

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590564

研究課題名(和文)MD分子による免疫応答制御機構

研究課題名(英文)The control mechanism of immune response by MD molecules

研究代表者

高村 祥子(赤司祥子)(Akashi-Takamura, Sachiko)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：00325599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：血中にも存在する生体内脂質、およびその脂質受容体により誘導されるシグナルが、免疫活性化にとっても重要な機能をしていることを見出した。またトル様受容体(Toll-like receptor, TLR)類似分子、RP105に会合する分泌タンパクMD-1が血清内にも存在することを、作製したELISAアッセイで確認した。さらにMD-1が前述の脂質応答を制御することで過剰な免疫反応を制御している可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：We found that a serum lipid and lipid-receptor induced signal works as an activator of immunology, importantly. A soluble protein MD-1 associated with RP105, which is one of the similar molecules of Toll-like receptors (TLRs) on immune cells. MD-1 was found in serum by our established ELISA assay. We also found the possibility that the serum MD-1 regulated a surplus immune response by a controlling the lipid activation.

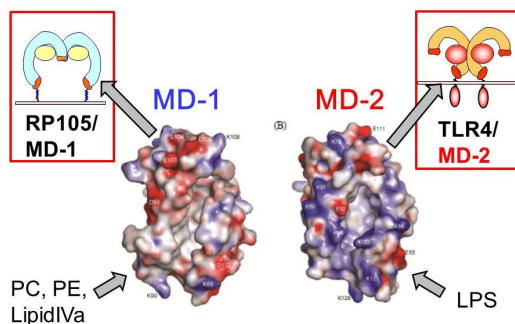
研究分野：免疫学

キーワード：MD-1 脂質 B細胞

1. 研究開始当初の背景

RP105 はマウスの成熟 B 細胞を放射線やステロイド誘導性アポトーシスから回避させ、かつ強い増殖反応を惹起する分子である。MD-1,MD-2 を介して TLR2 や TLR4 とも会合し、細胞表面 TLR を介する抗体産生能や B 細胞活性化を調節する分子であることから RP105 も TLR 分子群として重要な機能を担っている。しかしいっぽうで、RP105 を介してどのように B 細胞が活性化されるのかそのメカニズムがわかっていないこと、B 細胞と対極的に樹状細胞では RP105/MD-1 は TLR4/MD-2 応答の negative regulator として機能するという報告があること、マウスでは RP105 が SLE などの自己免疫疾患増悪因子になっていること、しかしながら反対にヒトでは RP105 陰性 B 細胞の占める割合が自己免疫疾患患者の病勢に応じて増加し、病勢のマーカーになっていること、といったように RP105 に関しては臨床的にも重要であると考えられながらもまだ未解明な部分が多い。本申請は RP105 会合分子である MD-1 に焦点をあてて、未解明な部分を明らかにしていこうという課題である。最近では MD-1 の構造解析が報告され MD-2 同様脂質会合分子であること、またさらには川崎病などの発症時に MD-1 の発現が上昇するなど臨床報告もあることから、MD-1 自体もさらに重要な機能が存在すると予想される。本期間では主に MD-1 の生体における機能に関して焦点を絞って検討する。

MD-1 binds to Phospholipids, MD-2 binds to LPS



(Harada H. Ohto U., et al. J.Mol.Biol. 2010, p843, Fig5) より改変

2. 研究の目的

本研究では、主に以下の3点に関する生体内での MD-1 の機能を明らかにする。

- (1) **脂質代謝・運搬に対する MD-1 の役割**
- (2) **エンドトキシンショックにおける MD-1 の重要性**
- (3) **MD-1 と自己免疫疾患との関連**

3. 研究の方法

MD-1 の生体内における機能を明らかにするため、以下の3点については以下のような方法で研究を進めた。

(1) **脂質代謝・運搬に対する MD-1 の役割**

MD-1 と脂質との結合を、精製 MD-1 あるいは作製した抗 MD-1 抗体を用いて調べる。

生体内 MD-1 が脂質運搬や代謝に関与する可能性があるかどうか調べるため、精製 MD-1 や MD-1 ノックアウトマウス、トランスジェニックマウスなどを用いて、脂質バランスの変化がないかどうか調べる。

(2) **エンドトキシンショックにおける MD-1 の重要性**

血清中の MD-1 が LPS に結合してショックを抑制する可能性が考えられたため、精製 MD-1 や MD-1 ノックアウトマウス、トランスジェニックマウスなどを用いて、検討を進める。また RP105 ノックアウトマウスに対してもショックに対して抵抗性かどうか、検討を進める。

