

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02080

研究課題名（和文）新規ワクチンアジュバント探索を志向したTLR4の細胞内動態解析システムの構築

研究課題名（英文）Development of a system to analyze the intracellular dynamics of TLR4 for the discovery of novel vaccine adjuvants

研究代表者

樺山 一哉（Kabayama, Kazuya）

大阪大学・放射線科学基盤機構・教授

研究者番号：00399974

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、TLR4リガンドのサイトカイン産生経路を検証するため、ライブセルイメージング技術とフローサイトメトリーおよびプロモーター活性評価系を用いて、各種検討を実施した。その結果、大腸菌由来LPSと紅色細菌由来LPSにおいて転写因子の活性上昇が前者では刺激濃度依存的に確認され、後者では見られないという明確な差異を確認した。また目的であった新規TLR4リガンドの探索結果として、脂肪酸鎖長が12であるスフィンゴミエリンSM-C12を見出し、これが免疫細胞においてTLR4リガンドとして結合後にインフラマソーム関連分子を生成し、その後パイロトーシスも惹起する新たな分子であることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は現在論文投稿中であるが、新規のTLRリガンドの発見というところで、学術的意義が高い。また、今回見出された分子であるSM-C12は、通常の哺乳動物細胞には見出されておらず、細菌などに存在する可能性が高い外来性の分子である。どの外来種に多く存在するのか詳細な報告は成されておらず、今後の調査が重要となる。また上記分子が、ヒトにおいて正常時には未発現、疾患に応じて発現するなどの現象が見出されれば、感染症や糖尿病における炎症状態などの治療ターゲットとして、大きな社会的意義を持つと思われる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the cytokine production pathways of TLR4 ligands using live-cell imaging technology, flow cytometry, and promoter activity assays. Our results demonstrated a clear difference between Escherichia coli-derived LPS (EcLPS) and Rhodobacter sphaeroides-derived LPS (RsLPS) in terms of transcription factor activation. Specifically, EcLPS induced a concentration-dependent increase in transcription factor activity, whereas RsLPS did not show such an effect. Additionally, in our search for novel TLR4 ligands, we identified sphingomyelin with a fatty acid chain length of 12 (SM-C12) as a new TLR4 ligand. SM-C12 was found to bind to immune cells and subsequently generate inflammasome-related molecules, ultimately triggering pyroptosis.

研究分野：脂質生物学

キーワード：自然免疫 TLR4 スフィンゴミエリン スフィンゴ脂質 リポ多糖 エンドトキシン パイロトーシス
ライブセルイメージング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

現在までに国内外において TLR4/MD2 複合体の細胞内移行を厳密に可視化した報告例は無い。にもかかわらず I 型インターフェロンを選択的に産生できる TLR4 の細胞内移行の作動機序の解明は、免疫アジュバント研究において重要な位置づけとなっている。顕微による一連の可視化操作は最近のノーベル賞受賞技術である超解像顕微鏡やクライオ電顕を筆頭に目覚ましい進歩を遂げているが、「正しい可視化」には、蛍光標識した分子が内在的な分子と同等の振る舞いをすることの多角的検証が必須となる。

2. 研究の目的

自然免疫受容体の TLR4 は感染防御を起動する重要な分子であり、炎症作用あるいは抗ウイルス/抗腫瘍作用を惹起する。前者は TLR4 が細胞膜上に留まり、後者は細胞内移行することでそれぞれに応じたサイトカインを産生することが生化学的に実証されているが、生細胞での可視化による検証は未だ行われていない。そこで我々によって新規に開発された、細胞膜上の TLR4/MD2 複合体のみを生細胞で可視化できるプローブを駆使し、既存の評価系と組み合わせることで、サイトカイン産生経路の仕分けを体系的に評価するシステムを構築する。これを用いることで臨床においても有用な、新規アジュバントとしての TLR4 リガンドの探索を実施する。

3. 研究の方法

1) TLR4/MD2 の細胞内移行のタイムラプスイメージング

TLR4 を高発現する HEK-Blue™hTLR4 株に HaloTag 融合 MD2 を発現させ、AlexaFluor488 を結合させて、細胞膜上の TLR4/MD2 を可視化し、TLR4 のアゴニスト/アンタゴニストである大腸菌 LPS(EcLPS)/紅色細菌由来 LPS(RsLPS)をそれぞれ添加し、細胞内移行(本研究では初期エンドソームへの局在を内在化指標とした)を輝度計測した。

