LER" was introduced by Chen and Vinther in 2013, and met with large interest in the pharmaceutical industry and regulatory institutions¹³⁾. Already before, LER-like phenomena were described in 1988 by Nakamura et al. They described the effects of Triton X-100, altering LPS micelles and thus being able to inhibit the activation of Factor C by LPS strongly¹⁴⁾. The formulation of large protein molecules often contains substances with similar effects. Citrate or phosphate buffer and polysorbate are often included in the formulation for stability reasons¹⁵⁾. Exactly these substances in combination were shown to introduce LER effects alone or in combination with the Active Pharmaceutical Ingredient (API)¹⁶⁾. In some cases the API alone, such as cationic proteins are able to lead to a LER effect¹⁷⁾. In other words, the endotoxin is masked and not accessible for detection.

LPSs are amphiphilic molecules which form supra-

molecular structures in aqueous solutions. The structure strongly depends on the chemical structure of the molecules and the aggregate structure has a strong effect on the biological activity^{18~21)}.

LER is not detectable by BET when testing for interfering factors according to current compendial chapters (eg., USP<85>). Therefore, standard endotoxin is added to the diluted sample immediately before the measurement (Positive Product Control (PPC)). However, the detection of PPC is not a proof of nonexistence of a LER effect. The masking of endotoxin depends on the concentrations in the formulation, thus spiking in the diluted sample can attenuate the masking effect. Additionally, spiking of the PPC is done just before the measurement. Because LER is a time-dependent effect, it cannot be detected in this way^{16,22~24)}. In fact regulatory authorities recommend tests to ensure the ability to detect endotoxins and mentions the importance of storage and handling^{25,26)}.

3. Controversial discussion : LER is not a problem!

A controversial discussion about the importance of LER regarding the validity of measurements of endotoxin contamination in biologicals and patient safety is still ongoing. The combination of chelating buffer and polysorbate has been used for 30 years in biological formulations, thus the LER issue exists already for the same time period. If LER is an issue, an incident with undetected endotoxin should have happened until now, however in literature or among reports on the FDA website, no report of such an incident can be found²⁷⁾. However, the traceability of side effects from endotoxin is quite difficult, because typical endotoxin side effects like fever are often observed after injection of biologicals. Consequently, the assignment of fever to potentially masked endotoxin is almost impossible.

Furthermore, there are also controversial discussions about endotoxin spikes used for hold time studies. Very often Endotoxin standards like Control Standard Endotoxin (CSE) or Reference Standard Endotoxin (RSE) are used for hold time studies to examine the LER propensity in Drug Products. These standards are purified endotoxin preparations. Endotoxin contaminations however originate from raw material or occur during the manufacturing process and are therefore not purified. In contrast, naturally occurring endotoxin might be a better choice for such spiking studies. Therefore, so called natural occurring endotoxins

(NOEs) have been created. NOE refers to endotoxin preparations with minimal processing, and should better represent the contaminations as they potentially occur during the manufacturing process. Electron microscopy studies showed structural differences between the NOEs and the purified LPS²⁸⁾.

In aqueous solutions LPS normally forms aggregates such as micelles, ribbons and other conformations and they tend to disaggregate in the presence of chelator and surfactant. The biological activity of LPS gets reduced by disaggregation^{18, 29)}. The different aggregation propensity of purified LPS standards and NOEs could explain their different behavior in the presence of LER causing agents. In fact, several recent studies have claimed that LER occurs only with purified LPS standards but not with NOEs³⁰⁾. Bolden et al. reported successfully recovered NOE in citrate and phosphate buffer systems containing polysorbate. Based on their findings, the harmonized compendia bacterial endotoxin testing methods are sufficient. They propose to use a NOE liquid stock endotoxin preparation instead of the currently used LPS for LER studies³¹⁾. The results of Schwarz et al. however showed that LER occurs not only for CSEs, but also for NOEs. Both masked endotoxin contaminations, a recombinant protein preparation (NOE) as well as masked LPS (CSE) were not detected in Factor C based Assays. The observation demonstrates not only the masking of LPS by different buffer formulations, but also LER effects on NOE, coming to the conclusion that LER is not exclusively for endotoxin standards (i.e. CSE, RSE). The biological activity as well as a potent immune response to masked LPS could be shown³²⁾. Thus, it is suggested that masked LPS is a potent trigger of human immune responses in a TLR4-NF- κ B-luciferase reporter gene assay, which raises a warning for the potential danger of masked LPS.

Reich et al. showed NOEs masking, dependent on originating species and growth conditions. Masking characteristics remained unchanged, independent of the purification process, concluding masking characteristics are mainly influenced by growth conditions and molecular structure, not by the purification process³³⁾.

The preparation of the NOEs used for the studies differs from lab to lab and might thus be the cause for the different results. Additionally, endotoxins are heterogeneous and their structure is strongly influenced by the growth conditions and source of the Gram-negative bacteria³⁴⁾. Last but not least the sample matrices

and hold time conditions need to be considered when different experiments and endotoxin preparations are compared. In order to evaluate the masking susceptibility of an endotoxin preparation, conditions should be chosen which allow the establishment of a new equilibrium. As an example, a matrix containing 0.05 wt % Polysorbate 20 and 10 mM Sodiumcitrate (pH 7.4) with a spike concentration of 100 EU/mL and hold time for 7 days at room temperature can be used.

4. Mechanism

A two-step mechanism of masking was proposed by Reich et al. The LPS equilibrium structure is shifted to an alternated supramolecular structure. The hydrophobic parts of the LPS molecules (lipid A) are the driving force for its self-aggregation. Further, the aggregates are stabilized by ionic interaction formed between the phosphates of the LPS molecules and divalent cations. The addition of complex forming agents is destabilizing the structure by destabilizing the salt bridges (Step I). In presence of surfactant, mixed aggregates are formed and the supramolecular structure is changed completely (Step II). This structural change leads to a loss in activity and inability to be detected via common endotoxin test methods¹⁶⁾.

A similar mechanism was also reported by Tsuchiya, involving chelating agents to remove divalent cations from the outer layer of the aggregated LPS as well. In this model, LPS molecules are replaced in the next step by detergent molecules. The overall size of the structure stays similar but the number of LPS molecules in these structures are reduced. Less LPS molecule surface is exposed and this is reducing the detectable activity³⁵⁾. Wang et al. also studied the aggregation status of masked endotoxin using static and dynamic light scattering methods. These results support the hypothesis that activation of Factor C of limulus-based test methods is dependent on aggregate size, and that the modulating effects of salts and surfactants on activation of Factor C is associated with changes in the LPS aggregation³⁶⁾. Taken together, there is a change in LPS aggregation, when it is masked for detection.

The two-step mechanism is kinetically controlled and the time period for these structural changes can range from seconds to several weeks³⁷⁾. The kinetic is directly dependent on the energy input and can be changed by the incubation temperature. The energy input at 25°C is higher than at 4°C and thus the masking occurs faster. The energy input by mixing is influ-

encing the masking kinetics as well²²⁾. The first step of the shown mechanism could be identified to be the critical step in endotoxin masking, influencing the masking kinetics very strongly. In general, the setup of hold time studies has a huge impact on the observed masking kinetics. The concentrations of the components involved in the masking of endotoxin are influencing the masking of the formulation very strongly, although it has to be kept in mind that the binding of endotoxin to the API itself is an important factor as well^{38,39)}.

5. Outlook

The phenomenon of LER represents the potential risk of obtaining false negative test results in BET. To overcome the LER effect demasking is a crucial step to secure the correct endotoxin determination in biologicals. If the reduced LAL activity is caused by the binding of endotoxin to the API a digestion of the protein with proteinase K was shown to recover formally masked endotoxin. Especially positively charged peptides and proteins are prone to bind LPS molecules⁴⁰⁾. After treatment, the Endotoxin-Protein Complex was dissociated and the activity of the endotoxin could be determined with the LAL assay¹⁷⁾. The addition of divalent cations in an excess to the masking components was shown to rectify the LER effect. In fact, the dilution of LER samples in 2 mM magnesium solutions were able to recover endotoxin, while the endotoxin detection after dilution in water was not able to overcome LER⁴¹⁾. This effect is used in some dispersing agents on the market, which show similar effects. Lowering the pH of the sample and lowering with it the chelating effect can increase the detectability of endotoxin as well.

If dilution in dispersing agent is not sufficient another attempt can be useful. Demasking by sample pretreatment using a combination of dedicated demasking components is recommended. Dedicated kits for demasking include several components that are, in combination, able to disturb the masked endotoxin complex. The components are able to adjust the pH, destabilize the masked endotoxin complex, adsorb the surfactant and to restore the endotoxin. These components can be combined in different variations and in different ratios in order to optimize the endotoxin recovery. As detection method, a heterogenous test format (e.g., EndoLISA[®]) is recommended due to its high toleration of test inhibitors, but optimization of

the dilution after demasking makes the detection in a compendial LAL test possible.

The LER effect is not completely understood yet, and the importance of the phenomenon for the safety of parenteral drugs is still under discussion. Thus, LER has to be further studied and the testing principles have to be optimized in order to secure correct endotoxin measurements. Additional testing methods like the monocyte activation test may also be able to give new insights in the activity of masked endotoxin.

Reference

- 1) Hort EC, Penfold WJ : A Critical Study of Experimental Fever. Proceedings of the Royal Society B. Biological Sciences 85 : 174-186, 1912
- 2) Hitchcock PJ, Leive L, Mäkelä PH, et al. : Lipopolysaccharide nomenclature—past, present, and future. J Bacteriol 166 : 699-705, 1986
- 3) Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR : Structure and function of lipopolysaccharides. Microbes Infect 4 : 837-851, 2002
- 4) Levin J, Bang FB : A Description of Cellular Coagulation in the Limulus. Bull Johns Hopkins Hosp 115 : 337-345, 1964
- 5) Iwanaga S : Primitive coagulation systems and their message to modern biology. Thromb Haemost 70 : 48-55, 1993
- 6) Iwanaga S, Kawabata S, Muta T : New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph : their structures and functions. J Biochem 123 : 1-15, 1998
- 7) Muta T, Seki N, Takaki Y, et al. : Purified Horseshoe Crab Factor G. Reconstitution and Characterization of the (13)- β -D-Glucan-Sensitive Serine Protease Cascade. J Biol Chem 270 : 892-897, 1995
- 8) Smith DR, Brockmann HJ, Beekey MA, et al. : Conservation status of the American horseshoe crab, (*Limulus polyphemus*) : a regional assessment. Rev Fish Biol Fish 27 : 135-175, 2017
- 9) General Chapter <85> Bacterial Endotoxin Test USP 41-NF 36. U. S. Pharmacopeia, 2018
- 10) EDQM Council of Europe. European Pharmacopeia (Ph. Eur.) 9th edition, 2017
- 11) The Japanese Pharmacopeia 17th edition. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency 2016
- 12) Cooper JF : Resolving LAL Test interferences. J Parenter Sci Technol 44 : 13-15, 1990
- 13) Chen J, Vinther A : Low endotoxin recovery in common biologics products. in PDA Annual Meeting, Orlando, FL. 2013

- 14) Nakamura T, Tokunaga F, Morita T, et al. : Interaction between lipopolysaccharide and intracellular serine protease zymogen, factor C, from horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) hemocytes. *J Biochem* 103 : 370-374, 1988
- 15) Mitragotri S, Burke PA, Langer R : Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals : formulation and delivery strategies. *Nat Rev Drug Discov* 13 : 655-672, 2014
- 16) 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
- 17) Petsch D, Deckwer WD, Anspach F : Proteinase K Digestion of Proteins Improves Detection of Bacterial Endotoxins by the Limulus Amebocyte Lysate Assay : Application for Endotoxin Removal from Cationic Proteins. *Anal Biochem* 259 : 42-47, 1998
- 18) Mueller M, Lindner B, Kusumoto S, et al. : Aggregates are the biologically active units of endotoxin. *J Biol Chem* 279 : 26307-26313, 2004
- 19) Schromm AB, Brandenburg K, Loppnow H, et al. : The charge of endotoxin molecules influences their conformation and IL-6-inducing capacity. *J Immunol* 161 : 5464-5471, 1998
- 20) Seydel U, Hawkins L, Schromm AB, et al. : The generalized endotoxic principle. *Eur J Immunol* 33 : 1586-1592, 2003
- 21) Ichikawa T, Yoshio M, Hamasaki A, et al. : Self-organization of room-temperature ionic liquids exhibiting liquid-crystalline bicontinuous cubic phases : formation of nano-ion channel networks. *J Am Chem Soc* 129 : 10662-10663, 2007
- 22) Bolden JS, Warburton RE, Phelan R, et al. : Endotoxin recovery using limulus amebocyte lysate (LAL) assay. *Biologicals* 44 : 434-440, 2016
- 23) Twohy CW, Duran AP, Munson TE : Endotoxin contamination of parenteral drugs and radiopharmaceuticals as determined by the limulus amebocyte lysate method. *J Parenter Sci Technol* 38 : 190-201, 1984
- 24) McCullough KZ, Weidner-Loeven C : Variability in the LAL test : comparison of three kinetic methods for the testing of pharmaceutical products. *J Parenter Sci Technol* 46 : 69-72, 1992
- 25) Guidance for Industry : Pyrogen and Endotoxins Testing : Questions and Answers (2012)
- 26) Hughes P, Thomas C, Suvarna K, et al. : Low Endotoxin Recovery : An FDA Perspective. *BioPharma Asia* 4 : 14-25, 2015
- 27) McCullough KZ : LER frequently asked questions. *Am Pharm Rev, Endotoxin Supplement* 4-7, 2015
- 28) Brogden K, Phillips M : The ultrastructural morphology of endotoxins and lipopolysaccharides. *Electron Microsc Rev* 1 : 261-278, 1988
- 29) Tsuchiya M : Possible mechanism of low endotoxin recovery. *American Pharmaceutical Review : Fishers, IN, USA* : 1-5, 2014
- 30) Platco C : Low Lipopolysaccharide Recovery versus Low Endotoxin Recovery in Common Biological Product Matrices. Date of access, 2017. 9 (01)
- 31) Bolden JS, Claerbout ME, Miner MK, et al. : Evidence against a bacterial endotoxin masking effect in biologic drug products by limulus amebocyte lysate detection. *PDA J Pharm Sci Technol* 68 : 472-477, 2014
- 32) Schwarz H, Gornicec J, Neuper T, et al. : Biological Activity of Masked Endotoxin. *Sci Rep* 7 : 44750, 2017
- 33) Reich J, Weyer FA, Tamura H, et al. : Low Endotoxin Recovery—Masking of Naturally Occuring Endotoxin. *Int J Mol Sci* 20 : 838, 2019
- 34) Simpson BW, Trent MS : Pushing the envelope : LPS modifications and their consequences. *Nat Rev Microbiol* 17 : 403-416, 2019 (doi : 10.1038/s41579-019-0201-x)
- 35) Tsuchiya M : Mechanism of Low Endotoxin Recovery Caused by a Solution Containing a Chelating Agent and a Detergent. *Immunome Res* 15 : 166, 2019
- 36) Wang C, Nelson T, Chen D, et al. : Understanding lipopolysaccharide aggregation and its influence on activation of Factor C. *J Colloid Interface Sci* 552 : 540-553, 2019
- 37) Gradzielski M : Kinetics of morphological changes in surfactant systems. *Current opinion in colloid & interface science* 8 : 337-345, 2003
- 38) Reich J, Tamura H, Nagaoka I, et al. : Investigation of the kinetics and mechanism of low endotoxin recovery in a matrix for biopharmaceutical drug products. *Biologicals* 53 : 1-9, 2018
- 39) 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
- 40) Tamura H, Reich J, Nagaoka I : Bacterial Endotoxin Assays Relevant to Host Defense Peptides. *Juntendo Medical Journal* 62 : 132-140, 2016 (10.14789/jmj.62.132)
- 41) Tsuchiya M : Sample Treatment that Solve Low Endotoxin Recovery Issues. *PDA J Pharm Sci Technol*. 2018.009464, 2019 (Epub ahead of print)

エンドトキシン試験で何を測定しているのか —Low Endotoxin Recovery で考えさせられたこと—

土谷 正和

Charles River, Microbial Solutions

What does the bacterial endotoxins test measure? —subjects that low endotoxin recovery raised—

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. LER raised a questions on the target of the Bacterial Endotoxins Test (BET). This includes endotoxin activity change by samples and undetectable endotoxin in samples. We have been measuring endotoxin activity, not the amount of endotoxin in a sample by the BET. Endotoxin activity in a sample can be changed by a different condition, like LER. There may be a status of endotoxin that cannot be detected by the BET. There was difference in LER resistance between purified endotoxin and naturally occurring endotoxin. Although there may be the highest endotoxin activity in a sample under a different condition, the highest activity is not the target of the BET. The endotoxin in a sample should be measured as is. There may be undetectable endotoxin, but we do not have enough information to discuss about its effects on human health. This should be studied in the future.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 13~16, 2019

Key words : Low Endotoxin Recovery (LER), エンドトキシン試験, リムルス試薬

はじめに

近年、欧米のバイオ医薬品の分野で問題になっている Low Endotoxin Recovery (LER) の問題は、われわれに種々の問題を再提起してくれた¹⁾。まず、リムルス試薬を用いたエンドトキシン試験法で測定しているエンドトキシンとは何かという問題である。エンドトキシン試験法で測定しているエンドトキシンとは、試料中に存在するエンドトキシンの活性であり、その重量(物質量)を測定しているわけではない。次に、エンドトキシンの活性は状態によって変化するという、さらには現在の測定法では検出できないエンドトキシンの状態が存在するかもしれないことを再確認することになった。その他、エンドトキシンの活性を発現するのがモノマーなのか凝集状態なのか、精製したエンドトキシンと天然エンドトキシンの違いなども、改めて議論されている。本稿

では、LER の研究で明らかになったことを踏まえ、これらの点について考えてみたい。

1. エンドトキシン試験法ではエンドトキシンの活性を測定している

エンドトキシン試験法は、カプトガニ由来のリムルス試薬を用いて、エンドトキシンの活性を測定する方法である。この点を理解しないと、測定結果の解釈を間違ってしまうかもしれない。精製したエンドトキシンが、対イオンや超音波処理によって、種々の生物活性を示すことは、以前から知られていた^{2,3)}。すなわち、エンドトキシンの重量あたりの生物活性は一定ではないということであり、医薬品や医療機器の安全性試験としてのエンドトキシン試験法でも「エンドトキシンの活性」を測定するという、重量ではなくエンドトキシン単位(EU または IU)という単位を用いている。現在使用されてい

る国際エンドトキシン標準品 (USP Reference Standard Endotoxin, RSE と同等品) は大腸菌由来のエンドトキシン精製品を用いており、その比活性は約 10 EU/ng 程度で、10,000 EU/vial の標品が入手できる⁴⁾。二次標準品 (Control Standard Endotoxin: CSE) を使用する場合は、RSE に対して活性を評定し、その比活性 (EU/ng) を算出する。ここでも測定値を活性として表すために、このような換算が行われる。標準エンドトキシンの比活性をわれわれが知っているため、また以前から医学界ではエンドトキシンの重量が使用されていたため、エンドトキシン試験で試料中のエンドトキシン重量を測定できると思われているかもしれない。しかし、上記の理由で、エンドトキシン試験で測定しているのが「活性」であり、試料に含まれる由来のわからないエンドトキシンの重量を知ることができないのは明らかである。

2. エンドトキシンの活性は変化する

エンドトキシンの活性は、共存物質や環境の影響で変化する。鉄やアルミニウムといった金属イオンが、マイクロモルレベルの濃度でエンドトキシンの活性を低下させることが以前から報告されている^{5,6)}。この中で、鉄はエンドトキシンの構造を変化させることが報告されているが⁷⁾、他のイオンについては、エンドトキシンそのものの構造を変化させるとは考えにくい。したがって、この活性変化は、エンドトキシンの凝集状態の変化によって起こると考えられる。LER においては、キレート剤と界面活性剤という 2 要素でエンドトキシンの活性低下が観察される。その活性低下の速度は、温度によって大きく影響を受ける他、pH や塩濃度の影響を受ける^{8,9)}。当初、LER の機序として、キレート剤によって結合が弱まったエンドトキシン凝集体から、界面活性剤がエンドトキシン分子を引き剥がし、最終的には細かく分散させてしまうといったことが予想されていた^{8,10)}。しかし、実際にその粒子分布を測定してみると、活性が低下し、長期間 (1 年以上) が経過しても、元のエンドトキシン粒子と同じサイズの粒子が観察された¹¹⁾。すなわち、LER の機序として、エンドトキシンが細かい粒子になって分散することが活性低下の主たる原因ではないと考えられた。また、低温 (4℃ 程度) では、LER 条件下でも RSE の活性は 1 カ月以上安定であり、これを水で希釈すると活性の低下が起こることも明らかになった¹²⁾。この活性低下は、マグネシウム溶液で希釈することにより抑制することができることから、キレート剤で弱くなったエンドトキシン凝集体は、低温ではその形態を維持しており、希釈などによって条件が変化することで、活性の低下が起こると考えられた¹¹⁾。これらの結果から、LER においては、エンドトキシン凝集体の表面でエンドトキシン分子と界面活性剤分子の入れ替えが起こるといふ機序が考えられた¹¹⁾。すなわち、エンドトキシン凝集体表面

のエンドトキシン分子の面積の減少が、主なエンドトキシン活性低下の原因と思われた。

3. 精製エンドトキシンと天然エンドトキシン

LER は、FDA ガイダンス¹³⁾で推奨されている試料中のエンドトキシンの安定性試験で明らかになった。この時、使用するエンドトキシンとしては、CSE か RSE が推奨されている¹⁴⁾。これらの標準エンドトキシンには、精製されたエンドトキシンが使用されている。一方、低栄養条件下で培養したグラム陰性菌から得られた天然エンドトキシンでは、LER が認められないことが報告されている¹⁵⁾。この原因の一つとして、低栄養時におけるグラム陰性菌の Lipid A 修飾が指摘されている¹⁶⁾。すなわち、低マグネシウム下で培養したグラム陰性菌では、Lipid A のリン酸基が、エタノールアミンやアミノ糖で修飾され、2 価の金属イオンの不足を補うことができるのである。このような Lipid A を持つリポ多糖 (LPS) では、キレート剤の影響を受けにくく、LER も起こりにくい。このようなエンドトキシンもエンドトキシン試験で検出できるので、バイオ医薬品の工程中に起こったグラム陰性菌の汚染によるエンドトキシンの増加を見逃すことはほぼないといえる¹⁶⁾。高栄養培地で培養したグラム陰性菌から精製したエンドトキシンは、リムルス試験の標準としては有用であるが、実際に製品に混入する可能性のあるエンドトキシンとは性質が異なるため、製品中のエンドトキシンの安定性試験には適さないと考えられる。しかし、欧米の規制当局が精製エンドトキシンを使用した標準エンドトキシンの添加を推奨していることから、これを使用せざるを得ない現状がある。どのような試験が、製品を投与される患者の安全性に寄与するかは、今後の研究によって明らかにされる必要がある。

4. エンドトキシン試験でどのようなエンドトキシン活性を測定すべきか

試料中のエンドトキシンの活性が、条件の変化によって変化することはすでに述べた。それでは、試料中のエンドトキシンの活性はどの状態のものを測定すべきであろうか。この問いは以前からあったのだが、LER の問題によって再度注目されることとなった。医薬品や医療機器の安全性試験としてのエンドトキシン測定で LER が提起した問題点は、「試料中のエンドトキシンの活性が現在の状況より高い値を取る可能性がある場合、試料中のあるがままの活性を測定すべきか、可能性のある最大活性を測定すべきか」ということである。LER では、添加した標準エンドトキシンの活性が低下するが、その条件はエンドトキシンを分解するような条件ではない。すなわち、試料中に標準エンドトキシンのような性質のエンドトキシンが汚染した場合、汚染前のエンドトキシン活性は試料中で低下し、試料中のエンドトキシン

活性は汚染前より低くなっていると考えられる。エンドトキシン自体は分解されたわけではないので、試料中のエンドトキシン重量は変わらないが、活性のみが低下した状態と考えられる。試料中のエンドトキシン活性として、どちらを取るべきであろうか。LERにおいては、試料に添加した標準エンドトキシンの比活性が分かっているため、添加前の活性を検出したいと思うのは人情であろう。しかし、実際に試料（製品）に混入してくるエンドトキシンは、精製されたものではないし、栄養培地で培養されたグラム陰性菌由来ではない。したがって、汚染したエンドトキシンが標準エンドトキシンと同じ挙動を示すとは言えず、元のエンドトキシン活性を知ることにはできない。しかも、標準エンドトキシンでさえ、条件によっては、その活性が上昇することも考えられることから、元の活性が最大活性とは限らない。これまでエンドトキシン試験では、試料中のエンドトキシン活性をあるがままに測定してきたのであり、試料中のエンドトキシンの最大活性については考慮してこなかった。リムルス試験を用いた「エンドトキシン試験法」が採用されてから39年が経ち、LERを引き起こすキレート剤と界面活性剤を含む製剤が開発されてから30年ほどが経過しているが、エンドトキシン試験の不具合による発熱事例は報告されていない¹⁷⁾。このことは、試料中のエンドトキシン活性をあるがままに測定することの有用性を示すものであり、エンドトキシン試験の有用性を支持するものである。

おわりに

エンドトキシン試験法は、試料中のエンドトキシン活性をあるがままに測定する方法である。LERがこの点に疑問を投げかけ、いまだにどの活性を測定するのが良いのか、結論は出していない。工程検査におけるエンドトキシン試験で、LERが起これると、エンドトキシンの汚染を見逃すかもしれないという規制当局の意見もあり、実際にバイオ医薬品メーカー各社は、自社製品に対するLER検討を余儀なくされている。今後、LERをどのように解釈し、どのような試験を行うことが、製品の安全性に寄与するかを、科学的に明らかにしていかなければならない。

LERが提起した問題点の一つに、リムルス試験を使用したエンドトキシン試験では検出できないエンドトキシンの状態があるかもしれないということがある。この状態のエンドトキシンは、その測定方法がないことからこれまで測定されておらず、その生物活性も明らかではない。少なくとも、発熱性のような急性毒性はないと思われるが、慢性的に投与された場合の影響については全く分かっていない。すなわち、LERで検出できなくなったエンドトキシンについては、これまで何のデータもないため、その危険性については未知である。今後、このような状態のエンドトキシンの生物活性についての研究が

期待される。

文 献

- 1) 土谷正和：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). エンドトキシン・自然免疫研究 21 : 23-25, 2018
- 2) Galanos C, Luderitz O : Lipopolysaccharide : properties of an amphipathic molecule. In "Handbook of Endotoxin, Vol. 1 Chemistry of Endotoxin" ed Rietschel ET, Elsevier Science publishers BV, Amsterdam, 1984, pp46-58
- 3) Komuro T, Murai T, Kawasaki H : Effect of sonication on the dispersion state of lipopolysaccharide and its pyrogenicity in rabbits. Chem Pharm Bull 35 : 4946-4952, 1987
- 4) Poole S, Dawson RE, Gaines Das RE : Second international standard for endotoxin : calibration in an international collaborative study. J Endotoxin Res 4 : 221-231, 1997
- 5) 土谷正和：リムルス試験の利用とその現状. 防菌防黴 18 : 287-294, 1990
- 6) Duner KI : The importance of the quality of water in Limulus amebocyte lysate tests. PDA J Pharm Sci Technol 49 : 119-121, 1995
- 7) Fujita Y, Nabetani, T : Iron sulfate inhibits Limulus activity by induction of structural and qualitative change in lipid A. J Appl Microbiol 116 : 89-99, 2014
- 8) 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
- 9) Tsuchiya M : Factors affecting reduction of reference endotoxin standard activity caused by chelating agent/detergent matrices. PDA J Pharm Sci Technol 71 : 478-487, 2017
- 10) Tsuchiya M : Possible Mechanism of Low Endotoxin Recovery. Am Pharm Rev 17 : 18-23, 2014
- 11) Tsuchiya M : Mechanism of Low Endotoxin Recovery Caused by a Solution Containing a Chelating Agent and a Detergent. Immun Res, 2019 (in press)
- 12) Tsuchiya M : Sample treatments that solve Low Endotoxin Recovery issues. PDA J Pharm Sci Technol 73 : 433-442, 2019
- 13) Guidance for Industry. Pyrogen and Endotoxins Testing : Questions and Answers. Food and Drug Administration, Washington DC, 2012
- 14) "Low Endotoxin Recovery, Technical Report No. 82", Parenteral Drug Association, 2019
- 15) Bolden J, Platco C, Dubczak J, et al. : The Use of Endotoxin as an Analyte in Biopharmaceutical Product Hold-Time Study. United States Pharmacopeia : Stimuli to the Revision Process 41 (5), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD. 2015

- 16) Dubczak J, McCullough KZ : Environmental endotoxins are non-static structures. Why the LAL test continues to be efficacious. "Contamination Control in healthcare Product Manufacturing" Vol 5, eds Madsen RE, Moldenhauer J, Parenteral Drug Association, 2018, pp243-263
- 17) McCullough KZ : Current USP perspectives on low endotoxin recovery. Am Pharm Rev, Endotoxin Supplement : 4-7, 2016

生物発光を利用した透析液および透析用水中のエンドトキシン測定

小田 侑, 八幡 悟史, 野田 健一, 荒川 智

東亜ディーケーケー株式会社

Detecting endotoxin in dialysis fluid using bioluminescence

Atsumu Oda, Satoshi Yawata, Kenichi Noda, Satoshi Arakawa

DKK-TOA corp.

Abstract

We released the Bioluminescence Endotoxin Analyzer (Luminutes-ET) for hemodialysis facilities in April 2017, which uses a new detection method combining LAL reaction and bioluminescence. The bioluminescence method has superior Signal/Noise ratio, allowing fast and highly sensitive measurements of up to 0.0003 EU/mL in under 20 minutes.

This detection method applies the mutant firefly luciferase discovered by Kuroda laboratory at Hiroshima University which is 10 times higher in luminescence intensity compared to the wild-type. We designed the analyzer and reagent kit to significantly reduce measurement errors and lyophilized the reagent for long-term stability.

The luciferase developed by Kuroda laboratory was not suitable for detecting endotoxin in dialysis fluid as its luminescence reaction was affected by the Na^+ in dialysate solutions. We improved on this luciferase to prevent the effect of Na^+ on its reaction. As a result, endotoxin detection in deionized water, i.e. dialysis water, and dialysis fluid now uses the same calibration curve.

Endotoxin measurement using this bioluminescence method was evaluated; its accuracy and measurement validated at six hemodialysis facilities based on the common guidelines set forth by Japanese Society for Hemodiafiltration. The validity of its calibration curve, blank tests, reaction interfering factor tests, detection limits, and quantitation limit of dialysate measurement were assessed. In conclusion, the bioluminescence method's fast and highly sensitive measurements were verified, and was confirmed that it is fit for biological contamination control in dialysis fluid.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 17~20, 2019

Key words : 生物発光法, 高発光ルシフェラーゼ, 耐塩性ルシフェラーゼ, 透析

はじめに

透析治療は透析患者の血液と大量の透析液が接触するため、エンドトキシン (ET) の徹底した管理が求められ、超純粋透析液においては水質基準が0.001 EU/mLという厳しい規制が設けられている¹⁾。これまでETの定量法は、比濁法または比色法を用いて行うのが主流であった。しかし、これらの方法は0.001 EU/mL測定時に30~90分程度の時間を必要とする。そのため透析開始前にET測定結果が得られないなど、測定結果の判明と臨床現場との間にタイムラグが生じる。この問題を解決する手法として、高発光ルシフェラーゼを用いた生物発光

法によるET測定システム²⁾に着目し、透析分野向けに生物発光式ET計Luminutes-ETをリリースした。今回、Luminutes-ETの製品化にあたり、①測定誤差を可能な限り小さくするための装置設計と試薬のキット化、②ルシフェラーゼをはじめとした試薬の長期保存を可能とするための凍結乾燥、③透析液に対する阻害をなくするためのルシフェラーゼの改良を行った。透析分野への参入に伴い、生物発光法によるET測定法の多施設間バリデーション試験を実施したので、その結果についても報告する。

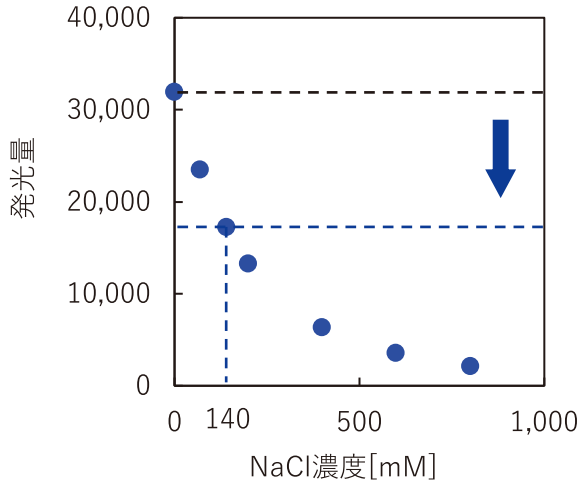


図 1 NaCl 添加時のルシフェリンの測定 (LAL 反応を介さない測定)

1. 高発光ルシフェラーゼを用いた生物発光式 ET 測定システム

ホタルルシフェラーゼの反応は ATP に対して鋭敏に反応し、広い範囲で直線性が得られることから、食品などの清浄度管理に利用されている³⁾。黒田らは、遺伝子組み換え技術を用いて、野生型の 10~15 倍の発光強度を持つルシフェラーゼ (高発光ルシフェラーゼ) を開発した⁴⁾。また高発光ルシフェラーゼの特徴を活かした測定として、ET の迅速・高感度測定を可能とする測定手法を開発した²⁾。生物発光法、比濁法、比色法はいずれもカプトガニの血球から抽出されたリムルス試薬を用いる測定方法である。生物発光法では、ルシフェリンを含む発光基質と高発光ルシフェラーゼ、ATP を添加すると ET とリムルス試薬の反応によって生成されたクロッキングエンザイムと反応してサンプルが自家発光するため、その発光強度から測定を行う手法である。同法は ET 濃度の増加に伴って発光強度が増大する測定法であり、透過光量の減衰を観察する他法と比べて S/N (Signal/Noise) に優れている。リムルス試薬のカスケード反応は長い時間をかけて進行するが、生物発光法の優れた S/N によって他法より短時間での測定が可能となる。

2. 生物発光式 ET 測定システムの製品化

2-1. 装置設計と試薬のキット化および凍結乾燥

生物発光法ではリムルス試薬が特定の時間反応した時点で BL 試薬 (発光基質, 高発光ルシフェラーゼ, ATP) を添加する必要があるが、添加のタイミングが変わると発光量も変動する。そこで BL 試薬を凍結乾燥してチューブに封入し、特定のタイミングで装置がチューブを押し出すことで試薬がサンプルに自動で添加されるシステムを構築した。これによって試薬添加のタイミングなどによる測定誤差を小さくし、さらに測定が簡便になった。

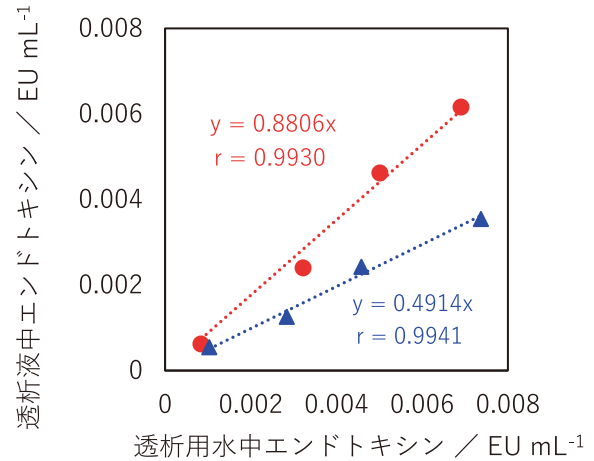


図 2 耐塩性 (●)/高発光 (▲) ルシフェラーゼを用いた際の透析液/水の ET 測定

また、不安定であった高発光ルシフェラーゼも凍結乾燥によって冷蔵で 1 年以上の保管が可能となった。

2-2. ルシフェラーゼの耐塩化

透析液の主成分は一般的に塩化ナトリウムをはじめとした電解質とブドウ糖、重炭酸ナトリウムからなり、ナトリウムイオンはおよそ 140 mM 含まれている⁵⁾。従来の高発光ルシフェラーゼはナトリウムイオン濃度の増大とともに顕著に反応阻害を受け、透析液と同等である 140 mM の塩化ナトリウム存在下では発光強度が約 50% 減少することがわかった (図 1)。そこで、高発光ルシフェラーゼにさらに変異を入れて、高い発光強度を維持しつつナトリウムイオンによって阻害を受けにくい耐塩性ルシフェラーゼを開発した。耐塩性ルシフェラーゼを用いて透析用水および透析液に標準エンドトキシンを添加し測定したところ、これまで透析液で希釈した ET サンプルに対する発光強度が、透析用水で希釈した ET サンプルと比較して 80~90% 程度まで改善した (図 2)。日本 HDF 研究会にて作成された「透析液エンドトキシン測定 (阻害・促進試験, 安定化剤, 外注検査) に関するバリデーション指針 (草案 96B)⁶⁾」より、同結果は基準 (75~125%) を満たしており、反応干渉は認められなくなった。そのため透析用水、透析液いずれのサンプルについても同一の検量線で測定することが可能となった。

3. 透析施設での多施設間バリデーション試験

3-1. 透析施設での多施設間バリデーション試験

透析液水質基準における ET 測定方法は、「リムルス試験法。同等の感度を有すると証明されたものについて使用可能である。」とされている¹⁾。近土らは、生物発光法による ET 測定システムのバリデーション試験として透析液 ET 測定に関するバリデーション指針に準じて多施設間で共通のプロトコールを作成し、手技確認試験とし

表 1 6 施設における試験方法および基準

		試験方法	基準
手技確認試験	検量線有効性の判定	低濃度 ET サンプル 4 濃度 (0.0005, 0.001, 0.005, 0.007 EU/mL), 高濃度 ET サンプル 4 濃度 (0.007, 0.01, 0.1, 0.2 EU/mL) を調製し, 各 3 重測定	低濃度, 高濃度で検量線を作成し, 相関係数 $r > 0.99$ を満たす
	ブランク値の確認	蒸留水を 8 重測定	平均値 + 2 SD < 0.001 EU/mL を満たす
測定試薬のバリデーション	反応干渉因子試験	透析液または蒸留水で調製した ET サンプル 3 濃度 (0.025, 0.05, 0.1 EU/mL) を各 3 重測定を 5 回行う	X 軸を蒸留水希釈, Y 軸に透析液希釈の結果をプロットし, 原点を通る近似直線を引く。相関係数 $r > 0.99$ かつ $0.75 < \text{傾き}$ の平均 $\pm 2 \text{ SD} < 1.25$ を満たす
	検出限界試験	蒸留水を 7 サンプル用意し, 各 3 重測定	$3.3 \text{ SD} < 0.001 \text{ EU/mL}$ を満たす
	透析液の定量限界	透析液で調製した ET サンプル (0.002 EU/mL) を用意し, 10 重測定	10 点すべての結果が 0.0015~0.0025 EU/mL の範囲内である

表 2 6 施設におけるバリデーション試験結果

	検量線有効性の判定	ブランク値の確認	反応干渉因子試験	検出限界	透析液の定量限界
A 施設	低濃度 $r : 0.995$ 高濃度 $r : 0.999$	平均値 + 2 SD : 0.0001	相関係数 $r : 0.992 \sim 0.999$ 傾きの平均 $\pm 2 \text{ SD} : 0.78 \sim 0.99$	$3.3 \text{ SD} : 0.0004$	0.0018~0.0023
B 施設	低濃度 $r : 0.999$ 高濃度 $r : 0.999$	平均値 + 2 SD : 0.0002	相関係数 $r : 0.995 \sim 0.999$ 傾きの平均 $\pm 2 \text{ SD} : 0.80 \sim 0.95$	$3.3 \text{ SD} : 0.0005$	0.0016~0.0022
C 施設	低濃度 $r : 0.995$ 高濃度 $r : 0.999$	平均値 + 2 SD : 0.0002	相関係数 $r : 0.990 \sim 0.998$ 傾きの平均 $\pm 2 \text{ SD} : 0.76 \sim 0.85$	$3.3 \text{ SD} : 0.0002$	0.002~0.0023
D 施設	低濃度 $r : 0.999$ 高濃度 $r : 0.999$	平均値 + 2 SD : 0.0002	相関係数 $r : 0.992 \sim 0.998$ 傾きの平均 $\pm 2 \text{ SD} : 0.76 \sim 0.99$	$3.3 \text{ SD} : 0.0001$	0.0021~0.0024
E 施設	低濃度 $r : 0.998$ 高濃度 $r : 0.999$	平均値 + 2 SD : 0.0003	相関係数 $r : 0.997 \sim 0.999$ 傾きの平均 $\pm 2 \text{ SD} : 0.77 \sim 0.94$	$3.3 \text{ SD} : 0.0003$	0.0009~0.0023
F 施設	低濃度 $r : 0.999$ 高濃度 $r : 0.999$	平均値 + 2 SD : 0	相関係数 $r : 0.997 \sim 0.999$ 傾きの平均 $\pm 2 \text{ SD} : 0.78 \sim 0.94$	$3.3 \text{ SD} : 0.0002$	0.0018~0.0024

て検量線有効性の判定, ブランク値の確認を行った上で, 測定試薬のバリデーションとして反応干渉因子試験, 検出限界試験, 透析液の定量限界試験について評価を行った⁷⁾。

3-2. 結果

表 1 に試験方法と基準, 表 2 に試験結果を示す。表 1, 2 より, 6 施設中 5 施設ですべての項目で基準を満たした。また, 残り 1 施設については透析液の定量限界試験を満たさなかったものの, それ以外のすべての項目で基準を満たした。以上の結果から, 生物発光法は従来法と比較して短時間かつ高感度な測定を可能としており, 透析液および透析用水の ET 測定に有用であるということが示唆された。

おわりに

生物発光式 ET 計 Luminutes-ET は測定時間 20 分未

満で 0.0003 EU/mL と, 迅速かつ高感度な測定を可能としており, サンプルの ET 濃度は低いがすぐに結果が求められるような場合や, 検査業務の効率化をしたい場合には非常に有用な装置である。

文 献

- 1) 峰島三千男, 川西秀樹, 阿瀬智暢, 他 : 2016 年版 透析液水質基準. 透析会誌 49 : 697-725, 2016
- 2) Noda K, Goto H, Murakami Y, et al : Endotoxin assay by bioluminescence using mutant firefly luciferase. Analytical Biochemistry 397 : 152-155, 2010
- 3) 厚生労働省 : 食品衛生検査指針 微生物編 2004. 日本食品衛生協会, 2004, pp71-73
- 4) Fujii H, Noda K, Asami Y, et al : Increase in bioluminescence intensity of firefly luciferase using genetic modification. Analytical Biochemistry 366 : 131-136, 2007
- 5) 扶桑薬品工業株式会社 : キングリー透析剤 AF2 号 添付

- 文書, 2009, p1
- 6) エンドトキシン測定の標準化検討部会：透析液エンドトキシン測定（阻害・促進試験，安定化剤，外注検査）に関するバリデーション指針（草案 96B）. 臨床透析 12 別冊 HDF 療法 '96 : 142-148, 1996
 - 7) 近土真由美, 内野順司, 村上淳, 他：新たに開発された limulus amebocyte lysate (LAL) 反応を用いた生物発光式エンドトキシン活性値測定装置（ルミニッツ[®]-ET）の多施設評価. 透析会誌 51 : 591-598, 2018

第3章

シンポジウム

「 α ガラクトシルセラミドの基礎と臨床応用」

海洋天然物と免疫作動性物質～ α -GalCer の基礎について～

名取 威徳

帝京平成大学薬学部

Marine natural products and immune-acting substances, basic research of α -galactosylceramides

Takenori Natori

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo Heisei University

Abstract

Marine organisms produce second metabolites with unique chemical structures because of their complexed symbiotic systems different from that of land organisms.

