

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（I）

目 次

課題番号		
KH11001	バイオフィotonicsを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 …… 1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 …… 16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 21
KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発	望月直樹 …… 30
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 …… 40
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 …… 100
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 …… 126
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 …… 144
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 …… 154
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 …… 168
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 181
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 …… 196
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 …… 208
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 …… 221
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 …… 235
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山耕造 …… 247
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出利光 …… 262
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島正弘 …… 286
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木哲朗 …… 300
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西正孝 …… 310
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤準一 …… 318

KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 344
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 …… 358
KH31025	生薬及び漢方処方の科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 …… 373
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 …… 390
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 …… 402
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 …… 417
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 …… 435
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクス的手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 449
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 …… 466
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 481
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ …… 494
KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田 恵理子 …… 509
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 525
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井 洋士 …… 537
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	網脇 祥子 …… 551
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍兒 …… 566
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和 行文 …… 576

エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への 応用に関する研究

所属 国立感染症研究所 細胞化学部

研究者 西島 正弘

研究期間 平成16年4月～平成19年3月

研究要旨

(1) リピドAは化学構造によってリムルス活性が異なる。化学構造の異なるリピドAが共存した場合、リムルス活性は単独で測定した場合の合算値とは異なった。この現象はリピドAの混合比および反応液のリピドA濃度の影響を受けた。リムルス反応は反応溶液中のリピドAの存在様式、すなわちミセル構造に大きな影響を受ける。

(2) Toll like receptor-4 はリポ多糖の活性部位リピッドAを認識するがその認識機構の詳細は不明である。リピッドAでマウスマクロファージを刺激した際に産生されるIL-1 β の量がリピッドAの分散状態の違いによる影響を受けた。また、リピッドAと同様にToll like receptor-4のリガンドであるオルニチンリピッドでも同様の結果が得られた。このことはリガンドの分散状態がToll like receptor-4によるリガンド認識に大きな影響を与えると事を示している。

(3) スフィンゴ糖脂質GSLはTLR4/MD2を介してマクロファージを活性化したが、リムルス活性をもたなかった。フラボノイドは、LPS刺激を受けたマクロファージ細胞膜でのラフト集積を抑制し、シグナル伝達の下流も抑制した。フラボノイドの前投与により、エンドトキシンショックが抑制された。

(4) ケルセチン、ルテオリンのLPS刺激抑制作用機序を検討した。両フラボノイドはLPS刺激によるI κ Bの消化、Aktのリン酸化、p38のリン酸化を抑制したがPMA刺激によるNF κ B活性化は抑制しなかった。またLPS刺激によるラフト集積を抑制した。

(5) リポ多糖(LPS)でマクロファージ刺激する際に抗体でCD14をブロックすると、Smooth型LPS(S-LPS)刺激によるtype I-IFNの産生が阻害された。LPSをliposomeに封入したナノ粒子を用いてマクロファージを刺激するとCD14の有無に関わらずtype I-IFNが産生され、CD14非依存的にMyD88非依存経路が活性化されることが明らかとなった。

(6) アポトーシス細胞の貪食に伴って産生されるIL-6は樹状細胞を未熟な状態にとどめるのに部分的に関わることにより、自己抗原に対する応答を未然に防いでいる

(7) 未熟樹状細胞がアポトーシス細胞を貪食する際に好中球が共存すると未熟樹状細胞上のMHC class IIの発現が低下し、好中球に対するケモカインのうちKC産生が低下した。これらのことより好中球は免疫寛容の成立を補助する作用を持つと推測された。はリピドAの混合比および反応液のリピドA濃度の影響を受けた。

分担研究者

- (1) 国立感染症研究所 田中康仁、川崎清史
- (2) 北里大学理学部 熊沢義雄
- (3) 東邦大学理学部 小林芳郎
- (4) 生化学工業株式会社 明田川純

A. 研究目的

注射用医薬品、生物学的製剤、及び医療用具中の発熱物質による汚染は医療安全性上重要な問題である。従来、汚染の検出にはウサギを利用した発熱試験及びその代替法としてのカプトガニ血液凝固系のエンドトキシン応答性を応用したリムルステストが利用されてきた。発熱試験は簡便性に欠け、一方リムルステストは簡便かつ高感度であるが、エンド

トキシンに対する特異性、非エンドトキシン発熱物質の存在、天然資源であるカプトガニを利用することから環境保護上の問題点が長らく指摘されてきた。従って、これらの問題点を解決する新しい試験法の開発は重要な課題である。

近年、エンドトキシンによる発熱応答の原因となるリポ多糖の免疫担当細胞による認識機構は、受容体を構成する因子(Toll-like receptor 4(TLR4)とMD-2)の発見に伴い急速に解明されつつある。宿主免疫細胞によるエンドトキシン認識はエンドトキシンによる発熱応答の分子基盤である。従って、この系をエンドトキシン検出に応用できればヒトの応答性に近いエンドトキシン試験法が開発されることが期待できる。

本研究では従来のリムルステスト法の問題点を補

完する、新しいエンドトキシン検出法を作出するため免疫担当細胞（マクロファージ等）によるエンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明とそのエンドトキシン検出法への応用に関する研究を行う。本研究により、ヒトのエンドトキシン応答性に非常に近い測定法が確立されることが期待できる。また、培養細胞を利用した測定法を目指しており、この方法はウサギ発熱試験より簡便かつ迅速であることが期待できる。これらの研究目標を達成するため、国立感染症研究所と生化学工業の研究グループは修飾型リピドAの作製、精製、及び活性測定に関する研究をこない、更に生化学工業の受託により国立感染症研究所でエンドトキシン受容体を利用したエンドトキシン検出法に関する研究を行う。北里大学ではリポ多糖シグナル伝達の情報伝達機構、東邦大学ではアポトーシス細胞の取込みに伴う未熟樹状細胞の応答とその生理的意義に関する研究を行なう。