(3) **MD-1 と自己免疫疾患との関連**

MD-1 ノックアウトマウスでは RP105 ノックアウトマウス同様自己免疫疾患が軽減するのかどうか、SLE モデルマウスと掛け合わせて確認すると共に、エンドトキシンショック同様、RP105 ノックアウトマウスとの解離が見られるならば、抗体産生能に違いがあるかどうか検討する。

さらに発展として、以下の計画を予定した。

(4) **脂質会合分子 MD 分子群の機能解析**

MD-1 ノックアウトマウスのみならず MD-2 ノックアウトマウスともかけあわせてダブルノックアウトマウスを作製し、両者が消失して初めて見えてくるフェノタイプはないか、調べてみる。

(5) 脂質会合機能と TLR 応答および抗体産生機能との関与

リン脂質投与により抗体産生能に影響が無い、MD-1、MD-2 や RP105 ノックアウトマウスなどで検討する。SLE モデルマウスなどで血清 MD-1 の値が上昇しているかどうか、ELISA などで調べてみる。ヒト MD-1 抗体が作製できたら患者血清などでの MD-1 の量を抗体を用いた ELISA 測定などで検討してみる。

4. 研究成果

(1) 脂質代謝・運搬に対する MD-1 の役割

作製できた抗 MD-1 モノクローナル抗体を用いてサンドイッチ ELISA システムを構築した。これにより血中の MD-1 濃度が測定できるようになった。また感染時や高脂肪食などのときの血中や尿中 MD-1 濃度が測定できるようになった。

MD-1 は MD-2 同様脂質がはいるポケットをもっており、精製 MD-1 を用いた Native PAGE 法によりさまざまなリン脂質、リゾリン脂質が入ることがわかった。中でもリゾリン脂質の一種、スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) に関しては、スフィンゴシン 1 リン酸受容体 ノックアウトマウスにおいて RP105 抗体による B 細胞活性化が減弱していることから、これまで不明であった RP105 による B 細胞活性化のメカニズムにスフィンゴシン 1 リン酸・および受容体が関係していることがわかった。さらにスフィンゴシン 1 リン酸受容体は B 細胞受容体を介する活性化にも重要であることが判明し、B 細胞活性化と脂質応答とが密接に関連することが明らかとなった。こ

れらは発展的研究として次の基盤研究テーマとして採択され、そのメカニズムについて現在も解析を継続中である。

(2) エンドトキシンショックにおける MD-1 の重要性

MD-1 や RP105 ノックアウトマウスに LPS を投与して人工的にエンドトキシンショックを誘導する系で、発症頻度や致死率の違いを検討したが一貫した大きな差はみられなかった。一方で RP105 や MD-1 のノックアウトマウスでは高脂肪食による肥満が見られないという報告もある。体重差や個体差による影響も否定しきれないため今後慎重に再検討していく必要があると考えられた。

(3) MD-1 と自己免疫疾患との関連

MD-1 に結合する脂質のうち陰性荷電リン脂質であるカルジオリピンについても前述のように Native PAGE 法を行い、MD-1 に結合することがわかった。また MD-1 のノックアウトマウスに SLE モデルマウスをかけあわせた B6/lpr/MD-1 ノックアウトマウスではワイルドタイプに比べ脾腫・リンパ節腫大が増強し、カルジオリピン等のリン脂質に対する抗体産生も高くなることがわかった。前述のサンドイッチ ELISA 法による測定で血清中にも MD-1 は存在し、RP105 ノックアウトマウスでもワイルドタイプマウスと同等かそれ以上の濃度の MD-1 を血清中に認めることがわかった。以上より MD-1 はカルジオリピンなどの脂質に結合し、自己免疫疾患の発症軽減に努めている可能性が示唆された。

前述の SLE モデルマウスに MD-1 ノックアウトマウスをかけあわせると、ワイルドタイプ掛け合わせ群に比べ増悪傾向にあることが判明した。これについても発展的研究として現在その機構を解明中である。

(4) 脂質会合分子 MD 分子群の機能解析

MD-1/MD-2 ダブルノックアウトマウスを作製して解析したが、細胞レベルでは各々のノックアウトマウス由来の特徴以外に新た

なフェノタイプは認めなかった。

(5) 脂質会合機能と TLR 応答および抗体産生機能との関与

期間内にはヒト MD-1 に対するモノクローナル抗体は完成できなかった。今後継続して行っていく予定である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件)