Unique glycosphingolipids with α -galactosylceramide structure, agelasphins, were obtained from Okinawan marine sponge *Agelas mauritanus* by the *in vivo* antitumor substance screening system. Agelasphins and the developmental candidate, KRN7000 (α -GalCer), markedly showed antitumor activity against tumor bearing mouse by activating host's immune system. The discovery of agelasphins and the development of KRN7000 revealed the detail of NKT cell functions. Unfortunately, development of KRN7000 intended to the antitumor drug by the systemic injection was abandoned because of several limitations. Now it is strongly expected that agelasphin or its derivative to be developed as a novel immunomodulator by conquering the limitations.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 21~24, 2019

Key words : agelasphin, α -galactosylceramide, α -GalCer, KRN7000, NKT cell

はじめに

海洋生物は、地上や淡水域の生物とは異なる複雑な共生機構のため、ユニークな構造をもつ二次代謝産物を生産することが知られ、それを利用した創薬の試みが多くなされてきた。

ナチュラルキラー T 細胞 (NKT 細胞) は、自然免疫と獲得免疫を橋渡しする免疫担当細胞であり、強力に Th1 型サイトカイン産生を誘導する一方、同時に Th2 型サイトカイン誘導も行うことのできるユニークな細胞である。これらの免疫誘導はいずれも脂質部分にセラミドをもち、これに糖鎖が特定の立体配位で結合したスフィンゴ糖脂質 (GSL) が樹状細胞上の CD1d 分子に提示され、TCR を発現するインバリエントな NKT 細胞がこれを認識・活性化することにより発動される。

このような GSL のうち、非常に強力な NKT 細胞活性化剤として知られる α -GalCer (KRN7000) は、キリンビール (株) のチームが海洋生物からの創薬スクリーニ

ングで見出した沖縄産海綿動物由来の GSL であるアゲラスフィン類 (agelasphins : AGLs) に由来する。AGLs は中性糖を糖鎖にもつが、その後 *Sphingomonas* 属のグラム陰性菌からは酸性糖を構成糖として有する GSL も単離され、類似の活性を示すことが明らかとなった。

AGLs の「真の生産者」が海綿動物に共生する微生物である可能性は高く、一部の GSL は脂質二重層ラフトを構成し細菌類と宿主の相互作用に関与するとの報告もあることから、AGLs の宿主中での存在意義などにも興味もたれる。近年さまざまな AGLs 誘導体の化学合成が進められており、そのユニークな作用を自在に制御することにより、免疫疾患やがん・感染症の治療・予防に資することが期待される。

1. アゲラスフィンの発見

1980 年代をピークとして世界中の製薬会社では放線菌などの微生物の二次代謝産物研究を基盤とする天然物化学による創薬研究が行われていた。さらにそれまで主

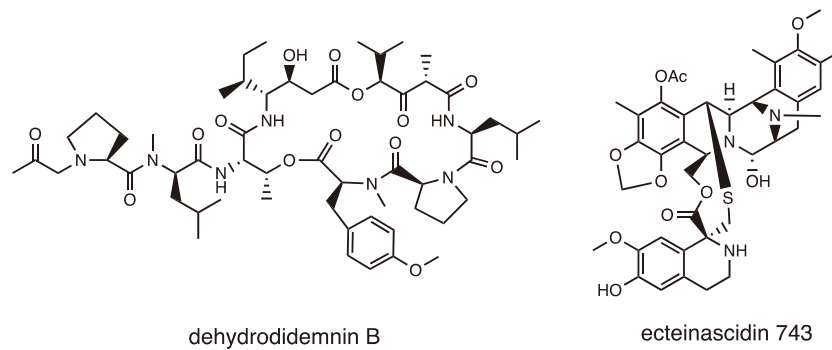


図 1 海洋生物由来の医薬品の例

に用いられてきた細胞毒性を指標とした抗がん剤探索とは異なる手法がスクリーニングに用いられたことにより、さまざまなユニークな構造と生理活性をもつ物質が見出されるようになった。

一方で海洋生物は陸上の生物とは異なるタイプの代謝物を生産する可能性が古くから示唆されてきた。とくにサンゴ礁域のスキューバダイビングで採取可能な海域の生物についての研究が進むとその複雑な共生様式が明らかとなった。太陽光が届く領域では光合成を行うシアノバクテリアを頂点とする複雑な一次共生、二次共生が形成され、オルガネラの連結が進み細胞内共生が成立する過程で、共生体と宿主細胞のゲノムが統合してオルガネラ間の代謝産物輸送システムに変化すると考えられている。この複雑な共生関係により、多様な代謝物生産が可能となることで海洋生物の代謝物は、陸上生物の代謝モデルにあてはまらない例が多いと考えられており、このことが天然物化学者たちの興味を海洋に引き付けた^{1,2)}。

この期待に応えるように海洋生物からは実に多彩な代謝物が見出されてきて、さらにその真の生産者に関する研究も進んだ。残念ながらいくつもの課題により実際に医薬品として臨床に供されるまでに至った化合物は少ないが、dehydrodidemnin B (plitidepsin (Aplidin[®])) や ecteinascidin 743 (trabectedin (Yondelis[®])) などが主にその抗腫瘍作用を期待されている (図 1)。

われわれはキリンビール (株) 医薬探索研究所 (当時) において、この流れを汲んで抗腫瘍性物質のスクリーニングを実施した。当初は海洋生物のエキスを調製し、細胞毒性など明確な指標を頼りにスクリーニングを実施したもののなかなか期待するような医薬品としての候補物質をヒットすることができなかった。そこである時から B16 マウスメラノーマを移植した C57BL/6 系担がんマウスの腹腔内に直接海洋生物のエキスを注入し、その延命効果を検討することで、エキスのもつポテンシャル全体を見極めることとした。するとある日動物飼育を担当するテクニシャンから「このエキスを投与したマウスは、延命効果はさほどではないものの、いつまでも毛艶がとても良い」との報告を受けたことからスクリーニングの

流れが変わった。通常がん細胞を移植した黒色系のマウスは体毛が逆立って極端に毛艶が悪化するのだが、このエキスを投与されたマウスは死亡する直前まで良好な毛艶を保っていたのである。それまでは抗腫瘍剤という強い毒性をもって増殖の早い腫瘍細胞を優先的に死滅させることをイメージしていたが、この海綿のエキスの投与により明らかに *in vivo* でマウス自身のもつ免疫系を強化して腫瘍を排除することが可能であることが確認されたのであった。その後はこの「毛艶」を指標とした活性物質の探索を行い、結果的に沖縄産の海綿 *Agelas mauritianus* より一連の新規 α -galactosylceramide を単離・構造解析してアゲラスフィン類 (agelasphins) と命名した。最も含有量の多かった agelasphin-9b の構造を図 2 に示す。なお本稿では詳説しないが、海洋生物由来の天然物については先述の通り共生関係が複雑なため、アゲラスフィン類の「真の生産者」が本当に海綿動物なのか共生微生物なのかなどの解明はなされていない。

2. アゲラスフィンの関連化合物と誘導体合成

アゲラスフィンは α -ヒドロキシ脂肪酸と phytosphingosine より成るセラミド部と D-ガラクトースより構成されたスフィンゴ糖脂質であり、その構造上の最大の特徴はセラミドに対してガラクトースが α 配位で結合していることであった。一連のモノグリコシルセラミドはセレプロシドと呼ばれ、古くから知られた分子種であり、当然ながら化学合成も多く行われてきたにもかかわらず、 α 配位の糖を結合させたセレプロシドはそれまでに報告例がなく、その生理活性も未知であった。

一方その後、別の *Agelas* 属や *Stylissa* 属の海綿よりアゲラスフィンおよびさらに高度に糖が結合した化合物群が単離され、アゲラスフィンは必ずしも珍しい化合物ではなく海綿動物に比較的広く分布している化合物であることがわかった。しかしながらスフィンゴ糖脂質がそのような強い抗腫瘍効果を示すことはそれまでに報告されたことはなく、精製したアゲラスフィンに残存する極微量で未知の不純物、例えば LPS のような物質による薬理作用も疑われたこともあり精製品のリムルステストまで

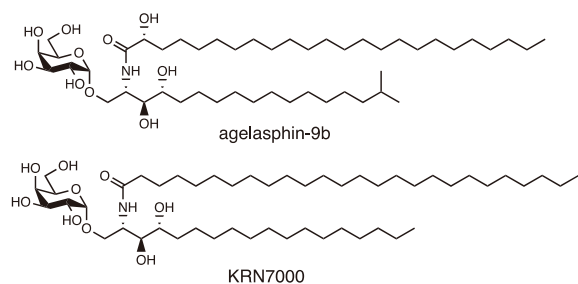


図2 アゲラスフィン (agelasphin-9b) と KRN7000 の化学構造

実施したこともあった。しかしながら最終的にはアゲラスフィンのなかでも構造が単純な AGL-9a と -9b の 13 工程をかけた立体特異的な全合成を達成した結果、これらが天然由来の化合物と同一な物理化学的性質を示すとともに、同等の生理活性を示したことから、アゲラスフィンが海綿の抽出液が示した抗腫瘍活性の活性本体であることが確認され、またその絶対立体配置を含めた構造が確定された。

さらにわれわれは医薬品としての開発にかなう低コストで合成可能な誘導体を見出すべく 100 種以上の誘導体を合成した。誘導体は糖の種類や数、結合の様式やセラミド部の立体化学と水酸基の数などを含む多方面にわたって精力的に検討・合成された。またその後われわれ以外のグループによっても多くの誘導体の合成と生理活性の検討が行われたが、そのオリジナルの構造がいずれも高度に水酸化された糖、長鎖塩基および脂肪酸の 3 つのパーツで構成され、それらがグリコシド結合とアミド結合で結合していたことから修飾部位はあまりにも多かったことから構造の最適化は容易ではなかった。最終的にわれわれのグループとしては生理活性を優先し、マウスでの抗腫瘍活性とヒト臍帯血由来の細胞に対する分化誘導能を指標として KRN7000 と命名した化合物を開発候補物質として選定したものの、このことにより後述の通りいくつかの課題を抱えることとなった (図 2)^{3,4)}。

3. アゲラスフィンの作用機序解明

アゲラスフィンは *in vitro* での細胞毒性や *in vivo* での動物に対する毒性をほとんど示さないにもかかわらず担がんマウスに対して顕著な延命効果を示したことから、何らかの宿主の免疫系に作用していることが推定され、当時知られていた抗腫瘍性を担う T 細胞や NK 細胞への作用が検討された。その結果 *in vivo*, *in vitro* のいずれでも脾臓細胞を活性化して増殖誘導が起ることが確認され、脾臓細胞の中のどのような細胞がアゲラスフィンの抗腫瘍作用に寄与しているかが興味の対象となった。

そのようななか開発候補物質として大量調製に成功した KRN7000 は世界中の共同研究者に提供されるようになり、精力的にその作用機序の解明と応用研究が行われ

た。その結果わかってきたことは、抗原提示細胞である樹状細胞 (DC) がもつ CD1d 分子を介して免疫細胞を活性化させること、さらにその抗原提示を受ける寄与度の最も大きい細胞は natural killer T (NKT) 細胞であることが判明した。当時 NKT 細胞は活性化メカニズムなどその実態が未解明な細胞の系統であったが、KRN7000 が DC を介して極めて強く NKT 細胞を活性化するリガンドであることが判明したことで、一気に NKT 細胞の研究が加速することとなった⁵⁾。

今日では KRN7000 あるいは類似の α -glycosylceramide 構造を有するスフィンゴ糖脂質やそのアナログによって NKT 細胞が活性化することで IFN- γ や IL-12 分泌が亢進することで Th1 細胞の活性化が誘導されることや、同時に IL-4 の分泌も促されることで Th2 細胞の活性化も可能であることが示されるようになった。今後はこのような NKT 細胞の特異的な性質を利用した免疫賦活作用を高めることによる抗腫瘍、抗感染症などの薬剤やワクチンアジュバントの開発、あるいは免疫抑制作用に基づく抗アレルギー、抗自己免疫疾患、臓器移植時の抗 GVHD を目的とした薬や治療法の開発が期待される。

4. KRN7000 の製剤化と初期の臨床試験

われわれは 1999 年当時、KRN7000 の静脈内全身投与による抗腫瘍効果に期待して、臨床試験を企画した。まず必要となったのは必要量の治験原薬の合成である。当時の治験原薬 GMP 基準に則った原薬が準備されたが、前述の通りその工程数が極めて長かったことから非常に難航した。

さらに静脈内投与にあたっては当然ながら注射剤として投与可能な溶剤に可溶化することが必須であるが、KRN7000 の水やアルコール系に対する溶解度は悲観的なほどに低かった。動物試験時には dimethylsulfoxide (DMSO) などの有機溶媒に溶解後バッファーに希釈するというのが一般的な動物実験用の投与液調製の手法であるが、臨床では当然そのような手法が使えないため製剤化には大きな困難が伴った。

最終的にはいくつかの界面活性剤と賦形剤を用いて KRN7000 原薬を溶解し、これを凍結乾燥した製剤が開発された。1 本の中に 200 μ g の KRN7000 を含み、1 mL の注射用蒸留水を加えてふり混ぜるだけで容易に溶解可能な小さなバイアル製剤である (図 3)。現在もこの処方では試薬として販売されている KRN7000 の溶解法に採用されており、また KRN7000 の臨床試験実施においてこの製剤の開発は大きなブレイクスルーとなった。多くの薬剤開発において大量合成や製剤化に払われた研究者たちの努力とその結果は、薬物治療における大きな貢献をしてきたことは間違いなく、個人的にはもっと広く知られるところとなって良いと思うのだが、これらの技術には感覚的、職人技的なところが多いためかあまり表に出



図 3 KRN7000 の臨床試験用に開発された静脈内投与用製剤

てこないのは残念なことである。

初期の臨床試験はオランダにて計画された。First-in-man の試験であったことから極めて低用量から慎重に投与するスケジュールが組まれ、週に 1 回点滴とともに投与され、3 週続けた上で 2 週間休薬するサイクルを 1 コースとして、最大 6 コースが固形癌の患者に対して実施された。最大投与量の $4,800 \mu\text{g}/\text{m}^2$ まで安全性の問題はなく増量され、KRN7000 の高い忍容性が確認された。また効果については一部の癌種では NC (不変) あるいは部分奏功 (PR) の患者が確認されたものの、全体にはマウスで示されたような著効を認めるには至らなかった⁶⁾。さらにわれわれを大きく落胆させたことは、KRN7000 の 1 回目投与時に各種サイトカインの分泌が認められた反応性のよかった患者においても、2 回目以降の投与において、その反応が全く認められなくなることであった。これは免疫反応におけるいわゆるアナジー (anergy, 免疫不応性) が発生しているものと考えられたが、現在でもそのメカニズムなどには不明点が多い。

その後なんとか KRN7000 を薬として世に出すことを目指して、いずれも海外での臨床試験が健常人や肝炎患者を対象に計画・実施されたが、全身投与における KRN7000 のヒトでの効果は限定的であると結論付けられ、その開発は中断となった。

通常であれば開発の中断の決定とともに KRN7000 やアゲラスフィンに対する科学的な興味は失われるところであるが、現在においても KRN7000 は NKT 細胞を活性化する「最強」のリガンドである点が評価され、NKT 細胞研究のための試薬として広く販売されるとともに、誘導体化や DDS (薬物送達)、さらには細胞移入療法の *ex vivo* での細胞の活性化剤などとして開発の対象となっ

ている。アゲラスフィンの発見から 30 年近くが経過する 2018 年末の時点においてもこのようなアクティビティがあることには驚かされるとともに、いかに NKT 細胞を介したさまざまな疾患を対象とした治療法の開発が魅力的で期待されているかを物語っている。

おわりに

初期の臨床試験の実施により明らかとなった KRN7000 の医薬品としてのいくつかの欠点は、今日においても克服されてはいない。しかしながら KRN7000 によりその詳細な機能が明らかとなった NKT 細胞とこの細胞を利用した免疫関連疾患治療法の開発という目標に対する魅力はいささかも失われてはおらず、むしろさらに魅力を増したと言える。

今後もこの領域への多くの科学者の参入により NKT 細胞関連の研究が活発化し、いつの日か何らかの形で NKT 細胞を用いた医療が確立することを強く期待したい。その時に海洋生物由来の agelasphin が再び脚光を浴び、同時に海洋天然物化学の領域も活発化することを願いたい。

文 献

- 1) 白岩善博：海洋微細藻類の光合成・物質生産と地球環境, Photosynthetic biomass production by marine microalgae and its impact on global environment. *Chemical Times* 238 : 2-9, 2015
- 2) 松永是, 竹山春子, 横内裕子：マリゲノム研究の今後の展望, Prospective of Marinegenome Research. *日本海水学会誌* 59 : 4-11, 2005
- 3) Uchimura A, Shimizu T, Morita M, et al. : Immunostimulatory activities of monoglycosylated α -D-pyranosylceramides. *Bioorg Med Chem* 5 : 2245-2249, 1997
- 4) Tashiro T, Mori K : Fifteen years since the development of KRN7000-structure-activity relationship studies on novel glycosphingolipids which stimulate natural killer T cells. *Trends Glycosci Glycotechnol* 22 : 280-295, 2010
- 5) Koezuka Y, Motoki K, Sakai T, et al. : Antitumor activity of KRN7000 (α -galactosylceramide) and its novel immunostimulatory mechanism. *Recent Res Devel Cancer* 1 : 341-354, 1999
- 6) Giaccone G, Punt CJ, Ando Y, et al. : A phase I study of the natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* 8 : 3702-3709, 2002

非小細胞肺癌に対する NKT 細胞免疫療法の開発

石井 絢菜, 高見真理子, 本橋新一郎

千葉大学大学院医学研究院免疫細胞医学

NKT cell-based immunotherapy for non-small-cell lung cancer

Ayana Ishii, Mariko Takami, Shinichiro Motohashi

Department of Medical Immunology, Graduate School of Medicine, Chiba University

Abstract

Invariant natural killer T (iNKT) cells are a unique lymphocyte subpopulation that possess an invariant T cell receptor (TCR) and recognize glycolipid antigens, such as α -Galactosylceramide (α GalCer), presenting on CD1d. Activated iNKT cells show a direct and indirect anti-tumor effect by producing effector molecules and cytokines that activate other immune cells, including NK cells and cytotoxic T cells. We are currently focusing on the development of immunotherapy targeting iNKT cells and have conducted early-phase clinical trials for non-small-cell lung cancer (NSCLC). Previous clinical studies have shown that the intravenous injection of α GalCer-pulsed dendritic cells (DCs) induced the activation of endogenous iNKT cells and iNKT cell-dependent responses. Furthermore, an increase in the number of IFN- γ -producing cells among peripheral blood mononuclear cells has been shown to be associated with a prolonged survival. A dramatic infiltration of iNKT cells in the tumor microenvironment was also observed after the injection of α GalCer-pulsed DCs. Based on these results, a phase II clinical trials of α GalCer-pulsed DCs for NSCLC were designed as an Advanced Medical Technology and approved by the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare. Patients with advanced or recurrent NSCLC who had received first-line chemotherapy underwent intravenous injection of α -GalCer-pulsed DCs. α GalCer-pulsed DCs were found to be well-tolerated and prolonged the overall survival. We also discuss future potential combination therapies of iNKT cell-based immunotherapy to achieve enhanced anti-tumor activity and provide better treatment options for patients with advanced NSCLC.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 25~29, 2019

Key words : NKT 細胞, 免疫療法, 非小細胞肺癌, 樹状細胞

はじめに

CD1d 拘束性のインバリアントナチュラルキラー T (invariant natural killer T : iNKT) 細胞は, 単一な T 細胞受容体 (ヒトでは Va24-J α 18 鎖と V β 11 鎖, マウスでは Va14-J α 18 鎖と V β 8.2 鎖) を発現し, MHC クラス I 様分子である CD1d 上に提示された糖脂質抗原を認識し活性化するリンパ球である。活性化した iNKT 細胞は, パーフォリンなどの細胞傷害分子の産生を介した直接的細胞傷害活性を示すと同時に, IFN- γ などのサイトカインを大量に産生し, NK 細胞や CD8⁺ T 細胞などの活性化を誘導することにより, 強力な抗腫瘍効果を発揮する¹⁾。

ヒト iNKT 細胞は末梢血中に非常に少ない割合 (0.01~0.1%程度) でしか存在しないため, その機能的な解析は

困難が伴うが, 1997 年に iNKT 細胞を活性化させるリガンドとして, スフィンゴ糖脂質である α -ガラクトシルセラミド (α -Galactosylceramide : α GalCer) が発見されて以降, がん治療に iNKT 細胞の示す抗腫瘍効果を利用する研究が発展してきた²⁾。本稿では, その中で当研究室がこれまで行ってきた iNKT 細胞を標的とした免疫療法の開発研究として, 肺癌に対する α GalCer パルス樹状細胞を用いた臨床試験の結果を示すと同時に, 先進医療 B として実施した, α GalCer パルス樹状細胞を用いた第 II 相試験について概説する。

1. 肺癌に対する NKT 細胞免疫療法

2018 年に全世界で最も多く診断されたがんは肺癌であり, がん死亡数の第 1 位 (18.4%) を占めている³⁾。日本では, 肺癌は 2018 年のがん死亡数予測において, 男性

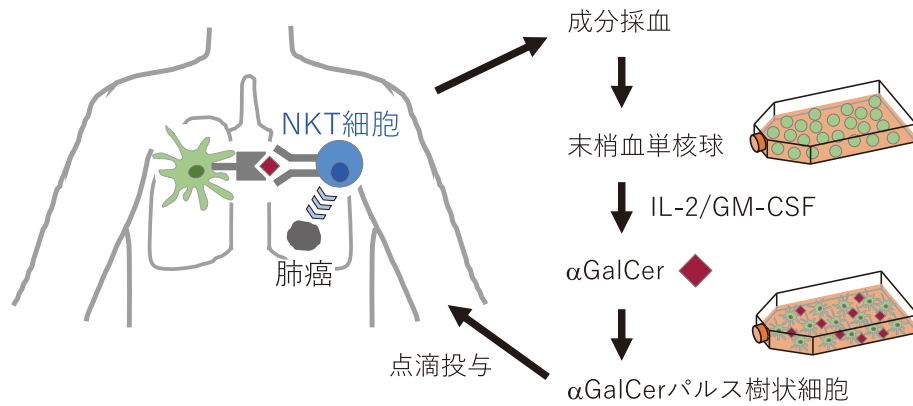


図 1 NKT 細胞を標的とした免疫療法の概要

肺癌患者から成分採血によって末梢血単核球を分離した後、IL-2 と GM-CSF 存在下で6日間もしくは13日間培養する。患者に投与する1日前に α GalCer を添加し、樹状細胞を含むすべての培養細胞 (α GalCer パルス樹状細胞) を点滴静脈注射により患者に投与する。静脈内投与された α GalCer パルス樹状細胞は血行性に肺に到達し、腫瘍局所にて NKT 細胞を活性化する。

の第1位 (25%)、女性の第2位 (14%) を占め、がん罹患数予測においても上位を占めている⁴⁾。また年齢別にみると、70歳以上でがん死亡全体に占める肺癌の割合が大きくなっている。一般的に、肺癌は予後不良であるとされ、肺癌全体の5年生存率は40%前後となっている。

肺癌は大きく2つの組織型に分かれ、そのうち非小細胞肺癌 (腺癌・扁平上皮癌・大細胞癌など) が大多数を占める。とくに、切除不能の進行非小細胞肺癌に対しては、標準治療として化学療法が用いられてきたが、根治は難しく極めて予後が不良である。近年は免疫チェックポイント阻害薬を用いた免疫療法の適応が拡大されつつあるが、いまだ単剤での効果は限定的で、さらなる治療効果が期待できる新規治療法が求められている。その中で、当研究室では幅広い免疫応答に関与する iNKT 細胞を標的とした治療法の確立を目指し、以下に述べる非小細胞肺癌を対象とした数々の臨床研究や、患者検体を用いたパイロットスタディを通して、 α GalCer パルス樹状細胞の投与がもたらす全生存期間の延長効果を始めとする有効性や安全性を明らかにしてきた。

2. α GalCer パルス樹状細胞の樹立

iNKT 細胞を *in vivo* にて活性化させるには、主に樹状細胞などの抗原提示細胞が大量に必要となる。しかし一般的な、末梢血中の CD14⁺ 単球を IL-4 と GM-CSF 存在下で培養し樹状細胞を誘導する従来の手法では十分な細胞数が得られないため、代替方法が求められた。そこで、肺癌患者の全末梢血単核球を IL-2 と GM-CSF 存在下で培養し、抗原提示細胞を分化誘導させる新たな手法を見出した (図1)⁵⁾。この手法では、樹状細胞だけではなく他の免疫細胞も含まれるため、とくに培養系の中の T 細胞による樹状細胞の成熟化が促進され、従来の手法より

も iNKT 細胞の活性化と増殖が増強されることが明らかとなった。以下、この手法により分化誘導した樹状細胞を含むすべての細胞を、 α GalCer パルス樹状細胞と称している。

3. これまでに実施した臨床試験： α GalCer パルス樹状細胞の投与

3-1. 切除不能進行肺癌に対する α GalCer パルス樹状細胞：第 I 相臨床試験

上述した手法で培養した細胞を用いて、第 I 相臨床試験を実施した⁶⁾。この臨床研究では、切除不能もしくは術後再発の非小細胞肺癌で標準治療を終了した方を対象とし、投与する α GalCer パルス樹状細胞数を3条件 (5×10^7 cells, 2.5×10^8 cells, 1×10^9 cells/m²) とする用量漸増法にて安全性の検討を行った。3カ月にわたって1コース2回の点滴静脈注射による投与を2コース計4回行い (図2)、全登録患者11名のうち9名でプロトコル治療を完遂した。

その結果、明らかな腫瘍縮小効果は認められなかったものの、 α GalCer パルス樹状細胞を 1×10^9 cells/m² を投与した患者3名において、末梢血中の iNKT 細胞の増加と1年以上の長期生存を認めた。また全患者で Grade 2 以上の有害事象は認められなかったことから、 α GalCer パルス樹状細胞投与の安全性が示唆された。

3-2. 切除不能進行肺癌に対する α GalCer パルス樹状細胞：第 I / II 相臨床試験

次に、安全性に加え臨床上の効果を検証すべく、臨床病期 III B, IV 期の切除不能もしくは術後再発の非小細胞肺癌患者を対象とした第 I / II 相臨床試験を実施した⁷⁾。先述した第 I 相臨床試験の結果をふまえ、 α GalCer パル

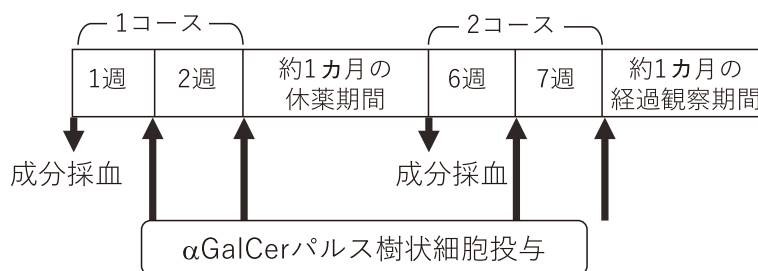


図2 αGalCer パルス樹状細胞による治療プロトコール
成分採血を行い、1週間後および2週間後にαGalCerパルス樹状細胞投与することを1コースとし、1カ月の休薬期間後に2コース目を施行する。

ス樹状細胞 1×10^9 cells/ m^2 を2コース計4回、点滴静脈注射により投与した。抗癌剤による化学療法施行後、最低4週間の休薬期間後に登録を行った。全登録患者23名のうち17名が完遂した。

その結果、17名の生存期間中央値は18.6カ月、2年生存率は41.2%であった。既存の報告では、ドセタキセルを用いた二次治療の大規模な第Ⅲ相臨床試験での生存期間中央値は7.0~7.5カ月⁸⁾、抗PD-1抗体を用いた免疫療法のランダム化比較試験(Randomized controlled trial)：第Ⅱ/Ⅲ相臨床試験では10.4~12.7カ月⁹⁾であった。われわれが行ったのは第Ⅰ/Ⅱ相臨床試験であるため、一概に他の報告と比較はできないが、NKT細胞免疫療法による生存期間延長効果を主要評価項目とした次の試験を計画するのにこの試験の結果は十分と考えられた。

また免疫応答に関しては、10症例において、αGalCer刺激により末梢血中のIFN- γ 産生細胞が2倍以上に増加しており(Good responder group)、一方で残りの7名の患者においては、若干の増加もしくは変動を認めなかった(Poor responder group)。両群の生存期間中央値および2年全生存率で比較すると、Poor responder groupでは9.7カ月・14.3%にとどまるのに対し、Good responder groupでは31.9カ月・60.0%と非常に良好な値を示し、有意差を認めた。過去に、ここで示すIFN- γ 産生細胞はαGalCer刺激により*in vivo*で活性化したNKT細胞とNK細胞であることを明らかにしている^{10,11)}。以上より、IFN- γ 産生細胞数の増加は全生存期間の延長と関連があることが示唆された。

有害事象に関して、1名の患者でGrade 3の深部静脈血栓症の再発を認め、入院後にヘパリンの持続投与が行われた。この患者は試験登録の前に左大腿に深部静脈血栓症(DVT)を発症しており、ワーファリンが処方されていた。効果安全性評価委員会によってワーファリンの投与量が不足したことでDVT再発が起こったと判断され、プロトコール治療との因果関係は認められなかった。また他の全患者でGrade 2以上の毒性や重篤な副作用は認められなかったことから、αGalCerパルス樹状細胞

投与の安全性が示された。

3-3. 切除可能進行肺癌に対するαGalCerパルス樹状細胞

先述した臨床研究で示された、非小細胞肺癌患者の全生存期間延長といった臨床効果発揮メカニズムを明らかにするために、αGalCerパルス樹状細胞の投与が腫瘍微小環境に及ぼす影響を検討することとした¹²⁾。この試験では、臨床病期ⅡB、ⅢA期で切除可能と判断された進行非小細胞肺癌症例を対象とし、手術の7日前にαGalCerパルス樹状細胞 1×10^9 cells/ m^2 を1回点滴静脈注射により投与した。αGalCerパルス樹状細胞投与後にiNKT細胞を中心とした免疫細胞がどのような免疫応答メカニズムを示すのかを検討するために、切除された腫瘍組織や非腫瘍部肺組織、リンパ節および末梢血を採取し、免疫学的解析を行った。またαGalCerパルス樹状細胞投与を実施していない進行非小細胞肺癌の切除検体をコントロール群として用いた。

その結果、αGalCerパルス樹状細胞投与群では、正常肺組織やリンパ節に含まれる単核球細胞よりも、腫瘍浸潤リンパ球中に高い割合でiNKT細胞が存在していた(0.002~0.031% vs 0.15~1.86%)。また腫瘍浸潤リンパ球中のiNKT細胞の割合を平均値と比較してみると、コントロール群よりもαGalCerパルス樹状細胞投与群で増加傾向にあった(0.165% vs 0.68%)。さらにαGalCer刺激応答性のIFN- γ 産生細胞数を検討したところ、αGalCerパルス樹状細胞投与群で、腫瘍浸潤リンパ球中のIFN- γ 産生細胞数の顕著な増加を認めた。以上より、αGalCerパルス樹状細胞の投与によって、腫瘍微小環境においてiNKT細胞の局所的な集積が促進され、IFN- γ の産生などの抗腫瘍免疫応答を惹起していることが示された。

4. 切除不能進行肺癌に対するαGalCerパルス樹状細胞：先進医療B

これまで実施してきた臨床研究において、αGalCerパルス樹状細胞投与の安全性と臨床上の有用性を明らかに

してきたが、NKT細胞免疫療法として切除不能進行期もしくは再発の非小細胞肺癌に対する新規二次治療の確立を目指すべく、先進医療Bとして第Ⅱ相臨床試験を実施した（厚生労働省第74回先進医療技術審査部会、第67回先進医療会議で報告済）。本試験では、臨床病期ⅢB、Ⅳ期もしくは術後再発の非小細胞肺癌と診断され、抗癌剤による一次治療を受けた症例を対象とし、最終の化学療法から4週間の休薬期間後に登録を行った。プロトコル治療として、 α GalCerパルス樹状細胞を2コース計4回、点滴による静脈内投与を行った。これまでの結果から、本試験で期待する全生存期間中央値を17カ月、閾値を8カ月とし、必要症例数を35例と設計した。

2012年より開始された本先進医療は、2015年に予定症例数35例の登録が完了し、2017年に全症例の追跡期間を終了した。その結果、全登録患者35名の生存期間中央値は21.9カ月、2年生存率は37.1%であった。既報で報告した全生存期間と関連するIFN- γ 産生細胞数に関しては、Good responder group（24名）とPoor responder group（8名）の生存期間中央値を比較すると24.7カ月と15.1カ月であり、Good responder groupで予後良好な傾向を認めた（Logrank test, $p=0.06$ ）。

またプロトコル治療期間中に発生した有害事象に関しては、1名の患者で現病悪化に伴う腫瘍疼痛の発生を認め、症状を緩和させる治療のために入院したため重篤と判断されたものの、緩和治療により軽快し、本治療との因果関係は無いと判断された。また他の症例において重篤と判断される有害事象は認められなかった。

5. 今後の課題

先進医療Bとして実施した α GalCerパルス樹状細胞の第Ⅱ相臨床試験では、過去に実施した臨床研究と同等の結果が示唆された。今後の検証試験として、コントロール群を設定したランダム化比較試験の実施が必要であると考えている。その方法として、臨床病期ⅢB期に対する放射線療法併用化学療法に上乘せ+維持療法で有効性を示したDurvalumab¹³⁾や、臨床病期Ⅳ期に対するプラチナ製剤化学療法との併用にて有効性を示したPembrolizumab^{14,15)}、切除可能な進行肺癌に対する術前Nivolumabの有効性¹⁶⁾など、既存の標準治療である抗癌剤・放射線・手術との併用で有効な治療となり得ることを考慮して、試験デザインを検討している。さらにわれわれは免疫チェックポイント阻害薬が非小細胞肺癌の一次治療や二次治療の標準治療となったことをふまえ、免疫チェックポイント阻害薬とNKT細胞免疫療法との併用療法の可能性についても検討している¹⁷⁾。免疫チェックポイント阻害薬の登場とその応用によって、現状の非小細胞肺癌に対する診療ガイドラインは頻繁に改訂を要する状況となっており、日々刻々と新たな治療オプションが報告されている。進行肺癌を根治できるようになる