B. 研究方法

B-1-1) 構造の異なるリピドAのリムルス活性

大腸菌の非修飾型 (U-lipid A)、パルミトイル化 (P-lipid A)、脱アシル化 (D-lipid A) および脱アシル・パルミトイル化 (DP-lipid A) の4種のリピドAを0.1%トリエチルアミン (TEA) で溶解し、超音波処理した後 (200ng/mL / 50W、2分間 / 氷冷下) 0.01%TEA で希釈し、これらをリムルス試薬 (エンドスペシーES-50M、生化学工業株式会社) を用いて常法に従い測定した。

B-2) リムルス反応における修飾型及び非修飾型リピドA並びに2種の合成リピドA間の相互作用

B-1-2) 修飾型および非修飾型リピドAの検出

構造の異なるリピドA (U-lipid A および P-lipid A) をそれぞれ0.1% TEA で溶解し、0.01% TEA を用いて 20 pg/mL に希釈した。これらの混合比を9:1~1:9に調製した溶液を調製し、リムルス活性を測定した。

B-1-3) 合成リピドAの検出

大腸菌型合成リピドA およびその前駆体リピドIVa (Compounds 506; 406、(株)ペプチド研究所) の一方の濃度を固定し、他方の濃度を変化させリムルス活性を測定し、それぞれの化合物単独で測定した場合の合算値 (理論値) と比較した。

なお、リムルス活性は米国薬局方標準エンドトキシンを対照としてEU/mLで表示した。

B-2-1) オルニチンリピッドとリピドAおよびMPLの調整

オルニチンリピッド (OL) は *Acromobacter xylosoxidans* から抽出精製した。リピッドAは化学合成で得られた大腸菌型 lipid A を使用した。

また、1'リン酸基が無いモノホスホリルリピッドA (MPL) は大腸菌由来の物を使用した。それぞれのリピッドを生理的食塩水またはジメチルスルフォキシド (DMSO) の二種の溶媒で分散したのち、超音波処理下でさらに過剰量の生理的食塩水で懸濁を行った。

B-2-2)

マウス腹腔マクロファージを方法 B-1 のリピッドで刺激し、産生されるサイトカイン量を測定した。また、細胞内のカススペース-1の活性は合成基質を利用して測定した。

B-3-1) リムルス活性と関連した細菌糖脂質の認識とシグナル伝達

糖脂質: 単糖型リピドA類縁体のGLA-60およびリピドAの構成脂肪酸タイプのacyloxyacyl基を導入したMDPは、岐阜大学・木曾真教授より分与された。*Sphingomonas* 属由来スフィンゴ糖脂質GSL-1およびGSL-4Aは、関東学院大学・川原一芳教授より分与された。

フラボノイド: フラボン、ルテオリン、アピゲニン、アピゲトリン、ディオスマチン、ディオスミン、ケンフェロール、ケルセチン、ルチン、モリン、ミリセチン、フラバノン、エリジクチオール、ナリンゲニン、ナリンジン、ヘスペレチン、ヘスペリジンを用いた。

マクロファージ: C57BL/10ScSn マウスおよびTLR4欠損 C57BL/10ScN マウスの骨髄由来マクロファージおよび腹腔滲出マクロファージを用いた。骨髄由来マクロファージは、骨髄細胞をM-CSF存在下で10日間培養して得た。腹腔滲出マクロファージは、4%チオグリコロート培地で誘導した。

サイトカイン測定: 各糖脂質で刺激した骨髄由来マクロファージの培養上清中のTNF- α は、L929細胞を用いたバイオアッセイで測定した。IL-6はELISA法で測定した。

ウエスタンブロット: 各糖脂質で刺激した骨髄由来マクロファージおよびマクロファージ様細胞株RAW264.7細胞を用い、乗法に従ってIkB、Akt、p38、リン酸化Aktおよびリン酸化p38に対する抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

ラフト集積: 細胞膜に存在するGM3をFITC標識コレラトキシンで結合させ、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

LPS誘導TNF- α 産生: LPSを静脈注射し、2時間後の血清中TNF- α を測定した。

エンドトキシンショックの誘導: ガラクトサミン負荷マウスにLPSを注射する系および *Salmonella typhimurium* 大量感染の系を用いた。

B-3-2) マクロファージ

C57BL/10ScSn マウスの骨髄由来マクロファージを用いた。骨髄由来マクロファージは、骨髄細胞を M-CSF 存在下で 10 日間培養して得た。

B-3-3) ウェスタンブロット

常法に従い、I κ B, Akt, p38, リン酸化 Akt およびリン酸化 p38 に対する抗体を用いて、ウェスタンブロットを行った。

B-3-4) ルシフェラーゼアッセイ

NF κ B の活性化を HEK293 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイにより測定した。

B-3-5) ラフトの観察

細胞膜に存在する GM1 を FITC 標識コレラトキシン B サブユニットで結合させ、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

B-3-6) LPS 刺激による TNF- α 産生

RAW264 細胞を 96 穴プレートに撒き (1.6×10^5 cells/well)、1, 10, 100 ng/mL の R-LPS, S-LPS, R-LPS-liposome, S-LPS-liposome でそれぞれ刺激し、4 時間後、OptEIA™Set (BD Bioscience) を用いて TNF- α 産生量を測定した。

B-3-7) TNF- α 産生に及ぼす CD14 ブロッキング抗体の影響

RAW264 細胞を 96 穴プレートに撒き (1.6×10^5 cells/well)、50 μ g/mL Anti-CD14 Ab を加え、R-LPS, S-LPS, R-LPS-liposome, S-LPS-liposome それぞれ 10 ng/mL で刺激した。4 時間後、OptEIA™Set (BD Bioscience) を用いて TNF- α 産生量を測定した。