2) 高感度レポーターアッセイによる TLR4 リガンド特性の解明

TLR4/MD2 発現細胞における NF-κB 経路、MAPK/AP-1 経路、IRF 経路に対応したルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて、上記 LPS のシグナル伝達特性を解析した。

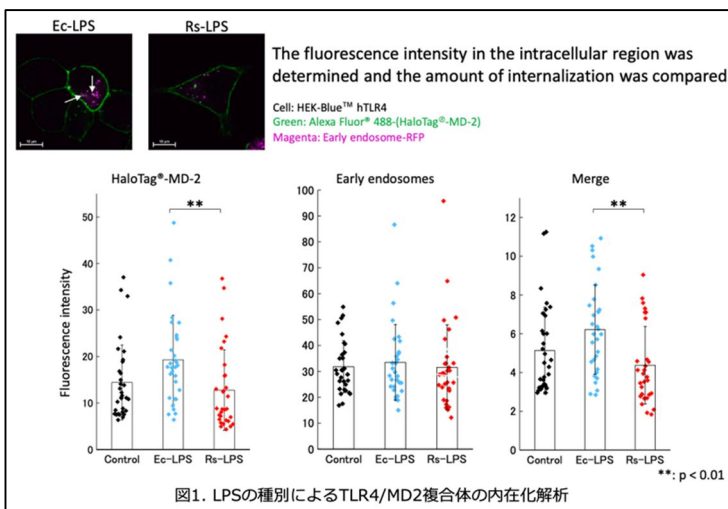
3) ELISA 法ならびにレポーターアッセイ用細胞を用いたスフィンゴミエリンのサイトカイン活性評価

マウスマクロファージ様細胞 (RAW264.7) あるいは骨髄由来マクロファージ細胞 (BMDM)を大腸菌由来の LPS および種々のアシル鎖の SM 分子種(SM d18:1/12:0, SM d18:1/14:0, SM d18:1/16:0)で共刺激し、炎症性サイトカイン IL-6,および IL-1α の放出量を調べた。ヒトあるいはマウス TLR4/MD2/CD14 遺伝子と分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP) レポーター遺伝子を発現した HEK-Blue™ TLR4 細胞を用いて TLR4 を介した NF-κB の活性を評価した。

4. 研究成果

1) TLR4 リガンドの機能評価 ~レポーターアッセイとイメージングによる解析~

イメージングによる TLR4/MD2 複合体の動態解析と、炎症作用を引き起こす MyD88 依存経路および抗ウイルス・抗腫瘍作用を引き起こす TRIF 依存経路、それぞれで分泌されるサイトカインの発現プロモーターを解析するシステムを構築することで、内在化と TRIF 依存経路の活性化の関係を調査した。具体的には、TLR4 と複合体を形成している MD-2 に対して蛍光標識をすることで TLR4 高発現株である HEK-Blue hTLR4 細胞における TLR4 の挙動を観察し、リガンドで刺激した際の内在化量を細胞内にお



る蛍光強度から定量して比較を行った。活性アゴニストである大腸菌 LPS(EcLPS)刺激時ではアンタゴニストである紅色細菌由来 LPS(RsLPS)刺激時に比べて、内在化量が有意に多く見られたことを共焦点走査型レーザー顕微鏡により解析した(図1)。次に HEK-Blue hTLR4 細胞に対して MyD88 依存経路で活性化される転写因子 NF- κ B, AP-1 と TRIF 依存経路で活性化される転写因子 IRF3 によって転写翻訳されるルシフェラーゼの遺伝子を導入し、EcLPS、RsLPS それぞれで刺激した際の転写産物を発光量より測定した。その結果、EcLPS 刺激においては各転写因子の活性上昇が刺激濃度依存的に見られたのに対し、RsLPS 刺激においては刺激による転写因子の活性化は見られないという、明確な差異を得ることが出来た(図2)。本検討により、イメージングによる TLR4/MD2 複合体の内在化能と、NF- κ B 経路、IRF 経路に対応したルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて測定した TLR4 リガンドのシグナル伝達特性に、相関があることを実証できた。これにより、その他の特徴的な活性を有する TLR4 リガンドがどのように TLR4/MD2 複合体を内在化させるのか、より詳細に検討することが可能になった。