までは、標準治療に対する改善の努力は続けられることから、その中でNKT細胞を用いた免疫療法が果たす役割を臨床試験にて明らかにすることで、非小細胞肺癌の治療成績向上に貢献していきたい。

文 献

- 1) Takami M, Ihara F, Motohashi S : Clinical Application of iNKT Cell-mediated Anti-tumor Activity Against Lung Cancer and Head and Neck Cancer. *Front Immunol* 9 : 2021, 2018
- 2) Kawano T, Cui J, Koezuka Y, et al. : CD1d-restricted and TCR-mediated activation of $V\alpha 14$ NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278 : 1626-1629, 1997
- 3) Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. : Global cancer statistics 2018 : GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68 : 394-424, 2018
- 4) がんの統計編集委員会編集 : “がんの統計 '18”. 公益財団法人がん研究振興財団, 2018
- 5) Ishikawa E, Motohashi S, Ishikawa A, et al. : Dendritic cell maturation by $CD11c^-$ T cells and $V\alpha 24^+$ natural killer T-cell activation by α -galactosylceramide. *Int J Cancer* 117 : 265-273, 2005
- 6) Ishikawa A, Motohashi S, Ishikawa E, et al. : A phase I study of α -galactosylceramide (KRN7000)-pulsed dendritic cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11 : 1910-1917, 2005
- 7) Motohashi S, Nagato K, Kunii N, et al. : A phase I-II study of α -galactosylceramide-pulsed IL-2/GM-CSF-cultured peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *J Immunol* 182 : 2492-2501, 2009
- 8) Shepherd FA, Dancey J, Ramlau R, et al. : Prospective randomized trial of docetaxel versus best supportive care in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 18 : 2095-2103, 2000
- 9) Herbst RS, Baas P, Kim DW, et al. : Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010) : a randomised controlled trial. *Lancet* 387 : 1540-1550, 2016
- 10) Motohashi S, Ishikawa A, Ishikawa E, et al. : A phase I study of *in vitro* expanded natural killer T cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 12 : 6079-6086, 2006
- 11) Motohashi S, Nakayama T : Clinical applications of natural killer T cell-based immunotherapy for cancer. *Cancer Sci* 99 : 638-645, 2008
- 12) Nagato K, Motohashi S, Ishibashi F, et al. : Accumula-

- tion of Activated Invariant Natural Killer T Cells in the Tumor Microenvironment after α -Galactosylceramide-Pulsed Antigen Presenting Cells. *J Clin Immunol* 32 : 1071-1081, 2012
- 13) Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, et al. : Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 377 : 1919-1929, 2017
 - 14) Paz-Ares L, Luft A, Vicente D, et al. : Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 379 : 2040-2051, 2018
 - 15) Mok TSK, Wu YL, Kudaba I, et al. : Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042) : a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *Lancet* 393 : 1819-1830, 2019
 - 16) Forde PM, Chaft JE, Smith KN, et al. : Neoadjuvant PD-1 Blockade in Resectable Lung Cancer. *N Engl J Med* 378 : 1976-1986, 2018
 - 17) Kamata T, Suzuki A, Mise N, et al. : Blockade of programmed death-1/programmed death ligand pathway enhances the antitumor immunity of human invariant natural killer T cells. *Cancer Immunol Immunother* 65 : 1477-1489, 2016

第4章

一般演題

うつ病の病態における神経炎症仮説と 治療ターゲットとしての可能性

古賀 農人¹⁾, 戸田 裕之¹⁾, 木下 学²⁾, 吉野 相英¹⁾

¹⁾防衛医科大学校精神科学講座, ²⁾同 免疫微生物学講座

Brain inflammation hypothesis in depression and its potential as a therapeutic target

Minori Koga¹⁾, Hiroyuki Toda¹⁾, Manabu Kinoshita²⁾, Aihide Yoshino¹⁾

¹⁾Department of Psychiatry, National Defense Medical College

²⁾Department of Immunology and Microbiology, National Defense Medical College

Abstract

Most of the current depression drugs have been developed based on the monoamine hypothesis. However, about 30% of patients indicate resistance to medication, and patients with relatively mild depression get only a small benefit from antidepressants. In addition, although an increase in monoamine concentration in synaptic gaps by monoamine transporter inhibition occurs within a relatively short time, it takes about six weeks to show an antidepressant effect in actual clinical settings. There are cases in which an antidepressant effect is observed for drugs that do not regulate the amount of monoamine. These facts suggest the presence of a variety of pathophysiologies in depression and depressive symptoms. Recently, a relationship between the onset of depression and the expression levels of immune-related molecules such as cytokines in the blood and the brain derived from patients with depression has been pointed out. Although there is so far no medication targeting neuroinflammation, many recent studies have shown that inflammation is not negligible and a significant factor in the pathogenesis of depression. Therefore, it is meaningful to focus on inflammation for elucidating the pathogenesis and developing medications. In this paper, we describe the pathogenesis pathways known to be involved in the inflammation, the serotonin hypothesis, hypothalamic-pituitary-adrenal axis hypothesis, and neurodegeneration/neurogenesis hypothesis and describe the applications to therapy and preventions based on them.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 30~34, 2019

Key words : 神経炎症仮説, うつ病, ミクログリア, サイトカイン

はじめに

うつ病に関する社会経済的負担は2兆円を超えており、患者自身の負担はもちろんのこと、社会的にもこの疾患に関する対策は急務である。1950年代に抗ヒスタミン剤として開発されたイミプラミンに抗うつ作用があることが偶然発見され、その後、この薬剤がモノアミントランスポーター阻害により、シナプス間隙のモノアミン(ノルアドレナリン, セロトニン)の濃度上昇を介して抗うつ効果を発揮するモノアミン仮説が1960年代に提唱された。それから現在に至るまで、うつ病の治療薬のほとんどは、モノアミン仮説に基づいて開発されている。しかし、治療を受けた患者の10~30%は投薬に対して抵

抗性を示すことや、比較的軽度のうつ病の場合には抗うつ薬の効果が得られにくいといったことがみられる。また、モノアミントランスポーター阻害薬によるシナプス間隙におけるモノアミン濃度の上昇は比較的短時間に起きるにもかかわらず、実際の臨床場面においては効果が現れるにはおよそ6週間かかるというタイムラグに対して、十分な説明ができていないことや、モノアミンの量を調節しない薬物でも抗うつ効果が認められる場合があることから、うつ病・うつ症状には多様な病態の存在が示唆されている。この様な状況で、神経炎症は、新しい病態メカニズム解明のキーワードとして焦点が当てられている。

中枢神経疾患を持つ患者由来の血液や死後脳組織にお

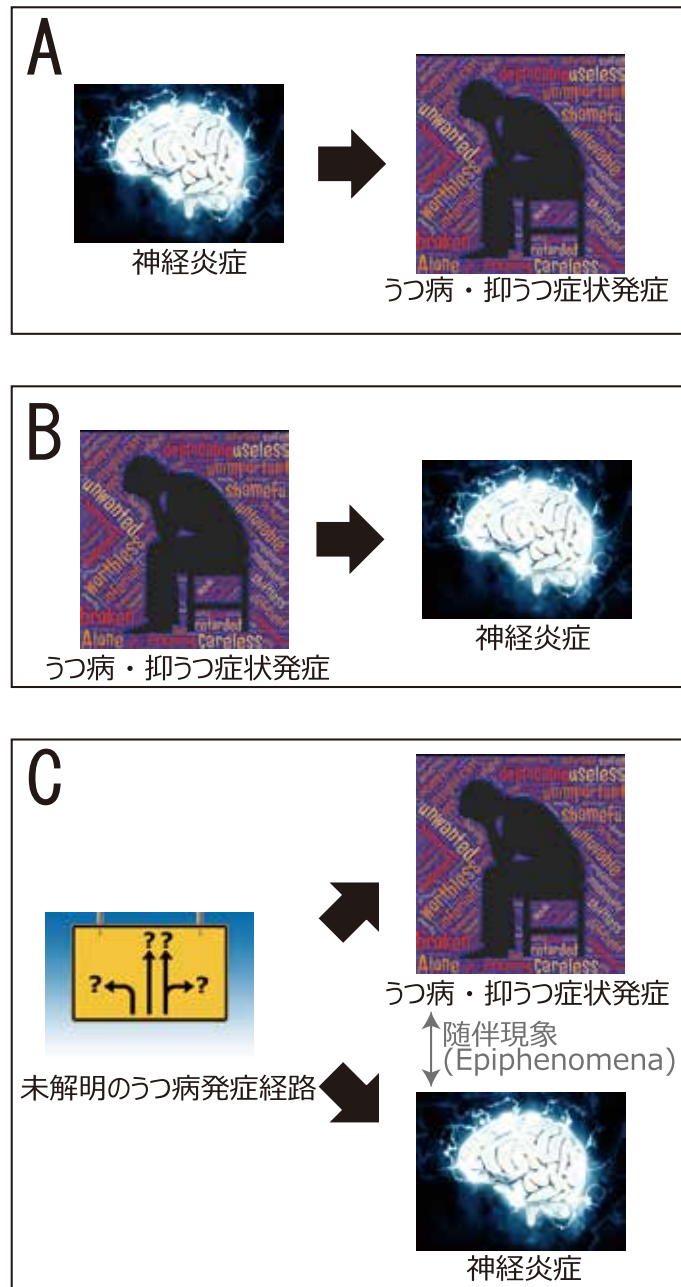


図 1 うつ病・抑うつ症状と神経炎症の関係

けるサイトカインなどの免疫にかかわる分子の発現量の変化が指摘され始めたのは1900年代後半からで、免疫系の異常と疾患の発症との関係が提案されるようになった。2000年代になり、本格的に、臨床研究や基礎研究ともに多様な研究により、炎症と中枢神経疾患における病態との関連や因果関係を示唆する結果が多数報告されるようになった。免疫系の異常は当初アルツハイマーやパーキンソン病といった神経変性疾患における報告が中心であったが、2004年頃から統合失調症や双極性障害、うつ病などの精神疾患においても、病態を構成する要因として炎症が着目されるようになった。うつ病と炎症をキーワードにPubMedで検索すると、2004年以前は年

間数十件～100件未満であったが、近年ではその数は500～600件を超え、いまだに明らかとなっていないうつ病やうつ症状の多様な病態の一つとして、炎症に多くの注目が集まっていることがうかがえる。これまでに報告されている多数の研究結果から、炎症がうつ病や抑うつ症状と関係があることは疑う余地はないが、その因果関係に関しては、いくつかのパターンが提案されており、今でも議論が続いている。炎症とうつ病の関係で、はじめにあげられるのは、脳内炎症がうつ病の病態を形成するというものであろう(図1A)。これは、重篤な敗血症の患者が回復した後に抑うつ症状や不安障害を発症するリスクが高いこと¹⁾や、インターフェロン治療後に抑う

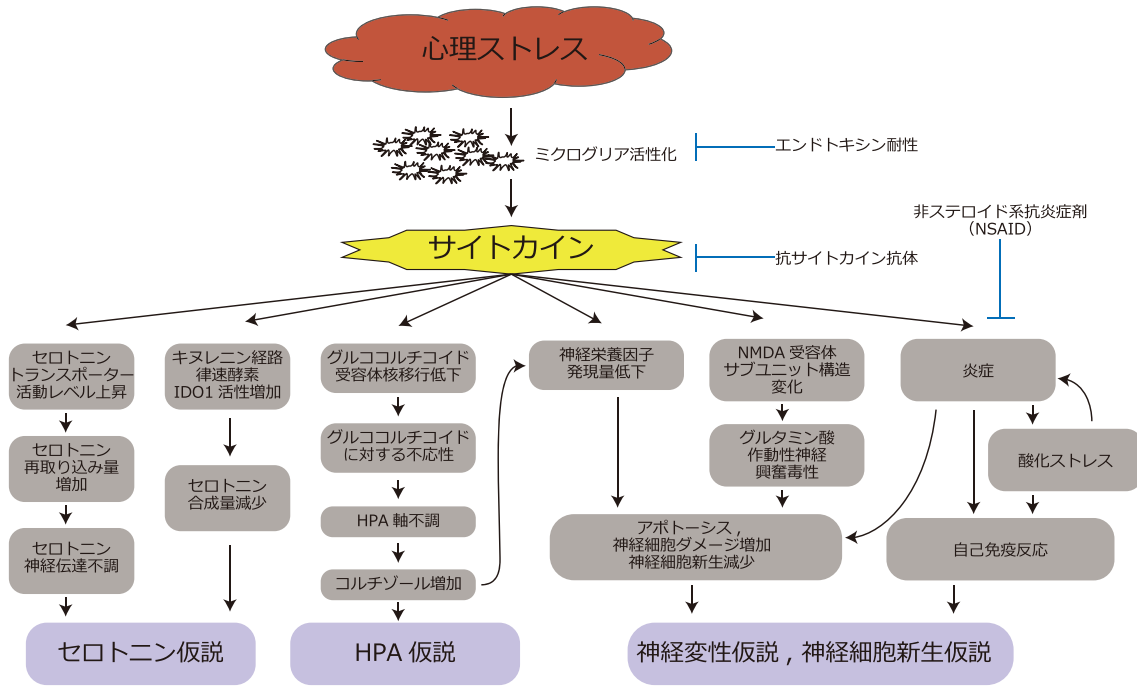


図 2 神経炎症仮説に基づくうつ病・抑うつ症状発症経路

うつ病を含む精神神経症状を発症することが報告されていること²⁾、および、動物を用いた研究ではリポ多糖 (Lipopolysaccharide : LPS) 投与により全身炎症を惹起すると抑うつ症状が出現する³⁾という結果が支持している経路である。この経路とは逆にうつ病・抑うつ症状の病態が免疫系の異常の要因となること (図 1B) を示唆する報告もある。Song らは精神疾患に罹患した対象者を縦断的に解析した結果、精神疾患発症後に自己免疫疾患を発症する患者が有意に多いことを示した⁴⁾。うつ病と炎症の相互作用についてはこのいずれか、あるいは両方であろう。これら以外のパターンとしては図 1C に示すように、何らかの機序により、うつ病・抑うつ症状の病態形成と並行して炎症も引き起こされるパターンである。これは、随伴現象 (Epiphenomena) で、炎症は、バイオマーカーとしての役割はあり得るが、うつ病の病態形成には関与していない。

うつ病・うつ症状の病態における炎症については、現在はまだ臨床応用には至っていないものの、種々の研究によりこれらの関連ならびに因果関係に関する成果は確実に積み重ねられており、病態解明や臨床応用の方向へと進んでいる。本稿では、炎症の関与が示されている病態形成経路についてあげるとともに、それらに基づいた治療法や予防法への応用について述べる。

1. 炎症性うつ病・うつ症状の病態における神経炎症仮説

脳と免疫の相関において最も主要なメディエーターとしてサイトカインがよく知られているところであり、さ

まざまなストレス反応の形成に重要な役割を果たしていることが示されている。サイトカインは免疫系のバランスの乱れなどによってその制御がうまくいかなくなると、サイトカインストームと呼ばれるサイトカインの過剰な産生状態を惹起し、程度によっては致死的な状態に陥ることさえある。サイトカインは本来、自身の防御のために持っている機能であるが、精神神経疾患や身体疾患のさまざまな病態への関与を示唆する知見が数多く報告されている。図 2 は、現在までに報告されている研究で支持されている神経炎症仮説に基づくうつ病発症経路を示している。サイトカインは炎症が引き起こす病態を形成するこれらの経路における根源的な役割を持つメディエーターである。また、サイトカインは、個体における炎症レベルを反映するマーカーとして用いられることも多い。

1-1. セロトニン仮説

神経炎症仮説におけるセロトニン仮説との関連については 2 つの経路が報告されている。一つはサイトカインがセロトニントランスポーターにおけるセロトニンとの親和性を変化させることで、セロトニントランスポーターの活性が上昇し、セロトニン再取り込み量が増加することで引き起こされるセロトニン神経伝達不調である。もう一つは、炎症性のサイトカインが、トリプトファンを基質として使用してセロトニンが合成される経路よりも同じ基質からキヌレニンを合成する代謝経路におけるインドールアミン酸素添加酵素 (Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 : IDO1) を活性化することにより、結果

としてセロトニンの合成が減少してしまうことが知られている。この2つの経路はうつ病におけるセロトニン仮説の分子メカニズムとして知られている。

1-2. 視床下部-下垂体-副腎系 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis : HPA axis) 仮説

さまざまなストレスに対する生体反応としてはHPA axisがよく知られている。この系には、ストレス反応が過剰にならないようにグルココルチコイド受容体を介したフィードバック機構が存在している。過去の臨床研究によって、健常者とうつ病の患者に対してコルチゾールへの反応を調査した結果では、うつ病の患者においてはこのフィードバック機構の機能が低下しており、結果としてコルチゾールの過剰な放出が認められた。また、IL-1のような炎症性サイトカインが細胞質のグルココルチコイド受容体の核移行を阻害する報告があり、これが神経炎症仮説における中枢神経系-内分泌系の機能異常のメカニズムとして知られている。また、異常なレベルのコルチゾールの放出は脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor : BDNF) の発現量低下を招き、結果として神経細胞新生を減少させることが指摘されている。これらの異常は、抗うつ薬や電気けいれん療法といったうつ病治療により回復することから、うつ病の病態形成のメカニズムであることが示唆されている。

1-3. 神経変性仮説・神経細胞新生仮説

うつ病患者は気分の落ち込み、意欲や興味の低下といった気分の障害だけでなく、記憶を含む認知機能も障害されることが知られている。これらの脳機能には海馬が重要な部位であり、うつ病との関連についての知見が集積されている。かつては、神経細胞は胎生期や幼若期に新生されたものであって、その後の成熟期では神経細胞は決して生まれないと信じられてきたが、1990年代後半、成体脳でも神経細胞が新生されていることが証明され、その後、多くの精神疾患や神経疾患の病態形成に寄与する重要な現象であることを示唆する多くの知見が得られている。うつ病の神経炎症仮説においては、炎症性のサイトカインにより神経保護の役割を持つBDNFの発現量低下が誘導され、アポトーシスや神経細胞新生の減少が知られている。また、サイトカインによるNMDA受容体のサブユニット構成が変化することによる興奮毒性も、アポトーシス、および神経細胞新生の減少を引き起こす。神経細胞新生は側脳室周囲、嗅球および海馬で起こることが知られているが、とくに海馬はHPA axisに対して抑制的に働いている。サイトカインによる海馬における神経細胞新生の抑制は、HPA経路の異常につながるのかもしれない。炎症と密接に関係する酸化ストレスは炎症によって引き起こされることが知られている (酸化ストレスは炎症を引き起こす要因とし

ても知られている)。これらによるアポトーシスや神経細胞新生の減少、および自己免疫反応もうつ病の病態形成における神経変性仮説・神経細胞新生仮説のメカニズムであることが知られている。

2. うつ病における炎症をターゲットとした治療法・創薬への応用の可能性

2-1. 非ステロイド系抗炎症剤

うつ病の病態形成への炎症の関与は多くの研究結果が支持しているが、うつ病における免疫学的変化、とくに炎症をターゲットとした治療の検討が始められたのは最近のことである。臨床的な検討は、非ステロイド系抗炎症剤 (Non-steroidal anti-inflammatory drugs : NSAIDs) は単剤療法もしくは既存の抗うつ薬の補助剤としての使用が提案されており、これまでに、選択的シクロオキシゲナーゼ2および非選択型シクロオキシゲナーゼ阻害薬 NSAID について、臨床試験が行われてきた。これらの結果はうつ病に対するNSAIDの使用を支持する結果が得られているものの、検討されている選択的シクロオキシゲナーゼ NSAID がセレコキシブに偏っていること、非選択型シクロオキシゲナーゼ阻害薬 NSAID の検討では後ろ向きコホート研究では有意な結果が得られていないこと、また、現在までに検討されている臨床試験では急性期のうつ病患者が対象であることなどから、うつ病に対する抗炎症治療の有用性に関して、今後のさらなる検討が必要であろう。

2-2. 抗サイトカイン抗体・中和抗体

うつ病における種々の病態形成経路における根源的なサイトカインを中和することで抑うつ症状は形成されなくなることを抑うつ症状モデル動物を用いた検討で報告されている。炎症性サイトカイン IL-1 α および TNF- α に対する抗体をマウスの内側前頭前皮質に投与した場合に抑うつ症状モデルマウスにおける症状緩和が認められたという報告がある。他方で、IL-6受容体に対する抗体をマウスの静脈に投与した場合に抑うつ症状が緩和したという報告がある。興味深いことに、この抗体は脳室への投与では症状緩和が認められなかったという。これらのことは、うつ病の病態形成において末梢組織と中枢神経系で異なるメカニズムの存在を示唆している。

2-3. エンドトキシン耐性

われわれのグループはLPS投与による全身炎症を介した抑うつ症状モデルマウス³⁾を用いて炎症性の抑うつ症状発症メカニズムの解明を目的とした分子生物学的検討を進めている。高用量のLPSは全身炎症を引き起こすが、比較的低用量のLPSを事前に投与 (プレコンディショニング) することで、組織や器官の増強や保護的な作用を示すことが報告されている。脳に関しては脳梗塞

や脳損傷のモデル動物においてLPSのプレコンディショニングが神経保護的に作用することが示されているが、精神症状に着目したプレコンディショニングの検討はこれまでなかった。そこでわれわれはLPSによる全身炎症による抑うつ症状モデルに対してLPSプレコンディショニングを行った場合の行動変化および生化学的变化を調査した。その結果、全身炎症後に出現する抑うつ症状が減少したことから、LPSのプレコンディショニングに抑うつ症状発症の予防作用が示唆された。また、脳組織中の生化学的变化としては、ミクログリアの活性化レベルがLPSプレコンディショニングにより抑えられていたことが示され、この行動変化のメカニズムとしてエンドトキシン耐性の関与が示唆された。現在、この現象に着目して、分子生物学的、分子解剖学的アプローチでうつ病の病態形成における炎症の関与や治療法、創薬への応用を目的とした詳細なメカニズムの解明を進めている。

おわりに

サイトカインやホルモンの発現量の変化は、うつ病の病態との随伴現象ではないことは疑う余地はないであろう。うつ病の病態については炎症も含めて複数の仮説が提案されており、それぞれ発症や重症度との関連が明らかにされているが、それぞれの経路におけるうつ病の病態形成への寄与率は不明である。うつ病に対して現在の標準的な治療法で効果が得られない難治性の患者においては、そうではない患者よりもIL-1 β やIL-6レベル

が高いことが報告されていることなどから、少なくとも炎症に関しては病態に有意に寄与していることが示唆される。最近、炎症が関与する病態形成にかかわる分子や細胞種がようやく明らかになってきたところであり、炎症による生体内の代謝経路への影響や脳の形態学的変化についてはいまだに明らかになっていない点が多い。治療法開発や創薬のターゲットに応用するには長い道のりがあるが、精神疾患において炎症は着目すべき現象であることは確かである。

文 献

- 1) Huang CY, Daniels R, Lembo A, et al. : Life after sepsis : an international survey of survivors to understand the post-sepsis syndrome. *Int J Qual Health Care* 31 : 191-198, 2019 (doi : 10.1093/intqhc/mzy137)
- 2) Valentine AD, Meyers CA, Kling MA, et al. : Mood and cognitive side effects of interferon-alpha therapy. *Semin Oncol* 25 (1 Suppl 1) : 39-47, 1998
- 3) O'Connor JC, Lawson MA, André C, et al. : Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Mol Psychiatry* 14 : 511-522, 2009 (doi : 10.1038/sj.mp.4002148)
- 4) Song H, Fang F, Tomasson G, et al. : Association of Stress-Related Disorders With Subsequent Autoimmune Disease. *JAMA* 319 : 2388-2400, 2018 (doi : 10.1001/jama.2018.7028)

新規アジュバントとしての TLR7 リガンド・糖鎖固定化金ナノ粒子の開発

山口 徹¹⁾, 新地 浩之¹⁾, 諸石 寿朗^{2,3,4)}, 若尾 雅広¹⁾, 林 公子⁵⁾,
Cottam B. Howard⁵⁾, Carson A. Dennis⁵⁾, 隅田 泰生^{1,6)}

¹⁾鹿児島大学大学院理工学研究科, ²⁾熊本大学大学院生命科学研究部分子酵素化学講座,
³⁾同 生命科学研究部附属健康長寿代謝制御研究センター, ⁴⁾国立研究開発法人科学技術振興機構さきがけ,
⁵⁾Moores Cancer Center, University of California, San Diego, ⁶⁾(株) スディックスバイオテック

Development of Toll-like receptor 7 ligand and sugar chain immobilized gold nanoparticles for vaccine adjuvant and immunotherapy

Toru Yamaguchi¹⁾, Hiroyuki Shinchi¹⁾, Toshiro Moroishi^{2,3,4)}, Masahiro Wakao¹⁾, Tomoko Hayashi⁵⁾,
Howard B. Cottam⁵⁾, Dennis A. Carson⁵⁾, Yasuo Suda^{1,6)}

¹⁾Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University

²⁾Department of Molecular Enzymology, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University

³⁾Center for Metabolic Regulation of Healthy Aging, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University

⁴⁾Precursory Research for Embryonic Science and Technology (PRESTO), Japan Science and Technology Agency (JST)

⁵⁾Moores Cancer Center, University of California, San Diego

⁶⁾SUDx-Biotech, Corporation

Abstract

Adjuvants enhance immune system during vaccination. Among FDA-approved adjuvants, aluminum salts are most commonly used for vaccines. Although aluminum salts enhance antibody production, they show a limited effect for the cell-mediated immune response. Thus, further development of adjuvants inducing T cell mediated immuno-responses are demanded. Toll-like receptors (TLRs) are immune-related receptors that recognize specific pathogen-associated molecular patterns and play important roles in the activation of innate immunity, which is crucial to shape adaptive immunity. Studies using TLR ligands as novel adjuvants for anti-microbial and anti-cancer immunotherapies have therefore attracted much attention. Among them, a low molecular weight TLR7 ligand, Imiquimod, has been approved for clinical use, but its use is restricted only for local administration due to unwanted adverse effects. Since TLR7 is mainly located in the endosomal compartment of immune cells, efficient transport of the ligand into the cell is important for activating TLR7. Our previous work indicated that the conjugation of a low molecular weight TLR7 ligand with serum albumin and polysaccharides can greatly enhance its potency. In this study, we examined gold nanoparticles (GNPs) as carriers, as GNPs are less toxic and can immobilize multiple molecules including antigens for pathogens and tumors. Furthermore, α -mannose for targeting antigen presenting cells was also examined for the efficient delivery of GNPs. In this paper, we describe preparation of a low molecular weight TLR7 ligand and α -mannose immobilized GNPs and its *in vitro* and *in vivo* immunostimulatory activities.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 35~39, 2019

Key words : アジュバント, Toll 様受容体, 金ナノ粒子, C 型レクチン, 自然免疫

はじめに

アジュバントは、ワクチン抗原とともに投与し、その効果を増強する目的で使用される物質（免疫増強剤）の

総称である。ワクチンによる獲得免疫の誘導には、抗原分子の投与のみでは不十分な場合が多く、その免疫原性を増強するためにアジュバントがしばしば使用される。近年では、自身の免疫系を活性化させることでがんなど

の疾患を治療する免疫療法にもアジュバントが使用されるようになり、その応用範囲が拡大している。一方、アジュバントとして最も臨床利用されているアルミニウム塩類は、液性免疫を増強するが細胞性免疫の誘導能が低いいため、免疫増強活性が十分に高くない。そのため、新たな効果的なアジュバントの開発が求められており、自然免疫を活性化する Toll 様受容体 (Toll-like receptor : TLR) のリガンドが注目されている。

TLR は、膜貫通型パターン認識レセプターの種類で、ウイルスや細菌などの病原体に特有の分子パターン (Pathogen-associated molecular patterns : PAMPs) を認識する。ヒトでは 10 種類が同定されており、病原体の感染を察知するセンサーとして働く。樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞をはじめとする免疫細胞に多く発現し、それぞれ異なる PAMPs を認識する。TLR に PAMPs が結合し、シグナル伝達が始まると、炎症性サイトカインや I 型インターフェロンなどが産生され、自然免疫が活性化される。その後、獲得免疫の誘導が促進されることから、TLR は宿主の生体防御機構において重要な役割を担っている。

現在までにいくつかの TLR リガンドの臨床利用が認可されている。例えば、TLR4 リガンドのモノホスホリルリポド A は、アルミニウム塩に吸着させた混合アジュバントとして子宮頸がんのワクチンアジュバントに利用されている。また、TLR7 の合成低分子リガンドであるイミキモドは、尖圭コンジローマや皮膚悪性黒色腫の治療薬として利用されている。この他にも種々の TLR リガンドの臨床研究が行われており、感染症やがんに対するワクチンや免疫療法のアジュバントとしての利用が期待されている¹²⁾。本稿では、TLR7 リガンドに焦点をあて、最近の研究について紹介する。

1. TLR7 リガンド

TLR7 は、細胞内のエンドソームに局在し、ウイルス特有の 1 本鎖 RNA を選択的に認識する。また、イミダゾキノリン様骨格やプリン様骨格を有する低分子化合物も認識する³⁾。低分子化合物に関しては、これまでに構造活性相関が明らかにされており、イミキモドをはじめ、レシキモド (R848) や Gardiquimod, 852A などの種々の合成低分子リガンドが開発されている。TLR7 にリガンド分子が結合すると I 型インターフェロンの産生が促進されることから、抗ウイルス薬やがん免疫療法のアジュバントとしての臨床研究が行われている。一方、合成低分子 TLR7 リガンドの多くは、全身投与すると血流で急速に拡散されるため、サイトカイン放出症候群などの重篤な副作用を引き起こす危険性がある。したがって、その利用法は局所投与に制限される。TLR7 は主に免疫細胞内のエンドソームに局在するため、TLR7 リガンドの効力を強くするためには、エンドサイトーシスに

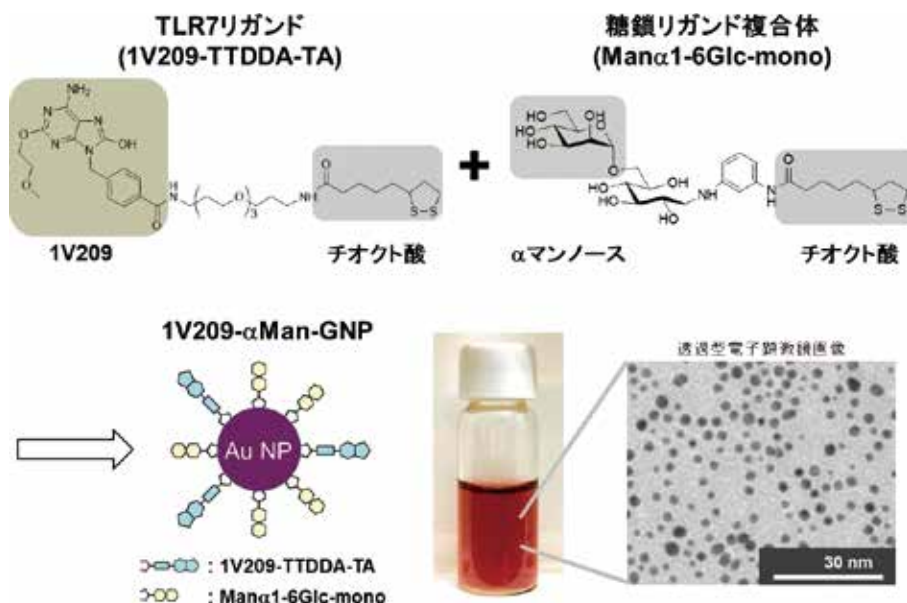
よりリガンド分子を免疫細胞内に効率的に輸送する必要がある。そこで、合成低分子 TLR7 リガンドをタンパク質や多糖類、ポリマー、ナノ粒子などの巨大分子と複合化することで薬物動態を改善し、免疫増強活性を向上させる研究が行われている⁴⁾。われわれはこれまでに、プリン様骨格を有する低分子 TLR7 リガンド (1V209) を開発し、血清アルブミンやデキストランなどに複合化することで、*in vitro* および *in vivo* での免疫増強活性が 10~10³ 倍向上したことを報告している^{5,6)}。

2. TLR7 リガンド・糖鎖固定化金ナノ粒子

われわれは最近、合成低分子 TLR7 リガンドのキャリア分子に金ナノ粒子 (Gold Nanoparticle : GNP) を用いた新規アジュバントを開発したので紹介する⁷⁾。GNP は、化学的に安定で、特徴的な光学的特性を持つ直径数 nm~数百 nm のナノ粒子である。GNP 表面はチオール基を有する機能性分子や生体分子を簡便に固定化できるため、バイオセンサーや診断薬などへの応用研究が展開されている⁸⁾。また、バイオイメージングや光線力学療法⁹⁾、ドラッグデリバリー¹⁰⁾など、医療分野での応用も検討されており、生体に対しても安全だと考えられている¹¹⁾。さらにわれわれは、GNP を免疫細胞に選択的に輸送するための分子として糖鎖を使用した。すなわち、樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞表層には、外来異物を捕捉するためのマンノース受容体やマクロファージガラクトースレクチンなどの C 型レクチン受容体¹²⁾が発現しているため、これらに結合する糖鎖を TLR7 リガンドとともに GNP 表面に固定化することで、抗原提示細胞の細胞内に効率的に輸送できるようになると考えた。本稿では、合成低分子 TLR7 リガンドと糖鎖成分の α マンノース (α Man) を共固定化した GNP の調製と *in vitro* および *in vivo* での免疫増強作用について紹介する。

2-1. 1V209- α Man-GNP の調製

合成低分子 TLR7 リガンドには、1V209 を用いた⁵⁾。1V209 を GNP 表面に固定化するために、4,7,10-トリオキサ-1,13-トリデカンジアミン (TTDDA) を介してチオクト酸を修飾した 1V209 誘導体 (1V209-TTDDA-TA) を合成した。1V209- α Man-SGNP の合成は既報¹³⁾を参考にした。1V209 誘導体と α マンノースを有するリガンド複合体 (Man α 1-6Glc-mono) のモル比が 1 : 9 になるように混合し、GNP 表面に共固定化した (図 1)。得られた 1V209- α Man-GNP は、透析 (Spectra/Por[®] 3, 分画分子量 : 3,500) により精製した。1V209- α Man-GNP に固定化された 1V209-TTDDA-TA および Man α 1-6Glc-mono を定量したところ、1 : 19 のモル比で固定化されていた。1V209- α Man-GNP の水溶液中での平均粒径を動的散乱 (DLS) 法により測定したところ、 9.4 ± 2.1 nm

図 1 1V209- α Man-GNP の調製

であった。これは、透過型電子顕微鏡 (TEM) で測定した粒径 (平均粒径 4.4 ± 1.3 nm) と類似しており、水溶液中で単一の粒子として分散していると考えられる。

2-2. 1V209- α Man-GNP の *in vitro* での免疫増強活性

In vitro での免疫増強活性をマウス骨髄由来樹状細胞 (Bone marrow-derived Dendritic cell : BMDC), マウスマクロファージ細胞株 J774A.1 細胞, ヒト末梢血単核細胞 (Peripheral blood mononuclear cell : PBMC) の 3 種類を用いて評価した。1V209- α Man-GNP の存在下で細胞を 18 時間培養後, 培養上清中に産生されたサイトカインを ELISA 法で定量し, サイトカイン産生能を評価した。

マウス BMDC を用いてインターロイキン-6 (Interleukin-6 : IL-6) の産生能を評価したところ, GNP に固定化した 1V209 誘導体の濃度依存的な IL-6 の産生が観察され, 1V209 誘導体単体に比べて 50% 効果濃度が約 6 倍低かった。1V209 誘導体を固定化していない α Man-GNP では IL-6 が産生されなかったことから, GNP に固定化した 1V209 誘導体によって IL-6 の産生が誘導されたと考えられる (図 2A)。また 1V209- α Man-GNP の細胞毒性を MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) アッセイにより評価したところ, 1V209 誘導体の濃度に依存的な細胞死は観察されなかったことから, 細胞障害性の低いアジュバントと考えられる (図 2B)。

次に, J774A.1 細胞を用いて IL-6 の産生能を評価した。その結果, 1V209 誘導体に比べて IL-6 の産生能が著しく低下した (図 2C)。これは, 未分化の J774A.1 細胞

はマンノース受容体の発現量が非常に少ないため¹⁴⁾, マンノース受容体を介した 1V209- α Man-GNP の取り込みが起こらず, TLR7 を活性化できないためだと考えられる。したがって, TLR7 の活性化には, 1V209- α Man-GNP がマンノース受容体を介したエンドサイトーシスによって細胞内に移行することが重要だと考えられる。

続いて, ヒト PBMC に対する腫瘍壊死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α : TNF- α) の産生能を評価した。その結果, 1V209 誘導体に比べて, より低濃度で TNF- α の産生が誘導された (図 2D)。したがって, 1V209- α Man-GNP は, ヒト細胞においても高いサイトカイン産生能を有することが示唆された。

2-3. 1V209- α Man-GNP の *in vivo* でのアジュバント活性

In vivo での免疫増強活性を C57BL/6 マウスを用いて評価した。0 日目と 14 日目に, モデルタンパク質抗原のオボアルブミン (Ovalbumin : OVA) と, アジュバントとなる 1V209- α Man-GNP をマウス尾部に皮内投与した。その後, 免疫 38 日目に眼窩静脈叢より採血し, 血中の OVA に対する IgG1 抗体と IgG2c 抗体の産生価を評価した。その結果, 1V209 単体に比べて IgG2c 抗体の産生価が 10^3 倍以上高かったことから, 細胞性免疫の誘導能が高いことが示唆された (図 3)。これは, これまでに開発した 1V209 とデキストランの複合体 (1V209-dextran)⁶⁾ と同様の結果であったが, 免疫 38 日目のマウスの体重に対する脾臓の重さの割合を比較したところ, 1V209-dextran を投与したマウスでは脾臓が腫大していた一方で, 1V209- α Man-GNP ではほとんど変化がなかった。以上から, 1V209- α Man-GNP は, B 細胞増加