B-3-8) I-IFN 産生に及ぼす CD14 ブロッキング抗体の影響

RAW264 細胞を 96 穴プレートに撒き (1.6×10^5 cells/well)、50 μ g/mL Anti-CD14 Ab を加え、R-LPS, S-LPS, R-LPS-liposome, S-LPS-liposome それぞれ 10 ng/mL で刺激した。8 時間後、L_{PHO} 細胞を用いたバイオアッセイにより I-IFN 産生量を測定した。

B-4-1) アポトーシス細胞の取込みに伴う未熟樹状細胞の応答とその生理的意義

IL-6KO マウスは東京大学医科学研究所岩倉教授より供与された。これを SPF 条件で繁殖させて用いた。他のマウスは三協ラボより購入した。マウス未熟樹状細胞は、マウス (C57BL/6, 雄 6 週令) 骨髄細胞を GM-CSF 存在下 7 日培養して得た。すなわち 3 日目に培地を半分交換し、5 日目に非付着性細胞を集め、まきなおして、得た。この方法で得られた細胞の 60-80% は細胞表面マーカーと形態から見て未熟樹状細胞であった。アポトーシス細胞は IL-2 依存性細胞 CTLL-2 を IL-2 非存在下 28 時間培養して得た。食食度の測定は、アポトーシス細胞を PKH26 で染色

して、共焦点顕微鏡を用いて行った。細胞表面マーカーは蛍光標識抗体を用いて、フローサイトメーターによって解析した。mRNA レベルは半定量的 RT-PCR によって測定した。上清中のサイトカインレベルは ELISA で測定した。樹状細胞の抗原提示能は、MLR によって測定した。また IL-6KO マウスにアポトーシス胸腺細胞を投与したときの自己抗体産生 (特に抗 ssDNA 抗体) について測定した。

B-4-2) アポトーシス細胞の取込みに伴う未熟樹状細胞の応答とその生理的意義

IL-6KO マウスは東京大学医科学研究所岩倉教授より供与された。これを SPF 条件で繁殖させて用いた。他のマウスは三協ラボより購入した。マウス未熟樹状細胞は、マウス (C57BL/6, 雄 6 週令) 骨髄細胞を GM-CSF 存在下 7 日培養して得た。すなわち 3 日目に培地を半分交換し、5 日目に非付着性細胞を集め、まきなおして、得た。この方法で得られた細胞の 60-80% は細胞表面マーカーと形態から見て未熟樹状細胞であった。アポトーシス細胞は IL-6KO マウスと同系統の C57BL/6 マウスの胸腺細胞を X 線照射して得た。得られたアポトーシス胸腺細胞を腹腔内、静脈内、および皮下組織内の 3 経路により単回あるいは複数回投与し、一週間後の血清中の自己抗体 (抗 ssDNA 抗体) の産生量を ELISA 法を用いて測定した。

B-4-3) アポトーシス細胞の取込みに伴う未熟樹状細胞の応答とその生理的意義に関する研究

使用したマウスは三協ラボより購入した。マウス未熟樹状細胞は、マウス (C57BL/6, 雄 6 週令) 骨髄細胞を GM-CSF 存在下 7 日培養して得た。すなわち 3 日目に培地を半分交換し、5 日目に非付着性細胞を集め、まきなおして、得た。この方法で得られた細胞の 60-80% は細胞表面マーカーと形態から見て未熟樹状細胞であった。アポトーシス細胞は IL-2 依存性 CTLL-2 細胞を IL-2 非存在下 28 時間培養したものを用いた。好中球は C57BL/6 マウスにチオグリコレート培地を投与して 6 時間後の腹腔浸潤細胞を刺激好中球として、骨髄細胞を Percoll にて分離したものを未刺激好中球として用いた。これらの好中球の存在下、非存在下においてアポトーシス細胞を未熟樹状細胞と 3 時間共培養し、未熟樹状細胞上の MHC class II の発現をフローサイトメーターにより、培養上清中の MIP-2 または KC の産生量を ELISA により、それぞれ測定した。

C. 研究結果

C-1-1) 構造の異なるリピド A のリムルス活性

各種リピド A のリムルス活性は P-lipid A (2.7 EU/ng) \ll DP-lipid A (14.2 EU/ng) \leq D-lipid A (15.5 EU/ng) \leq U-lipid A (18.7 EU/ng) であった (表 1)。

表1. 非修飾型及び修飾型リポドAのリムルス活性

Lipid A	Conc.	EU/mL	EU/ng
U-lipid A	2.5 pg/mL	0.047	18.73
	5.0 pg/mL	0.094	18.73
P-lipid A	12.5 pg/mL	0.034	2.71
	25 pg/mL	0.078	3.11
D-lipid A	5.0 pg/mL	0.083	16.52
	10 pg/mL	0.144	14.39
DP-lipid A	2.5 pg/mL	0.036	14.51
	5.0 pg/mL	0.069	13.85

C-1-2) リムルス反応における修飾型及び非修飾型リポドA並びに2種の合成リポドA間の相互作用

C-2-1) 修飾型および非修飾型リポドAの検討

P-lipid A:U-lipid Aの重量比が9:1、7:3および3:7では混液のリムルス活性(実測値)は各lipid A活性の混合比をもとに算出した合算値(理論値)に対して低くなり、およそ85~95%の活性を示した。一方、P-lipid A:U-lipid A比が1:9であるU-lipid Aが主体の混液のリムルス活性は理論値に対して107%となった。