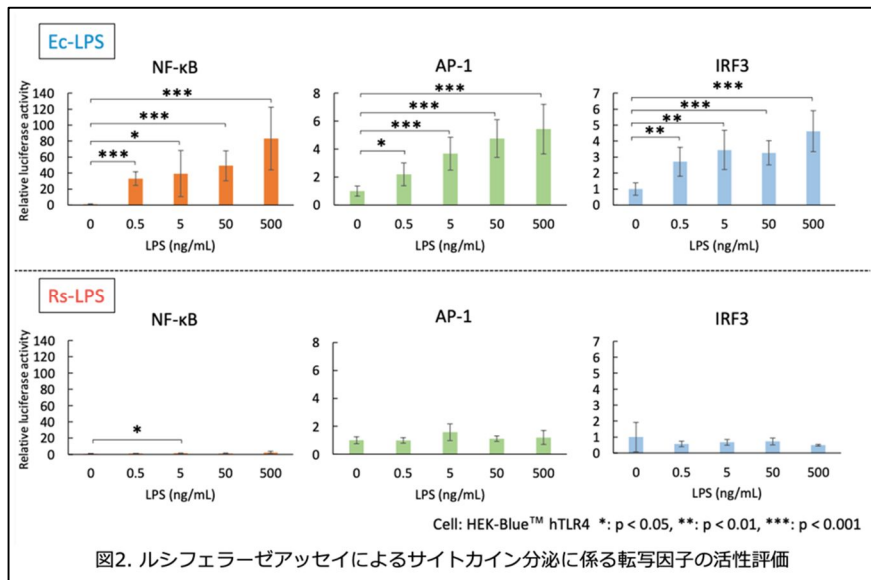


図2. ルシフェラーゼアッセイによるサイトカイン分泌に係る転写因子の活性評価

2) 新規 TLR4 リガンドとしてのスフィンゴミエリン SM-C12 の発見とパイロトーシス活性

本研究で探索された TLR4 リガンド候補分子のうち、スフィンゴミエリン(SM)分子種で興味深い知見が得られた。マウスマクロファージ細胞を大腸菌由来の LPS と種々の脂肪酸鎖の SM 分子種で共刺激し、炎症性サイトカイン IL-6 と IL-1 α の放出量を調べた ELISA の結果を右図に示した(図3)。LPS 単独刺激(灰色の棒グラフ)に対して C18-SM、C24-SM、C24:1*-SM などの哺乳動物に存在する内在性 SM は LPS 刺激との共存に影響しないが、C14-SM は若干の抑制作用を示している。C14-SM はごくわずかに動物個体内にも存在しており、その関連性にも興味を持たれる。一方で、動物細胞に存在しない C12-SM(赤色の棒グラフ)は LPS を抑制せず、単独で顕著な IL-6 および IL-1 α の分泌を促していた。特にパイロトーシスに係るサイトカインである IL-1 α の分泌が著しく、比較的高濃度の LPS(1 ng/ml)刺激に対して、C12-SM 20 μ M の濃度処理が、約 10 倍の分泌活性を示した。なお、親水性基が SM と同じコリン残基で C12 の脂肪酸鎖を有するホスファチジルコリン(PC)は、C12-SM と同様の活性を全く示していない。