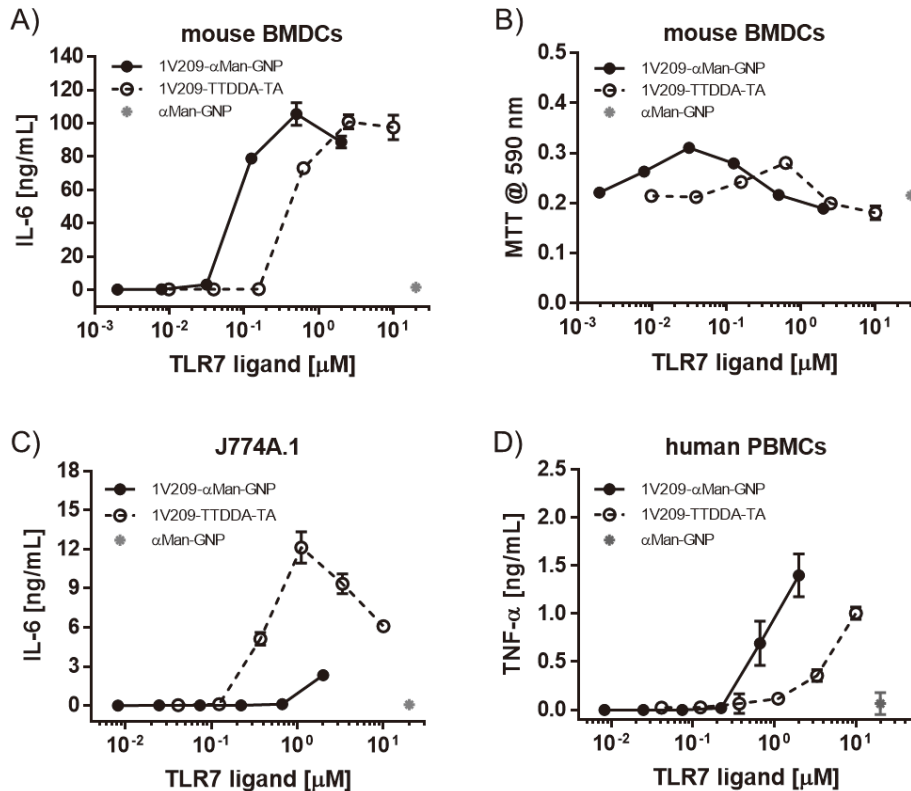


図 2 1V209- α Man-GNP の *in vitro* での免疫増強活性と細胞毒性

1V209- α Man-GNP または 1V209-TTDDA-TA の存在下で 18 時間培養後、培養上清中に産生されたサイトカイン (A) マウス BMDC より産生された IL-6 の産生量、(B) マウス BMDC の MTT アッセイ、(C) J774A.1 細胞より産生された IL-6 の産生量、(D) ヒト PBMC より産生された TNF- α の産生量。すべての結果は 3 回の独立した実験の平均値と標準偏差を示す。

などの過剰な免疫応答を起こさない効果的なアジュバントであることが示された。

おわりに

本稿では、TLR7 リガンドに焦点をあて、最近の研究について紹介した。われわれが合成低分子 TLR7 リガンドのキャリアに用いた GNP は、チオール基を有するさまざまな分子を簡便に固定化できることが特徴である。抗原分子とアジュバント化合物が単一の分子に修飾されているとワクチン効果が向上することが報告されていることから、TLR リガンドだけでなく、多様な分子を共固定化できる GNP は、さまざまな疾患に対するワクチン開発のための有力な分子基盤になると期待できる。また、1V209- α Man-GNP は高い免疫増強作用を有することから、免疫療法のためのアジュバントとしての利用など、さまざまな応用が期待できる。

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]、[JSPS 科研費若手研究 (B) (17K17968)]、[「公

益財団法人米盛誠心育成会研究助成事業]、[JST さきがけ (JPMJPR17HA)] の御支援を受けて行われました。

文献

- 1) Dowling JK, Mansell A : Toll-like receptors : the swiss army knife of immunity and vaccine development. Clin Transl Immunology 5 : e85, 2016
- 2) Smith M, Garcia-Martinez E, Pitter MR, et al. : Trial Watch : Toll-like receptor agonists in cancer immunotherapy. Oncoimmunology 7 : e1526250, 2018
- 3) Zhang Z, Ohto U, Shibata T, et al. : Structural Analysis Reveals that Toll-like Receptor 7 Is a Dual Receptor for Guanosine and Single-Stranded RNA. Immunity 45 : 737-748, 2016
- 4) Ignacio BJ, Albin TJ, Esser-Kahn AP, et al. : Toll-like Receptor Agonist Conjugation : A Chemical Perspective. Bioconjug Chem 29 : 587-603, 2018
- 5) Chan M, Hayashi T, Kuy CS, et al. : Synthesis and immunological characterization of toll-like receptor 7 agonistic conjugates. Bioconjug Chem 20 : 1194-1200,

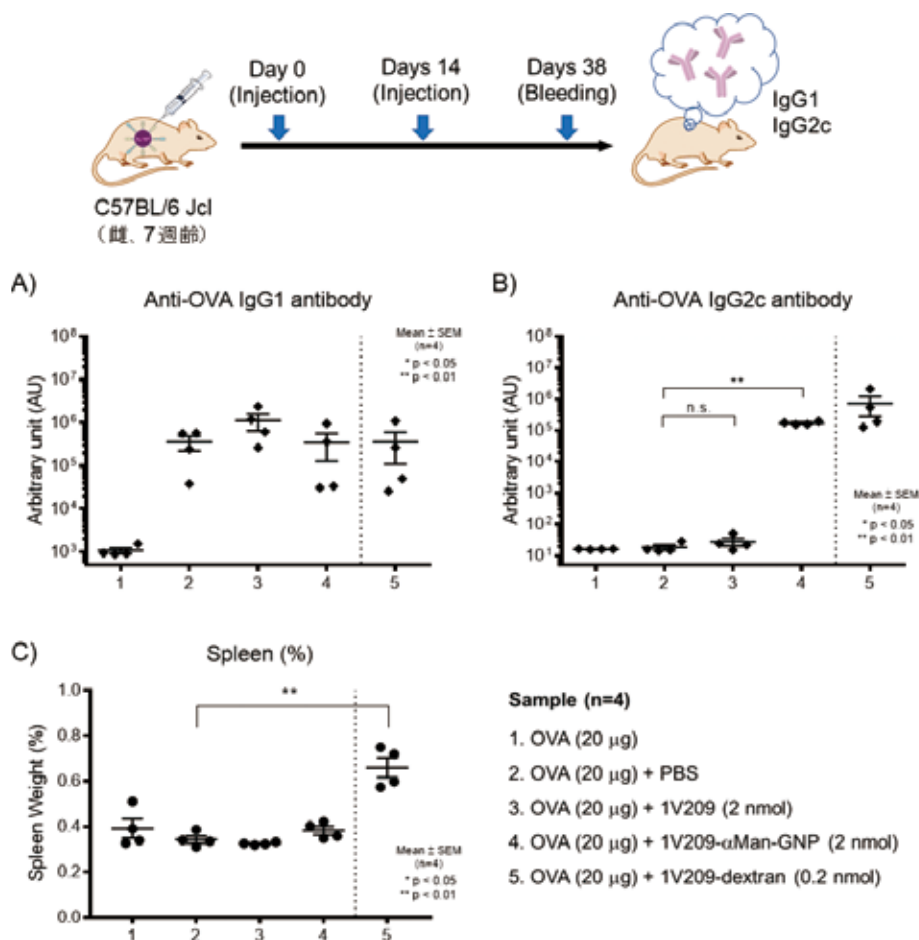


図 3 1V209- α Man-GNP の *in vivo* でのアジュバント活性と毒性

OVA (20 μ g) と 1V209- α Man-GNP (2 nmol), 1V209 (2 nmol), または, 1V209-dextran (0.2 nmol) を C57BL/6 マウスの尾部に皮内投与し, 38 日後の A) 抗 OVA IgG1 抗体の産生価, B) 抗 OVA IgG2c 抗体の産生価, C) マウスの体重に対する脾臓の割合。

2009

- 6) Shinchi H, Crain B, Yao S, et al. : Enhancement of the Immunostimulatory Activity of a TLR7 Ligand by Conjugation to Polysaccharides. *Bioconj Chem* 26 : 1713-1723, 2015
- 7) Shinchi H, Yamaguchi T, Moroishi T, et al. : Gold nanoparticles coimmobilized with small molecule toll-like receptor 7 ligand and α -mannose as adjuvants. *Bioconj Chem*, 2019 (doi : 10.1021/acs.bioconjchem.9600560)
- 8) Saha K, Agasti SS, Kim C, et al. : Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. *Chem Rev* 112 : 2739-2779, 2012
- 9) Libutti SK, Paciotti GF, Byrnes AA, et al. : Phase I and pharmacokinetic studies of CYT-6091, a novel PEGylated colloidal gold-rhTNF nanomedicine. *Clin Cancer Res* 16 : 6139-6149, 2010
- 10) Koonce NA, Quick CM, Hardee ME, et al. : Combination

of Gold Nanoparticle-Conjugated Tumor Necrosis Factor- α and Radiation Therapy Results in a Synergistic Antitumor Response in Murine Carcinoma Models. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 93 : 588-596, 2015

- 11) Yang X, Yang M, Pang B, et al. : Gold Nanomaterials at Work in Biomedicine. *Chem Rev* 115 : 10410-10488, 2015
- 12) Geijtenbeek TB, Gringhuis SI : C-type lectin receptors in the control of T helper cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 16 : 433-448, 2016
- 13) Nakamura-Tsuruta S, Kishimoto Y, Nishimura T, et al. : One-step purification of lectins from banana pulp using sugar-immobilized gold nano-particles. *J Biochem* 143 : 833-839, 2008
- 14) Mantovani A, Sica A, Sozzani S, et al. : The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25 : 677-686, 2004

IL-29 は口腔粘膜上皮細胞において RIG-I および IFI-16 発現誘導を介し抗ウイルス活性を増強する

四釜 洋介, 黒澤 実愛, 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

IL-29 exhibits antiviral activity by inducing RIG-I and IFI-16 expression in oral epithelial cells

Yosuke Shikama, Mie Kurosawa, Kenji Matsushita

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

Abstract

Interleukin (IL)-29 is a cytokine belonging to the type III interferon family, which regulates a similar set of genes as type I interferons. Although type I interferons act globally, type III interferons primarily target epithelial cells and protect them against the frequent viral attacks that are common for barrier tissues. The antiviral effects of IL-29 have been demonstrated at barrier surfaces in the respiratory and gastrointestinal tracts, liver, blood-brain barrier, and skin, but it remains unknown whether IL-29 exhibits these effects in oral epithelial cells. In this study, we found that the functional IL-29 receptor, interferon- λ receptor 1, is expressed in epithelial cells from both human oral mucosa and gingiva, but not in human gingival fibroblasts. Although IL-29 stimulation did not induce pro-inflammatory cytokine mRNA expression, such as IL-6 and IL-8, it did induce retinoic acid-inducible gene (RIG)-I and interferon gamma-inducible protein 16 (IFI-16) production via a signal transducers and activator of transcription 1 (STAT1)-dependent pathway in gingival epithelial cells. RIG-I and IFI-16 sense viral nucleic acids, and the stimulation of these receptors induces interferon beta production. Moreover, we confirmed that the augmenting effects of IL-29 on 5'triphosphate double-stranded RNA (a synthetic ligand for RIG-I)-induced interferon beta production in gingival epithelial cells. These data suggest the therapeutic potential of IL-29 for preventing viral infections in the oral mucosa.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 40~42, 2019

Key words : Type III interferon, Type I interferon, Virus infection, Innate immunity, Oral mucosa

はじめに

口腔病変の主体は粘膜病変であり、その原因は多彩であるが、感染症、とくにウイルス感染による場合も多い。ウイルス感染による口腔咽頭の粘膜病変は、水疱、アフタ、びらん、潰瘍を呈し、白板症や口腔の扁平上皮癌もウイルス感染が原因であることが明らかになっている。これまで抗ウイルス療法として I 型インターフェロン (IFN) が用いられてきたが、I 型 IFN 受容体は標的臓器および標的細胞以外のあらゆる細胞で発現しているため、種々の副作用が報告されてきた。これに対し、III 型 IFN である interleukin (IL)-29 (IFN- λ 1) は I 型 IFN 同様、抗ウイルス作用を有するが、その受容体発現が限局的であるため、副作用の少ない IFN として期待されて

いる。III 型 IFN に関する研究は、肝臓、腸管上皮、気道粘膜上皮、皮膚、血液、血液脳関門などで行われている¹⁾が、口腔粘膜における IL-29 受容体発現やその機能に関する報告はほとんどない。われわれは IL-29 の口腔粘膜における抗ウイルス薬としての臨床応用を目指し日々研究している。本稿では、口腔粘膜病変の原因となるウイルスおよび III 型 IFN について概説した後、われわれの研究結果を交えてその臨床応用の可能性について述べる。

1. ウイルス性口腔粘膜疾患

1-1. 単純ウイルス属およびパリスロウイルス属²⁾

2 本鎖 DNA をゲノムとして持つ DNA ウイルスであり、単純ヘルペス (HSV) および水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) が知られている。HSV は接触感染と考えられて

おり、不顕性感染も多いことが知られているが、VZV は感染力が高く、不顕性感染は少ないと考えられている。ヘルペスウイルス属の特徴は、組織中に潜伏感染することである。とくに HSV および VZV は神経節に潜伏感染し、回帰感染として知られている。宿主の免疫力低下などにより再活性化し症状を呈する。

1-2. エンテロウイルス属³⁾

エンベロープのない一本鎖 RNA ウイルスであり、手足口病の主な原因ウイルスとなるエンテロウイルス 71 やコクサッキーウイルス A16 が属する。感染経路についてはまだ不明な点もあるが、感染すると症状として口腔粘膜に疼痛性の水疱、潰瘍が形成される。また、夏かぜの代表疾患としても知られているヘルパンギーナの原因ウイルスは主にコクサッキーウイルス A4 である場合が多く、水疱および潰瘍を形成する。

1-3. モルビリウイルス属⁴⁾

エンベロープを持つ一本鎖 RNA ウイルスであり、麻疹ウイルスがこれに属する。飛沫感染や接触感染などさまざまな感染経路を示し、その感染力は極めて強い。ウイルス感染後 10~12 日の潜伏期後、発熱や上気道炎症状を経て発疹を認めるが、その 1~2 日前頃に臼歯部頬粘膜に白色小斑点（コプリック斑）が出現する。

1-4. パピローマウイルス属⁵⁾

エンベロープのない二本鎖 DNA ウイルスであり、ヒトパピローマウイルス（HPV）感染による病変は、口腔・消化器ばかりでなく、婦人科、皮膚科、耳鼻科、泌尿器科領域と多岐にわたる。HPV は上皮細胞、とくに盛んに細胞増殖している基底細胞に感染すると考えられている。口腔粘膜においては、白板症、紅板症、乳頭腫などの良性病変の発症に、また悪性病変である扁平上皮癌の発症に HPV の関与が報告されている。

1-5. レンチウイルス属⁶⁾

エンベロープを持つ一本鎖 RNA ウイルスであり、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）がこれに属する。HIV 感染に伴う口腔病変として再発を伴う口腔カンジダ、口角炎、口内炎などが知られている。口腔病変が後天性免疫不全症候群（AIDS）診断のきっかけになることも多く、臨床では HIV 検査の敷居を下げて診療にあたるのが重要であると考えられる。

2. III 型 IFN

III 型 IFN は IFN- λ ファミリーとしても知られている比較的新しい IFN であり、IFN- $\lambda 1$ から $\lambda 4$ まで存在する。 $\lambda 1$, $\lambda 2$, $\lambda 3$ はそれぞれ IFNL1 (IL-29), IFNL2 (IL-28A), IFNL3 (IL-28B) によりコードされ、抗ウイルス

効果は IFN- $\lambda 1$ > IFN- $\lambda 3$ > IFN- $\lambda 2$ の順に強いことが報告されている⁷⁾。IFN- $\lambda 4$ は他の IFN- λ との相同性が低く、機能も異なる⁸⁾。あらゆる細胞に受容体が発現している I 型 IFN (IFN- α および IFN- β) とは異なり、IFN- λ 受容体、とくにそのリガンドと高親和性である IFN- λ R1 はその発現が肝細胞、上皮細胞、および樹状細胞などに限局している。IFN- λ が受容体に結合すると、Signal Transducers and Activator of Transcription (STAT) 1 および STAT2 をリン酸化し、Interferon Stimulating Gene (ISG) を誘導して抗ウイルス作用を発揮する¹⁾。つまり、III 型 IFN は受容体と結合後は I 型 IFN と同じ下流シグナル分子を共有している。ISG 誘導能は I 型 IFN と比較し、III 型 IFN の方が弱いことが知られている⁷⁾が、III 型 IFN シグナルは持続的に ISG を誘導するとされている。

3. 口腔粘膜における IL-29 受容体 (IFN- λ R1) 発現およびその機能解析

上記背景をふまえ、われわれは口腔粘膜を構成する細胞および IL-29 受容体が発現していることが知られている表皮由来ケラチノサイトを用い、その遺伝子発現レベルを PCR 法で解析した。その結果、表皮由来ケラチノサイトと同様に、口腔粘膜由来および歯肉由来ケラチノサイトにおいても IFN- λ R1 が遺伝子レベルで発現していることを確認した。さらにフローサイトメトリー法を用いタンパクレベルで IFN- λ R1 が発現していることも明らかにした。一方で、歯肉由来線維芽細胞では発現していなかったため、口腔粘膜において上皮細胞のみにその受容体が発現している可能性が推察される。次に口腔粘膜由来および歯肉由来ケラチノサイトを IL-29 で刺激すると、その濃度依存的に STAT1 がリン酸化されることをウェスタンブロットング法で確認した。宿主細胞が細菌やウイルスなどの病原体を感知する認識機構として、病原体で保存された特徴的な構造を認識するパターン認識受容体を発現している。上記 1. で記述した通り、口腔粘膜疾患の原因になるウイルスは RNA ウイルスおよび DNA ウイルスともに存在するため、本研究では RNA ウイルスの核酸認識を担うパターン認識受容体である retinoic acid-inducible gene (RIG)-I および二本鎖 DNA ウイルスの核酸認識を担うパターン認識受容体である interferon gamma-inducible protein 16 (IFI-16)⁹⁾ に着目し解析を行った。その結果、ヒト歯肉由来ケラチノサイトにおいて、IL-29 濃度依存的に RIG-I および IFI-16 発現が誘導されることをウェスタンブロットング法で確認した。IL-29 で発現誘導されるこれら 2 つの受容体は、STAT1 阻害薬によりその発現が著しく抑制されたため、STAT1 依存的反応と考えられる。以上の様に、IL-29 は炎症サイトカインなどを誘導することなく、ウイルス核酸を認識する受容体を発現誘導することが明らかになったため、われわれは IL-29 が口腔粘膜

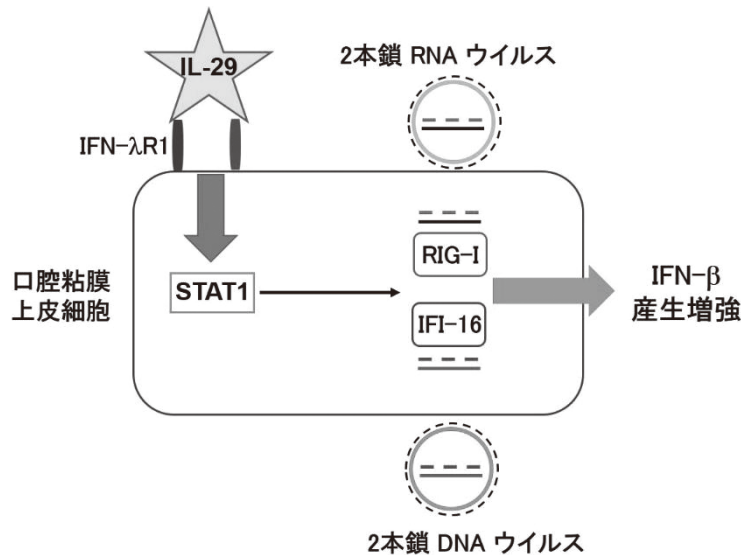


図 1 口腔粘膜における IL-29 の抗ウイルス能増強メカニズム

において、抗ウイルス能を増強し得るか検証した。すなわち、ヒト歯肉由来ケラチノサイトにおいて、RIG-Iの合成リガンドである 5' triphosphate double-stranded RNA 刺激による IFN- β 産生が IL-29 前処理により増強されるか検討したところ、real-time PCR 法および ELISA 法を用いた結果から、その増強効果を確認した(図 1)。今後、生ウイルスを使用した実験も検討しており、臨床応用に向けた更なるエビデンス構築が必要と考えられる。

おわりに

ウイルスに関する研究は非常に幅広く行われているが、口腔粘膜における抗ウイルス能の増強、賦活作用に着目した検討はほとんど行われていない。歯科領域疾患の中で、ウイルス感染に起因する疾患の予防、治療法開発は临床上非常に重要であると考えられる。われわれが得た知見を基にした新規治療戦略を構築することを現在目指している。

文 献

- 1) Lazear HM, Nice TJ, Diamond MS : Interferon-lambda : Immune Functions at Barrier Surfaces and Beyond. *Immunity* 43 : 15-28, 2015
- 2) 川口寧 : ヘルペスウイルスの感染機構. *生化学* 84 : 343-351, 2012
- 3) Muehlenbachs A, Bhatnagar J, Zaki SR : Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection. *J Pathol* 235 : 217-228, 2015
- 4) 国立感染症研究所 : 麻疹とは. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansenohanashi/518-measles.html>
- 5) 前田初彦 : ヒトパピローマウイルス (HPV) と口腔粘膜疾患. *日口腔外会誌* 56 : 464-470, 2010
- 6) 田上正 : AIDS の口腔粘膜病変. *病理と臨* 26 : 603-609, 2008
- 7) Friberg J, Levine S, Chen C, et al. : Combinations of lambda interferon with direct-acting antiviral agents are highly efficient in suppressing hepatitis C virus replication. *Antimicrob Agents Chemother* 57 : 1312-1322, 2013
- 8) Prokunina-Olsson L, Muchmore B, Tang W, et al. : A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat Genet* 45 : 164-171, 2013
- 9) Zevini A, Olgarnier D, Hiscott J : Crosstalk between Cytoplasmic RIG-I and STING Sensing Pathways. *Trends Immunol* 38 : 194-205, 2017

Th2 バイアス型脂質改変 CD1d リガンド開発と機能解析

竝河 悦子¹⁾, 柏原 瑛美¹⁾, 平田 菜摘¹⁾, 井貫 晋輔^{1,2)}, 藤本ゆかり¹⁾

¹⁾慶應義塾大学理工学部化学科, ²⁾京都大学大学院薬学研究科

Development and functional evaluation of Th2-biased CD1d ligands containing modified lipid moiety

Etsuko Nabika¹⁾, Emi Kashiwabara¹⁾, Natsumi Hirata¹⁾, Shinsuke Inuki^{1,2)}, Yukari Fujimoto¹⁾

¹⁾Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Keio University

²⁾Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

Abstract

CD1d, one of the lipid antigen-presenting proteins, binds to a glycolipid ligand and forms CD1d-ligand complex, which is recognized by NKT cells and induces the secretion of various cytokines including Th1 and Th2 cytokines. The cytokines are known to control immune responses: Th1 cytokines (e.g. IFN- γ) are involved in cell-mediated immunity such as tumor clearance and protection against infection, and Th2 cytokines (e.g. IL-4) are associated with humoral immunity such as allergies and promotion of antibody production. Recent studies revealed that the balance of the cytokines released by NKT cells depends on the CD1d ligand structures. α -GalCer (KRN7000) is a representative ligand and has potent activity to induce both Th1 and Th2 cytokines. On the other hand, OCH is known as a Th2-selective CD1d ligand, and several clinical trials for the ligand in patients with multiple sclerosis and Crohn's disease are ongoing. However, few studies of potent Th2-selective CD1d ligands have been reported compared with Th1-selective ones, and the detailed mechanism of cytokine balance regulation remains unclear. Therefore, the development of potent Th2-selective ligands and elucidation of their biasing mechanism are required. In this article, we review the reported Th2-biased CD1d ligands and the cellular imaging with Th2-biased lipid-modified CD1d ligands for understanding of Th1/Th2 selectivity.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 43~48, 2019

Key words : 脂質抗原, CD1d, α -GalCer, 脂質改変, Th1/Th2

はじめに

抗原提示タンパク質である CD1d は、免疫反応にかかわる細胞のなかでも樹状細胞などの抗原提示細胞に存在し、糖脂質リガンドと結合して複合体を形成する。この複合体は、ナチュラルキラー T (NKT) 細胞表面の T 細胞抗原受容体 (TCR) によって認識され、IFN- γ のような Th1 サイトカインや、IL-4 のような Th2 サイトカインなどさまざまなサイトカインを誘導する。これらのサイトカインはそれぞれ異なる免疫反応にかかわっており、Th1 サイトカインは腫瘍排除や感染防御などの細胞性免疫、Th2 サイトカインはアレルギー性炎症や抗体産生の促進などの液性免疫にかかわることが知られている。これまでの研究から、NKT 細胞が放出するサイトカインの誘導量や選択性は CD1d リガンドの構造に影響を

受けることが明らかになってきており、免疫応答のバランスを制御し得るリガンドの創製が望まれている。

代表的な CD1d リガンドとして知られている α -GalCer (KRN7000)¹⁾ は、海綿由来の糖脂質であり、Th1 および Th2 サイトカインの双方を強く誘導する。また、Wongらによって開発された α -GalCer 誘導体(図1の1)²⁾ は、アシル鎖末端にアリアル基が導入されており、Th1 選択的なサイトカイン誘導能を示すことが報告されている。一方、OCH³⁾ は Th2 選択的な CD1d リガンドとして知られており、現在、多発性硬化症やクローン病に対する治療薬として開発が進められている。しかしながら、Th1 選択的リガンドと比較して、高活性な Th2 選択的リガンドの報告例は少なく、そのサイトカインバランス制御に関する知見は限られている。そのため、活性の高い Th2 選択的リガンドの創製や選択性発現メカニズムの解

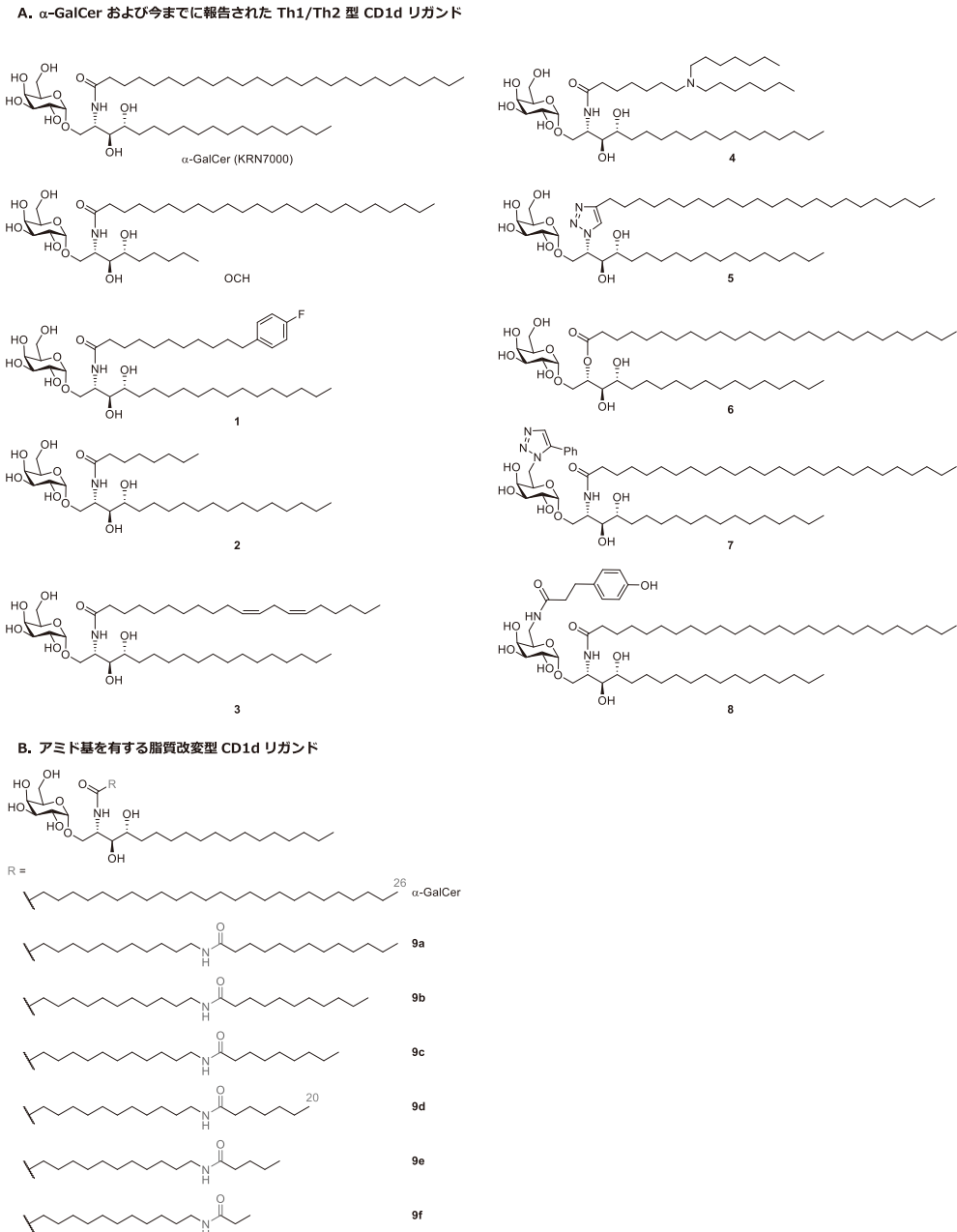


図 1 α -GalCer (KRN7000) およびその誘導体の構造

明は重要な研究課題である。

これまでに、いくつかのグループにより、 α -GalCer の構造変換が行われ、さまざまな選択性を持つ脂質改変型 α -GalCer 誘導体が開発されてきた。本稿では、これまでに報告されている Th2 選択的 CD1d リガンドとしての α -GalCer 誘導体および Th1/Th2 選択性発現メカニズムについて概説するとともに、われわれの最近の知見を紹介する。

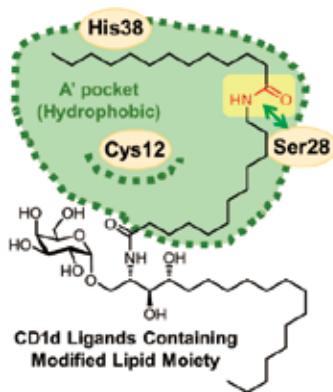
1. Th2 選択的 CD1d リガンド

代表的な Th2 選択的リガンドとしては、前述の OCH が知られている。Yamamura らによって開発されたこの

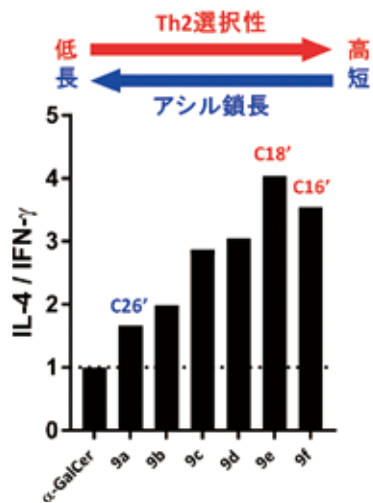
化合物は、 α -GalCer のスフィンゴシン鎖およびアシル鎖の鎖長を短くした誘導体であり、臨床研究が進められている。また、Goff らにより、 α -GalCer と比較して短いアシル鎖を持つリガンド (図 1 の 2)⁴⁾ が報告されているほか、Yu らによって、短いアシル鎖に不飽和結合が導入されたリガンド (図 1 の 3)⁵⁾ も見出されており、どちらも Th2 選択的なサイトカイン誘導活性を有することが報告されている。しかし、アシル鎖長を短くすると Th2 選択性が向上する反面、CD1d との結合親和性が低下し、サイトカイン誘導活性が大幅に低下することが知られている。

また、他の構造変換を行った例として、アシル鎖中に

A. CD1d の疎水性ポケット



B. マウス脾臓細胞を用いた Th1/Th2 サイトカイン誘導バランスの評価



C. AlphaScreen を用いたリガンドと CD1d の結合能評価

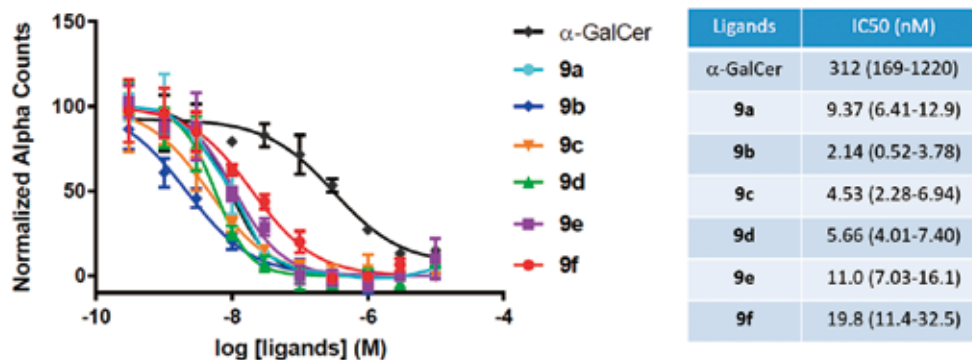


図 2 CD1d の疎水性ポケット, マウス脾臓細胞を用いた Th1/Th2 サイトカイン誘導バランスの評価, AlphaScreen を用いたリガンドと CD1d の結合能評価

Reprinted by permission from RightsLink : John Wiley and Sons, *Angewandte Chemie International Edition*, Potent Th2 Cytokine Bias of Natural Killer T Cell by CD1d Glycolipid Ligands : Anchoring Effect of Polar Groups in the Lipid Component, Shinsuke Inuki ; Emi Kashiwabara ; Natsumi Hirata ; Junichiro Kishi ; Etsuko Nabika ; Yukari Fujimoto, Copyright © 2018 [一部改変]

ジアルキルアミノ基を導入したりガンド (図1の4)⁶⁾や、アミド基を1,2,3-トリアゾール基 (図1の5)⁷⁾やエステル基 (図1の6)⁸⁾に変換したりガンドについても、Th2型のサイトカイン産生を誘導することが明らかになっている。

また、セラミド部位の変換のみならず、ガラクトースの6位を修飾したTh2選択的CD1dリガンドも開発されており、Jervisらはトリアゾール (図1の7)⁹⁾を、Huらは p -ヒドロキシフェニルプロピオニルアミド (図1の8)¹⁰⁾を導入した誘導体を報告している。

2. アミド基を有する脂質改変型CD1dリガンド

われわれは最近、CD1dの疎水性ポケット中に存在するSer28に着目し、この極性アミノ酸残基と水素結合を介して相互作用可能なアミド基を α -GalCerのアシル鎖に導入することで、大幅にサイトカイン誘導活性が向上することを見出した (図2A)¹¹⁾。とくに、アシル鎖長を短くした α -GalCer誘導体にアミド基を導入することで、Th2選択性を有しつつもCD1dとの結合親和性が高いリ

ガンドが得られ、これまでに報告例が少ない特異な活性を持つCD1dリガンドとなることを報告している (図1の9d)。

われわれが開発したアミド基含有リガンド9a-fのTh1/Th2サイトカイン誘導バランスの評価として、マウス脾臓細胞を用いたサイトカイン誘導アッセイを行った。INF- γ およびIL-4を定量し、その比率をTh1/Th2選択性の指標としたところ、アシル鎖長が短くなるにつれてTh2選択性が向上する傾向が示唆された (図2B)。

また、AlphaScreenTM (PerkinElmer Life Sciences) を用いて各リガンドのCD1dとの結合親和性を評価した結果、アミド基を持つ9b-fは α -GalCerよりも強くCD1dと結合し、そのなかでも9b-dは高い結合親和性を有することが分かった (図2C)¹²⁾。

3. Th1/Th2選択性発現メカニズム

先述したように、さまざまなグループによりTh2選択的リガンドの開発が行われているが、その選択性発現メカニズムについてはいまだに明らかになっていない部分

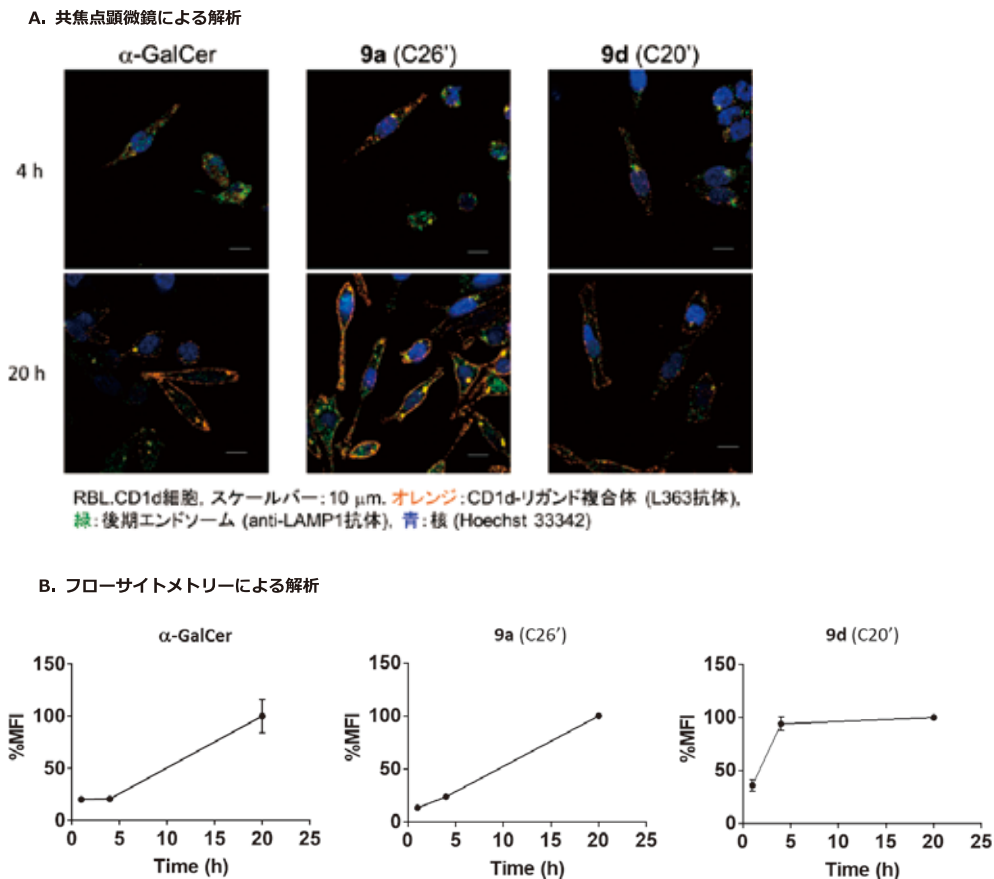


図 3 リガンド-CD1d 複合体の細胞内挙動解析

Reprinted by permission from RightsLink : John Wiley and Sons, Angewandte Chemie International Edition, Potent Th2 Cytokine Bias of Natural Killer T Cell by CD1d Glycolipid Ligands : Anchoring Effect of Polar Groups in the Lipid Component, Shinsuke Inuki ; Emi Kashiwabara ; Natsumi Hirata ; Junichiro Kishi ; Etsuko Nabika ; Yukari Fujimoto, Copyright © 2018 [一部改変]