C-1-3) 合成リポドAの検討

Compound 406 および Compound 506 の混合比を変えた反応溶液のリムルス活性(実測値)はそれぞれ単独で測定したリポドAのリムルス活性の合算値(理論値)とは異なる値を示した。406が100 pg/mL共存した条件で506の用量を増加させると、406と506混液のリムルス活性は506の用量が1.56 pg/mLを越えると合算値に対して125~180%の活性を示した。次に506が2.5 pg/mL混在した条件で406の用量を増加させた。406の用量が5.0 ng/mLのとき、406と506混液の実測値は合算値に対して180%と高くなった。一方、506が1.25 pg/mLに対して混在させる406の濃度を100pg/mL~6.25pg/mLに低下させた場合、406と506混液のリムルス活性は合算値に対して55~80%の活性しか示さなかった。

C-2) エンドトキシン受容体を利用したエンドトキシン検出法に関する研究

OLとリポドAおよびMPLは構造が異なるがどちらもToll-like receptor 4 (TLR-4)を刺激する。マウスマクロファージをこれらのリポドで刺激したところ、どのリポドも分散状態の違いによって、IL-1 β の産生に差が認められた。すなわち、DMSOで分散したリポドによる刺激ではIL-1 β の産生が認められないが、生理的食塩水で分散したOLとリポドAでは産生が認められた。一方、MPLはどちらの分散方法でマウスマクロファージを刺激してもIL-1 β を産生しなかった。さらに研究を進めた結果、MPLはTLR-4を介してNF κ Bを活性化するにもかかわらず、

リポドAとは異なりカスパーズ-1を活性化しない事が解った。以上の結果はマクロファージのTLR-4を介した脂質の認識は単なるリガンドとレセプターの結合では説明できない機構が存在することを示唆している。

C-3-1) TLR4を介して認識されるエンドトキシン以外のリガンドについての検討

グラム陰性菌の外膜に存在するリポ多糖(LPS)はToll-like receptor (TLR)4/MD2複合体を介して、グラム陽性菌由来の糖脂質やリポペプチドはTLR2とTLR1またはTLR6複合体を介して認識され、マクロファージを活性化し、サイトカイン産生を誘導する。細菌由来糖脂質がどのようにしてTLRによりパターン認識されているかについては未だ明らかになっていない。リムルス反応によるLPSの認識には、リポドAの構成脂肪酸とリン酸基が重要である。ペプチドグリカンやムラミルジペプチド(MDP)は、TLRではなくNODにより認識されることが報告されている。そこで、化学合成した単糖型リポドA類縁体、リポドAの構成脂肪酸であるacyloxyacyl基を導入したMDPを用い、これら糖脂質がTLR2かTLR4により認識されるのか、あるいはNODを介して認識されるかについて検討した。

グラム陰性菌の*Sphingomonas*属の細胞壁にはリポ多糖ではなく、スフィンゴ糖脂質(GSL)が存在する。GSL-1はセラミドにグルクロン酸が結合した化合物であり、それに糖が付加したGSL-4A [α -Man-(1 \rightarrow 2)- α -Gal-(1 \rightarrow 6)- α -GlcN-(1 \rightarrow 4)-GSL-1]が存在する。GSLがどのような受容体を介してマクロファージを活性化するかについても検討した。

単糖型リポドA類縁体のGLA-60がTLR4によって認識されるのを確認した。MDPにリポドAの構成脂肪酸タイプのacyloxyacyl基を導入してもTLR4により認識されなかった。スフィンゴ糖脂質のGSL-1(セラミドにグルクロン酸が結合した化合物)やGSL-4AはTLR4を介してマクロファージに作用し、TNF- α やIL-6などのサイトカイン産生を誘導した。しかし、その活性はリポ多糖と比べ約1/1000の活性であり、リムルス活性を示さなかった。GSLで前処理してもエンドトキシントレランすは誘導されなかった。また、GSL-4A刺激を受けたマクロファージ細胞株において、TLR4を介する3種類のシグナル伝達経路(I κ Bの分解、Aktとp38のリン酸化)についてウエスタンブロットで検討したところ、いずれの経路でも刺激が伝達されていた。

C-3-2) LPS刺激を制御する分子についての検討

植物性フラボノイドは、LPS で誘導されるマクロファージ活性化作用を抑制することが報告されている。種々のフラボノイドを用いて、LPS 刺激で誘導される TLR4/MD2 を介したマクロファージ活性化のシグナル伝達について検討した。さらに、フラボノイドの前投与によりが2種類のエンドトキシンショックモデルを制御できるかについても検討した。

17 種類のフラボノイドについて、LPS 誘発マクロファージ活性化作用について検討した。配糖体よりアグリコン骨格の化合物の方が *in vitro* の活性は強かった。この中で、抑制作用が強かったルテオリン (LUT)、クエルセチン (QUE) を用いてシグナル伝達の抑制作用について検討したところ、弱いながら LPS で誘導される上述の I κ B の分解、Akt と p38 のリン酸化の抑制が認められた。LPS 刺激すると TLR4 を含めたラフトが集積することを認めていたので、細胞膜に存在する GM3 に FITC 標識コレラトキシンを結合させ、ラフトの集積に及ぼす LUT と QUE の作用について検討したところ、両者はラフトの集積を抑制した。フラボノイドのナリンジン、ヘスペリジンを腹腔内に前投与すると、LPS で誘導される TNF- α 産生、LPS 誘導ガラクトサミン負荷マウスでのショック、および *Salmonella typhimurium* aroA 変異株の大量感染により誘導されるエンドトキシンショックが抑制された。

C-3-3) リポ多糖シグナル伝達の情報伝達機構

マクロファージを LPS で刺激する前にケルセチンおよびルテオリンで処理すると、I κ B の消化、Akt のリン酸化、p38 のリン酸化が抑制された。そこで、受容体を介さずに、直接 PKC を活性化する PMA で刺激したときの NF κ B の活性化を測定したところ、両フラボノイドは NF κ B の活性化を抑制しなかった。

