

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：若手研究(B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19790329
研究課題名（和文） TLR4 シグナル阻害ペプチドを用いた感染認識機構の解析及び敗血症治療薬への応用
研究課題名（英文） Analysis of mechanism for the detection of infection and the clinical application of therapeutic reagent for sepsis using a peptide that inhibits TLR4 signaling
研究代表者 杉山 圭一 (Sugiyama Kei-ichi) 国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部・主任研究官 研究者番号：80356237

研究成果の概要： Toll-like receptor 4 (TLR4) のリガンドである内毒素のシグナルを阻害する 17 アミノ酸からなるペプチド (STM28) の生理作用を検討した結果、TLR4 の下流に存在する 2 経路のシグナル伝達系を STM28 が阻害することを明らかにした。また STM28 の短縮化と非活性化型と推測されるペプチドの同定を試み、TLR4 のリガンド認識機序の解明および敗血症治療剤のリードコンパウンドとして利用可能な各種派生ペプチドの取得に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	0	1,500,000
2008 年度	1,700,000	0	1,700,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	0	3,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：感染免疫

1. 研究開始当初の背景

感染症である敗血症は、米国だけで年間 20 万人を越す死亡者を数える重篤な疾患でありながら、その主要な原因物質と考えられるグラム陰性細菌の外膜構成成分の内毒素（物質名 lipopolisaccharide; LPS）の除去・不活性化等による治療法が提案されているものの、未だ有効な医薬品が開発されるに至っていないのが実情である。

一方、今世紀に入りその受容体である Toll-like receptor 4 (TLR4) に関する研究が進み、これまで不可能であった LPS の受容体に対するアプローチで敗血症治療薬を開発する基盤が整いつつあった。

2. 研究の目的

これまでの一連の研究から、TLR4 に結合する 17 アミノ酸からなるペプチド (STM28)

の取得に成功している。STM28 はその特徴として TLR4 シグナルを阻害する可能性が強く示唆されていたが、その詳細なプロファイルは未だ不明であった。本研究では、まず STM28 の作用機序を明確にすることを目的に STM28 の短縮化ならびにその作用機序の解析を試みた。

また、敗血症治療薬としてのポテンシャルを正確に評価するために、より臨床病態に近い敗血症モデルにおける STM28 の薬理効果を検証した。

3. 研究の方法

(1) LPS 誘導性 NF- κ B の活性化に対する STM28 およびその短縮型の作用を、NF- κ B 依存性レポーター遺伝子を安定的に保持するマウスマクロファージ用細胞 RAW264 を用いて、ルシフェラーゼ活性を指標に評価した。得られたルシフェラーゼ活性はタンパク質濃度で補正した。

(2) LPS による IFN- β プロモーターの活性化に対する STM28 の作用を、IFN- β レポーター遺伝子を安定的に保持するマウスマクロファージ用細胞 RAW264 を用いて、ルシフェラーゼ活性を指標に評価した。得られたルシフェラーゼ活性はタンパク質濃度で補正した。

(3) マウスを用いた盲腸の穿孔性腹膜炎モデル (cecal ligation and puncture: CLP モデル) による STM28 の薬理効果の検討を試みた。CLP モデルは臨床病態に近い敗血症モデルと考えられている。穿孔数は 2 puncture、穿孔時に使用する注射針は 18 ゲージとした。STM28 はマウスを処置後、腹腔内に観察期間中連続投与した。

4. 研究成果

(1) LPS 誘導性 NF- κ B の活性化に対する各種 STM28 派生ペプチドの効果

LPS 誘導性 TLR4 シグナルの阻害活性を指標とした STM28 の短縮化は、その活性中心の同定を可能とするだけでなく、同時に得られると予想される TLR4 シグナル阻害活性を喪失したペプチドは、STM28 の作用機序を解明するうえで、ネガティブコントロールとして極めて有用なツールとなり得る。今回の LPS 誘導性 NF- κ B の活性化に対する STM28 の作用を検討することにより、STM28 を短縮化することに成功し、同時に TLR4 シグナル阻害活性が認められない派生ペプチドも得られた。これらペプチドは、今後の STM28 の TLR4 シグナル阻害活性のブラッシュアップへの活用のほか、STM28 の作用機序の解明にも利用できると思われる。