が多い。Th1/Th2 選択性を説明するメカニズムとして、現在までにいくつかの説が提唱されており、Wong らは、CD1d との結合が強いリガンドは Th1 選択的であると考察している²⁾。一方 Porcelli らは、CD1d リガンドは 2 つの経路で CD1d に結合し、その経路の違いによりサイトカインのバランスがコントロールされるという説を唱えており、Th2 選択的なりガンドは細胞表面上の CD1d に直接結合すると提唱している¹³⁾。

しかし、前項で述べたように、われわれが開発したアミド基含有リガンド **9d** は CD1d との結合親和性が高いものの Th2 選択的なりガンドであり、Wong らの報告とは異なる結果を示している。また、Th2 選択的かつ高活性な CD1d リガンドの報告例は少なく、Th1/Th2 選択性と細胞内挙動との関連性を示す研究は限られている。そこでわれわれは、Th1/Th2 選択性発現メカニズムの解明を目指し、開発したアミド基含有 CD1d リガンドを用いたリガンド-CD1d 複合体の細胞内挙動解析に着手した。

4. リガンド-CD1d 複合体の細胞内挙動解析¹²⁾

まず、共焦点顕微鏡を用いた観察を行った。CD1d を高発現させた RBL CD1d 細胞に対してリガンドを添加し、4 時間または 20 時間培養した後、リガンド-CD1d 複合体を認識する L363 抗体を用いて染色し、観察した。その結果、長いアシル鎖を持つ α -GalCer や **9a** の場合、リガンド-CD1d 複合体 (図 3A, 橙色) は 20 時間後においてのみ細胞表面に観察されたのに対し、アシル鎖長の短い **9d** では、4 時間後の時点で細胞表面に複合体の局在が観察された。

同様の現象は、フローサイトメトリーを用いた解析でも観察された。すなわち、RBL CD1d 細胞にリガンドを添加し、L363 抗体を用いて、各時間における細胞表面上の複合体を定量した。その結果、アシル鎖長の長い α -GalCer や **9a** では時間経過とともに徐々に細胞表面上の複合体が増加したのに対し、アシル鎖長の短い **9d** では、より早い時間において最大値に到達することが示された (図 3B)。

これらの結果から、Th2 選択的な短鎖のアミド基含有リガンド **9d** は細胞表面上の CD1d に直接結合することが推測された。これは Porcelli らの説と一致する結果であり、Th1/Th2 選択性はリガンドの細胞表面への提示の速さに影響を受けることが見出された。

5. CD1d リガンドの細胞内挙動解析

さらに、CD1d リガンド自体の挙動についても観察するため、蛍光基を導入した脂質改変型 CD1d リガンドを合成した。それらを RBL CD1d 細胞に添加し、共焦点顕微鏡を用いたライブセルイメージングを行った結果、アシル鎖の違いによってリガンド自体の細胞内での挙動が

異なることが分かった。とくに、Th2 選択的である **9d** の蛍光標識体は細胞膜上への局在が速く、細胞膜上への局在が速いリガンドは Th2 選択的であることが示唆された。

おわりに

われわれは、Th2 選択的かつ高活性な CD1d リガンドを開発し、リガンドの細胞表面への提示速度が Th1/Th2 選択性に影響を与えることを見出した。これらのリガンドの開発により、Th1/Th2 選択性発現メカニズムの解明が進展し、選択性をコントロールすることで自己免疫疾患などの治療薬やワクチンアジュバントの開発へとつながることが期待される。

文 献

- 1) Morita M, Motoki K, Akimoto K, et al. : Structure-activity relationship of alpha-galactosylceramides against B16-bearing mice. *J Med Chem* 38 : 2176-2187, 1995
- 2) Liang PH, Imamura M, Li X, et al. : Quantitative microarray analysis of intact glycolipid-CD1d interaction and correlation with cell-based cytokine production. *J Am Chem Soc* 130 : 12348-12354, 2008
- 3) Miyamoto K, Miyake S, Yamamura T : A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature* 413 : 531-534, 2001
- 4) Goff RD, Gao Y, Mattner J, et al. : Effects of lipid chain lengths in alpha-galactosylceramides on cytokine release by natural killer T cells. *J Am Chem Soc* 126 : 13602-13603, 2004
- 5) Yu KO, Im JS, Molano A, et al. : Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acyl variants of alpha-galactosylceramides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 : 3383-3388, 2005
- 6) Baek DJ, Lee YS, Lim C, et al. : Rational design and evaluation of a branched-chain-containing glycolipid antigen that binds to CD1d. *Chem Asian J* 5 : 1560-1564, 2010
- 7) Lee T, Cho M, Ko SY, et al. : Synthesis and evaluation of 1,2,3-triazole containing analogues of the immunostimulant alpha-GalCer. *J Med Chem* 50 : 585-589, 2007
- 8) Shiozaki M, Tashiro T, Koshino H, et al. : Synthesis and biological activity of ester and ether analogues of alpha-galactosylceramide (KRN7000). *Carbohydr Res* 345 : 1663-1684, 2010
- 9) Jervis PJ, Graham LM, Foster EL, et al. : New CD1d agonists : synthesis and biological activity of 6"-triazole-substituted α -galactosyl ceramides. *Bioorg Med Chem Lett* 22 : 4348-4352, 2012

- 10) Hu L, Zhao C, Ma J, et al. : Design, synthesis, and evaluation of α -galactopyranosylceramide mimics promoting Th2 cytokines production. *Bioorg Med Chem Lett* 29 : 1357-1362, 2019
- 11) Inuki S, Aiba T, Hirata N, et al. : Isolated Polar Amino Acid Residues Modulate Lipid Binding in the Large Hydrophobic Cavity of CD1d. *ACS Chem Biol* 11 : 3132-3139, 2016
- 12) Inuki S, Kashiwabara E, Hirata N, et al. : Potent Th2 Cytokine Bias of Natural Killer T Cell by CD1d Glycolipid Ligands : Anchoring Effect of Polar Groups in the Lipid Component. *Angew Chem Int Ed Engl* 57 : 9655-9659, 2018
- 13) Im JS, Arora P, Bricard G, et al. : Kinetics and cellular site of glycolipid loading control the outcome of natural killer T cell activation. *Immunity* 30 : 888-898, 2009

Klebsiella pneumoniae のミリスチン酸転移酵素遺伝子を利用した大腸菌リピド A の改変

川原 一芳, 谷口 千穂, 菅原 健広, 尾之上さくら

関東学院大学理工学部理工学科生命学系

Modification of *Escherichia coli* lipid A by the introduction of myristoyltransferase gene cloned from *Klebsiella pneumoniae*

Kazuyoshi Kawahara, Chiho Taniguchi, Takehiro Sugawara, Sakura Onoue

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

Abstract

Late stages of lipid A biosynthesis of *Escherichia coli* are transfer reactions of lauric acid (C_{12:0}) and myristic acid (C_{14:0}) to the hydroxyl group of 3-hydroxy-myristic acid (3-OH-C_{14:0}). In the previous study we constructed the mutant strains with disrupted C_{12:0}-transferase and C_{14:0}-transferase genes, and used those mutant strains for the modification of lipid A by the introduction of foreign acyltransferase genes. In the study reviewed here, C_{14:0}-transferase gene (*lpxL2*) of *Klebsiella pneumoniae* was cloned, and introduced to the mutant strains by transformation to modify the lipid A structure. LPS preparations of the transformants were analyzed through chemical modification and MALDI-TOF mass spectrometry, and were proved to have the lipid A with one C_{14:0}, or two C_{14:0}, one of which replaced C_{12:0} bound to 3-OH-C_{14:0} at the C2-position of the non-reducing end glucosamine. The IL-6 inducing activity of the LPS with C_{14:0} was measured, and compared with that of the original LPS with C_{12:0}. The activity of LPS with C_{14:0} was found to be comparable with that of LPS with C_{12:0}, suggesting that C_{14:0} can replace C_{12:0} without changing the immunostimulating activity of lipid A.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 49~53, 2019

Key words : リピド A, 脂肪酸転移酵素, 質量分析, IL-6, 大腸菌

はじめに

リポ多糖 (LPS) の構造, とくに脂肪酸の炭素鎖と結合位置が, LPS が示す免疫活性に重要であることは, 1980 年代の芝, 楠本らによるリピド A の化学合成研究¹⁾で明らかになっており, 化学合成の手法を用いれば, 多様なリピド A 誘導体の合成が可能となっている。一方, 大腸菌にさまざまな構造のリピド A を合成させることができれば, 免疫刺激物質を作り出すうえで, 化学合成とは異なる有用な手法となると思われる。活性にかかわる構造の改変という観点からは, 大腸菌リピド A 生合成の後半に付加され分岐鎖構造を形成するラウリン酸 (C_{12:0}) とミリスチン酸 (C_{14:0}) を他の脂肪酸に置き換える, あるいは結合位置を変化させるという方法が最も容易である。われわれは構造を改変する目的で, 他の研究²⁾を参考に, C_{12:0}転移酵素遺伝子, あるいは C_{14:0}転移

酵素遺伝子の破壊変異株を作製し, この株にサルモネラの C_{16:0}転移酵素遺伝子を導入し, 通常大腸菌が持たない構造のリピド A を合成させることに成功した^{3,4)}。同様の手法を使って, さまざまなグラム陰性細菌から脂肪酸転移酵素遺伝子上記変異株に導入することで, 多様な脂肪酸の分岐鎖構造を持つリピド A を作製できると考えられる。脂肪酸転移酵素について調べていく中で, 最近, *Klebsiella pneumoniae* が大腸菌リピド A の C_{12:0} の位置に C_{14:0} を転移する酵素遺伝子を持つことが報告された⁵⁾。そこで, われわれもこの研究を参考に, 同遺伝子をクローニングして変異株に導入し, 上記研究の一環として, リピド A の構造と免疫活性の変化について調べた⁶⁾。ここでは, その研究内容について解説する。

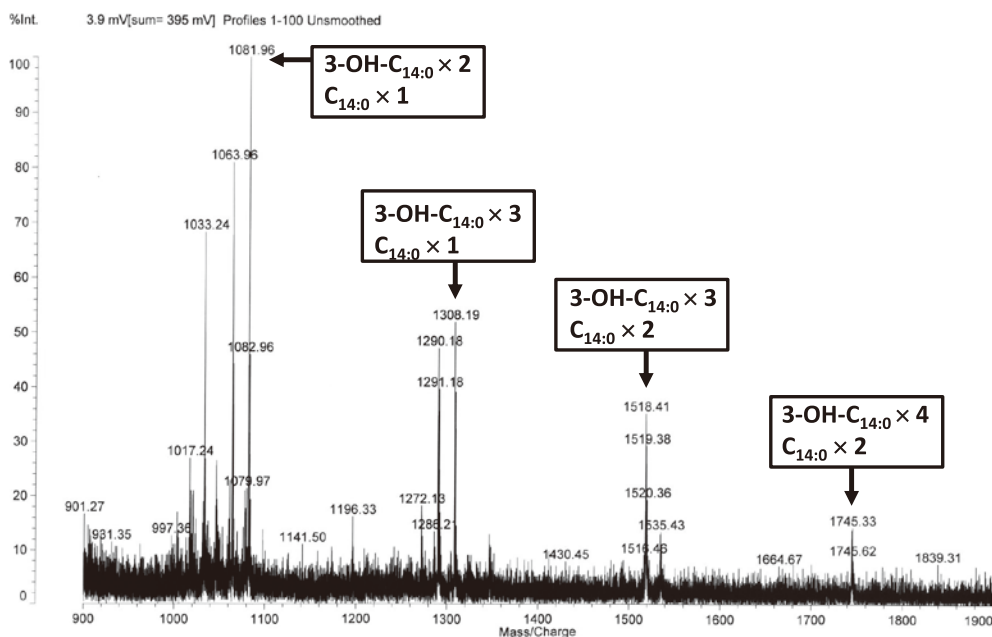


図 1 KGU0485 株 LPS から弱酸加水分解および弱アルカリ加水分解により得られたリピド A 分解物の MALDI-TOF マススペクトル
Negative mode で陰イオン $[M-H]^-$ を検出

1. ミリスチン酸転移酵素遺伝子の導入によるリピド A 脂肪酸組成の変化

われわれのこれまでの研究で、大腸菌 BL21 由来の野生株 (KGU0107 株), $C_{14:0}$ 転移酵素遺伝子破壊株 (KGU0221 株), および $C_{12:0}$ 転移酵素遺伝子と $C_{16:0}$ 転移酵素遺伝子を破壊した二重変異株 (KGU0377 株) が作製されている³⁾。KGU0221 株は単純に $C_{14:0}$ を欠く株であるが、KGU0377 株は $C_{12:0}$ を欠くことにより $C_{14:0}$ もほとんど持たない株である。 $C_{14:0}$ は $C_{12:0}$ の後に転移されるため、このような構造のリピド A が得られると考えられている。

K. pneumoniae は大腸菌リピド A の $C_{12:0}$ の位置に、 $C_{12:0}$ あるいは $C_{14:0}$ を転移するため、 $C_{12:0}$ 転移酵素とは別に、 $C_{14:0}$ 転移酵素遺伝子 (*lpxL2*) を有していることが報告された⁵⁾。そこでこの論文に従い、 $C_{14:0}$ 転移酵素遺伝子を PCR で増幅し、ベクタープラスミド pUC119 を用いてクローニングした。作製されたプラスミド、pUC119-*lpxL2* を形質転換で上記の変異株 KGU0377 あるいは KGU0221 に導入し、LPS の脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーを用いて調べた。その結果、KGU0377 株から得られた形質転換体 KGU0485 株のリピド A、1 分子中の $C_{14:0}$ 量は、約 0.2 分子から 2 分子以上へと増加した。われわれはこの極端な増加は、導入した *lpxL2* の働きだけではなく、 $C_{12:0}$ の位置に $C_{14:0}$ が転移されることにより、大腸菌本来の $C_{14:0}$ 転移酵素も働いた結果ではないかと推論した。KGU0221 株については、プラスミドの導入によりリピド A の $C_{12:0}$ がほとんど消失し、その

代わり $C_{14:0}$ がリピド A あたり約 1 分子に増加した。そこで、この形質転換体を KGU0496 株とした。KGU0496 株において、 $C_{12:0}$ がほとんど $C_{14:0}$ に置き換わった原因としては、ベクタープラスミドのコピー数 (pUC 系プラスミドは高コピー数)、すなわち遺伝子の量的効果で $C_{14:0}$ の転移が優先的に起こったと考えられた。

2. 質量分析によるリピド A 構造の解析

リピド A 分子中の脂肪酸の数を正確に分析するには、質量分析が適している。われわれの研究室ではこれまでに、LPS を弱酸で加水分解し (0.1 M HCl, 100°C, 30 min), 得られた C1 位脱リン酸化リピド A を MALDI-TOF マススペクトロメトリー (MS) で分析する手法が用いられ、分析データが蓄積されてきた。KGU0496 株および KGU0485 株のリピド A についてもこの方法で分析したところ、最も質量数が高いピークとしては、KGU0485 株では m/z 1745 が検出され、KGU0496 株では m/z 1534 が検出された。これらのピークはそれぞれ、リピド A 中に $C_{14:0}$ が 2 分子、あるいは 1 分子含まれることを示している。

$C_{14:0}$ の結合位置については、通常の $C_{12:0}$ の位置に $C_{14:0}$ が転移されたと考えるのが妥当であるが、これを確かめるため、上記の分析に使用した脱リン酸化リピド A をさらに弱アルカリ条件下 (150 倍希釈トリエチルアミン, 100°C, 2h) で加水分解し、MALDI-TOF MS 分析を行った。その結果、図 1 に示したように、KGU0485 株リピド A については $C_{14:0}$ を 2 分子持つピークと 1 分子持つピークが検出され、最も強度が強いピークは 3-ヒ

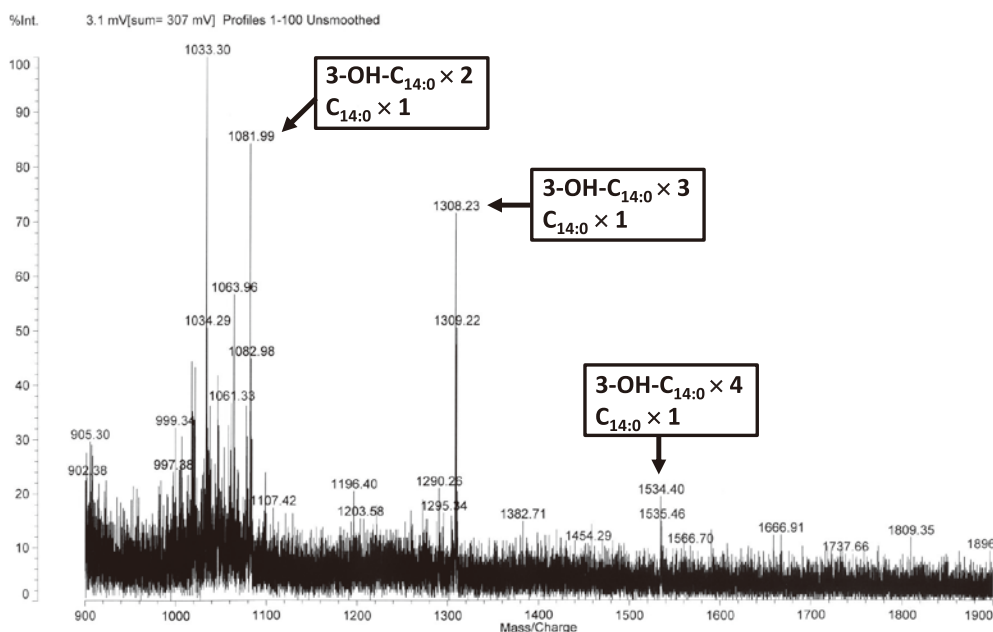


図 2 KGU0496 株 LPS から弱酸加水分解および弱アルカリ加水分解により得られたリポド A 分解物の MALDI-TOF マススペクトル
Negative mode で陰イオン $[M-H]^-$ を検出

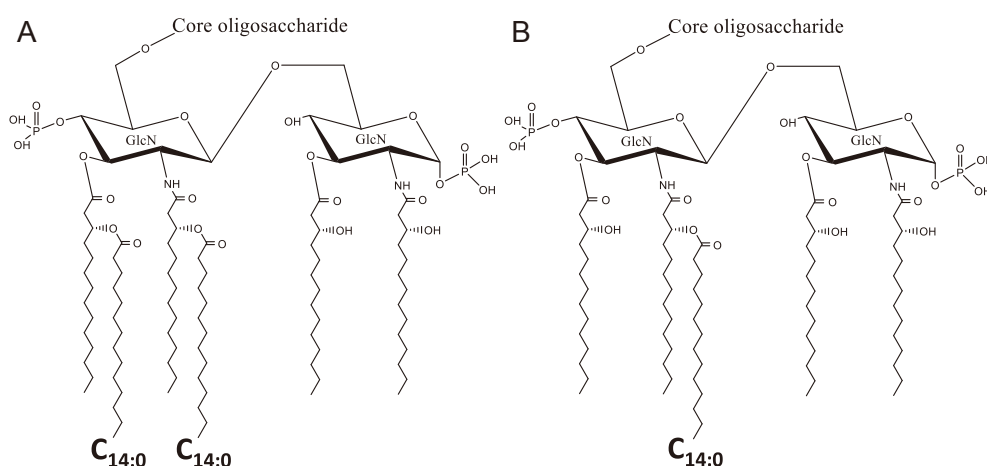


図 3 ミスチン酸転移酵素遺伝子導入株リポド A の推定化学構造
A : KGU0485 株リポド A の化学構造。B : KGU0496 株リポド A の化学構造

ドロキシミスチン酸 ($3\text{-OH-C}_{14:0}$) を 2 分子, $C_{14:0}$ を 1 分子含むものであった。すなわち, 1 分子の $C_{14:0}$ はグルコサミンの C3 位の水酸基に結合した $3\text{-OH-C}_{14:0}$ に結合しているため弱アルカリ処理で遊離し易く, もう 1 分子は C2 位のアミノ基に結合した $3\text{-OH-C}_{14:0}$ に結合して比較的安定であることを示す結果が得られた。一方, KGU0496 株リポド A については, 図 2 に示したように, すべてのピークが $C_{14:0}$ を 1 分子含んでおり, $C_{14:0}$ はこの弱アルカリ分解により遊離しなかったことがわかった。したがって, この $C_{14:0}$ はアミノ基に結合した $3\text{-OH-C}_{14:0}$ に結合していることが示された。なお, これらの $C_{14:0}$ が還元末端側のグルコサミンに結合した 3-

$\text{OH-C}_{14:0}$ に結合しているのではないことも, 非還元末端グルコサミン由来のオキソニウムイオンの検出と, 他の化学的分解と質量分析の組合せで確認されているが, 詳細については省略する。

以上の情報から, KGU0485 株と KGU0496 株のリポド A を図 3A, 3B のように推定した。いずれの構造も, 本来の $C_{12:0}$ の位置に $C_{14:0}$ が置換した構造をとっていると考えられた。

3. 改変されたリポド A を持つ LPS の免疫活性

$C_{14:0}$ 転移酵素遺伝子の導入により得られた KGU0485 株と KGU0496 株の LPS について, 免疫活性の指標とし

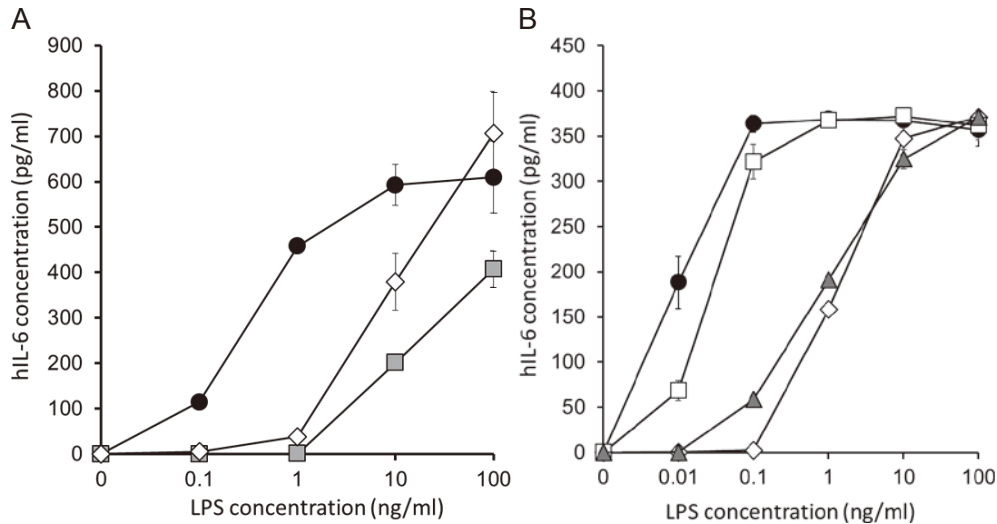


図 4 野生株、脂肪酸転移酵素遺伝子破壊株、およびミリスチン酸転移酵素遺伝子導入株由来 LPS の U937 細胞に対する IL-6 産生誘導活性

A : ●, KGU0107 株 (野生株) ; ◇, KGU0221 株 ; ■, KGU0377 株

B : ●, KGU0107 株 (野生株) ; ◇, KGU0221 株 ; □, KGU0485 株 ; ▲, KGU0496 株

て IL-6 産生誘導活性を調べ、元株の活性と比較した。アッセイにはヒト由来単芽球様細胞株 U937 細胞を用い、ホルボールミリスチン酸アセテート (PMA) を 100 nM になるように加えて 3 日間培養した後、各菌株の LPS で刺激し、6 時間培養した後に培養液中に産生される IL-6 をサンドイッチ ELISA 法を用いて定量した。

図 4A には、野生株 (KGU0107 株) と 2 種類の遺伝子破壊変異株である KGU0377 株と KGU0221 株 LPS の活性を比較した (以前の論文³⁾ から抜粋)。KGU0377 株 LPS は $C_{12:0}$ 、 $C_{14:0}$ いずれも欠いているため、野生株 LPS と比べて活性が極めて弱いことがわかる。これに対して KGU0221 株の LPS の活性は KGU0377 株よりは強く、高濃度では KGU0107 株 LPS と同等の活性を示した。このデータを基に KGU0485 株、KGU0496 株 LPS について測定した結果、KGU0485 株の LPS は野生株である KGU0107 株の LPS と同等の活性を示し、KGU0496 株の LPS は KGU0221 株 LPS と同等の活性を示すという興味ある結果が得られた (図 4B)。前述の通り、KGU0485 株 LPS 中のリピド A は野生株リピド A の $C_{12:0}$ が $C_{14:0}$ に置き換わっており、KGU0496 株 LPS 中のリピド A についても KGU0221 株リピド A の $C_{12:0}$ が $C_{14:0}$ に置き換わった構造をとっている。したがってこの結果から、 $C_{14:0}$ は免疫活性の面からも $C_{12:0}$ を代替することができることが明らかになった。これをレセプターの面から考えると、LPS のレセプターである TLR4 は非還元末端グルコサミンの 2 位に結合した 3-OH- $C_{14:0}$ と分岐鎖を形成する脂肪酸の、炭素鎖 2 個の違いを識別しないものと推定された。

おわりに

リピド A の脂肪酸分岐鎖構造の改変に関して、化学合成の場合は脂肪酸の炭素鎖を変えるのは比較的容易であり、結合位置についても変化させることが可能であると思われる。これに対して、脂肪酸転移酵素の導入によりリピド A 構造を改変する方法は、作製し得る構造が酵素の種類や性質に規定されるという難点がある。しかし、作出できる構造の意外性という面では面白味があるのではないかと思われる。さらに、菌の培養により大量の LPS を容易に得ることができるので、この面では応用の範囲が広がると期待される。今後もさらに他菌種の脂肪酸転移酵素を用いた大腸菌リピド A の改変を行っていく予定である。

謝 辞

関東学院大学大学院在学中に本研究で用いた変異株の作製を行った伊藤瑞穂氏、大澤絵美里氏、および研究に携わった関東学院大学のすべての学生諸君に感謝致します。また、IL-6 産生誘導活性の測定方法について、有用なアドバイスを頂きました滝本博明博士、松浦基博博士に深謝致します。

文 献

- 1) Imoto M, Yoshimura H, Kusumoto S, et al. : Total synthesis of lipid A, active principle of bacterial endotoxin. Proc Jpn Acad Ser B 60 : 285-288, 1984
- 2) 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
- 3) Sugawara T, Onoue S, Takimoto H, et al. : Modification

- of lipid A structure and activity by the introduction of palmitoyltransferase gene to the acyltransferase-knockout mutant of *Escherichia coli*. *Microbiol Immunol* 62 : 497-506, 2018
- 4) 川原一芳, 菅原健広, 大澤絵美里, 他 : リポド 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. *エンドトキシン・自然免疫研究* 21 : 51-55, 2018
- 5) Li Y, Yun J, Liu L, et al. : Identification of two genes encoding for the late acyltransferases of lipid A in *Klebsiella pneumoniae*. *Curr Microbiol* 73 : 732-738, 2016
- 6) Taniguchi C, Sugawara T, Onoue S, et al. : Structural modification of *Escherichia coli* lipid A by myristoyltransferase gene from *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol Immunol* 63 : 334-337, 2019

酢酸菌による外膜小胞の産生とその性質

橋本 雅仁

鹿児島大学理工学域工学系

Production of outer membrane vesicles from acetic acid bacteria and their properties

Masahito Hashimoto

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

Abstract

Outer membrane vesicles (OMVs) are mainly composed of lipopolysaccharide (LPS), phospholipids, and outer membrane and periplasmic proteins. Recently OMV vaccines have been developed, because their LPS act as adjuvant. However, attenuation of the toxicity of typical LPS is necessary to reduce adverse effects of OMV vaccine. Previously we found that acetic acid bacteria *Acetobacter pasteurianus* produces low immunostimulatory LPS. In this study, we separated OMVs from *A. pasteurianus* and characterized their immunostimulatory effects. *A. pasteurianus* NBRC 3283 were grown at 27°C in 804 broth. Vesicle secretion from the cell was observed after 2 days in culture by TEM imaging. The vesicles were separated from culture supernatants after 7 days in culture by ultracentrifugation. We found that the precipitation contains vesicles which can be purified by OptiPrep density gradient centrifugation. Since the vesicles composed of LPS and outer membrane proteins, we concluded they are OMVs and designated as Ap-OMV. We further found that Ap-OMV stimulated TLR2 and weakly TLR4 in TLR expressing cells and TNF- α production in J774A.1 cells. Furthermore the OMV-like vesicles were also found in Japanese black vinegar, kurozu. These data suggest that *A. pasteurianus* produce LPS-containing OMVs and can stimulate innate immune system.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 54~57, 2019

Key words : Acetobacter, LPS, OMV, TLR, 黒酢

はじめに

細菌外膜小胞 (OMV) は, グラム陰性菌が産生する 20~300 nm 程度の小胞であり, リポ多糖 (LPS), リポタンパク質 (LP), ペプチドグリカン (PGN) をはじめとした微生物分子パターン (MAMPs), 外膜タンパク質 (OMP), 多糖などの抗原を含むことが知られている¹⁾。近年, OMV の機能が注目されており, 宿主細胞に接触, 侵入することで免疫系を調節するなど, 細菌と宿主細胞との相互作用に関与していることがわかってきた。また, OMV のワクチンへの応用も検討されており, とくに髄膜炎菌に対してはすでに実用化されている例もある。しかし一般細菌由来の OMV は LPS の強毒性のため弱毒化などの加工が必要であるなど欠点がある。

酢酸菌は, 酢酸発酵だけでなくソルボースやバイオセルロースの生産にも使われる, 多くの菌属を含む総称で

ある。酢酸菌のうち, *Acetobacter pasteurianus* はエタノールを酸化して酢酸を生成するグラム陰性菌であり, 鹿児島県特産の醸造酢である黒酢の発酵微生物の一つとして知られている。最近われわれは, *A. pasteurianus* の LPS (Ap-LPS) がヒトの TLR4 を弱く活性化する弱毒性であることを明らかにした²⁾。そこで本稿では酢酸菌に着目して, OMV の産生能と免疫学的性質について述べる³⁾。

1. 酢酸菌による OMV 産生

OMV は, 菌体表面の膜が湾曲し出芽して菌から放出されることが知られている。そこで, 酢酸菌で OMV が産生されるかどうかについて, 菌体と培養上清を用いて検討した。菌株は *A. pasteurianus* NBRC3283 を用いた。804 培地 (Hipolypepton-Yeast extract-Glucose-MgSO₄) を用い 27°C で振とう培養した条件下では, 菌の増殖は 5

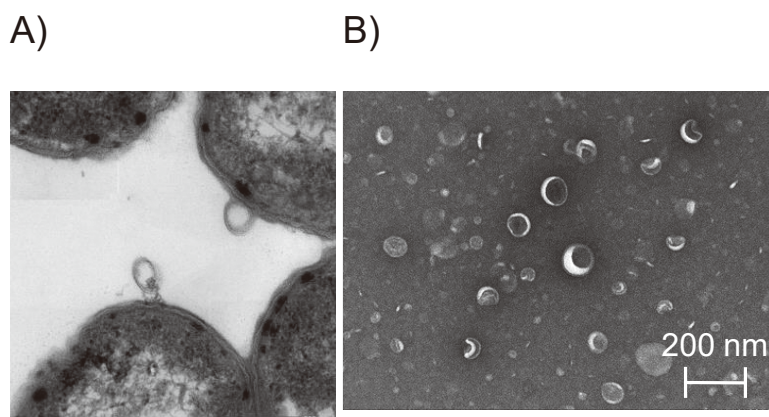


図 1 A : 培養 2 日目の *A. pasteurianus* 由来菌体の TEM 像, B : 培養 7 日目の *A. pasteurianus* 由来小胞の TEM 像

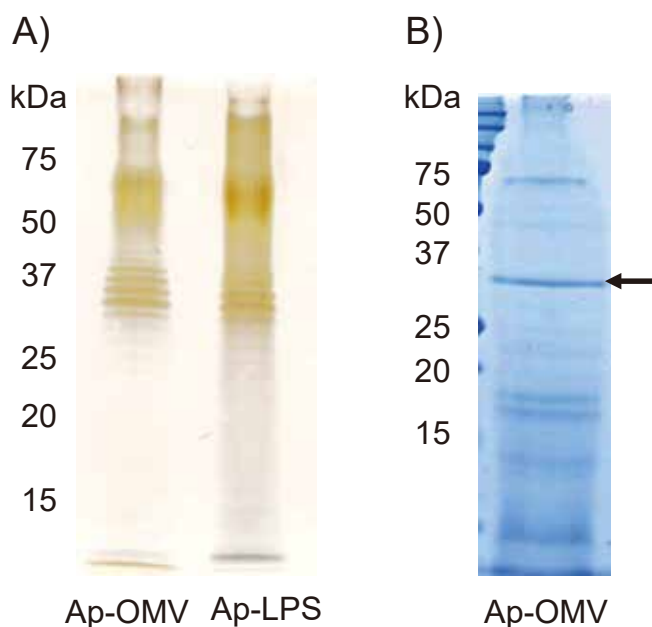


図 2 Ap-OMV および Ap-LPS の SDS-PAGE 泳動像
A : 過ヨウ素酸—銀染色, B : CBB 染色, 矢印は OmpA のバンド

日程度で定常期に達した。培養中の菌体を TEM を用いて追跡したところ、2 日目に菌体表面からの小胞の出芽が観察され、OMV の産生が示唆された (図 1A)。そこで、培養上清をメンブランフィルター濾過後、超遠心分離し沈殿を TEM 観察したところ、培養 3 日目以降に OMV と思われる小胞を回収することがわかった (図 1B)。沈殿の SDS-PAGE 像から LPS を含有することがわかったため、ヘキソース含量を基準に沈殿の回収量を比較したところ、培養 7 日目が最も多いことがわかった。

そこで OptiPrep を用いた密度勾配遠心法により小胞の分離を試みた。7 日目の培養上清由来沈殿物を 10~45% の OptiPrep 段階密度勾配で分離したところ、20% と 25% の境界に小胞を分離することができた。小胞画分

を超遠心分離で回収したところ、2.4 L の培養から 1~2 mg 程度 (乾燥重量) の小胞を得ることができた。DLS 測定の結果、小胞は 120 nm 程度の直径を持つと推定された。TEM 測定像からの計測では、80~120 nm 程度であり、大きな矛盾はなかった。

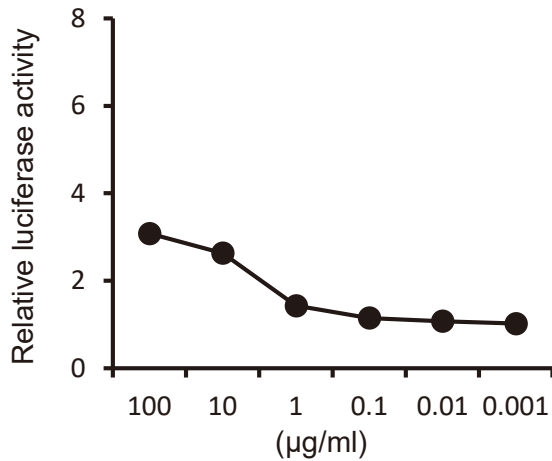
小胞を SDS-PAGE で分離後、過ヨウ素酸—銀染色で糖を可視化したところ、酢酸菌型の LPS と同様のバンドパターンを示した (図 2A)。アルジトールアセテート法による単糖定量の結果、小胞はグルコース、ラムノースを主要な構成糖とし、ガラクトースとマンノースをわずかに含むことがわかった。これは、Ap-LPS の構成糖と同様であり、小胞中に酢酸菌由来の LPS が含まれていることがわかった。また CBB 染色されたバンドを、トリプシン消化後に質量分析で解析したところ、*A. pasteurianus* の外膜タンパク質 OmpA も検出された (図 2B)。以上の結果は、酢酸菌が産生する小胞が OMV であることを示しており、本画分を Ap-OMV とした。

2. 酢酸菌による OMV の免疫学的性質

Ap-OMV は LPS を有することから、自然免疫を活性化しうることが期待できる。そこで、TLR2 および TLR4 の活性化を強制発現細胞を用いて検討した。その結果、TLR4 を弱く活性化することが示され (図 3A)、Ap-LPS の性質と一致することがわかった。また TLR2 も活性化しうること (図 3B) がわかった。このことは、OMV が未同定ながらリポタンパク質も含むことを示唆している。

また、サイトカインの産生誘導能も検討した。マウスマクロファージ様細胞 J774A.1 を用いたところ、TNF- α 産生を誘導することがわかった (図 4)。Ap-OMV の誘導能は Ap-LPS よりも強い傾向にあり、LPS 以外の成分の活性への関与が示唆された。また、大腸菌由来の精製 LPS (EC-LPS) と比較すると 1/1,000 倍程度と活性が弱いことから、Ap-OMV が弱毒型の OMV であることがわかった。

A)



B)

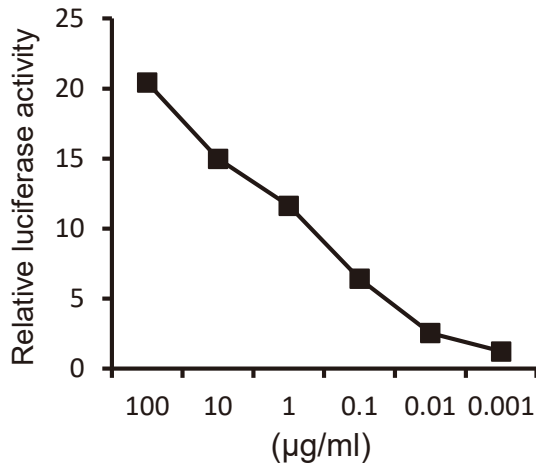


図 3 Ap-OMV の TLR 活性化能

A : Ba/mTLR4-MD2 細胞, B : Ba/mTLR2 細胞を用いた。活性は NF- κ B 依存的ルシフェラーゼアッセイによって検出した。

3. 黒酢に含まれる OMV 様小胞

酢酸菌が OMV を生産することから、酢酸菌を発酵微生物とする黒酢にも OMV が含まれる可能性について検討した。黒酢は鹿児島県福山町で静置発酵にて生産された玄米黒酢を用いた。黒酢をメンブランフィルター濾過し、超遠心分離したところ、*A. pasteurianus* 培養上清と同様に沈殿が得られた。TEM で観察したところ、Ap-OMV と同様の小胞が存在することがわかった(図 5A)。そこで、OptiPrep 段階密度勾配で分離したところ、Ap-OMV と同様に小胞を分離することができた。小胞を SDS-PAGE で分離後、過ヨウ素酸—銀染色で糖を可視化したところ、酢酸菌型の LPS と同様のバンドパターンを示した(図 5B)。以上の結果は、黒酢中にも Ap-OMV と同様の構造体が存在することを示している。

おわりに

これまで OMV は、主に病原細菌を対象として病原性の発現機構やワクチンへの応用が研究されてきていた。しかし、OMV に含まれる LPS の毒性が問題であり免疫系の調整に用いるには加工などの手間が必要であった。一方で、本稿で示した酢酸菌が産生する OMV は、弱毒性の LPS を持つことから、自然免疫系を弱く活性化することができる。これは、LPS の毒性を減弱することなく、そのまま利用できる可能性を示すものである。また、酢酸菌を発酵細菌とする黒酢にも OMV 様の構造が含まれていた。黒酢の飲用は、免疫系を調整するとされていることから、この構造体はその活性を担っている可能性も考えられる。今後は、酢酸菌 OMV の *in vivo* での効果を明らかにし、酢酸菌の免疫調整への寄与について明らかにしたい。