LPS による刺激を伝達するためには、ラフトの集積が重要である。そこで、ケルセチンおよびルテオリンが LPS 刺激によるラフトの集積を抑制するか検討したところ、両フラボノイド共にラフトの集積を抑制した。また、抗 CD3 抗体あるいは抗 IgM 抗体で受容体を架橋することによるラフトの集積も、両フラボノイド前処理により抑制された。

C-3-4) LPS 刺激による TNF- α 産生

R-LPS, S-LPS とともに、1, 10, 100 ng/mL で濃度依存的な TNF- α 産生が確認できた。これに対し LPS-liposome は R-LPS, S-LPS とともに 1, 10, 100 ng/mL いずれの濃度においても、ほとんど TNF- α 産生がみられなかった。また以降の実験は各 LPS の濃度を 10 ng/mL で行った。

C-3-5) TNF- α 産生に及ぼす CD14 ブロッキング抗体の影響

サイトカイン産生における CD14 の役割を調べ

るために、Anti-CD14 Ab (ブロッキング抗体) を各 LPS と共に加えてマクロファージを刺激した。抗体処理により、S-LPS 刺激においては TNF- α 産生が阻害された。一方 R-LPS 刺激では抗体処理による TNF- α 産生の変化はみられなかった。また、LPS-liposome は、S-LPS, R-LPS とともに、抗体処理の有無に関わらず、TNF- α 産生がみられなかった。

C-3-6) I-IFN 産生に及ぼす CD14 ブロッキング抗体の影響

I-IFN の産生は、S-LPS, R-LPS とともに、抗体処理によって阻害された。一方、LPS-liposome は、S-LPS, R-LPS とともに、抗体処理の有無に関わらず、I-IFN の産生が認められた。

C-4-1) アポトーシス細胞の取込みに伴う未熟樹状細胞の応答とその生理的意義

正常マウスより調製した未熟樹状細胞とアポトーシス胸腺細胞を共培養すると、未熟樹状細胞の成熟分化が観察されないのに対して、IL-6KO マウスより調製した未熟樹状細胞を用いた場合には、未熟樹状細胞の成熟化が観察された。この結果は、我々が以前に抗体を用いて IL-6 を中和したときの結果と一致するものであり、やはり IL-6 は未熟樹状細胞が成熟分化を抑制していることが確認された。

さらに IL-6KO マウスにアポトーシス胸腺細胞を腹腔内、静脈内、および皮下組織内投与したあとの抗 ssDNA 抗体 (IgM および IgG) 産生を調べた。いずれの投与経路、また投与回数においても抗 ssDNA 抗体 (IgG) の産生量は野生型マウスおよび IL-6KO マウスともに極微量であった。一方、抗 ssDNA 抗体 (IgM) の産生は、いずれの投与経路においても IL-6KO マウスのほうが高い傾向があった。しかしながら、両系統マウスで有意差のある結果は得られなかった。

C-4-2)

未熟樹状細胞とアポトーシス CTLL-2 細胞を共培養するとき好中球を共存させると、非共存下に比べ、未熟樹状細胞上の MHC class II が低下した。この低下は刺激好中球でも未刺激好中球でも観察された。これらの培養上清中の好中球に対するケモカイン、MIP-2 および KC、を ELISA で定量したところ、MIP-2 産生は好中球存在下、非存在下で変化がなかったが、KC 産生は好中球存在下では非存在下に比べ減少した。この減少も刺激好中球でも未刺激好中球でも観察された。

D. 考察

D-1-1) 構造の異なるリポド A のリムルス活性

用いた4種のリポド A について最も特徴的な違いはアシル基の本数であり、これがリムルス活性に大きな影響を与えているものと考えられる。P-lipid A はアシル基が7本であり、他のリポド A と比較して

疎水性が高いことがミセルの形成に影響を与え、生体反応およびリムルス反応に影響を与えていると推察される。ブルセラ属、クラミジア属由来 LPS の生物活性（ブルセラ属はリムルス活性も低い）が低い原因も上記と同様に疎水性の高いこと（アシル基が C22 を越えるものが含まれる）が原因であると考えられる。一方、U-lipid A, DP-lipid A はアシル基が 6 本、D-lipid A は 5 本であるが、3 者ではリムルス活性はほぼ同等であったことから、親水性が高まる場合はミセルの形成に与える影響は小さいと思われる。

培養細胞に強制発現させた TLR-4 と MD-2 を介した NF- κ B 活性化能は DP- \leq D=P<<U-Lipid A と報告されており、リムルス活性の大小順とは完全には一致しなかった。これはそれぞれの反応における Lipid A 感受性因子である TLR-4/MD2 とカプトガニ C 因子の活性化に要求される Lipid A の化学構造あるいはミセル構造に若干差があるためかも知れない。

D-1-2) リムルス反応における修飾型及び非修飾型リピド A 並びに 2 種の合成リピド A 間の相互作用

構造の異なるリピド A を混合した場合、それらの相互作用によりリムルス活性（実測値）が単独で測定した場合の合算値と一致しなかった。Compound 506 と Compound 406 を単独で測定した場合の力価比は約 50 対 1 である。高力価である 506 に対する 406 の作用を見ると 406 の濃度が低い場合はアンタゴニストとして働き、濃度が高い場合はアゴニストとして働いた（図 3-2, 3-3）。ただし 406/506 重量比が図 3-3 と同程度でも合算濃度が高い場合はアゴニストとして働いた（図 3-1）。これらの現象は 2 種のリピド A 間の相互作用ならびに合算濃度の変化により、双方あるいはどちらかのミセルの構造が変化するためと推察される。Mueller らは Compound 506 と 406 をそれぞれ蒸留水で懸濁し、その混合比を変えた懸濁液のヒト単核白血球からの TNF- α 産性能を測定し同様な現象を報告している。