*【C24:1】脂肪酸鎖に 1 つの不飽和結合を含む。C12 は飽和型脂肪酸で C12:0 を省略。

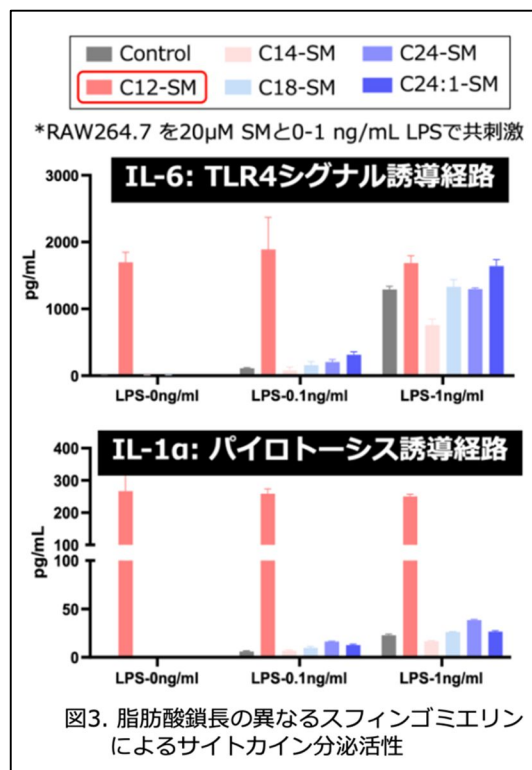
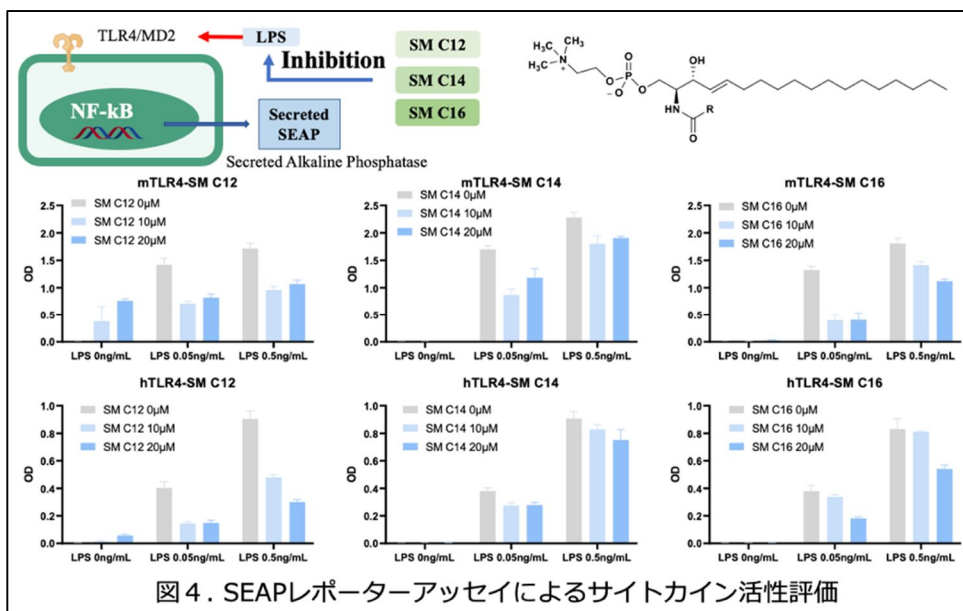


図3. 脂肪酸鎖長の異なるスフィンゴミエリンによるサイトカイン分泌活性

またマウスおよびヒトの TLR4/MD2 を発現し、NF- κ B の転写を可視化基質で評価できる SEAP レポーターアッセイ細胞(HEK-Blue™ mTLR4/mMD2, HEK-Blue™ hTLR4/mMD2)を用いて、C12-SM、C14-SM、C15-SM の活性評価を行ったところ、これらの分子がマウス/ヒト双方で、TLR4 を介した LPS に対するアンタゴニストであることも示した。また C12-SM はこの評価系でも単

独で NF- κ B の誘導活性を示した (図 4)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kato Hiroki, Huang Xuhao, Kadonaga Yuichiro, Katayama Daisuke, Ooe Kazuhiro, Shimoyama Atsushi, Kabayama Kazuya, Toyoshima Atsushi, Shinohara Atsushi, Hatazawa Jun, Fukase Koichi	4. 巻 19
2. 論文標題 Intratatumoral administration of astatine-211-labeled gold nanoparticle for alpha therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Nanobiotechnology	6. 最初と最後の頁 223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12951-021-00963-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito K., Manabe Y., Aiga T., Chang TC., Kabayama K., Ohshima S., Kametani Y., Furukawa H., Inaba H., Matsuura K., Fukase K.	4. 巻 2020
2. 論文標題 Immunological Evaluation of Conjugate/Co-Assembly of Peptide Antigen and Adjuvant as Self- adjuvanting Anti-breast Cancer Vaccine Candidates.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Peptide Science 2020	6. 最初と最後の頁 19-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計26件（うち招待講演 1件／うち国際学会 8件）