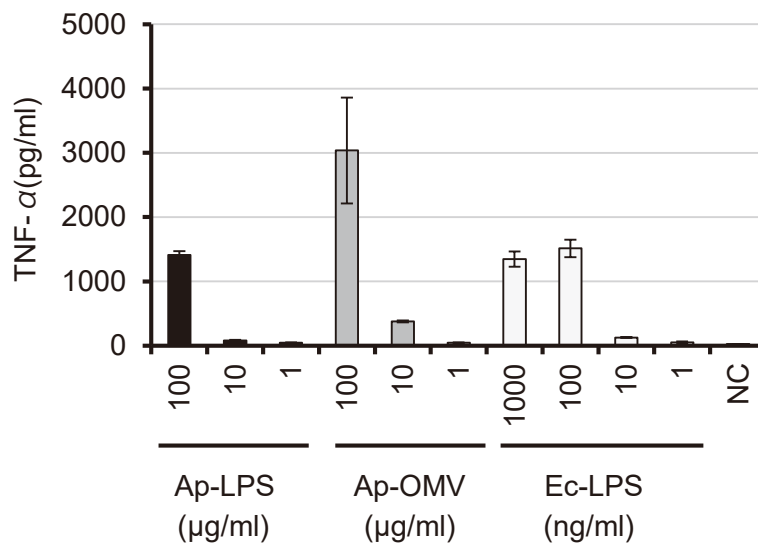


図 4 Ap-OMV の J774A.1 に対する TNF- α 産生誘導能

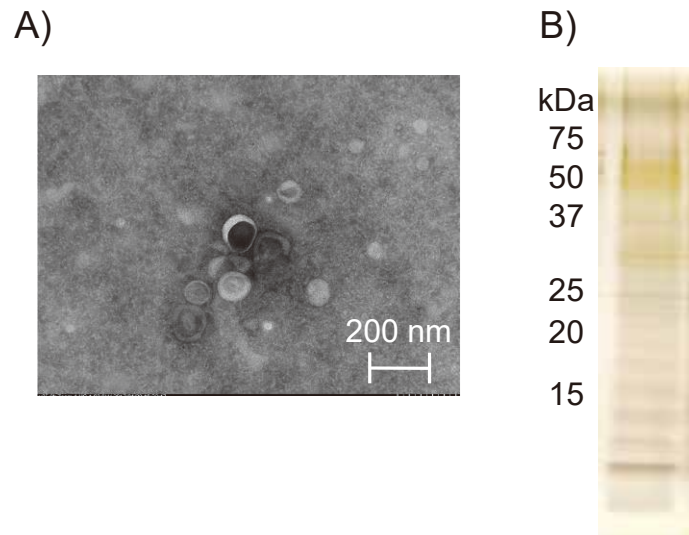


図 5 黒酢由来 OMV 様構造体の A : TEM 像, B : SDS-PAGE 泳動後の過ヨウ素酸一銀染色像

文 献

- 1) Pathirana RD, Kaparakis-Liaskos M : Bacterial membrane vesicles : biogenesis, immune regulation and pathogenesis. *Cell Microbiol* 18 : 1518-1524, 2016
- 2) Hashimoto M, Ozono M, Furuyashiki M, et al. : Characterization of a novel D-glycero-D-talo-oct-2-ulosonic acid-substituted lipid A moiety in the lipopolysaccharide produced by the acetic acid bacterium *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283. *J Biol Chem* 291 : 21184-21194, 2016
- 3) Hashimoto M, Matsumoto T, Tamura-Nakano M, et al. : Characterization of outer membrane vesicles of *Acetobacter pasteurianus* NBRC3283. *J Biosci Bioeng* 125 : 425-431, 2018

LPS 感受性プロテアーゼ前駆体の 自己触媒的活性化における遷移状態を捕捉する

川畑俊一郎, 柴田 俊生

九州大学大学院理学研究院生物科学部門

Capturing the active transition state of an LPS-sensitive protease zymogen in autocatalytic activation

Shun-ichiro Kawabata, Toshio Shibata

Department of Biology, Faculty of Science, Kyushu University

Abstract

Hemolymph coagulation in horseshoe crabs is triggered by the autocatalytic activation of a lipopolysaccharide (LPS)-sensitive serine protease zymogen factor C through its transition state (factor C^{*}). However, the existence of factor C^{*} is only speculative, and it remains unknown whether the autocatalytic cleavage of the Phe⁷³⁷-Ile⁷³⁸ bond (the F737 site) of factor C^{*} required for the conversion to an active form α -factor C occurs intramolecularly or intermolecularly. We show that the F737 site of a catalytic Ser⁹⁴¹-deficient mutant of factor C is cleaved by an F737 site-uncleavable mutant in the presence of LPS. These data clearly indicate the existence of factor C^{*} without cleavage of the F737 site. We also found the following facts : (1) the autocatalytic cleavage at the F737 site of factor C^{*} occurs intermolecularly on the LPS surface ; (2) factor C^{*} does not exhibit intrinsic chymotryptic activity against the F737 site during the autocatalytic activation, and (3) LPS is required not only to complete the substrate-binding site and oxyanion hole of factor C^{*} but also to allow the F737 site to be cleaved.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 58~62, 2019

Key words : horseshoe crab, lipopolysaccharide (LPS), serine protease zymogen, autocatalytic activation, transition state

はじめに

カブトガニは、古生代に繁栄した三葉虫亜門の系譜にはなく、クモ・サソリ・ダニなどを含む鋏角亜門 (Chelicerata) に属している。節足動物の化石群からなる北米のバージェス頁岩動物群 (約 5 億 500 万年前) には、三葉虫類とともにサンクタカリス (*Sanctacaris uncata*) やハベリア (*Habelia optata*) といった鋏角類がすでに出現している。現存種としては、日本に *Tachypleus tridentatus*、北アメリカ東岸に *Limulus polyphemus*、アジア東南海域沿岸には、*T. tridentatus* に加えて *T. gigas* と *Carcinoscorpius rotundicauda* が生息している。

カブトガニの免疫系における特徴は、グラム陰性菌の細胞壁成分であるリポ多糖 (Lipopolysaccharide : LPS) に対する高い感受性と、それに惹起される体液凝固反応にある。カブトガニ体液の顆粒細胞は、LPS に鋭敏に反

応して顆粒に貯蔵されている凝固因子を放出する¹⁾。凝固因子は、4つのセリンプロテアーゼ前駆体 (C 因子, G 因子, B 因子, 凝固酵素前駆体) と凝固タンパク質前駆体のコアギュロゲンから成り、限定分解による活性化の連鎖反応 (カスケード反応) を引き起こす (図 1)。C 因子は、N-末側ドメインのトリプレット配列 (-Arg³⁶-Trp³⁷-Arg³⁸-) を介して LPS に結合し²⁾、自己触媒的な限定分解により α -C 因子となり、 α -C 因子は B 因子を活性化型に変換する。活性化型 B 因子は、凝固酵素前駆体を凝固酵素に活性化し、コアギュロゲンは、凝固酵素によりコアギュリンに変換されてゲル化する。

また、C 因子は顆粒細胞の細胞膜に局在する LPS 受容体としても機能し、プロテアーゼ依存性の G タンパク質共役受容体を活性化すると推定される³⁾。一方、G 因子は、真菌や海藻の細胞壁成分である β -1,3-D-グルカン (BDG) と相互作用して自己触媒的に活性化し、B 因子

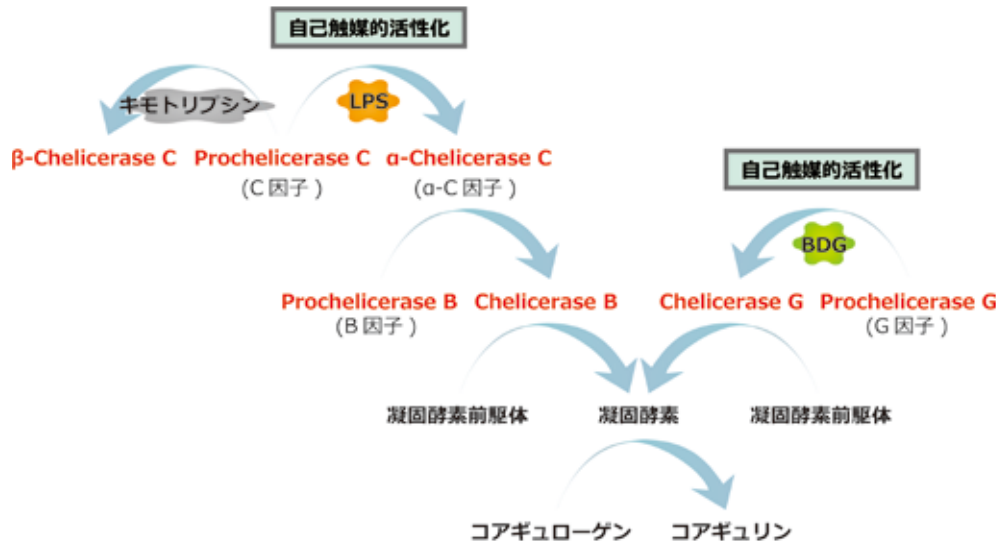


図 1 カプトガニ体液凝固のカスケード反応
新しい凝固因子の呼名を赤字で示した。

を介することなく凝固酵素前駆体を活性化する (図 1)。なお、BDG やペプチドグリカンは、顆粒細胞を刺激して凝固因子を放出させることはない³⁾。

われわれは、1998 年より大腸菌や酵母の系を用いて、組換え体 C 因子の調製法を模索したが、実用には至らなかった。Wang らは、ショウジョウバエ S2 細胞系を用いて、N-結合型糖鎖が C 因子のフォールディングに不可欠であることを明らかにした⁴⁾。その後、われわれは、哺乳類細胞 (HEK293S 変異株) を用いて、一定サイズの N-結合型糖鎖 (Man₅GlcNAc₂) を付加した組換え C 因子を調製した。ところが、得られた組換え C 因子は、天然の C 因子と同等の LPS 結合活性を示すものの、自己触媒的に活性化しなかった。アミノ酸配列分析の結果、N-末端 Arg¹ 残基にベクター由来の 3 つのアミノ酸残基が付加していたため、Arg¹ のアミノ末端側に本来の C 因子のプロペプチドを挿入したところ、培養細胞中でプロペプチドが正常にプロセシングされ、天然 C 因子に匹敵する野生型 C 因子の調製に成功した⁵⁾。さらに、Arg¹ が自己触媒的活性化に必須であること、Arg¹ と LPS 結合配列との距離が自己触媒的活性化に重要であることも判明した。

われわれは、C 因子の LPS 依存的な自己触媒的活性化機構を説明するために、『限定分解を受けていないが、活性型コンフォメーションを有する遷移状態 (C* 因子)』を仮定している。配列相同性から判断すると、α-C 因子は、基質の切断位置 (P1 部位) に Arg や Lys 残基を好むトリプシン族に属し、事実、P1 部位に Arg を有する合成ペプチド基質を特異的に切断する。しかし、自己触媒的活性化を介した C 因子から α-C 因子への変換には、F737 部位の限定分解が生じるため (図 2)⁶⁾、『C* 因子は F737 部位を切断する内在的キモトリプシン様活性を有

する』という都合のよい仮定も必要であった。さらに、『C* 因子の F737 部位が分子内で切断されるのか、あるいは C* 因子の分子間で切断されるのか』についても未解決の問題であった。これらの懸念を解決すべく、C 因子の変異体を用いて詳細に検討した⁷⁾。

1. 限定分解を介したセリンプロテアーゼ前駆体の活性化機構

セリンプロテアーゼ前駆体の活性化機構は、トリプシンによるキモトリプシノーゲンの限定分解を介した活性化モデルにより説明される。すなわち、ウシキモトリプシノーゲンの -Arg¹⁵-Ile¹⁶- のペプチド結合がトリプシンにより限定分解されると、新たに生じた Ile¹⁶-Val¹⁷-Asn¹⁸-Gly¹⁹- のペプチド配列が折れ曲がって、キモトリプシノーゲンの活性化ポケット (activation pocket) と呼ばれる疎水的な穴に潜り込み、Ile¹⁶ の α-アミノ基と分子内部にある Asp¹⁹⁴ 側鎖の β-カルボキシル基とが salt bridge (塩橋) を形成する。そのことが触媒部位 (His⁵⁷, Asp¹⁰², Ser¹⁹⁵ のトライアド) 周辺のコンフォメーション変化を誘導し、基質結合部位 (Arg や Lys の側鎖に対する結合部位) とオキシアニオンホール (基質・酵素複合体の四面体中間体を一時的に安定化する部位) を完成させる。つまり、セリンプロテアーゼ前駆体活性化の本質は、-Arg¹⁵-Ile¹⁶- の限定分解ではなく、分子内の塩橋形成が誘導するコンフォメーション変化である。したがって、限定分解されなくとも塩橋形成と同じ作用をするものがあれば、前駆体は活性型に変換されるはずである。

C 因子は H 鎖と L 鎖から成る 2 本鎖からなる前駆体であり、L 鎖にプロテアーゼドメインが含まれる (図 2)。キモトリプシノーゲン活性化モデルに準じて、C 因子の自己触媒的活性化を推定すると、LPS との相互作用によ

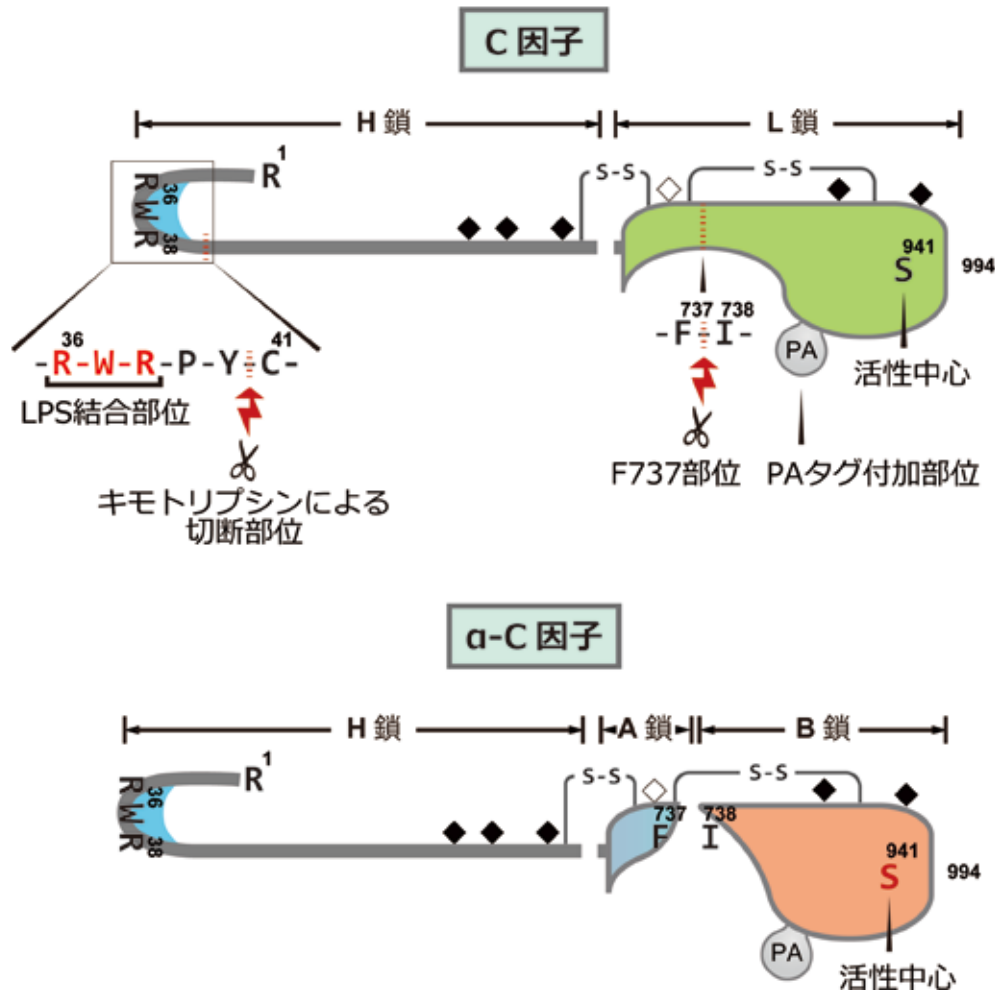


図 2 C 因子と α -C 因子のモデル図

C 因子は、N 末端側に局在するトリプレット配列 (-R³⁶-W³⁷-R³⁸-) を介して LPS に結合し、自己触媒的活性化反応により、-F⁷³⁷-I⁷³⁸- (F737 部位) が限定分解を受けて、活性型の α -C 因子に変換される⁵⁾。その際、L 鎖が切断されて A 鎖と B 鎖が生じる。なお、C 因子の F737 部位は、キモトリプシンでも切断されて、ペプチド基質に対してアミダーゼ活性を有する β -C 因子となる。しかし、 β -C 因子は、二次的に -Y⁴⁰-C⁴¹- の間もキモトリプシンにより切断されているため、B 因子を活性化することができない⁸⁾。

り遷移状態となった C* 因子は、分子内あるいは分子間で、-Arg¹⁵-Ile¹⁶- に相当する -Phe⁷³⁷-Ile⁷³⁸- (F737 部位) を自己触媒的に限定分解する。その結果、Ile⁷³⁸-Trp⁷³⁹-Asn⁷⁴⁰-Gly⁷⁴¹- のペプチド配列は折れ曲がって活性化ポケットに潜り込み、Ile⁷³⁸ の α -アミノ基が Asp¹⁹⁴ に相当する Asp⁹⁴⁰ の側鎖 β -カルボキシル基と塩橋を形成して、 α -C 因子へと変換される。実験的には、C 因子から α -C 因子への変換は、(1) F737 部位の切断に伴って L 鎖から B 鎖が遊離することを、B 鎖の抗体を用いてウェスタンブロットする、さらに (2) 合成ペプチド基質に対するアミダーゼ活性を測定することで確認している。

2. C* 因子の内在的キモトリプシン様活性を仮定する必要はない

セリンプロテアーゼの触媒残基 Ser¹⁹⁵ に相当する C 因

子の Ser⁹⁴¹ 残基を Ala に置換した S941A 変異体は、LPS 依存的な自己触媒的活性化を誘導しないことから、C* 因子においても Ser⁹⁴¹ が触媒部位として機能していることは明らかである。そこで、C* 因子の「内在性のキモトリプシン様活性」を確認する目的で、F737 部位の Phe⁷³⁷ を Ala (F737A 変異体)、あるいは Glu (F737E 変異体) に置換すると、予想に反して、F737A および F737E 変異体は、野生型と同様に LPS 依存的な自己触媒的活性化を引き起こした。つまり、C* 因子による F737 部位の限定分解の際には、P1 部位の Phe⁷³⁷ は基質認識に重要でないことを示している。

一方、Phe⁷³⁷ を Pro 残基に置換した F737P 変異体には、LPS 依存的な限定分解はみられなかった。Pro 残基は、 α -ヘリックスや β -シートといった二次構造を壊すアミノ酸であり、F737 部位周辺のコンフォメーション変化

による立体構造が、C*因子による限定分解に必須なのかもしれない。これらの実験結果から、自己触媒的なF737部位の限定分解には、C*因子の内在的キモトリプシン様活性を仮定する必要がないことが判明した。

3. C*因子の捕捉と分子間でのF737部位の限定分解

S941A変異体は触媒残基Ser⁹⁴¹を失っているが、F737部位は正常である。一方、F737P変異体のSer⁹⁴¹は正常であるが、F737部位は限定分解されない。2つの変異体をLPS存在下で混合した場合、F737P変異体が遷移状態(F737P*)をとり、分子間で限定分解が起こるとすれば、S941A変異体のF737部位が限定分解されるはずである。LPS存在下で、S941A:F737Pのモル比を50:1, 50:2, 50:5で混合して一定時間インキュベーションすると、F737Pの量に比例してS941A変異体のF737部位が切断され、遷移状態F737P*(C*因子)の存在を実証する結果となった。

C*因子による分子間での限定分解をさらに確認するために、C因子に標識タグをつける必要があった。しかし、C因子のN末端やC末端にHis-タグを導入すると、LPS親和性には影響を与えないが、自己触媒的活性化が阻害された。ところが、PA-タグ(ポドプラミンに由来する10残基のペプチド)をC因子のB鎖内部に導入したPA-C因子(図2)は、LPS存在下で活性化した。PA-タグは、そのリング状構造から、導入したタンパク質に対して機能障害を与えにくいとされる。そこで、S941A変異体のB鎖にPA-タグを導入したPA-S941A変異体を作成した。LPS存在下でPA-S941A変異体とF737P変異体を1:1で混合すると、F737P*によりPA-S941A変異体のF737部位が限定分解され、B鎖の遊離がPA-タグ抗体で確認された。以上の結果から、C*因子は、分子間でF737部位を限定分解できることが証明された。なお、F737P*は本来F737部位が切断されない変異体であり、C*因子が「分子内でF737部位を切断しない」という直接的な証明にはなっていない。

4. C*因子同士の分子間反応にはLPSという足場が必要である

C因子のLPS結合モチーフ(-Arg³⁶-Trp³⁷-Arg³⁸-)の2つのArg残基をGlu残基に置換したRE-C因子は、LPS結合活性を失い、LPS依存的な自己触媒的活性化を誘導しない³⁾。そこで、LPS結合活性を欠失させたRE-S941A変異体を作成した。LPS存在下で、RE-S941A変異体とF737P変異体を1:1で混合したが、RE-S941A変異体のF737部位は限定分解されなかった。このことは、C*因子で分子間のF737部位を限定分解するには、基質側のC因子もLPSに結合しておく必要があることを示唆している。基質側のC因子がLPSと結合することで、

F737部位が限定分解を受けやすいコンフォメーションへと変換されるのであろう。

5. カプトガニ凝固因子の改名

最近、B因子もLPS結合タンパク質であることが判明した⁸⁾。一方、カプトガニ血漿中には、補体C3因子、補体B因子、補体系レクチンが存在している^{9,10)}。興味深いことに、C因子は補体C3因子と複合体を形成し、補体活性化の初期過程で重要な働きをしている¹¹⁾。さらに、ダニのC因子ホモログが発見され、補体系に関与している¹²⁾。このように、カプトガニ凝固因子と補体系因子の名前と機能に重複がみられるため、カプトガニ凝固因子を改名した⁷⁾。銚角重門の分類名にちなんで、C、B、G因子は、それぞれProchelicrase C、Prochelicrase B、Prochelicrase Gとし、活性型はProを除いたものとした(図1)。また、Prochelicrase Cに対しては、自己触媒的に活性化したものは α -chelicrase C、キモトリプシンにより活性化されたものは β -chelicrase Cとした。なお、 β -chelicrase Cは、合成ペプチド基質に対しては α -chelicrase Cと同等のアミダーゼ活性を示すが、LPS結合モチーフ近辺の-Tyr⁴⁰-Cys⁴¹-のペプチド結合がキモトリプシンにより切断されてLPS結合性を失っており、B因子(Prochelicrase B)を活性化しない(図2)⁸⁾。

おわりに

C因子変異体を用いた研究により、遷移状態のC*因子の存在を示せたことは大きな成果であった(図3)。加えて、以下のC*因子の特徴が解明された。(1)自己触媒的なF737部位の限定分解は、C*因子同士の分子間反応である。(2)F737部位の限定分解に対して、C*因子の内在的キモトリプシン様活性を仮定する必要はない。(3)LPSの結合は、C*因子の基質結合部位やオキシアニオンホールを完成させるだけでなく、F737部位周辺のコンフォメーション変化を誘導する。今後は、すべての凝固因子の組換えタンパク質を調製して、凝固カスケードの分子機構を詳細に解析していく必要がある。

文献

- 1) Kawabata S, Muta T : Sadaaki Iwanaga : Discovery of the lipopolysaccharide- and β -1,3-D-glucan-mediated proteolytic cascade and unique proteins in invertebrate immunity. J Biochem 147 : 611-618, 2010
- 2) Koshiba T, Hashii T, Kawabata S : A structural perspective on the interaction between lipopolysaccharide and Factor C, a receptor involved in recognition of Gram-negative bacteria. J Biol Chem 282 : 3962-3967, 2007
- 3) Ariki S, Koori K, Osaki T, et al. : A serine protease

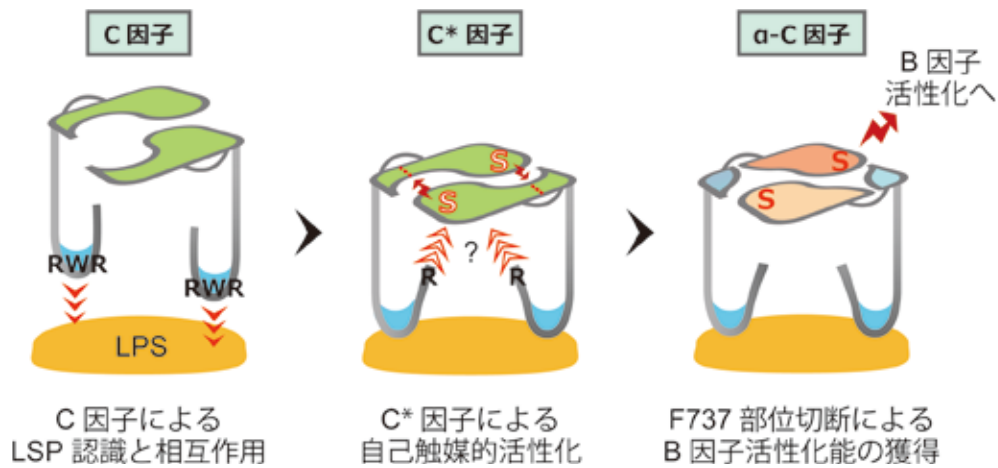


図 3 C 因子の LPS 存在下における自己触媒的活性化のモデル図

トリプレット配列を介して LPS に結合した C 因子は、遷移状態である C* 因子の複合体を形成する。その際、アミノ末端の R¹ 残基が何らかの重要な働きをすることが推定される。C* 因子は、分子間で F737 部位を切断することで α-C 因子に変換され、カスケードの次の前駆体である B 因子を活性化する。

zymogen functions as a pattern-recognition receptor for lipopolysaccharides. Proc Natl Acad Sci USA 101 : 953-958, 2004

- 4) Wang J, Tan NS, Ho B, et al. : Modular arrangement and secretion of a multidomain serine protease. Evidence for involvement of proline-rich region and N-glycans in the secretion pathway. J Biol Chem 277 : 36363-36372, 2002
- 5) Kobayashi Y, Shiga T, Shibata T, et al. : The N-terminal Arg residue is essential for autocatalytic activation of a lipopolysaccharide-responsive protease zymogen. J Biol Chem 289 : 25987-25995, 2014
- 6) Tokunaga F, Miyata T, Nakamura T, et al. : Lipopolysaccharide-sensitive serine-protease zymogen (factor C) of horseshoe crab hemocytes. Identification and alignment of proteolytic fragments produced during the activation show that it is a novel type of serine protease. Eur J Biochem 167 : 405-416, 1987
- 7) Shibata T, Kobayashi Y, Ikeda Y, et al. : Intermolecular autocatalytic activation of serine protease zymogen factor C through an active transition state responding to lipopolysaccharide. J Biol Chem 293 : 11589-11599, 2018
- 8) Kobayashi Y, Takahashi T, Shibata T, et al. : Factor B is the second lipopolysaccharide-binding protease zymogen in the horseshoe crab coagulation cascade. J Biol Chem 290 : 19379-19386, 2015
- 9) Zhu Y, Thangamani S, Ho B, et al. : The ancient origin of the complement system. EMBO J 24 : 382-394, 2005
- 10) Tagawa K, Yoshihara T, Shibata T, et al. : Microbe-specific C3b deposition in the horseshoe crab complement system in a C2/factor B-dependent or -independent manner. PLoS One 7 : e36783, 2012
- 11) Ariki S, Takahara S, Shibata T, et al. : Factor C acts as a lipopolysaccharide-responsive C3 convertase in horseshoe crab complement activation. J Immunol 181 : 7994-8001, 2008
- 12) Urbanová V, Hartmann D, Grunclová L, et al. : IrFC-An *Ixodes ricinus* injury-responsive molecule related to *Limulus* Factor C. Dev Comp Immunol 46 : 439-447, 2014

Fusobacterium nucleatum によるマスト細胞の 細胞外トラップ放出と炎症誘導

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

Fusobacterium nucleatum induces the production of extracellular traps by human mast cells, resulting in inflammatory responses

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

Mast cells play an important role in the innate immune responses to bacterial infections as the first line of defense such as in the skin and mucosa. Mast cells can produce extracellular traps to kill bacteria by trapping pathogens. Mast cell extracellular traps (MCETs) are composed of web-like DNA fibers that contain bactericidal substances such as DNA, histones, trypsinase, and antimicrobial peptides. At present, it is unknown whether the induction of inflammation in periodontal diseases is due to MCETs induced by periodontal bacteria. We investigated the role of mast cells in the induction of MCET production following infection with *Fusobacterium nucleatum*, a Gram-negative anaerobic bacterium associated with periodontal disease. We found that mast cells produced MCETs in response to *F. nucleatum* infection. Furthermore, the MCETs highly expressed macrophage migration inhibitory factor (MIF). Of note, the level of MIF expressed in the MCETs was inhibited by tauroldine, an LPS antagonist. We next investigated whether MCETs can induce inflammatory responses in monocytes. The MCETs induced the production of IL-1 β , IL-6, and IL-8 by monocytes. The production of IL-1 β , IL-6, and IL-8 was inhibited by an MIF inhibitor. These findings suggest that MCETs produced by mast cells in response to *F. nucleatum* infection induce proinflammatory cytokine production by monocytes, which may lead to the chronic inflammation observed in periodontal diseases.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 63~66, 2019

Key words : 慢性歯周炎, マスト細胞, Mast cell extracellular traps, *Fusobacterium nucleatum*, リボ多糖

はじめに

30歳以上の成人の約8割が罹患する慢性歯周炎は、歯周病関連細菌による感染症であるが、歯の喪失をもたらす歯周組織の破壊は、歯周ポケットに慢性的に感染する歯周病関連細菌に対する免疫応答の遷延化による慢性炎症が引き起こす。歯周ポケットには、デンタルプラーク

と呼ばれる1 mgで1億を超える口腔細菌がバイオフィルムを形成しており、慢性歯周炎罹患者のデンタルプラーク細菌叢は主に歯周病関連細菌で構成されている。歯周病関連細菌の感染に対して歯周ポケットに集積する免疫細胞の大多数は好中球であるが、重度の慢性歯周炎患者における炎症歯周組織にはマスト細胞が多く局在することが示されており、慢性歯周炎の病態形成において

マスト細胞による免疫応答は炎症の増悪にかかわる可能性が推測される。

細菌感染に際して、好中球は NETosis という細胞死に陥ることで neutrophil extracellular traps (NETs) と呼ばれる細胞内容物を放出し感染防御作用を発揮する。しかしながら、好中球からの持続的あるいは過剰な NETs 放出は、慢性炎症性疾患を増悪させることが示唆されている。一方、マスト細胞も Group A *Streptococcus* 感染に際して、好中球と類似するマスト細胞細胞外トラップ (mast cell extracellular traps : MCETs) を放出することで感染防御機構を担う。

本稿では、歯周病関連細菌である *Fusobacterium nucleatum* 感染によるマスト細胞からの MCETs 放出と MCETs による炎症誘導について、われわれの知見を中心に概説したい。

1. マスト細胞による細胞外トラップ放出

病原体の感染に際して、マスト細胞は TLR, Dectin-1 や補体受容体など自然免疫受容体で病原体を認識し、食食、脱顆粒や活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) などを放出することで直接的に防御機構を発揮する一方、マスト細胞はヒスタミンやロイコトリエン C4 による上皮細胞からのムチン産生や血管透過性の亢進ならびに IL-8, TNF- α や eotaxin による好酸球、好中球や NK 細胞の遊走などにより間接的に防御機構を発揮する¹⁾。近年、マスト細胞は Group A *Streptococcus* や *Leishmania* 感染に対して、好中球が放出する NETs と類似した DNA やヒストンから構成される MCETs を放出することが明らかにされ²⁻⁴⁾、MCETs は細菌感染におけるマスト細胞による防御機構であることが示された。

2. 慢性歯周炎における歯周病関連細菌とマスト細胞の役割

歯周病関連細菌は、慢性歯周炎の病態増悪に最も強く関与するレッドコンプレックスと呼ばれる 3 菌種 *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* を頂点とする細菌種で構成される。*Fusobacterium nucleatum* は、慢性歯周炎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嫌気性菌であり、レッドコンプレックスに次ぐオレンジコンプレックスに属し⁵⁾、ヒト口腔の他に腸管にも常在し大腸がんの増殖を促進させる⁶⁾。デンタルプラークの形成は、まず始めに初期付着菌 (early colonizer) である、う蝕原因菌 *Streptococcus mutans* を含むグラム陽性通性菌が菌面に定着する。次に、時間の経過に伴うデンタルプラークの成熟により、後期付着菌 (late colonizer) である歯周病関連細菌を中心とするグラム陰性嫌気性菌 (後期付着菌) 主体に遷移するが、この細菌叢の遷移 (dysbiosis) において *F. nucleatum* は強力な共凝集能を有することで、初

期付着菌と後期付着菌の双方を結合させる役割を担う⁷⁾。

重度慢性歯周炎患者の炎症歯肉にはマスト細胞が集積することが示唆されているが⁸⁻¹²⁾、慢性歯周炎の病態形成におけるマスト細胞の機能的役割は十分に明らかにされていない。最近われわれは、マウス口腔に *P. gingivalis* を感染させると、マスト細胞依存的に炎症性サイトカイン IL-31 が産生され、IL-31 は歯肉上皮細胞に作用するとタイトジャンクション分子 claudin-1 発現をダウンレギュレーションさせることで慢性炎症の誘導にかかわることを示した¹³⁾。

3. *F. nucleatum* によるマスト細胞からの細胞外トラップ放出

F. nucleatum による好中球からの ROS 産生は、*P. gingivalis* よりも高いことが示されており¹⁴⁾、ROS は細胞質における NETs ならびに MCETs 誘導に必須の分子であることから、*F. nucleatum* は *P. gingivalis* よりマスト細胞からの MCETs 放出を強く誘導することが予測される。そこでわれわれは、*F. nucleatum* 感染によりマスト細胞が MCETs を放出する可能性について、ヒトマスト細胞株 HMC-1 に *F. nucleatum* を感染させた結果、マスト細胞は感染 4 時間後から細胞外に DNA を放出することを見出した。また、マウス骨髄細胞由来マスト細胞 (BMMCs) に *F. nucleatum* を感染させても同様に細胞外 DNA 放出が観察された。この細胞外 DNA 放出は、*F. nucleatum* 死菌ならびに cytochalasin D および nocardazole を前処理したマスト細胞でも観察されたことから、細菌の細胞内侵入やマスト細胞による細菌の食食に依存しないことが示された。*F. nucleatum* 感染によりマスト細胞から放出された細胞外 DNA は、著明にヒストン H3 のシトルリン化が検出されたことから、*F. nucleatum* 感染によりマスト細胞が放出した細胞外 DNA は MCETs であることが証明された。また、同 MCETs にはカテリシジンファミリーの属する抗菌ペプチドである cationic antimicrobial peptide of 18-kDa (CAP-18) が発現しており、感染防御能を有することが示唆された。そこで *F. nucleatum* 感染によりマスト細胞から放出された MCETs に発現する分子群について、105 種類のサイトカインを中心とした分子の抗体が固相化されたメンブレンを用いたサイトカインアレイ法で解析した結果、*F. nucleatum* 感染によりマスト細胞から放出された MCETs には IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) や plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) に加え、マクロファージ遊走阻止因子 (macrophage migration inhibitory factor : MIF) が高レベルで発現することを HMC-1 ならびに BMMCs で明らかにした。他方、われわれは *F. nucleatum* 感染によりヒト好中球は NETs を放出し、この NETs も MIF を高発現しており血管内皮細胞に炎症を誘導することを明らかにした。

4. MCETs 発現 MIF による炎症誘導

MIF は当初、キャピラリーからマクロファージの無秩序な遊走を阻止する因子として発見された。その後、LPS によるエンドトキシンショック誘導は抗 MIF 抗体で阻害され¹⁵⁾、MIF はエンドトキシンショック誘導にかかわる IL-1 β 、IL-6、IL-8 や TNF- α など炎症性サイトカイン産生を誘導することが明らかにされ¹⁶⁾、MIF は炎症性サイトカインとしての機能を有することが明らかにされた。MIF は構成的に多様な細胞種の細胞質に発現しており、MIF はアミノ末端を欠如することから小胞体を介する通常のタンパク質分泌系では細胞外に産生されず、damage-associated molecular patterns (DAMPs) のようにネクロシスに伴う細胞傷害の結果、MIF は細胞外に放出される¹⁷⁾。興味深いことに、*F. nucleatum* 感染によりマスト細胞が放出した MCETs には著明な MIF 発現がみられたのに対して、培養上清中には MIF はほぼ検出されなかった。そこで、*F. nucleatum* 感染による MCETs の MIF 発現を誘導する菌体成分について、*F. nucleatum* の LPS により担われる可能性について検討した。*F. nucleatum* 感染によりマスト細胞が放出する MCETs の MIF 発現は、MCETs を LPS 阻害剤である taurolidine で前処理することで著明に抑制された。そこで、マスト細胞を *F. nucleatum* 由来 LPS で刺激したところ、MIF は培養上清には産生されず、細胞質に著明な MIF 発現が誘導されることを見出した。これらの知見は、マスト細胞が *F. nucleatum* 感染を受けると、細胞質に MCETs が形成されると同時に LPS 刺激により細胞質に MIF が蓄積し、MIF-MCET 複合体が形成され細胞死に伴い細胞外に放出されたと捉えられる (図 1)。最後に、*F. nucleatum* 感染により放出された MCETs による炎症誘導について、ヒト THP-1 細胞を活性型ビタミン D3 で分化誘導させた単球様細胞を供試し、MCETs による THP-1 細胞からの炎症性サイトカイン産生について検討した。THP-1 細胞を MCETs で刺激すると著明に IL-1 β 、IL-6 および IL-8 が産生され、THP-1 細胞を MIF アンタゴニスト ISO-1 で前処理すると同作用は完全に阻害された。以上の知見から、*F. nucleatum* 感染によりマスト細胞は MCETs を放出し、MCETs に発現する MIF は単球から炎症性サイトカイン産生を誘導することが示された (図 1)。

おわりに

われわれは歯周病関連細菌 *F. nucleatum* の感染によりマスト細胞は MCETs を放出し、同菌 LPS は MIF 発現を誘導することを示した。また、MCETs に結合する MIF は単球から炎症性サイトカインを誘導することが明らかとなった。慢性歯周炎において、歯周病関連細菌の感染により放出されるマスト細胞の MCETs ならびに