これらの現象は LPS でも起こることが推測され、リムルス反応を用いて医薬品や医療用具中の LPS すなわちエンドトキシン活性を分割して評価する際には十分注意すべきことと思われる。

D-3-1) TLR4 を介して認識される新規リガンドの検討

単糖型リピド A 類縁体の GLA-60 も TLR4/MD2 を介してマクロファージ活性化作用を発現すること、acyloxyacyl 基を導入した MDP が TLR4 により認識されなかったことから、TLR4/MD2 は単糖型でもよいが、

アシル基とリン酸基などマイナスチャージの両方が認識に必要であることが示唆された。GSL が TLR4/MD2 を介してマクロファージを活性化したことは、グルクロン酸のマイナスチャージが TLR4/MD2 による認識に有効であることを示唆している。GSL はリムルス活性を示さなかったことから、その認識は TLR4/MD2 によるものと異なることが示唆された。これらの結果から、リムルス試験のみでは、発熱原性を発現する物質を見逃す可能性があるため、TLR4/MD2 を介したシグナルの検討も重要であることが示唆された。

D-3-2) LPS 刺激を制御する分子についての検討

フラボノイドは、LPS によるマクロファージ活性化を抑制することが報告されているが、本研究により、フラボノイドは LPS 刺激による TLR4 を含めたラフトの集積を抑制することにより、シグナル伝達の上流から抑制することが明らかとなった。LPS 刺激を受けたマクロファージの活性化作用がフラボノイドにより抑制されるという現象は、*in vitro* だけではなく *in vivo* でも確認することが出来た。今後、フラボノイドを経口投与した時の体内への吸収・移行などを明らかにする必要があるが、慢性疾患に対するフラボノイドの抑制作用が期待できる。

D-3-3) リポ多糖シグナル伝達の情報伝達機構

ケルセチンおよびルテオリンは LPS によって誘導される TNF- α および IL-6 産生を抑制するが、その作用機序は、ラフトの集積を抑制することで、下流へのシグナル伝達を抑え、LPS 刺激を抑制することが明らかとなった。両フラボノイドは、抗 CD3 抗体、抗 IgM 抗体を用いたラフト集積も抑制したことから、両フラボノイドは、シグナル伝達にラフトの集積が重要な刺激に対して、抑制的に働くことが示唆された。

D-3-4) マクロファージを LPS で刺激すると、MyD88 依存経路と MyD88 非依存経路が活性化され、それぞれ TNF- α 、I-IFN の産生が認められた。しかし、LPS-liposome においては、LPS の濃度によらず、TNF- α 産生がほとんど認められなかった。

近年の報告で、MyD88 非依存経路の活性化には CD14 が必要であることが示された¹⁾。本研究においても、LPS 刺激時に CD14 のブロック抗体を加えることにより、I-IFN の産生が阻害され、MyD88 非依存経路の CD14 依存性が確認できた。しかし本研究で用いた LPS-liposome は、CD14 の有無に関わらず I-IFN 産生を誘導することを明らかとした。

CD14 は細胞内に LPS を取り込む機能を有することが報告されている²⁾。このことから LPS-liposome

は効率よくマクロファージなどの細胞に取り込まれ、CD14 非依存的に MyD88 非依存経路を活性化させる可能性が示唆された。また、LPS-liposome では TNF- α 産生が認められないことから、MyD88 依存経路には細胞表面に存在する TLR4 からのシグナルが関与している可能性が示唆された。

D-4-1) アポトーシス細胞の取込みに伴う未熟樹状細胞の応答とその生理的意義

今回の結果から、アポトーシス細胞を貪食した未熟樹状細胞が IL-6 を産生し、それが樹状細胞への分化をオートクリン的に抑制していることが示唆された。これは、自己アポトーシス細胞を未熟樹状細胞が取込んで免疫応答を起ささないようにする上で重要な機構の一つであろうと推察される。実際、IL-6KO マウスにアポトーシス胸腺細胞を腹腔投与して自己抗体 (抗 ssDNA 抗体 (IgM クラス)) が産生されるか調べたところ、野生型マウスよりも上昇する傾向があった。しかし抗 ssDNA 抗体 (IgG クラス) はむしろ野生型マウスのほうが高い傾向が見られた。後者は IL-6 がクラススイッチに関わるためであろうと考えられる。また、アポトーシス胸腺細胞の投与方法によって異なった自己抗体産生がみられたが、このような結果が得られたのは、投与方法によって抗原提示に携わる細胞が異なるためではないかと考えられた。D-3) アポトーシス細胞の取込みに伴う未熟樹状細胞の応答とその生理的意義

D-4-2) *in vitro* においてアポトーシス細胞を貪食した未熟樹状細胞が IL-6 を産生し、それが樹状細胞への分化をオートクリン的に抑制していることが示唆された。これは、アポトーシス細胞に対して免疫寛容を起し、自己抗体を産生させないようにする上で重要な機構の一つであろうと推察された。しかしながら、*in vivo* において IL-6KO マウスにアポトーシス胸腺細胞を投与すれば、自己抗体が産生されることが予測されたが、実際には正常マウスと比較して有意な自己抗体産生は認められなかった。この結果は、IL-6 が未熟樹状細胞の成熟分化だけでなく、抗体産生に至るまでの免疫応答にも重要な役割を果たしていることを示している。