Sachiko Akashi-Takamura 敗血症性ショックに關与する Toll-like receptor の機能 *Antibiotics & Chemotherapy (化学療法領域)* vol30, No4, p40-47 (2014) 査読無し

https://www.iyaku-j.com/iyakuj/system/M2-1/summary_viewer.php?trgid=28095

森田奈央子、高村祥子 TLR4 応答における RP105/MD-1 の役割 臨床免疫・アレルギー科 (2014) vol 62, No2, 217-222 <http://www.kahyo.com/brand/b-M201408-622> 査読無し

中島昭奈、高村祥子 スフィンゴシン 1 リン酸の生体における機能について エンドトキシン・自然免疫研究 17 (2014), p49-52. <http://www.shiga-med.ac.jp/~jesmail/pg73.html> 査読無し

Tanimura N, Saitoh SI, Ohto U, Akashi-Takamura S, Fujimoto Y, Fukase K, Shimizu T, Miyake K. The attenuated inflammation of MPL is due to the lack of CD14-dependent tight dimerization of the TLR4/MD2 complex at the plasma membrane. *Int Immunol.* Jun26, 307-14. 2014. doi: 10.1093/intimm/dxt071. Epub 2013 Dec 31. 査読有り

Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, Ramani SR, Gonzalez LC, Akashi-Takamura S, Miyake K, Zhang J, Lee WP, Muszyński A, Forsberg LS, Carlson RW, Dixit VM. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science* 2013, 341(6151), p1246-9. doi: 10.1126/science.1240248. Epub 2013 Jul 25. 査読有り

. Deguchi A, Tomita T, Omori T, Komatsu A, Ohto U, Takahashi S, Tanimura N, Akashi-Takamura S, Miyake K, Maru Y. Serum amyloid A3 binds MD-2 to

activate p38 and NF- κ B pathways in a MyD88-dependent manner. *J. Immunol.*, 2013, 191(4), p1856-64. doi:10.4049/jimmunol.1201996. Epub 2013 Jul 15. 査読有り

Hiratsuka S, Ishibashi S, Tomita T, Watanabe A, Akashi-Takamura S, Murakami M, Kijima H, Miyake K, Aburatani H, Maru Y. Primary tumours modulate innate immune signalling to create pre-metastatic vascular hyperpermeability foci. *Nat. Commun.*, 2013, 4, p1853-1863 doi: 10.1038/ncomms2856. 査読有り

Kondo Y, Ikeda K, Tokuda N, Nishitani C, Ohto U, Akashi-Takamura S, Ito Y, Uchikawa M, Kuroki Y, Taguchi R, Miyake K, Zhang Q, Furukawa K, Furukawa K. TLR4-MD-2 complex is negatively regulated by an endogenous ligand, globotetraosylceramide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2013, 110(12), p4714-9. doi: 10.1073/pnas.1218508110. Epub 2013 Mar 5. 査読有り

Yamakawa N, Ohto U, Akashi-Takamura S, Takahashi K, Saitoh S, Tanimura N, Suganami T, Ogawa Y, Shibata T, Shimizu T, Miyake K. Human TLR4 polymorphism D299G/T399I alters TLR4/MD-2 conformation and response to a weak ligand monophosphoryl lipid A. *Int. Immunol.*, 2013, 1, p45-52. doi: 10.1093/intimm/dxs084. Epub 2012 Sep 7. 査読有り

Ohto U, Yamakawa N, Akashi-Takamura S, Miyake K, Shimizu T. Structural analyses of human Toll-like receptor 4 polymorphisms D299G and T399I. *J. Biol. Chem.*, 2012, 287(48), p4061-1. doi: 10.1074/jbc.M112.404608. Epub 2012 Oct 10. 査読有り

Doronin K, Flatt JW, Di Paolo NC, Khare R, Kalyuzhnyi O, Acchione M, Sumida JP, Ohto U, Shimizu T, Akashi-Takamura S, Miyake K, MacDonald JW, Bammler TK, Beyer RP, Farin FM, Stewart PL, Shayakhmetov DM. Coagulation factor X activates innate immunity to human species C adenovirus. *Science*, 2012, 338(6108),

p795-8. doi: 10.1126/science.1226625.
Epub 2012 Sep 27. 査読有り

Honda H, Nagai Y, Matsunaga T, Saitoh S, Akashi-Takamura S, Hayashi H, Fujii I, Miyake K, Muraguchi A, Takatsu K. Glycyrrhizin and isoliquiritigenin suppress the LPS sensor toll-like receptor 4/MD-2 complex signaling in a different manner. *J. Leukoc. Biol.*, 2012, 91(6), p967-76. doi: 10.1189/jlb.0112038. Epub 2012 Mar 15. 査読有り