1. 発表者名 黨功樹、樺山一哉、黄栩昊、兼田加珠子、豊嶋厚史、深瀬浩一
2. 発表標題 線放出核種 211At を用いたがん特異的な免疫活性化機構の解明
3. 学会等名 第14回光塾
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 黨功樹、樺山一哉、黄栩昊、兼田加珠子、豊嶋厚史、深瀬浩一
2. 発表標題 線放出核種を用いた放射線療法における腫瘍特異的な免疫活性化メカニズムの解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黛功樹、樺山一哉、黄栩昊、兼田加珠子、豊嶋厚史、深瀬浩一
2. 発表標題 短寿命 線放出核種を用いた腫瘍特異的な免疫活性化機構の解明
3. 学会等名 第27回日本エンドトキシン・自然免疫研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuya Kabayama; Kazuko Kaneda; Yoshiyuki Manabe; Atsushi Shimoyama; Atsushi Toyoshima; Atsushi Shinohara; Koichi Fukase
2. 発表標題 Development of 211At-labeled antibodies and investigation of their endocytosis and inhibition of tumor growth
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keita Ito, Yoshiyuki Manabe; Taku Aiga; Kazuya Kabayama; Shino Ohshima; Yoshie Kametani; Hiroto Furukawa; Hiroshi Inaba; Kazunori Matsuura; Koichi Fukase
2. 発表標題 Immunological evaluation of co-assembly of lipidated CH401 peptide antigen and lipophilic adjuvant as self-adjuncting anti-breast cancer vaccine candidates
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ayane Miura; Syuto Miyake; Kazuya Kabayama; Yoshiyuki Manabe; Asuka Shirakawa; Hiroki Syomura; Toshiyuki Yamaji; Kenichi Suzuki; Koichi Fukase
2. 発表標題 Quantitative analysis of galectin-dependent glycoprotein dynamics by using synthetic glycan displaying system on the cell surface
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hersa Milawati, Yoshiyuki Manabe, Kazuya Kabayama, Koichi Fukase
2. 発表標題 Cancer immune therapy by antibody- recruiting using metabolic labeling
3. 学会等名 16th Meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society (IEIIS-16) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keita Ito, Yoshiyuki Manabe, Taku Aiga, Kazuya Kabayama, Shino Ohshima, Yoshie Kametani, Hiroto Furukawa, Hiroshi Inaba, Kazunori Matsuura, Koichi Fukase
2. 発表標題 Immunological Evaluation of Co- Assembling Vaccine of Lipidated-Peptide Antigens and Lipophilic Adjuvants for the Breast Cancer therapy
3. 学会等名 16th Meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society (IEIIS-16) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mayu Higashi, Kazuya Kabayama, Yuichiro Kadonaga, Kohtaro Goto, Wataru Tsukimura, Akio Matsuda, Mamoru Mizuno, Koichi Fukase
2. 発表標題 Development and evaluation of β -ray nuclide labeled antibodies
3. 学会等名 16th Meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society (IEIIS-16) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hitoshi Ogaki, Kazuya Kabayama, Hikari Naito, Atsushi Shimoyama, Hirotaka Kanoh, Jin-ichi Inokuchi, Koichi Fukase
2. 発表標題 Functional Analysis of TLR4 Ligands by Fluorescent Imaging and Reporter Assay
3. 学会等名 16th Meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society (IEIIS-16) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koki Mayusumi, Kazuya Kabayama, Changhao Dai, Kazuko Kaneda, Kazuhiro Ooe, Takahiro Teramoto, Atsushi Toyoshima, Atsushi Shinohara, Koichi Fukase
2. 発表標題 Development and application of antibodies labeled with alpha-emitting radionuclides
3. 学会等名 16th Meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society (IEIIS-16) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 兼田(中島)加珠子, 真鍋 良幸, 下山 敦史, 樺山 一哉, 金井 好克, 豊嶋 厚史, 深瀬 浩一, 篠原 厚