D-4-3) 今回の結果から、未熟樹状細胞がアポトーシス細胞を貪食する際に好中球が共存すると未熟樹状細胞の成熟化がさらに抑制されると考えられた。

つまり好中球には免疫寛容を補助する機能があることが明らかとなった。一方、好中球に対するケモカインのうち MIP-2 産生は影響されなかったものの KC 産生は抑制された。これによりさらなる好中球浸潤が抑制されていると考えられた。

E. 結論

E-1-1) 構造の異なるリピド A のリムルス活性

リピド A の化学構造によりリムルス活性は異なったが、TLR-4/MD2 を強制発現させた細胞に対する生物活性とは弱い相関しか認められなかった。

E-1-2) リムルス反応における修飾型及び非修飾型リピド A 間ならびに 2 種の合成リピド A 間の相互作用

構造の異なるリピド A が混在する場合、それぞれの濃度ならびに存在比により、単独で測定した場合の反応性の合算値とは異なる反応性を示した。

E-2) エンドトキシンの分散状態やリン酸化修飾の違いは TLR-4 の認識に大きな影響を与えるだけでなく、下流のシグナルにも差が生じる事が示唆される。

E-3-1) TLR4/MD2 を介して認識されるエンドトキシン以外のリガンドについての検討

TLR4/MD2 は acyloxyacyl 基を 1 分子導入した MDP を認識できなかったが、スフィンゴ糖脂質 GSL は TLR4/MD2 を介してマクロファージを活性化したが、リムルス活性をもたなかった。

E-3-2) LPS 刺激を制御する分子についての検討

フラボノイドは、LPS 刺激を受けたマクロファージ細胞膜でのラフト集積を抑制し、シグナル伝達の下流も抑制した。フラボノイドの前投与により、エンドトキシンショックが抑制された。

E-3-3) ケルセチンおよびルテオリンの LPS 刺激抑制作用の機序について検討した結果、両フラボノイドは LPS の刺激は抑制したが、直接 PKC を活性化する PMA の刺激は抑制しなかった。また LPS 刺激によるラフト集積を抑制しただけでなく、抗 CD3 抗体や抗 IgM 抗体で受容体を架橋したラフト集積も抑制した。これらのことから、ケルセチンおよびルテオリンは、ラフトの集積を抑制することで、下流へのシグナル伝達を抑え、LPS の刺激を抑制することが明らかとなった。

E-4-1) アポトーシス細胞の取込みに伴う未熟樹状細胞の応答とその生理的意義

アポトーシス細胞の貪食に伴って産生される IL-6 は樹状細胞を未熟な状態にとどめるのに部分的に関わることにより、自己抗原に対する応答を未然に防いでいると考えられた。

E-4-2) 未熟樹状細胞がアポトーシス細胞を貪食する際に好中球が共存すると未熟樹状細胞上の MHC class II の発現が低下し、好中球に対するケモカインのうち KC 産生が低下した。これらのことより好中球は免疫寛容の成立を補助する作用を持つと推測された。

F. 研究発表

F-1) 論文発表

1. K. Kawasaki, R. K. Ernst, and S. I. Miller: 3-O-deacylation of lipid A by PagL, a PhoP/PhoQ-regulated deacylase of *Salmonella typhimurium*, modulates signaling through Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem* (2004) vol. 279, 20044-20048
2. K. Kawasaki, R. K. Ernst, and S. I. Miller: Deacylation and palmitoylation of lipid A by Salmonellae outer membrane enzymes modulate host signaling through Toll-like receptor 4. *J. Endotoxin Res.* (2004) vol.10 439-444
3. Kano, H., T. Doi, Y. Fujita, H. Takimoto, I. Yano and Y. Kumazawa. 2005. Serotype-specific modulation of human monocyte functions by glycopeptidolipid (GPL) isolated from *Mycobacterium avium* complex. *Biol. Pharm. Bull.* 28(2): 335-339.
4. Nagayama, Y., O. Saitoh, S.M. McLachlan, B. Rapoport, H. Kano and Y. Kumazawa. 2004. TSH receptor-adenovirus-induced Graves' hyperthyroidism is attenuated in both interferon- and interleukin-4 knockout mice; implications for the Th1/Th2 paradigm. *Clin. Exp. Immunol.* 138: 417-422.
5. Morita, H., R. Hasunuma, K. Kawaguchi, Y. Adachi, S. Tanaka and Y. Kumazawa. 2004. Limitation of polymyxin B on suppression of endotoxin shock induced by *Salmonella* infection in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 27 (11): 1840-1843.
6. Kudo, K., H. Sano, H. Takahashi, K. Kuronuma, S. Yokota, N. Fujii, K. Shimada, I. Yano, Y. Kumazawa, D. R. Voelker, S. Abe and Y. Kuroki. 2004. Pulmonary collectins enhance phagocytosis of *Mycobacterium avium* through increased activity of mannose receptor. *J. Immunol.* 172: 7592-7602.
7. Kaneko, M., T. Mizunuma, H. Takimoto and Y. Kumazawa. 2004. Development of TCR $\alpha\beta$ CD8 $\alpha\alpha$ intestinal intraepithelial lymphocytes is promoted by IL-15- producing epithelial cells constitutively stimulated by Gram-negative bacteria via TLR. *Biol. Pharm. Bull.* 27(6): 883-889.
8. Kawaguchi, K., S. Kikuchi, R. Hasunuma, H. Maruyama, T. Yoshikawa and Y. Kumazawa. 2004. A *Citrus* flavonoid hesperidin suppresses infection-induced endotoxin shock in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 27(5): 679-683.
9. Takimoto, H., D. Wakita, K. Kawaguchi and Y. Kumazawa. 2004. Potentiation of cytotoxic activity in naïve and tumor-bearing mice by oral administration of hot-water extracts from *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Biol. Pharm. Bull.* 27 (3): 404-406.
10. Kawaguchi, K., S. Kikuchi, R. Hasunuma, H. Maruyama, R. Ryll and Y. Kumazawa. 2004. Suppression of infection-induced endotoxin shock in mice by a *Citrus* flavanone naringin. *Planta Med.* 70: 17-22.
11. Takahashi, M. and Kobayashi, Y.: Cytokine production in association with phagocytosis of apoptotic cells by immature dendritic cells. *Cell. Immunol.* 226, 105-115 (2003)
12. Ohtani, M., Kobayashi, Y. and Watanabe, N.: Gene expression in the elicitation phase of guinea pig DTH and CHS reactions. *Cytokine* 25, 246-253 (2004)
13. Takahashi M., Kurosaka K., and Kobayashi Y.: Immature dendritic cells reduce proinflammatory cytokine production by a coculture of macrophages and apoptotic cells in a cell-cell contact-dependent manner. *J. Leukoc. Biol.* 75, 865-873 (2004)
14. Iyoda T. and Kobayashi Y.: Involvement of MIP-2 and CXCR2 in neutrophil infiltration following injection of late apoptotic cells into the peritoneal cavity. *Apoptosis* 9, 485-493 (2004)
15. K. Kawasaki, R. K. Ernst, and S. I. Miller: Inhibition of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lipopolysaccharide deacylation by aminoarabinose membrane modification. *J. Bacteriol.* (2005) vol.187, 2448-2457
16. K. Kawasaki, R. K. Ernst, and S. I. Miller: Purification and characterization of deacylated and/or palmitoylated lipid A species unique to *Salmonella typhimurium*. *J. Endotoxin Res.* (2005) vol.11, 57-61
17. R. K. Ernst, K. N. Adams, S. M. Moskowitz, G. M. Kraig, K. Kawasaki, C. M. Stead, M. S. Trent,