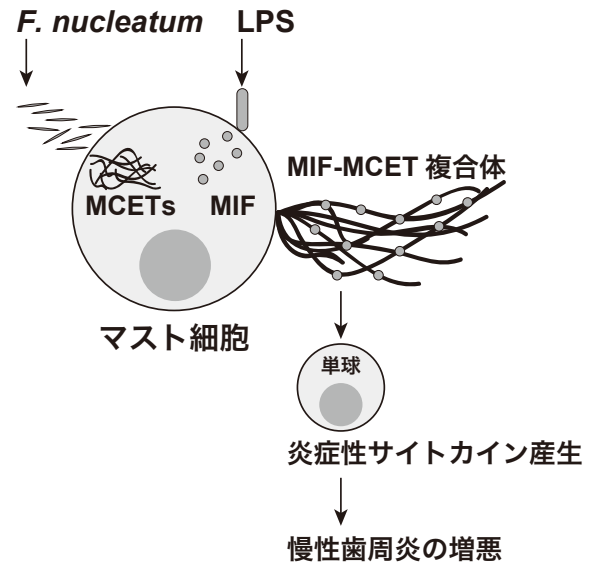


図 1 *F. nucleatum* 感染によるマスト細胞の MIF-MCET 複合体の放出は、単球からの炎症性サイトカイン産生を誘導する

F. nucleatum 感染によりマスト細胞は MCETs を放出する一方、*F. nucleatum* 由来 LPS の刺激はマスト細胞に MIF 発現を誘導する。MIF が結合した MCETs は細胞死に伴い細胞外に放出されると、単球からの炎症性サイトカイン産生を誘導する。

好中球の NETs に発現する MIF は、慢性歯周炎における炎症の遷延化にかかわる可能性が想定され、今後の検討課題といえる。

文 献

- 1) Urb M, Sheppard DC : The role of mast cells in the defense against pathogens. PLoS Pathog 8 : e1002619, 2012
- 2) Clark M, Kim J, Etesami N, et al. : Group A *Streptococcus* prevents mast cell degranulation to promote extracellular trap formation. Front Immunol 9 : 327, 2018
- 3) von Köckritz-Blickwede M, Goldmann O, Thulin P, et al. : Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. Blood 111 : 3070-3080, 2008
- 4) Naqvi N, Ahuja K, Selvapandiyan A, et al. : Role of mast cells in clearance of *Leishmania* through extracellular trap formation. Sci Rep 7 : 13240, 2017
- 5) Socransky SS, Haffajee AD : Dental biofilms : difficult therapeutic targets. Periodontol 2000 28 : 12-55, 2002
- 6) Kostic AD, Chun E, Robertson L, et al. : *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. Cell Host Microbe 14 : 207-215, 2013
- 7) Jiao Y, Hasegawa M, Inohara N : The role of oral pathogens in dysbiosis during periodontitis development. J

- Dent Res 93 : 539-546, 2014
- 8) Gupta K, Idahosa C, Roy S, et al. : Differential regulation of mas-related G protein-coupled receptor X2-mediated mast cell degranulation by antimicrobial host defense peptides and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. Infect Immun 85 : e00246-17, 2017
 - 9) Huang S, Lu F, Chen Y, et al. : Mast cell degranulation in human periodontitis. J Periodontol 84 : 248-255, 2013
 - 10) Huang S, Lu F, Li J, et al. : Quantification of tryptase-TIM-3 double-positive mast cells in human chronic periodontitis. Arch Oral Biol 59 : 654-661, 2014
 - 11) Myint M, Steinsvoll S, Yuan ZN, et al. : Highly increased numbers of leukocytes in inflamed gingiva from patients with HIV infection. AIDS 16 : 235-243, 2002
 - 12) Steinvoll S, Halstensen TS, Schenck K : Extensive expression of TGF- β 1 in chronically-inflamed periodontal tissue. J Clin Periodontol 26 : 366-373, 1999
 - 13) Tada H, Nishioka T, Takase A, et al. : *Porphyromonas gingivalis* induces the production of interleukin-31 by human mast cells, resulting in dysfunction of the gingival epithelial barrier. Cell Microbiol 21 : e12972, 2019
 - 14) Wright HJ, Chapple IL, Matthews JB, et al. : *Fusobacterium nucleatum* regulation of neutrophil transcription. J Periodontol Res 46 : 1-12, 2011
 - 15) Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, et al. : MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxemia. Nature 365 : 756-759, 1993
 - 16) Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, et al. : The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. J Exp Med 179 : 1895-1902, 1994
 - 17) Roth S, Agthe M, Eickhoff S, et al. : Secondary necrotic neutrophils release interleukin-16C and macrophage migration inhibitory factor from stores in the cytosol. Cell Death Discov 1 : 15056, 2015

抗菌ペプチド LL-37 による好中球細胞外小胞 (エクトソーム) の放出を介したマウス敗血症の病態改善

熊谷 由美¹⁾, 村上 泰介¹⁾, 栗原 京子²⁾, Johannes Reich³⁾, 田村 弘志⁴⁾, 長岡 功¹⁾

¹⁾順天堂大学医学部生化学・生体防御学講座, ²⁾同 微生物学講座, ³⁾Microcoat Biotechnologie GmbH,

⁴⁾LPS コンサルティング事務所

Antimicrobial peptide LL-37 ameliorates murine sepsis through the induction of microvesicle (ectosome) release from neutrophils

Yumi Kumagai¹⁾, Taisuke Murakami¹⁾, Kyoko Kuwahara²⁾, Johannes Reich³⁾, Hiroshi Tamura⁴⁾, Isao Nagaoka¹⁾

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

²⁾Department of Bacteriology, Juntendo University, School of Medicine

³⁾Microcoat Biotechnologie GmbH

⁴⁾Laboratory Program Support (LPS) Consulting Office

Abstract

Neutrophils release microvesicles (ectosomes) upon stimulation. Interestingly, ectosome level is elevated in sepsis survivors. Previously, we revealed that LL-37, a human cathelicidin antimicrobial peptide, improves the survival of a murine cecal ligation and puncture (CLP) sepsis model. Thus, in the present study, we elucidated the action of LL-37 on sepsis, by focusing on the effect of LL-37 on ectosome release in the CLP model. The results demonstrated that the ectosome level was elevated in CLP mice, and the level was further enhanced by the LL-37-administration, accompanied with the reduced bacterial load. Importantly, ectosome-containing microvesicles isolated from LL-37-injected CLP mice contained higher amounts of antimicrobial proteins/peptides (such as lactoferrin and murine cathelicidin-related antimicrobial peptide), and exhibited higher antibacterial activity, compared with those from PBS-injected CLP mice, suggesting that LL-37 induces the release of ectosomes with antibacterial potential *in vivo*. In fact, LL-37 stimulated mouse bone marrow neutrophils to release ectosomes *ex vivo*, and the LL-37-induced ectosomes possessed the antibacterial activity. Furthermore, the administration of LL-37-induced ectosomes reduced the bacterial load and improved the survival of CLP mice. Together these observations suggest that LL-37 induces the release of ectosome-containing antimicrobial microvesicles in CLP mice, thereby reducing the bacterial load and protecting mice from lethal septic condition.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 67~71, 2019

Key words : エクトソーム, 抗菌ペプチド, 好中球, 敗血症

はじめに

敗血症は、感染に対する過剰な生体反応によって引き起こされ、多臓器不全や致死性のショックをとともう¹⁾。敗血症に対して有効な治療法はいまだ確立されておらず、先進国においても致死率が25~50%と高い、重篤な疾患である¹⁾。われわれは、敗血症に対する有効な治療法を探索する過程において、ヒト抗菌ペプチド LL-37 が、盲腸結紮穿孔 (cecal ligation and puncture : CLP)

によるマウス敗血症モデルの症状を軽減し、生存率を改善させることを報告してきた^{2,3)}。

一方、好中球をホルミルペプチド fMLF などで刺激すると、エクトソームと呼ばれる 0.1~1 μm の細胞外小胞が放出される^{4,5)}。エクトソームは、好中球の顆粒に由来する分子 (抗菌タンパク質など) を含み、また表面には好中球の細胞膜に存在する分子 (Ly6G, phosphatidylserine [PS] など) を発現している^{4,5)}。興味深いことに、敗血症の生存患者では、血中のエクトソーム数が上

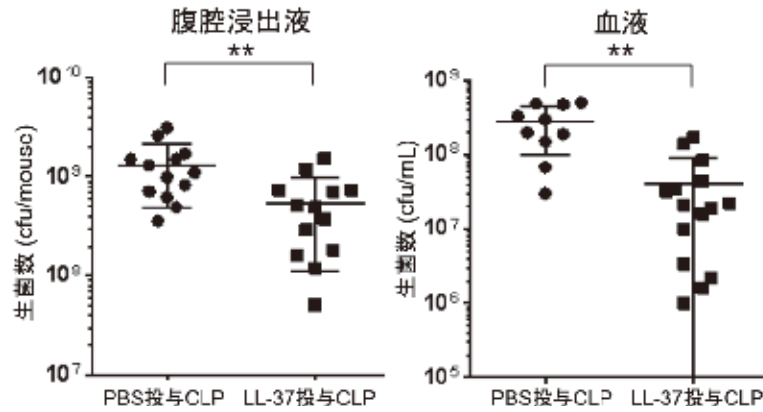


図 1 CLP マウスの生菌数に及ぼす LL-37 投与の効果

** $P < 0.01$

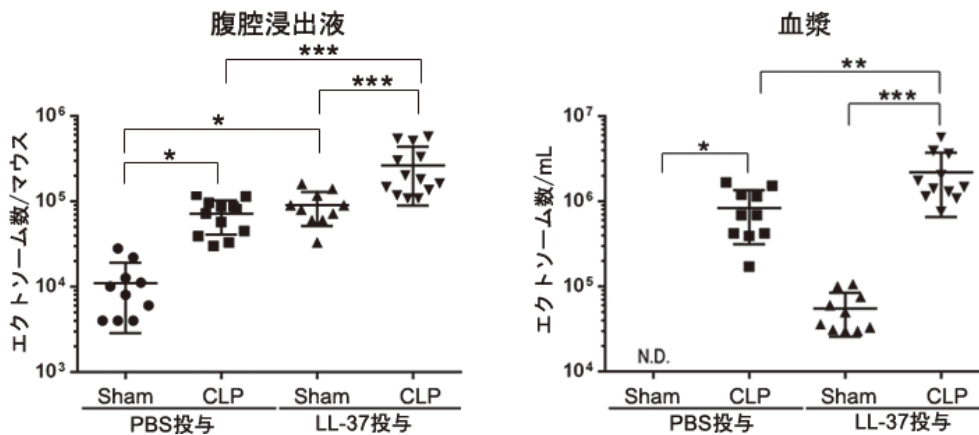


図 2 CLP マウスにおけるエクソソーム数に及ぼす LL-37 投与の効果

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, N. D.: 検出されず

昇することから^{6,7)}, エクソソームの敗血症病態へのかかわりが示唆されている。そこで本研究では, LL-37 の好中球からのエクソソーム放出作用に注目して, LL-37 のマウス敗血症モデルに対する効果を検討した。

1. LL-37 を投与した CLP マウスにおける生菌数の減少およびエクソソームレベルの上昇

BALB/c マウス (メス, 7~8 週齢) に LL-37 ($3 \mu\text{g}/\text{mouse}$) あるいはコントロールの PBS (phosphate-buffered saline) を尾静脈注射し, CLP 処置³⁾を施した。Sham マウスは, 開腹手術のみ行い, 結紮穿刺は行わなかった。CLP 施行 14~18 時間後に, 生理的食塩水あるいは HBSS⁻ (Hanks balanced salt solution, Ca^{2+} および Mg^{2+} 非含有) を腹腔内に注射して腹腔浸出液を回収し, また心臓からヘパリン採血をし, 腹腔浸出液と血液中の生菌数をコロニー形成法で調べた。その結果, LL-37 を投与した CLP マウスでは, PBS を投与した CLP マウスと比較して生菌数が有意に低下していた (図 1)。一方, Sham マウスの腹腔浸出液と血液には生菌が検出されな

かった (data not shown)。さらに, エクソソーム数を測定するために, 腹腔浸出液については $400 \times g$ で 5 分遠心し, その上清を $10,000 \times g$ で 10 分, さらにその上清を $100,000 \times g$ で 1 時間遠心し, その沈殿 (細胞外小胞画分) を PBS に懸濁した。また, 血液については $5,000 \times g$ で 20 分遠心して血小板を除いた血漿を調製した。これらの画分に含まれるエクソソームを, PE (Phycoerythrin)-Ly6G および FITC-Annexin V (PS に特異的に結合) で蛍光標識して, その数をフローサイトメーターで測定した。その結果, 腹腔内および血漿中のエクソソーム数は, PBS 投与マウスでも LL-37 投与マウスでも, CLP により有意に増加した (図 2, PBS 投与 Sham vs. PBS 投与 CLP; LL-37 投与 Sham vs. LL-37 投与 CLP)。興味深いことに, CLP 処置したマウスのエクソソーム数は, LL-37 の投与によりさらに増加した (図 2, PBS 投与 CLP vs. LL-37 投与 CLP)。また, Sham マウスにおいても, LL-37 投与によってエクソソーム数が有意に増加した (図 2, PBS 投与 Sham vs. LL-37 投与 Sham)。

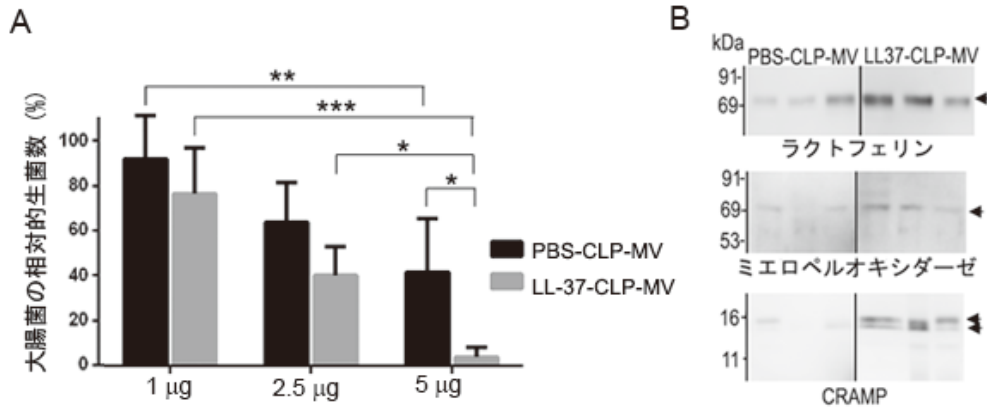


図 3 CLP マウスから調製した細胞外小胞画分の抗菌活性 (A) と抗菌タンパク質・ペプチド (B)
 A : 大腸菌を PBS とインキュベーションしたときの生菌数を 100 として、細胞外小胞とインキュベーションしたときの生菌数を相対値で示す。
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$
 B : ラクトフェリン, ミエロペルオキシダーゼ, CRAMP をウェスタンブロット法で検出した。

2. LL-37 を投与した CLP マウスから単離した細胞外小胞（エクソソーム）の抗菌活性

上記のように、LL-37 を投与した CLP マウスでは、PBS 投与 CLP マウスと比較して、エクソソーム数の増加がみられたと同時に、生菌数の減少が観察されたので、LL-37 投与によって抗菌活性をもつエクソソームが放出される可能性が考えられた。そこで、PBS あるいは LL-37 を投与した CLP マウスの腹腔浸出液から調製した細胞外小胞 (microvesicle : MV) (1, 2.5, 5 µg) を、マウス盲腸から単離した大腸菌 (5×10^3 , 対数期) とインキュベーションして、これら細胞外小胞の抗菌活性を評価した。その結果、PBS 投与 CLP マウス由来の細胞外小胞 (PBS-CLP-MV) と LL-37 投与 CLP マウス由来の細胞外小胞 (LL-37-CLP-MV) は、ともに用量依存的に抗菌活性を示すこと、また LL-37-CLP-MV は PBS-CLP-MV よりも有意に高い抗菌活性を有することが明らかとなった (図 3A)。さらに、エクソソームには好中球由来の分子が含まれるので^{4,5)}、細胞外小胞に含まれる抗菌タンパク質・ペプチドをウェスタンブロット法で調べたところ、LL-37-CLP-MV は PBS-CLP-MV と比較して、ラクトフェリン、ミエロペルオキシダーゼ、CRAMP (cathelicidin-related antimicrobial peptide, LL-37 のマウス ortholog) の含有量が多いことがわかった (図 3B)。

3. LL-37 による好中球からのエクソソーム放出

LL-37 は CLP マウスにおいてエクソソームの放出を誘導することが明らかとなったので、次に LL-37 が好中球に直接作用してエクソソームを放出させるかどうかを

調べた。そのために、マウス骨髄から Percoll を用いた密度勾配遠心法⁸⁾により単離した好中球 (2×10^6) を HBSS⁺ (Hanks balanced salt solution, Ca^{2+} および Mg^{2+} 含有) 中で、fMLF あるいは LL-37 により 37°C で 30 分間刺激した。その後、上清を $500 \times g$ で 5 分、その上清を $3,000 \times g$ で 5 分遠心し、その上清中のエクソソーム数をフローサイトメーターにより測定した。

その結果、fMLF 刺激によりエクソソームの放出が誘導され、また LL-37 によってもエクソソームの放出が濃度依存的に誘導された (図 4A)。また、エクソソームを含む細胞外小胞画分を大腸菌とインキュベーションしたところ、fMLF で放出された細胞外小胞 (fMLF-MV)、LL-37 で放出された細胞外小胞 (LL-37-MV) とともに生菌数を減少させたことから (図 4B)、好中球から放出されたエクソソームを含む細胞外小胞に抗菌作用があることが確認された。

4. LL-37 で刺激した好中球から放出された細胞外小胞（エクソソーム）の敗血症マウスに対する保護効果

最後に、LL-37-MV が敗血症に対して保護的に作用するかどうかを評価した。マウスに CLP 処置を施した 2 時間後に、 3×10^5 のエクソソームを含む LL-37-MV を腹腔内投与して、24 時間後のマウス腹腔内および血液中の生菌数を測定し、またマウスの生存を 10 日間にわたってモニターした。その結果、LL-37-MV を投与した CLP マウスでは、PBS を投与した CLP マウスに比べて、生菌数が有意に低下しており (図 5A)、また生存率も有意に上昇した (図 5B)。一方、PBS あるいは LL-37-MV を投与した Sham マウスでは、腹腔浸出液や血液中に生菌は検出されず、また生存率も 100% であった (図 5B)。

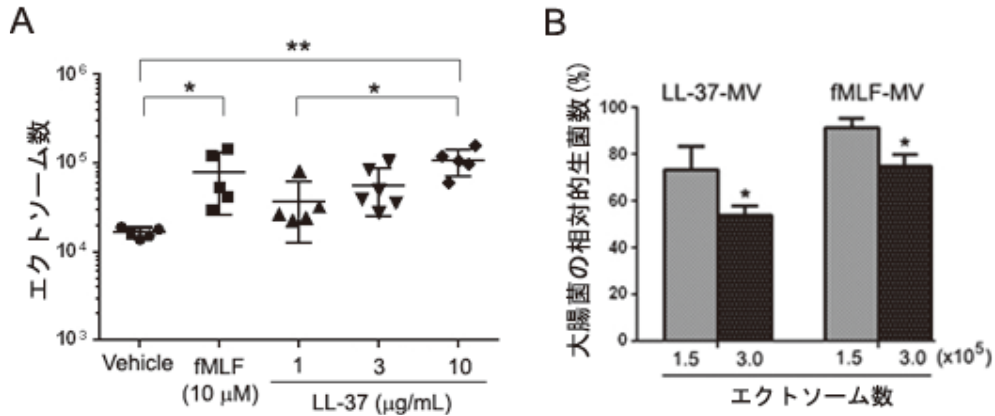


図 4 LL-37 による好中球からのエクソソーム放出 (A) とエクソソーム含有細胞外小胞画分の抗菌活性 (B)
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

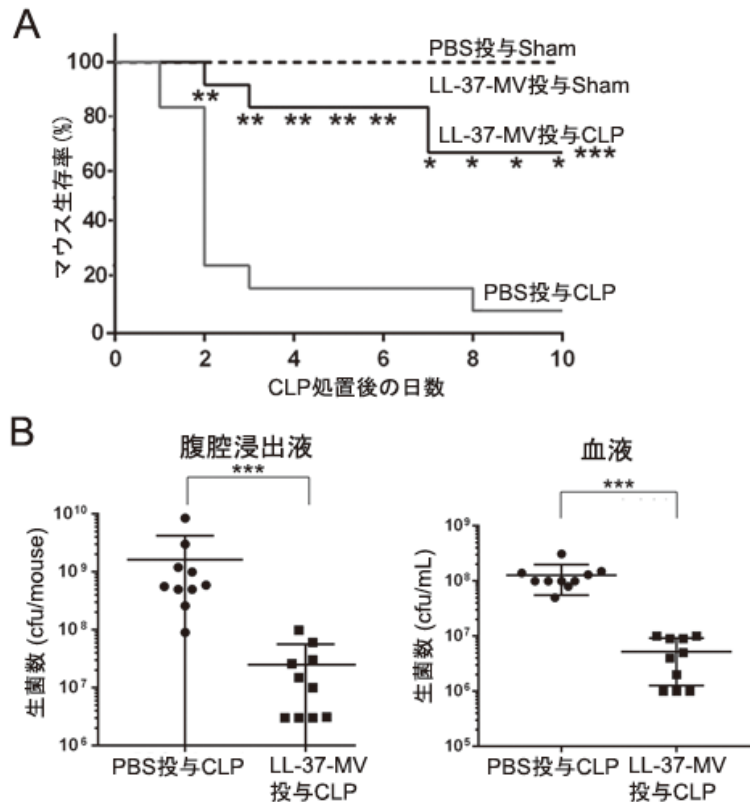


図 5 LL-37 で刺激した好中球から放出された細胞外小胞のマウス敗血症に対する保護効果
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

おわりに

われわれは以前、抗菌ペプチド LL-37 が CLP 敗血症マウスの生存率を向上させることを報告してきたが^{2,3)}、本研究では、LL-37 が CLP マウスの腹腔および血液における生菌数を減少させると同時に、エクソソーム数を増加させることを明らかにした。さらに、LL-37 投与マウスから単離した細胞外小胞は、PBS 投与マウスの細胞

外小胞と比較して、好中球由来の抗菌活性分子（ラクトフェリン、ミエロペルオキシダーゼ、CRAMP）を多く含み、高い抗菌活性を有することがわかった。したがって、LL-37 は CLP マウスにおいて、抗菌活性を有するエクソソーム数を増加させることで、腹腔や血液中の生菌数を減少させ、結果としてマウス生存率を改善する可能性が考えられる。また、LL-37 はマウス骨髄から調製した好中球に直接作用して、エクソソーム放出を誘導

することも明らかになった。さらに、LL-37 刺激の好中球から放出されたエクソソームにも抗菌活性があり、またこのエクソソームを CLP マウスに投与すると、腹腔や血液中の生菌数が減少し、生存率が改善した。これらのことから、LL-37 は抗菌活性を有するエクソソームの放出を促進することで、敗血症に対して保護的に作用することが示唆された。

LL-37 は敗血症において多面的な作用を示すことがわかっている。われわれはすでに、LL-37 が好中球に作用して、抗菌作用を有する NETs (neutrophil extracellular traps) の放出を誘導すること²⁾、また IL-1 β などの炎症性サイトカインを放出して炎症を増悪させる、マクロファージのピロトーシスを抑制することを示している³⁾。したがって、LL-37 のように、敗血症において多面的な作用を発揮する物質を探索し、その作用機構を解明することは、敗血症に対する有効な治療法を開発するために重要な情報を与えるものと考えられる。

文 献

- 1) Cecconi M, Evans L, Levy M, et al. : Sepsis and septic shock. *Lancet* 392 : 75-87, 2018
- 2) 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
- 3) 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
- 4) Kalra H, Drummen GP, Mathivanan S : Focus on Extracellular Vesicles : Introducing the Next Small Big Thing. *Int J Mol Sci* 17 : 170, 2016
- 5) Nauseef WM, Borregaard N : Neutrophils at work. *Nat Immunol* 15 : 602-611, 2014
- 6) Dalli J, Norling LV, Montero-Melendez T, et al. : Micro-particle alpha-2-macroglobulin enhances pro-resolving responses and promotes survival in sepsis. *EMBO Mol Med* 6 : 27-42, 2014
- 7) Lashin HMS, Nadkarni S, Oggero S, et al. : Microvesicle subsets in sepsis due to community acquired pneumonia compared to faecal peritonitis. *Shock* 49 : 393-401, 2018
- 8) Hu Z, Murakami T, Tamura H, et al. : Neutrophil extracellular traps induce IL-1 β production by macrophages in combination with lipopolysaccharide. *Int J Mol Med* 39 : 549-558, 2017

コレラ菌抽出物による IgE の不活化とアナフィラキシーの抑制

山崎 達也, 高村 (赤司) 祥子

愛知医科大学医学部感染・免疫学講座

Receptor-destroying enzyme (RDE) from *Vibrio cholerae* inactivates the function of IgE and reduces anaphylaxis

Tatsuya Yamazaki, Sachiko Akashi-Takamura

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

Abstract

IgE is known to play a key role in allergy. Mast cells bind IgE via the Fc receptor, FcεRI, and secrete inflammatory mediators via the recognition of allergens bound with IgE. Therefore, IgE is a major target for therapeutic treatment. Previous reports have demonstrated that oligomannose on IgE could be a new target to inhibit allergen function. However, the specific enzyme that modulates IgE for allergy treatment is not yet known. Here, we found that commercial receptor destroying enzyme (RDE) from *Vibrio cholerae* culture fluid can specifically modulate IgE, not IgG, and inactivate the initiation of anaphylaxis. RDE-treated IgE was unable to find the binding site of bone marrow derived-mast cells (BMMCs), followed by a reduction in the release of histamine and cytokines. We also confirmed that RDE-treated IgE could not induce passive cutaneous anaphylaxis (PCA) in mouse ears. From these results, we consider that RDE modulates the structure of IgE, rendering it unable to cause allergy. To reveal the function of RDE, we focused on the relationship of the modulation and glycosylation of IgE using lectin microarray analysis. We found that RDE-treated IgE significantly reduced the binding to *Lycopersicon esculentum* lectin (LEL) and *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L). These results suggest that RDE specifically modulates branched glycans on IgE, which is then rendered unable to induce an allergic response. These findings could be used in the development of a new drug to inhibit the function of IgE.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 72~78, 2019

Key words : IgE, allergy, glycans, *Vibrio cholerae*

はじめに

リポポリサッカライド (LPS) などのバクテリア成分はさまざまな自然免疫応答を誘導する。これまでの多くの研究から、それらバクテリア成分がどのような免疫応答に影響を与えるのか明らかにされてきた。しかし一方で、いまだに機能が不明なバクテリア成分も多数存在する。われわれは以前の研究で、タンパク抗体ではなく抗体を発現する遺伝子を用いた新しい受動免疫法で、インフルエンザを治療できたことを報告した¹⁾。この研究の中で偶然にも、市販のコレラ菌抽出物 (Receptor destroying enzyme : RDE) が中和 IgE 抗体のウイルス抗原への結合能を消失させていることを見出した。気管支喘息やアナフィラキシー誘導において IgE は主要因の一つである。近年、抗体医薬を用いて IgE を不活化させ

ることが治療に効果的であることが報告されているが、効果が現れるまでに時間がかかることも問題となっている。ゆえに IgE をターゲットとしたあたらしい治療法の開発は重要であると考えられる。そこでわれわれは、RDE が IgE を不活化するメカニズムを解明し、RDE をアレルギー治療へ応用できないか検討することにした。その結果、IgE に付加している糖鎖が RDE の標的となっている可能性が示唆された。本稿では、われわれの研究²⁾を中心に、IgE の機能と糖鎖の関連性や、IgE の糖鎖を標的としたアレルギー治療の可能性について概説したい。

1. コレラ菌抽出物 Receptor destroying enzyme (RDE) とは

市販のコレラ菌抽出物 RDE は、インフルエンザウイルスに対する中和抗体価を測定する際に、非特異反応を

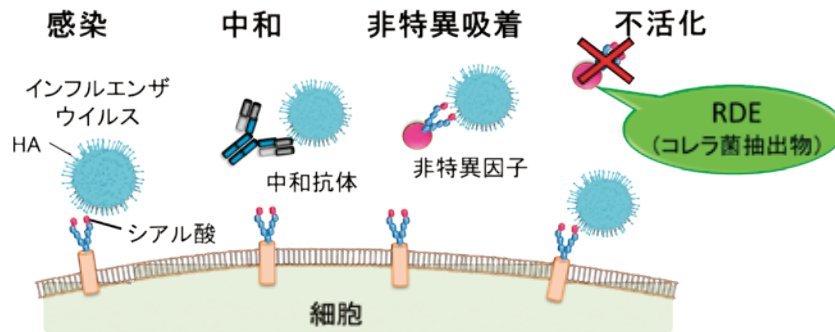


図 1 RDE によるウイルス非特異吸着因子の不活化

血清中のシアル酸が付加している非特異因子は、ウイルスへ非特異に吸着し、感染を阻害してしまう。これではワクチンなどで誘導された血清中の特異的抗体の中和能を測定することができない。そこで RDE で血清を処理することで、非特異因子を不活化することができる。

抑制するために古くから用いられている³⁾。インフルエンザウイルスは宿主が発現している糖鎖の一つであるシアル酸に結合して、細胞へ感染する。ワクチン投与などで血清に誘導されたウイルス特異的中和抗体価を測定する場合、その血清とウイルスを混合して細胞に添加する。血清中の抗体に中和能があれば感染を防御でき細胞は生存するが、中和能がなければ細胞はウイルスによって死滅する。しかし血清中に含まれるシアル酸は細胞へのウイルス感染を非特異的に阻害してしまう(図 1)。そこでシアリダーゼ活性をもつ RDE であらかじめ血清を処理 (RDE と血清を混合して 37℃ で一晩反応させる) しておくことで、この非特異反応を抑えることができ、正確な中和抗体価を測定することができる⁴⁾。

われわれは新たなインフルエンザ治療法を検討するために、ウイルス抗原の一つであるヘマグルチニン (HA) に結合する IgG 抗体遺伝子もしくは IgE 抗体遺伝子を作製した¹⁾。両者の抗体遺伝子の構造は、可変領域は同一で定常領域だけが異なっている。それら抗体遺伝子を HEK293T 細胞へトランスフェクションし、培養上清に分泌された抗 HA-IgG もしくは抗 HA-IgE の中和能を調べるために、上清を RDE 処理して、ウイルスと混合した。すると、抗 HA-IgG は中和能を示したのに対し、予想外に、抗 HA-IgE では中和能を全く示さなかった¹⁾。そこでわれわれは RDE 処理によって IgE が不活化されたと予想し、詳細を調べることにした。

2. RDE による IgE 不活化メカニズムについて

2-1. RDE 処理した抗 HA-IgE は抗原結合能を消失する

作製した抗 HA-IgG と抗 HA-IgE の可変領域は同一であるが、それぞれを RDE 処理した場合、抗 HA-IgE のみ中和能が消失していた。そこで最初に、RDE 処理した抗 HA-IgG と抗 HA-IgE の抗原結合能を ELISA で解析した (図 2A)。まず抗 HA-IgG は RDE 処理の有無では

ほとんど抗原結合レベルに変化は認められなかった (図 2B)。しかし RDE 処理した抗 HA-IgE は、バックグラウンドレベルまで抗原結合能が低下していた。この結果より、RDE 処理によって、抗 HA-IgE は抗原への結合性を失い、その結果、ウイルス中和能が認められなかったことがわかった。また、両者は可変領域および L 鎖は共通しているため、IgE の定常領域 (ε 鎖) に RDE が何らかの作用をして、抗原結合能を低下させている可能性が示唆された。

2-2. RDE 処理は IgE の構造に影響する

IgE に対するこの RDE の作用は、IgE の構造に影響を及ぼしているのだろうか。それを確認するために、市販の精製抗体を RDE 処理してウェスタン・ブロッティング (W.B) で解析を行った。まず、精製 IgG では RDE の処理の有無によって、主要なバンド (150 kDa 付近) の大きな変化は認められなかった (図 3A lane1~8)。一方で、未処理の IgE のバンドの予想サイズは 190 kDa であったが、実際に検出されたバンドは 250 kDa 以上の大きなサイズであった (図 3A lane9~12)。これより IgE は糖鎖などの修飾を受けて、特殊な構造をしている可能性が示唆された。さらに RDE 処理によって、このバンドサイズは 150 kDa 付近まで大きく低下していた (図 3A lane13~16)。この低下したバンドに L 鎖は含まれるのだろうか、それとも H 鎖のみであろうか。そこで、同様の条件で精製 IgE を RDE で処理し、W.B の検出を HRP 標識した L 鎖結合タンパクで行った。すると、RDE 処理した IgE において、150 kDa 付近に同様のサイズのバンドが検出された (図 3B lane2)。この結果より、RDE 処理した IgE のバンドサイズは大きく低下するが、H 鎖と L 鎖は結合した状態であることがわかった。それでは RDE 処理で影響を受けるのは H 鎖と L 鎖のどちらであろうか。それを確認するために、RDE 処理した IgE を還元条件で W.B を行った。まず L 鎖では、RDE 処理あり

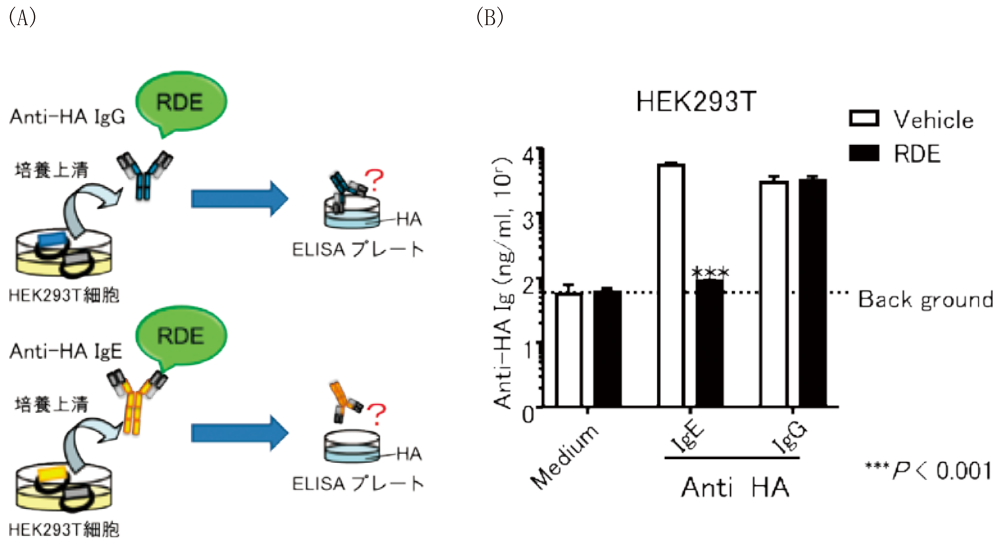


図 2 RDE 処理した抗 HA-IgE は抗原結合能を消失する

抗 HA-IgG および抗 HA-IgE 抗体遺伝子をトランスフェクションした HEK293T 細胞の上清を回収し、それぞれに RDE を添加して 37°C、6 時間インキュベーションした。その後、それぞれの抗原結合能を ELISA で測定した。(文献²⁾より引用)

なしで、IgG、IgE ともにバンドサイズに大きな変化は認められなかった (図 3C)。一方で、H 鎖では、RDE 処理によって IgE のバンドサイズの低下が認められた。よって、前述の予想通り、RDE は L 鎖ではなく、IgE の H 鎖 (ϵ 鎖) に作用していることがわかった。

2-3. IgE 不活化における RDE の作用機序～プロテアーゼ? シアリダーゼ? それ以外?