2. 発表標題 万能治療を目指した短寿命アルファ線核医学治療薬の開発
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片山大輔、加藤弘樹、大江一弘、角永悠一郎、黄栩昊、下山敦史、樺山一哉、深瀬浩一、畑澤順
2. 発表標題 アスタチン-211標識金ナノ粒子局所投与による癌増殖抑制
3. 学会等名 第61回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤弘樹、片山大輔、大江一弘、角永悠一郎、黄栩昊、下山敦史、樺山一哉、深瀬浩一、畑澤順
2. 発表標題 局所投与による癌増殖抑制のためのアスタチン標識金ナノ粒子の最適化
3. 学会等名 第61回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黄栩昊、加藤弘樹、角永悠一郎、下山敦史、樺山一哉、片山大輔、大江一弘、豊嶋厚史、羽場宏光、王洋、篠原厚、深瀬浩一
2. 発表標題 新規アルファ線ブラキセラピー開発に向けたAt-211標識金ナノ粒子の合成と機能評価
3. 学会等名 第65回放射化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黄栩昊、加藤弘樹、角永悠一郎、下山敦史、樺山一哉、大江一弘、豊嶋厚史、篠原厚、深瀬浩一
2. 発表標題 核医学治療法を目指したAt-211標識機能化金ナノ粒子創製と評価
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黛功樹、樺山一哉、戴長浩、兼田加珠子、大江一弘、寺本高啓、豊嶋厚史、篠原厚、深瀬浩一
2. 発表標題 線核種を標識したがんターゲティング分子の創製とがん免疫療法への展開
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 二村友香、樺山一哉、朝比奈雄也、花島慎弥、北條裕信、深瀬浩一
2. 発表標題 膜貫通ペプチドを用いたインスリン受容体とガングリオンドGM3の相互作用解析
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東茉由, 樺山一哉, 角永悠一郎, 後藤浩太郎, 月村亘, 松田昭生, 水野真盛, 深瀬浩一
2. 発表標題 線核種標識抗体の創製と機能評価
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大垣 仁之、 樺山 一哉、 内藤 ひかり、 下山 敦史、 狩野 裕考、 井ノ口 仁一、 深瀬 浩一
2. 発表標題 TLR4リガンドの機能評価 ~レポーターアッセイとイメージングによる解析~
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 樺山一哉
2. 発表標題 難治性がん治療のための 線核種標識抗体の創製および機能評価
3. 学会等名 東海大学総合医学研究所/マイクロ・ナノ研究開発センター 第17回 研修会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 樺山一哉
2. 発表標題 LacCer-BODIPYを用いた細胞膜脂質のライブセルイメージング解析
3. 学会等名 第15回 スフィンゴセラピー研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 榊山一哉、新井健太、蟹江治、蟹江善美、深瀬浩一
2. 発表標題 蛍光標識化糖脂質プローブを用いた細胞膜糖脂質の動態解析
3. 学会等名 第40回 日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦彩音、榊山一哉、真鍋良幸、三宅秀斗、白川明日香、初村洋紀、 山地俊之、鈴木健一、深瀬浩一
2. 発表標題 生細胞表面への合成糖鎖の導入および糖鎖-レクチン相互作用の分子化学的解析
3. 学会等名 第40回 日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 真鍋良幸, Roberta Marchetti, 武部智之, 笠原里実, 高倉陽平, 二瓶涉, 田中克典, 榊山一哉, Alba Silipo, Antonio Molinaro, 深瀬浩一
2. 発表標題 コアフコース含有N-グリカンの機能解明・制御を目指したケミカルバイオロジー研究
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 榊山一哉、新井健太、蟹江治、蟹江善美、深瀬浩一
2. 発表標題 蛍光標識化糖脂質プローブを用いた細胞膜糖脂質の動態解析
3. 学会等名 第63回 日本脂質生化学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Kazuya Kabayama, Jinichi Inokuchi	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Humana	5. 総ページ数 314
3. 書名 Glycolipids: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, 2613)	

1. 著者名 手老龍吾, 樺山一哉	4. 発行年 2021年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 576
3. 書名 図説 表面分析ハンドブック(日本表面真空学会)「光学顕微鏡」	

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 金ナノ粒子含有医薬	発明者 加藤弘樹, 深瀬浩一, 樺山一哉ほか	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/018485	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 金ナノ粒子含有医薬	発明者 加藤弘樹, 深瀬浩一, 樺山一哉ほか	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、WO/2021/230369	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 線放出抗体薬物複合体	発明者 樺山一哉, 深瀬浩一, 角永悠一郎ほか	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-160158	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	狩野 裕考 (KANOH HIROTAKA) (40774279)	慶應義塾大学・政策・メディア研究科・特任助教 (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------