(2) LPS 誘導性 IFN- β プロモーターの活性化に対する STM28 の作用

各種 TLR より惹起されるシグナルは MyD88 依存もしくは非依存経路を介してシグナルが伝達されるが、TLR4 シグナル伝達経路は他の TLR と異なり両経路を活性化することが報告されている。これまでの一連の研究から MyD88 依存経路の下流に位置する NF- κ B の LPS による活性化に対する STM28 の阻害効果は確認されているが、MyD88 非依存経路に対する STM28 の作用は不明であった。IFN- β 遺伝子は MyD88 非依存経路により発現制御を受けることが知られている。故に LPS 刺激により活性化される MyD88 非依存経路の STM28 の作用を IFN- β プロモーターの活性を指標に検証した。その結果、LPS 誘導性 IFN- β プロモーターの活性を STM28 は濃度依存的に抑制することが明らかとなった。これより STM28 は LPS により惹起される TLR4 シグナル全般を抑制すること、並びに STM28 の LPS シグナル阻害機序が細胞内のシグナル

伝達系より上流に存在することが強く示唆され、STM28 の薬理作用の解明に貴重な知見が得られたと考えられる。

(3) CLP モデルに対する STM28 の効果

今回検討した条件下では STM28 非投与群は 5 日後に致死率が 100%に達したが、投与群において同致死率の減少は観察されなかった。CLP モデルは、その処置から起炎菌が外膜構成成分として LPS を有すグラム陰性細菌に限定されるものではないと予測される。STM28 は TLR4 の細胞外ドメインへの相互作用を指標に単離されたペプチドであり、また *in vitro* の解析において TLR シグナルへの阻害作用は TLR4 特異的であることが強く示唆されている。従って、*in vivo* での STM28 の薬理効果の検証には、グラム陰性細菌を用いた感染実験に対する STM28 の効果を確認する必要があることが本研究結果から明確となった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Sugiyama, K., Muroi, M. and Tanamoto, K: A novel TLR4-binding peptide that inhibits LPS-induced activation of NF- κ B and *in vivo* toxicity, *Eur. J. Pharmacol.* **594**, 152-156 (2008).

[学会発表] (計 8 件)

1. 杉山圭一, 小西良子: 食品成分を用いたマイコトキシン毒性制御のアプローチ, 東京大学大学院農学生命科学研究科食の安全研究センターシンポジウム (日本農芸化学会 蕨田セミナー), 2009

年 3 月 10 日, 東京

2. 杉山圭一, 室井正志, 棚元憲一, 小西良子: マウスマクロファージにおける LPS 誘導性 NO 産生に与えるデオキシニバレノールおよびニバレノールの影響, 第 14 回日本エンドトキシン研究会、プログラム・講演抄録集, 34, 仙台 (2008, 10).
3. 杉山圭一, 室井正志, 薬袋裕二, 棚元憲一, 芳賀 実, 小西良子: デオキシニバレノールの Toll-like receptor シグナル伝達系に対する作用機構の解析, 第 15 回日本免疫毒性学会学術大会講演要旨集 78, 東京 (2008, 9).
4. Sugiyama, K., Muroi, M., Tanamoto, K., Nishijima, M. and Sugita-Konishi, Y: Effect of deoxynivalenol and nivalenol on LPS-induced nitric oxide production by mouse macrophages, The 10th Biennial Meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society, 48, Edinburgh (2008, 7).
5. 杉山圭一, 濱田 理, 室井正志, 薬袋裕二, 棚元憲一, 芳賀 実, 小西良子: Toll-like receptor シグナリングに及ぼすデオキシニバレノールの影響, 2008 年度日本農芸化学会講演要旨集 131, 名古屋 (2008, 3).
6. Sugiyama, K., Muroi, M., Tanamoto, K., Nishijima, M. and Sugita-Konishi, Y: Effect of deoxynivalenol on LPS signaling in macrophage, 47th Society of Toxicology, Seattle (2008, 3).

7. 杉山圭一：微生物由来の毒物からのリスク回避にむけて,東京農業大学栄養生化学セミナー,2008年3月10日,東京
8. 杉山圭一、室井正志、棚元憲一：TLR4をターゲット分子としたLPSシグナル阻害ペプチドの諸性質について、第13回日本エンドトキシン研究会、プログラム・講演抄録集,17,鹿児島 (2007,10).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 圭一 (Sugiyama Kei-ichi)

国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部・主任研究官

研究者番号：80356237