RDE にはコレラ菌由来のさまざまな成分が含まれていると考えられるが、シアリダーゼ活性の他にプロテアーゼ活性も有することが知られている⁴⁾。まず、IgE への RDE 作用が酵素反応であるか確認するために、RDE を熱処理してから IgE へ作用させた。すると 100°C で熱処理した場合に、IgE のバンドサイズの低下が認められなくなった (図 4A)。このことより、RDE の作用は酵素反応である可能性が示唆された。別の実験より、トリプシンも RDE と同様に IgE のバンドサイズを低下させることが確認された²⁾。これより、RDE の作用の中心もプロテアーゼではないかと予想し、プロテアーゼ阻害剤で RDE を処理して IgE への作用を抑制できるか確認を行った。まずコントロールとして用いたトリプシンでは、阻害剤によって IgE への作用が消失していた (図 4B lane5, 6)。一方で予想外にも、RDE の作用をプロテアーゼ阻害剤では抑制できなかった (図 4B lane3, 4)。別のプロテアーゼ阻害剤でも RDE の作用を抑制できなかった²⁾ことから、RDE の主要な作用はトリプシンのようなプロテアーゼではないと考えられた。そこで、別の候補であるシアリダーゼ活性について検討を行った。具体的には、市販の精製シアリダーゼを用いて、RDE と同様に

IgE を処理した。しかし、RDE と同様の作用は認められなかった²⁾。このことから、RDE の IgE 不活化反応においては、シアリダーゼも主要な作用ではないと考えられた。以前の報告で、PNGase (ほとんどの N 結合型糖鎖を切断する酵素) で IgE を処理すると、その機能が消失することがわかっている^{5,6)}。そこで RDE 処理した IgE も、糖鎖構造に変化があるか解析を行うことにした。

2-4. RDE 処理は IgE に付加した糖鎖構造へ影響する

あるタンパクに付加した糖鎖を解析するために、糖鎖結合タンパクであるレクチンがよく使用される。多数のレクチンを用いて、その結合能の変化から、付加している糖鎖構造の変化を読み解くのである。これを網羅的に解析するツールとしてレクチンマイクロアレイがある⁷⁾。このマイクロアレイを用いて、RDE の作用によって変化する IgE に付加した糖鎖の解析を行った。その結果、LEL (トマトレクチン (*Lycopersicon esculentum lectin*)) と PHA-L (*Phaseolus vulgaris leucoagglutinin*) という 2 つのレクチンとの結合能が有意に低下することがわかった。このことは、レクチンプロットでも再確認できた (図 4C, D lane1, 2)。すなわち、RDE 処理した IgE ではバンドサイズの低下とともに、LEL, PHA-L で検出した際のバンドの濃さも未処理の IgE バンドと比較すると低下していた。この結果から、RDE は IgE に付加した糖鎖に影響していることがわかった。とくに LEL, PHA-L に結合性をもつ糖鎖に影響していると考えられた。興味深いことに、LEL, PHA-L は IgG にまったく結合性を示さなかった (図 4C, D lane3, 4)。これまでの結果から、IgG はほとんど RDE の作用による影響を受

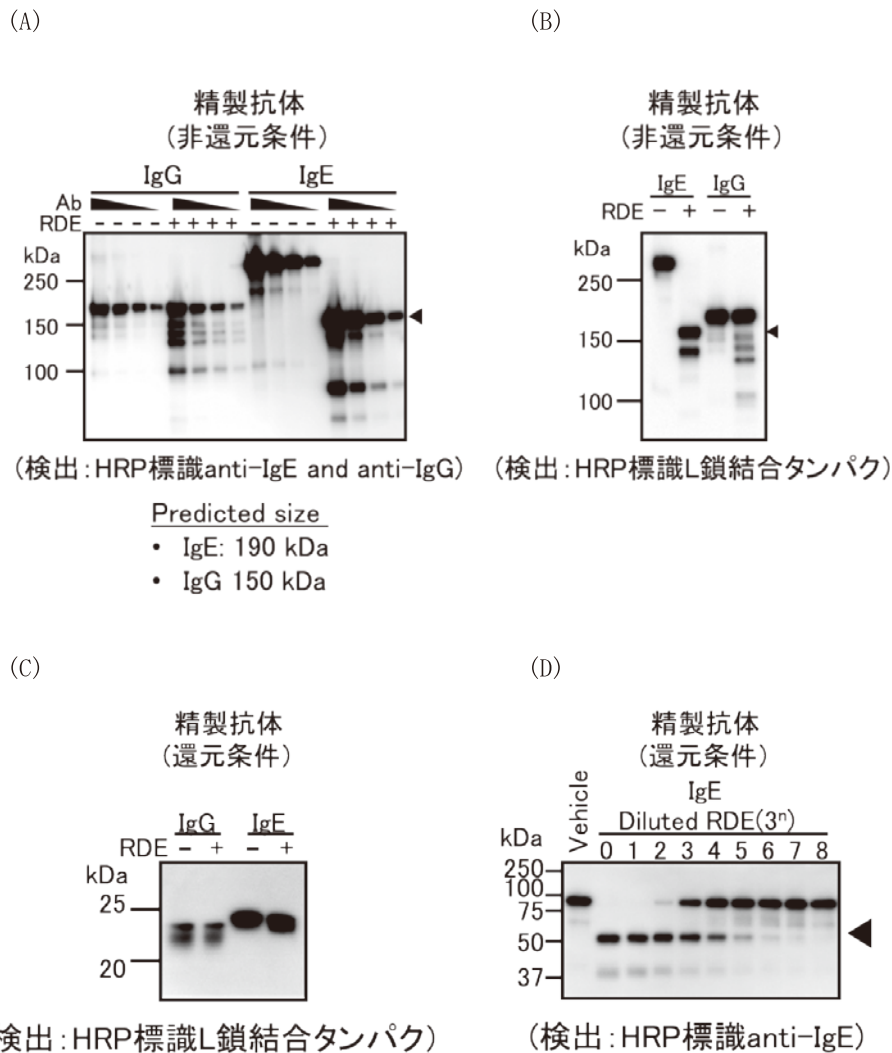


図 3 RDE は IgE の H 鎖に作用して構造を変化させている (A~D)市販の精製 IgE もしくは IgG を RDE と混合し、37℃一晩インキュベーションした。その後、非還元条件 (A, B) と還元条件 (C, D) でそれぞれ処理を行い、W. B で解析を行った。バンドの検出には、HRP 標識 anti-IgE + anti-IgG (A), HRP 標識 L 鎖結合タンパク (B, C), HRP 標識 anti-IgE (D) をそれぞれ用いた。(文献²⁾を改変)

けていない。以上から RDE は IgE に付加している糖鎖を特異的に認識して作用している可能性が示唆された。

2-5. IgE の機能と糖鎖について

抗体機能において、糖鎖は重要な役割を果たしていることが知られている。IgG では付加している糖鎖のうち、フコースを除去すると抗体依存性細胞傷害 (Antibody-Dependent-Cellular-Cytotoxicity: ADCC) 活性が上昇することが知られている⁸⁾。一方で、IgE は抗体の中で最も糖鎖が付加された抗体である (ヒト: 7 つ, マウス: 8~9 つ)。Shade らの報告で、IgE に付加している N 結合型糖鎖のうち、定常領域ドメイン 3 (Ce3) に付加している高マンノース型糖鎖が、マスト細胞への結合に重要な役割を果たしていることを見出した⁶⁾。すなわち高マ

ンノース型糖鎖を切断する酵素で IgE を処理すると IgE のマスト細胞への結合能は低下していた。また Wu らの報告で、高 IgE 症候群の患者血清中に存在する IgE の同様の部位に高マンノース型糖鎖を検出している⁹⁾。われわれの研究やこれら過去の報告から、IgE の機能にも糖鎖は重要な役割を果たしていると考えられる。

3. IgE を標的としたアレルギー治療の可能性

3-1. IgE を標的とした抗体医薬について

アレルギーの主要因の一つであることが知られている IgE は、アレルゲンの暴露によって誘導され、マスト細胞膜上に発現している FcεR と結合する。さらにアレルゲンが IgE に結合すると FcεR 同士が架橋され、その結果、ヒスタミンなどのアレルギー誘導物質が放出され

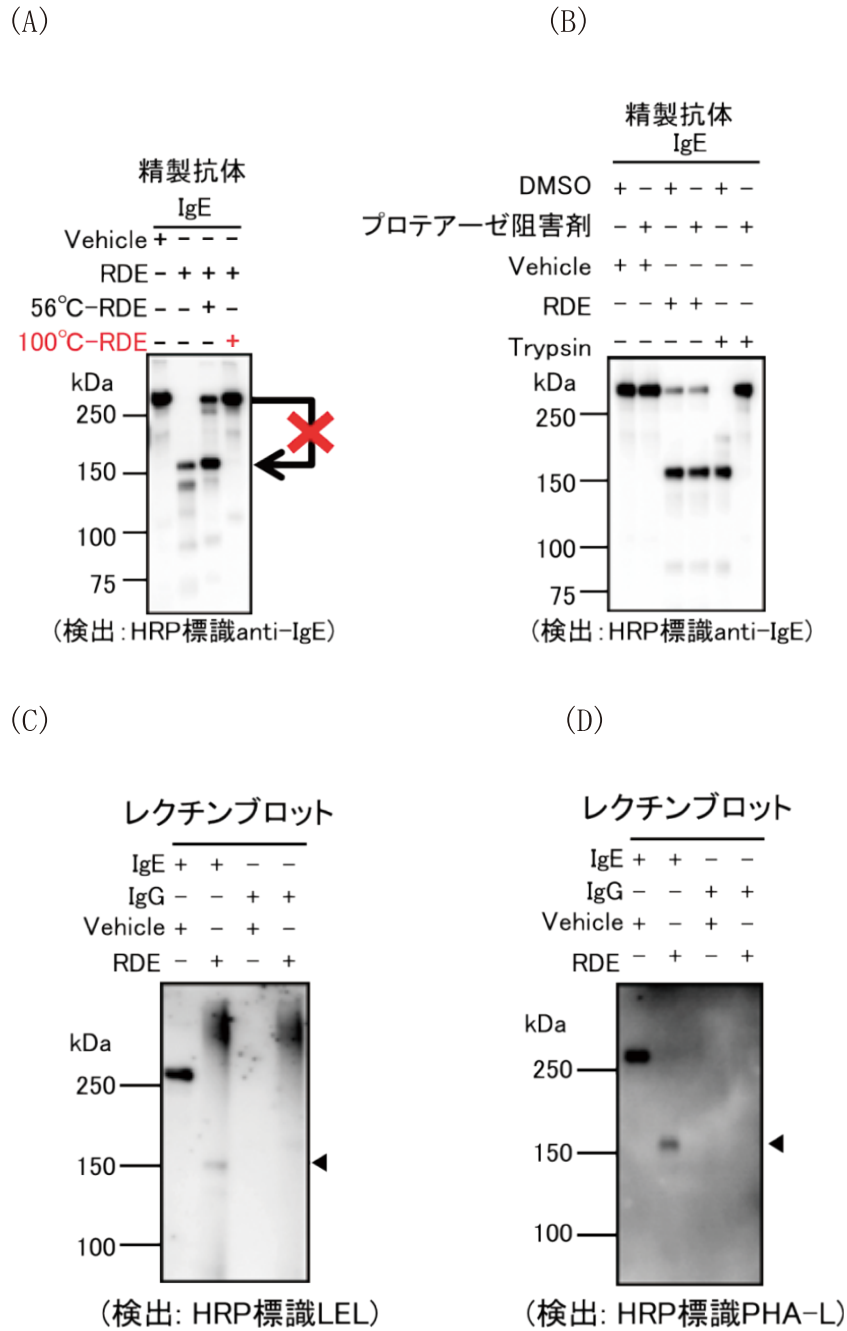


図 4 RDE は IgE の糖鎖に作用する

(A, B) RDE を熱処理 (A), もしくはプロテアーゼ阻害剤 (B) で前処理してから IgE と混合し, 37°C 一晩インキュベーションした。その後, W. B で解析を行った。(C, D) RDE 処理した IgE もしくは IgG をレクチンブロットで解析を行った。検出は HRP 標識 LEL (C) もしくは HRP 標識 PHA-L (D) をそれぞれ用いた。(文献²⁾を改変)

る。よって IgE を標的としたアレルギー治療は効果的であると考えられる。すでに IgE に対する抗体医薬 (オマリズマブ) が, 気管支喘息や慢性蕁麻疹治療に対して承認されている。しかし, すでに FcεR に結合した IgE に対して, オマリズマブは結合することができないので, 治療効果が得られるのに時間がかかるという問題点も

ある¹⁰⁾。

3-2. RDE で不活化された IgE はアナフィラキシーを誘導できない

そこでわれわれは RDE 処理した IgE のアナフィラキシーの誘導能を確認し, RDE をアレルギー治療への応用

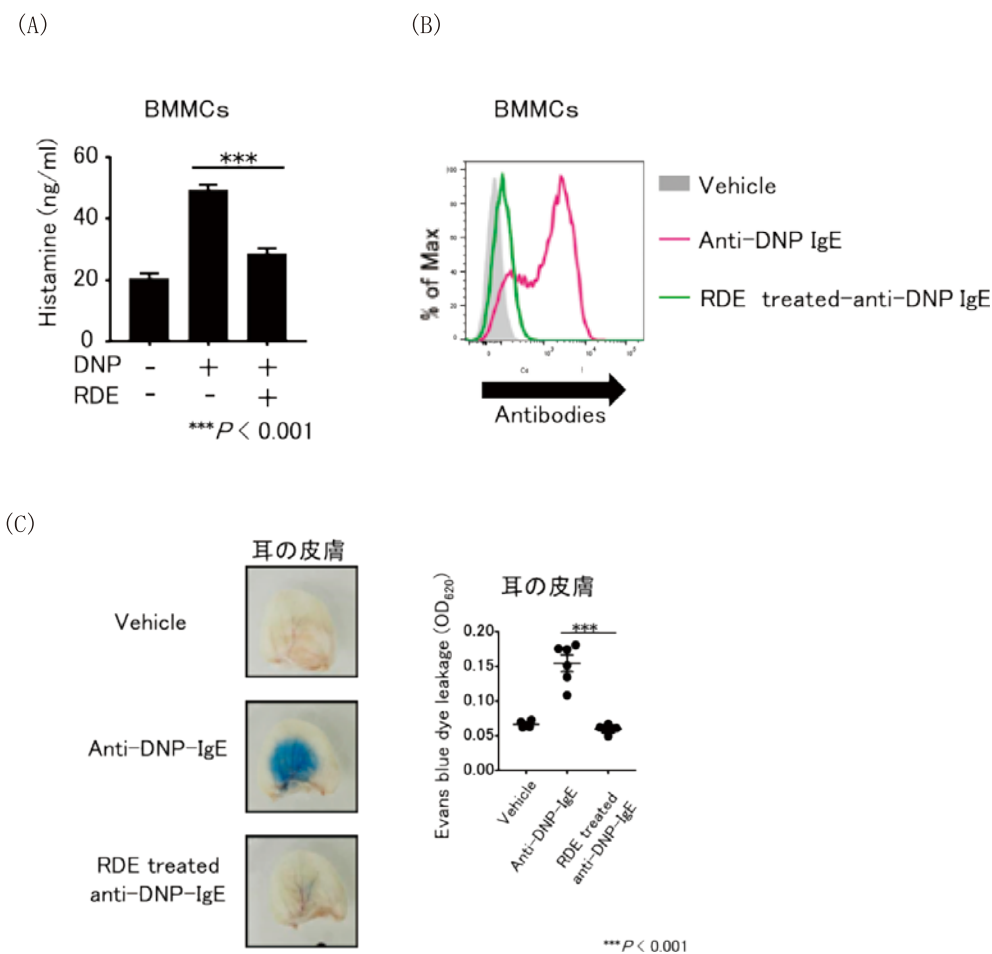


図 5 RDE 処理した IgE はアナフィラキシーを誘導できない

(A) RDE 処理した抗 DNP IgE を骨髓から誘導したマスト細胞に添加し、アレルゲン (HSA-DNP) を加え、上清中のヒスタミン量を ELISA で解析した。(B) RDE 処理した抗 DNP IgE のマスト細胞への結合レベルを FACS で解析した。(C) RDE 処理した抗 DNP IgE をマウスの耳に注射し、その後、Evans blue を含む HSA-DNP を静脈注射して、アナフィラキシー誘導レベルの解析を行った。右図は、耳の皮膚に滲出した Evans blue 量を数値化したグラフである。(文献²⁾を改変)

が可能か検討することにした。そのために、抗 dinitrophenol (DNP) IgE をマスト細胞に結合させてアレルゲン (HSA-DNP) を加え、ヒスタミンなどのアレルギー誘導物質を放出させるモデルを用いた。その結果、RDE 処理した IgE では、ヒスタミンの分泌量は低下することがわかった (図 5A)。その原因を解明するために、RDE 処理した IgE のマスト細胞への結合能を FACS で解析を行った。その結果、RDE 処理した IgE では、マスト細胞にほとんど結合できないことがわかった (図 5B)。このことは、RDE によって IgE の構造が変化した結果であると考えられる。

In vivo においても同様の効果があるか確かめるため、抗 DNP IgE をあらかじめマウスの耳に投与しておき、エバンスブルーを含んだ HSA-DNP を静脈注射した。未処理の IgE を投与した場合には、アナフィラキシーによって、血管透過性が亢進し、エバンスブルーの滲出が

おこるので、耳の皮膚で青い部分が観察される (図 5C)。一方で、RDE 処理した IgE では、そのような反応はほとんど認められなかった。以上から、RDE 処理をした IgE は *in vivo* においてもアナフィラキシー誘導能がほとんど認められないことがわかった。

おわりに

RDE によって IgE に付加した糖鎖が変化することで構造が変化し、その結果、IgE のマスト細胞への結合能が低下し、アレルギー誘導物質の分泌量が低下したと考えている (図 6)。すなわち IgE の糖鎖を変化させる因子は、アレルギー治療の候補となり得ると考えられる。過去の報告より、N 結合型糖鎖を切断することで、IgE の機能が消失することは知られていた^{5,6)}。さらにわれわれの研究によって、IgE の不活化には LEL もしくは PHA-L に結合する糖鎖が重要であることが示唆された。また

コレラ菌抽出物(RDE)でIgEを処理すると、

1. 糖鎖へ影響→構造変化
2. アレルギー誘導の抑制効果

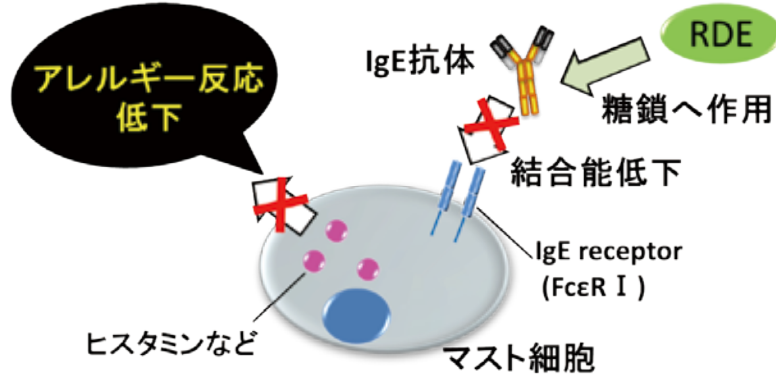


図 6 RDE 処理による IgE 不活化の模式図

RDE の作用は IgG ではほとんど認められなかったことから、IgE に特異的な糖鎖がその機能に重要であると考えられる。残念ながら、RDE を直接マウスに投与してもアナフィラキシーを抑制することはできなかった。しかし、RDE に含まれる IgE 不活化に重要な因子を同定し、標的となる糖鎖をさらに詳細に解析することで、アレルギー治療の開発に貢献できると考えている。

文 献

- 1) 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
- 2) Yamazaki T, Inui M, Hiemori K, et al. : Receptor-destroying enzyme (RDE) from *Vibrio cholerae* modulates IgE activity and reduces the initiation of anaphylaxis. *J Biol Chem* 294 : 6659-6669, 2019
- 3) Tyrrell DA, Horsfall FL Jr : A procedure which eliminates nonspecific inhibitor from human serum but does not affect specific antibodies against influenza viruses. *J Immunol* 69 : 563-574, 1952
- 4) Nakayama M, Ogawa Y, Yamazi Y : Sialidase and protease activities of commercial (RDE) receptor destroying enzyme products used for the (HI) hemagglutination inhibition test of influenza viruses. *Nihon Ika Daigaku Zasshi* 53 : 534-536, 1986
- 5) Björklund JE, Karlsson T, Magnusson CG : N-glycosylation influences epitope expression and receptor binding structures in human IgE. *Mol Immunol* 36 : 213-221, 1999
- 6) Shade KT, Platzer B, Washburn N, et al. : A single glycan on IgE is indispensable for initiation of anaphylaxis. *J Exp Med* 212 : 457-467, 2015
- 7) Tateno H, Toyota M, Saito S, et al. : Glycome diagnosis of human induced pluripotent stem cells using lectin microarray. *J Biol Chem* 286 : 20345-20353, 2011
- 8) Natsume A, Niwa R, Satoh M : Improving effector functions of antibodies for cancer treatment : Enhancing ADCC and CDC. *Drug Des Devel Ther* 3 : 7-16, 2009
- 9) Wu G, Hitchen PG, Panico M, et al. : Glycoproteomic studies of IgE from a novel hyper IgE syndrome linked to PGM3 mutation. *Glycoconj J* 33 : 447-456, 2016
- 10) Oettgen HC : Fifty years later : Emerging functions of IgE antibodies in host defense, immune regulation, and allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 137 : 1631-1645, 2016

ハチ毒 PLA2 の機能と免疫応答への影響

高村 (赤司) 祥子

愛知医科大学医学部感染・免疫学講座

A function of bee venom PLA2 and influence on immunoresponse

Sachiko Akashi-Takamura

Microbiology and Immunology, Aichi Medical University, School of Medicine

Abstract

The bee venom (BV) is the secretion which is produced by a needle device for protection the bee from an enemy. However, BV has been applied to the folk medicine for various diseases because it is included many enzymes which are containing anti-inflammatory or anti-cancer action. Above all, Phospholipase A2 (PLA2) is a hydrolytic enzyme which cleaves membrane phospholipids, and in bee venom occupying up to 12%. PLA2 has been analyzed in greatest detail. This mini review sets out the latest scientific evidence concerning the therapeutic effects of PLA2 in the context of diseases and provides a detailed description of the mechanisms.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 79~82, 2019

Key words : ハチ毒, PLA2 (phospholipase A2), 酵素活性, マイクログリア細胞, リン脂質

はじめに

ハチ毒はハチが敵から身を守るために針装置から産生される分泌物であるが、多くの酵素を含み抗炎症作用、抗がん作用などがあることからさまざまな病気に対する民間療法に応用されてきた。近年開発された解析方法によればハチ毒には合計 102 ものタンパクやペプチドが含まれていることが示されている。なかでも PLA2 (Phospholipase A2) は最大 12% を占めるハチ毒内の酵素であり、最も詳細に解析されており、アラキドン酸代謝を介して炎症を誘導することも知られている。本稿ではハチ毒 PLA2 の特徴と主な免疫応答や疾患への作用について概説する。

1. PLA2 とは

PLA2 とは生体膜主要成分であるグリセリン脂質を加水分解し、遊離脂肪酸とリゾリン脂質を産生する酵素群の総称である。前述のハチ毒のみならずわれわれ哺乳類も産生し、30 種類以上の分子種が認められ構造や局在、進化などから細胞質型、細胞外分泌型など複数のグループに大別される。当初は細胞質型 PLA2 が細胞膜リン脂質からアラキドン酸を遊離することによりプロスタ

グランジンやロイコトリエンなどの脂質メディエーター代謝につながるものが明らかにされていた。最近の脂質メタボローム解析技術の向上などから細胞質型 PLA2 以外の PLA2 による免疫制御機構も明らかになりつつある。

最大の PLA2 サブグループである分泌性 PLA2 (sPLA2) には細胞分布や基質リン脂質に対する選択性の違いから 10 種類の活性型アイソザイムが存在する。なかでも III 型 (sPLA2-III) はハチ毒 PLA2 と唯一相同性を持つ分子種であり、ヒトにおいてもアレルギー反応を誘発する分子である。sPLA2-III トランスジェニックマウス (Tg) を動脈硬化自然発症マウスである ApoE 欠失マウスと交配後に高コレステロール食を与えると、血中リゾホスファチジルコリン (LPC) の増加と動脈硬化の促進がみられたり、ヒト動脈硬化巣で内因性の sPLA2-III 発現が著増していたりすることなどから、sPLA2-III が血管壁でリポタンパク質分解・変性を促進して動脈硬化に関与することが推定されている¹⁾。また sPLA2-III Tg マウスを長時間飼育すると高頻度で皮膚炎の自然発症がみられるという。

2. ハチ毒PLA2の構造と免疫応答や疾患への作用

ハチ毒PLA2は分子量約14~18 KDのタンパクからなる酵素であり、3つの主要な α -ヘリックス部分と、2本鎖の逆並行な β シートからなる構造をとっている。また4つの非疎水性のアミノ酸残基 (H34, D35, Y87, D64) により保存された酵素活性をもち、活性中心部はヒスチジンとアスパラギン酸の対となっている²⁾。またカルシウム結合モチーフをもち酵素として機能するにはミリモルレベルの濃度のカルシウムが必要である。ハチ毒PLA2による以下のさまざまな免疫応答や疾患への影響に関する報告がある³⁾。

2-1. 神経変性における抑制作用

ヒト白血球抗原であるHLA-DRを発現しているマイクログリア細胞とその反応がパーキンソン病やアルツハイマー病、多発性硬化症などの神経変性疾患に関与していることがわかってきている。

パーキンソン病では、マイクログリア細胞は神経障害に対する反応で活性化され、黒質のドーパミンニューロンに対して広範囲に二次的な障害を引き起こす。活性化されたマイクログリア細胞はTNF- α やIL-1 β , IFN- γ などの炎症性サイトカインを産生し、これらはinducible nitric oxide synthase (i-NOS) 発現やcaspase3および8の活性化などの神経障害増悪因子産生につながる。NOやスーパーオキシドなどのフリーラジカルは脂質の過酸化と神経のDNA障害を引き起こしミトコンドリア呼吸を停止させ、細胞死につながる。さらに、HLA-DR発現マイクログリア細胞はポジティブシグナルを誘導し、これによりCD4陽性ヘルパーT細胞はTh1やTh17細胞に分化し、炎症性サイトカインを産生する一方で神経生存シグナルとして作用するinsulin-like growth factor (IGF-1)の分泌を抑制するようグリア細胞を刺激し、神経障害に向かうポジティブフィードバックループを誘導する。HLA-DR発現マイクログリア細胞はまたアポトーシス誘導シグナルであるFas/Fas-ligand経路を活性化することでも神経障害を引き起こす。しかし、ハチ毒PLA2はこれら病的徴候に対しネガティブレギュレーターとして作用する。ハチ毒PLA2は樹状細胞上のレクチンタイプのCD206レセプターに結合し、prostaglandin E2 (PGE2)の発現を誘導する。次いでPGE2がナイーブCD4T細胞上のEP2レセプターに結合しこれによりCD4T細胞はFoxp3陽性の制御性T細胞へ分化する。制御性T細胞は、マイクログリアの活性化とT細胞浸潤を減弱させることで炎症を終わらせる⁴⁾(図1)。

またアルツハイマー病は中枢神経系でのアミロイド β ペプチドの形成により生じ、海馬や大脳皮質での細胞外老人斑や細胞内の神経原線維の錯綜や神経縮小などが増

加し、痴呆や行動・認知機能障害などの症状が生じる。ハチ毒PLA2はアルツハイマー病を減弱させる機能をもっている。3種類の痴呆関連遺伝子を発現させたアルツハイマー病モデルマウスにハチ毒PLA2を投与したグループでは、コントロールグループに比べ認知機能の改善がみられ脳での糖代謝が増加し、海馬でのアミロイド β 沈着およびT細胞浸潤の減少も認められた。さらにハチ毒PLA2は制御性T細胞によるマイクログリアの活性化制御に対しても増強作用をもたらした。

さらにハチ毒PLA2は、PrPフラグメントというproteinsase K-抵抗性プリオンタンパクによる神経変性障害であるプリオン病で引き起こされる神経細胞死を減弱させる効果がある。プリオン病では、正常細胞内プリオンタンパクがスクレイピープリオンタンパクへ変異し、このスクレイピープリオンタンパクがPI3K/AKT経路を遮断しCaspaseおよびp38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)経路を活性化して神経細胞死を引き起こす。ヒト神経芽細胞腫にプリオンタンパクを加える前にハチ毒PLA2を添加しておくと、プリオンタンパクによるp38MAPK経路の活性化がブロックされ、Caspaseも減弱しPI3K/AKT経路が復活しプリオンタンパクによる細胞死を免れることがわかった(図1)。

2-2. 抗炎症作用

ハチ毒PLA2は解熱鎮痛薬に含まれるアセトアミノフェン誘導性の急性肝障害に対する抑制作用ももっている。アセトアミノフェン投与によるマウスの肝障害モデルでは、ハチ毒PLA2を5日間前投与しておくことで、肝障害の指標であるalanine transaminase (ALT)やaspartate transaminase (AST)などの酵素やIL-6, TNFやNOなどの炎症性サイトカインなどがコントロール群に比べ減少することが報告されている。またハチ毒PLA2は、制御性T細胞や抑制性サイトカインであるIL-10の産生を上昇させてシスプラチン誘発腎毒性に対する防御機能を及ぼす。さらにハチ毒PLA2によるアレルギー性気道炎症制御も報告されている。ハチ毒PLA2投与により、卵白アルブミン投与による気管支肺胞洗浄液中の炎症性細胞浸潤や気道上皮の杯細胞増殖などが減弱する。

またハチ毒PLA2は、放射線治療による急性肺炎に対する制御性T細胞を介した防御作用も持っている。マウスに放射線照射後3週間後にハチ毒を合計6回腹腔投与することで、コントロールグループに比べ明らかな炎症反応の減弱を認め、この減弱作用は制御性T細胞が除去されたマウスでは認められなかった。

2-3. 抗がん作用

さまざまながん細胞株において、ハチ毒PLA2は細胞溶解作用や抗増殖作用を有している。産生された腫瘍溶解物はmonocyte-derived dendritic cellへの分化と成熟

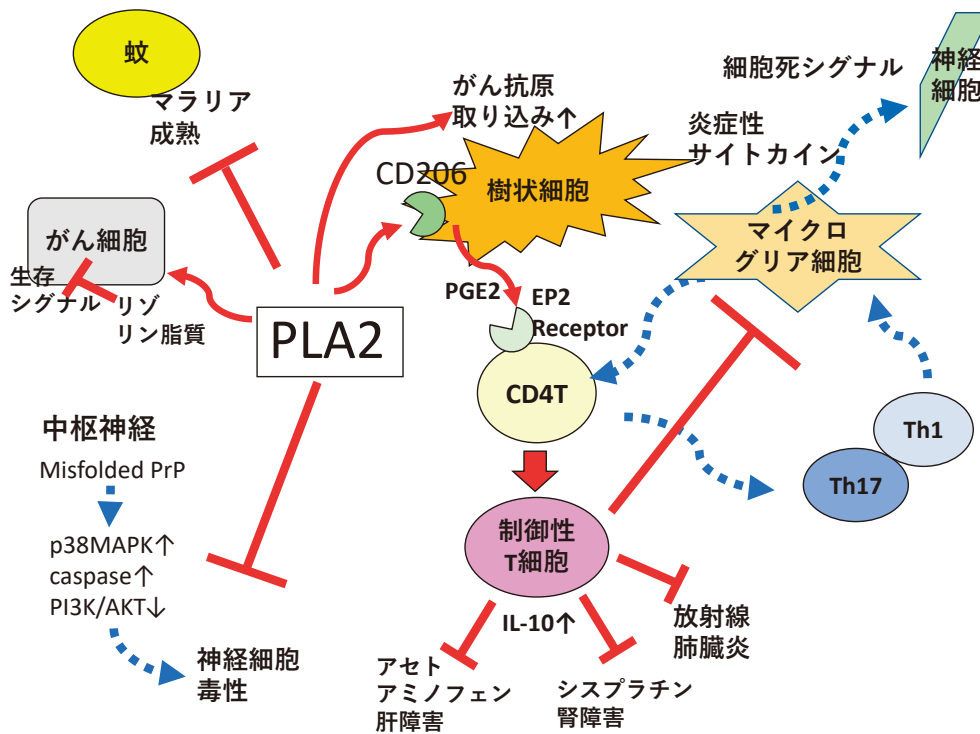


図 1 ハチ毒 PLA2 による神経変性疾患抑制作用，抗炎症作用，抗がん作用，寄生虫感染に対する制御作用の概要
 実線は PLA2 による作用，点線は細胞傷害に向かうシグナルを示す。

を促し、腫瘍細胞に対する免疫療法でのアジュバント作用をもたらす。ハチ毒 PLA2 は細胞膜のリン脂質に作用しリゾリン脂質を産生するがこれらはミセルとなり細胞膜の構造に影響を及ぼし、細胞表面の高分子や受容体の確かな機能や発現を損なうため、細胞生存シグナル伝達経路は最初から途絶えてしまう。これらの作用はまた細胞生存に必要な PI3/AKT や extracellular signal regulated kinase (ERK1/2) シグナル伝達経路も途絶えさせる。またハチ毒 PLA2 により産生されたリゾリン脂質の一つである LPC は、カルシウムチャネルおよびフリーラジカルを産生する細胞質内シグナル伝達経路を活性化させ細胞膜障害を誘導する。以上の細胞傷害作用は急速に増殖している腫瘍細胞に大きく影響を及ぼし殺傷する。

さらにはこの抗がん作用に関して、樹状細胞は T 細胞に抗原提示するという点で大きな役割を果たしている。ハチ毒 PLA2 は細胞の種類を問わず不可逆的に細胞膜の疎水基に結合でき、かつ細胞膜リン脂質の陰イオンに静電的に結合できるため、PLA2 の C 末端領域に候補のがん抗原ペプチドを結合させると、そこを起点に PLA2+抗原ペプチド複合タンパクを取り込むようなアンカーの役割を果たすようになる。樹状細胞でのがん抗原ワクチン準備として、MHC クラス I ペプチドによるクロスプレゼンテーションと MHC クラス II ペプチド抗原提示を強化するために、ハチ毒 PLA2 の 34 番目のヒスチジンをグルタミンに変異させると、PLA2 の酵素作

用自体は消失し樹状細胞を用いたがん抗原ワクチンにおける細胞膜結合ベクターとして効果的なものになる⁵⁾。

2-4. 細菌・寄生虫感染に対する制御作用

ハチ毒 PLA2 が明らかな抗細菌作用や抗寄生虫作用を持つことも報告されている。ハチ毒 PLA2 はトリパノソーマに対する抗原生動物作用やエンテロバクター、大腸菌などに対する抗細菌活性を持つことも示されている。ハチ毒 PLA2 遺伝子配列を腸上皮特異的に発現させた蚊では、腸でのマラリア原虫の成熟に影響しマウスへのマラリア感染を防ぐことが報告されている⁶⁾。このハチ毒 PLA2 の抗マラリア作用はマラリア原虫と蚊の中腸細胞との結合を防ぐことが考えられている。

おわりに

PLA2 の臨床応用に関しては、まだ大きな可能性を秘めていると思われる。われわれはヒト皮膚細胞においてハチ毒 PLA2 が病原体成分による活性化を増強させることを見出し、ハチ毒 PLA2 のヒト皮膚細胞膜への作用がその増強作用に関与していると推察した(論文リバイス中)。将来的には病原体成分を用いた抗がん作用増強に PLA2 を併用したり、やけどや褥瘡などで皮膚の増殖速度を高めたい場合に併用したりするなどの臨床応用の可能性を考えている。

文 献

- 1) 山本圭, 村上誠: ホスホリパーゼ A₂. 生化学 83 : 449-461, 2011
- 2) Perez-Riverol A, Lasa AM, Dos Santos-Pinto JRA, et al. : Insect venom phospholipases A1 and A2 : Roles in the envenoming process and allergy. *Insect Biochem Mol Biol* 105 : 10-24, 2019
- 3) Hossen MS, Shapla UM, Gan SH, et al. : Impact of Bee Venom Enzymes on Diseases and Immune Responses. *Molecules* 22 : E25, 2016
- 4) Chung ES, Lee G, Lee C, et al. : Bee Venom Phospholipase A2, a Novel Foxp3+ Regulatory T Cell Inducer, Protects Dopaminergic Neurons by Modulating Neuroinflammatory Responses in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *J Immunol* 195 : 4853-4860, 2015
- 5) Almunia C, Bretaudeau M, Held G, et al. : Bee Venom Phospholipase A2, a Good "Chauffeur" for Delivering Tumor Antigen to the MHC I and MHC II Peptide-Loading Compartments of the Dendritic Cells : The Case of NY-ESO-1. *PLoS One* 8 : e67645, 2013
- 6) Moreira LA, Ito J, Ghosh A, et al. : Bee venom phospholipase inhibits malaria parasite development in transgenic mosquitoes. *J Biol Chem* 277 : 40839-40843, 2002

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25回研究会は、令和元年11月29日、30日に防衛医科大学校免疫・微生物学講座 木下 学先生が当番世話人で、防衛医科大学校所沢キャンパスにて開催されます。

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2.173（JCR Science Edition 2018）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 22

—エンドトキシン・自然免疫研究の新たな可能性を求めて—

令和元年 11 月 5 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 川原 一芳 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

簡便性と信頼性を融合したエンドトキシン測定システム

簡易型エンドトキシン測定システム トキシノメーター[®] ET-Mini & リムルス ES-IIプラス CS シングルテストワコー

※本システムは日本薬局方のエンドトキシン試験法には準拠していません。



小型エンドトキシン測定装置「トキシノメーター[®] ET-Mini」と簡便法試薬キット「リムルス ES-IIプラス CS シングルテストワコー」の組合せで迅速かつ簡単にエンドトキシンを測定できます。

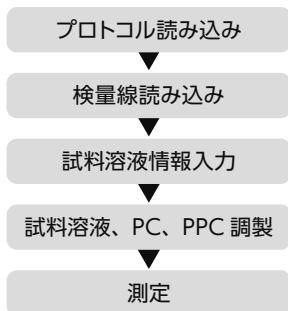
標準液調製と検量線作成が不要

試薬キットに添付のデータシートから QR コードを読み込むことで保存検量線を自動的に登録

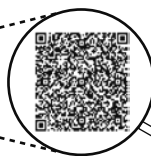
陽性コントロール (PC) と陽性製品コントロール (PPC) の調製が簡単

試薬キットに付属の低含量 CSE*から 1 ステップで調製可能 ※CSE: コントロールスタンダードエンドトキシン

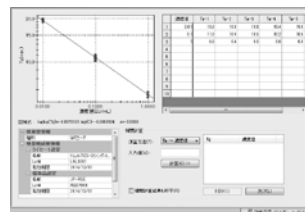
簡単操作



データシート



QRコードリーダー



富士フイルム 和光純薬株式会社

本社 〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号 TEL: 06-6203-3741 (代表)
東京本店 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目4番1号 TEL: 03-3270-8571 (代表)

フリーダイヤル 0120-052-099

Wako LAL システム: www.wako-chem.co.jp/lal/
E-mail: ffwk-labchem-tec@fujifilm.com

営業所: 九州・中国・東海・横浜・筑波・東北・北海道

PyroSmart[®] RS-50M SET

エンドトキシン比色測定組換え試薬



世界初

組換え技術を用いた

エンドトキシン比色測定試薬

お問い合わせ先

生化学工業株式会社 海外事業推進部

Tel. 03-5220-8953 Fax.03-5220-8956

E-mail: lal@seikagaku.co.jp

URL : <http://www.lalbiz.com>



生化学工業株式会社

〒100-0005 東京都千代田区丸の内一丁目6-1

科学するヤクルト

ヤクルト中央研究所
(東京都国立市)

ヤクルトには「科学するひと」がいます。多くの研究者が、日夜、世界の人々の健康を願い、研究開発に力を注いでいます。乳酸菌にできることはもっともとあるはず。私たちはそう信じて、今日もここヤクルト中央研究所で、すこやかな未来のために一人ひとりがマイクロの世界を科学し続けています。



人も地球も健康に

Yakult

株式会社ヤクルト本社 中央研究所

〒186-8650 東京都国立市泉5-11

協和発酵キリン株式会社

たった一度の、
いのちと歩く。

笑

顔



笑顔。それは、世界の人々の
力になり、支えとなる。
癒しになり、救いとなる。

一つでも多くの笑顔をとどけるために
協和発酵キリンは、
私たちのすべてを尽くします。



KYOWA KIRIN



保 険 で 、
認 知 症 を
予 防 ! ?

人生100歳時代を、
ずっと元気に生きていくため。
保険にはもっとできることがあると、
太陽生命は考えます。
たとえば認知症保険も、治療だけでなく
予防のためにも使えるよう進化します。
太陽生命の「ひまわり認知症予防保険」なら、
加入1年後から2年ごとに
予防給付金を受け取れるので、
軽度認知障害発症リスクの検査や
様々な認知症予防のために活用できます。
変化し続ける時代のニーズに、
太陽生命は保険でお応えしていきます。

業界初

ひまわり認知症 **予防** 保険

※当広告では選択緩和型認知症診断保険に生存給付金特則を付加したプランを「ひまわり認知症予防保険」としてご案内しています。状態継続日数の要件がなく、所定の認知症と診断された時に保険金を主契約でお支払いする生命保険は業界初です。(2018年7月現在、当社調べ)

[資料のご請求は] 太陽生命お客様サービスセンター **0120-04-22-33** (通話無料)

営業時間:月~金 9時~18時 / 土・日 9時~17時 ※祝日・年末年始(12/30~1/4)は休業します

<https://www.taiyo-seimei.co.jp/>

太陽生命 検索

T&D
T&Dグループ

生菌製剤
ミヤBM[®]細粒
MIYA-BM[®] FINE GRANULES

生菌製剤
ミヤBM[®]錠
MIYA-BM[®] TABLETS

酪酸菌(宮入菌)製剤

効能・効果、用法・用量、使用上の注意等については添付文書をご参照ください。

薬価基準収載