- and S. I. Miller : The *Pseudomonas aeruginosa* Lipid A Deacylase: Selection for Expression and Loss Within the Cystic Fibrosis Airway *J. Bacteriol.* (2006) vol.188, 191-201
18. K. Okemoto, K. Kawasaki, K. Hanada, M. Miura, and M. Nishijima.: A potent adjuvant monophosphoryl lipid A triggers various immune responses, but not secretion of IL-1beta or activation of caspase-1. *J. Immunol.* (2006) vol. 176, 1203-1208
19. Gotoh M., Takamoto Y., Kurosaka K., Masuda J., Ida M., Satoh A., Takayama E., Kojima-Aikawa K., Kobayashi Y. and Matsumoto I.: Annexins I and IV inhibit *Staphylococcus aureus* attachment to human macrophages. *Immunology Letters* 98, 297-302 (2005)
20. Hatada, S., Ohta, T. Shiratsuchi, Y., Hatano, M. and Kobayashi, Y.: A novel accessory role of neutrophils in Concanavalin A-induced hepatitis. *Cell. Immunol.* 233, 23-29 (2005)
21. Iyoda, T., Nagata, K., Akashi, M. and Kobayashi, Y.: Neutrophils accelerate macrophage-mediated digestion of apoptotic cells in vivo as well as in vitro. *J. Immunol.* 175, 3475-83 (2005)
22. Saijo, S., Nagata, K., Nakano, Y., Tobe, T. and Kobayashi, Y.: Inhibition by adiponectin of IL-8 production by human macrophages upon coculturing with late apoptotic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 334, 1180-1183 (2005)
23. M. Kobayashi, S. Saitoh, N. Tanimura, K. Takahashi, K. Kawasaki, M. Nishijima, Y. Fujimoto, K. Fukase, S. Akashi-Takamura, and K. Miyake: Regulatory roles for MD-2 and TLR4 in ligand-induced receptor clustering. *J. Immunol.* (2006) vol. 176, 6211-6218
24. Shibata, T., Nagata, K., and Kobayashi, Y.: A suppressive role of nitric oxide in MIP-2 production by macrophages upon coculturing with apoptotic cells. *J. Leukoc. Biol.* 80, 744-752 (2006)
25. Akasaka, Y., Morimoto, N., Ishikawa, Y., Fujita, K., Ito, K., Kimura-Matsumoto, M., Ishiguro, S., Morita, H., Kobayashi, Y. and Ishii, T.: Myocardial apoptosis associated with the expression of proinflammatory cytokines during the course of myocardial infarction. *Mod. Pathol.* 19, 588-598 (2006)
26. Nagayoshi K, Ohkawa H, Yorozu K, Higuchi M, Higashi S, Kubota N, Fukui H, Imai N, Gojo S, Hata J, Kobayashi Y., and Umezawa A.: Increased mobilization of c-kit+ Sca-1+ Lin- (KSL) cells and colony-forming units in spleen (CFU-S) following de novo formation of a stem cell niche depends on dynamic, but not stable, membranous ossification. *J Cell Physiol.* 208, 188-194 (2006)
27. Kobayashi, Y.: Neutrophil Infiltration and Chemokines. *Critical reviews in Immunology* (invited) 26, 307-315 (2006)
28. Umemoto, T, Yamato, M., Shiratsuchi Y., Terasawa, M., Yang, J., Nishida, K., Kobayashi, K. and Okano, T.: Expression of integrin $\beta 3$ is correlated to the properties of quiescent hematopoietic stem cells possessing the side population phenotype. *J. Immunol.* 177, 7733-7739 (2006)
29. Shiratsuchi, Y., Iyoda, T., Tanimoto, N., Kegai, D., Nagata, K., and Kobayashi, Y.: Infiltrating neutrophils induce allospecific CTL in response to immunization with apoptotic cells via MCP-1 production. *J. Leukoc. Biol.* 81, 412-420 (2007)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

平成18年度
政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル(小伝馬町駅前)4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社