Shibata T, Takemura N, Motoi Y, Goto Y, Karuppuchamy T, Izawa K, Li X, Akashi-Takamura S, Tanimura N, Kunisawa J, Kiyono H, Akira S, Kitamura T, Kitaura J, Uematsu S, Miyake K PRAT4A-dependent expression of cell surface TLR5 on neutrophils, classical monocytes and dendritic cells. *Int. Immunol.* (2012) Oct 24(10): 613-23. 査読有り

Shibata T, Motoi Y, Tanimura N, Yamakawa N, Akashi-Takamura S, Miyake K. Intracellular TLR4/MD-2 in macrophages sense Gram-negative bacteria and induces a unique set of LPS-dependent genes. *Int. Immunol.*, 2011, 8, p503-10. doi: 10.1093/intimm/dxr044. Epub 2011 Jun 28. 査読有り

[学会発表](計 21 件)

Sachiko Akashi-Takamura MD-1 influences a binding between S1P1 and BCR

日本細菌学会総会 2015年3月28日 長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)(招待講演)

Erdenezaya Odkhuu The search for endogenous ligand of RP105/MD-1 receptor complex on B cell 4th Bizan Immunology Symposium 2015年1月29日 徳島大学(徳島県徳島市)

Sachiko Akashi-Takamura MD-1 influences a binding between S1P1 and BCR 日本免疫学会総会 2014年12月10日 京都国際会議場(京都府左京区)

ODKHUU Erdenezaya The search for endogenous ligand of RP105/MD-1 receptor complex on B cell 日本免疫学会総会 2014年12月10日 京都国際会議場(京都府左京区)

Erdenezaya Odkhuu lipopolysaccharide downregulates the expression of p53 through activation of MDM2 and enhances activation of nuclear factor-kappa B エンドトキシン・自然免疫研究会 2014年12月6日 順天堂大学(東京都文京区)

Murakami Yusuke Cell surface TLR3 on CD8-positive dendritic cells and an essential role of the cleaved N-fragment of TLR3 ectodomain in polyI:C sensing 日本免疫学会総会 2013年12月12日 幕張メッセ(千葉県千葉市)

Sachiko Akashi-Takamura S1P1 is required for B cell activation by B cell receptor or Toll-like receptor 日本免疫学会総会 2013年12月11日 幕張メッセ(千葉県千葉市)

Sachiko Akashi-Takamura S1P1 IS REQUIRED FOR B CELL RECEPTOR-AND TOLL-LIKE RECEPTOR-MEDIATED エンドトキシン・自然免疫研究会 2013年12月7日(滋賀県大津市)

高村(赤司)祥子 脂質会合分子による免疫応答への影響 日本リウマチ学会総会 2013年4月19日 京都国際会議場(京都府左京区)(招待講演)

Natsuko Yamakawa Human TLR4 polymorphism D299G/T399I alters TLR4/MD-2 conformation and response to a weak ligand monophosphoryl lipidA 日本免疫学会総会 2012年12月7日 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

Kondo Yuji TLR4-MD-2 is negatively regulated by endogenous ligand, glycolipid Gb4 日本免疫学会総会 2012年12月6日 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

Yuji Motoi Cell surface TLR1,2 and 6 showed variety expression patterns but all depends on PRAT4a completely 日本免疫学会総会 2012年12月6日 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

Sachiko Akashi-Takamura Roles for RP105/MD-1 in autoantibody production Innate Immunity Society (IEIS) meeting 2012年10月26日 National Center of Science Building (Tokyo)

Natsuko Yamakawa Human TLR4

polymorphism D299G/T399I alters TLR4/MD-2 conformation and response to a weak ligand monophosphoryl lipidA
Innate Immunity Society (IEIS) meeting
2012年10月24日 National Center of Science Building (Tokyo)

Yuji Motoi Cell surface TLR1,2 and 6 showed variety expression patterns but all depends on PRAT4a completely
Innate Immunity Society (IEIS) meeting
2012年10月24日 National Center of Science Building (Tokyo)

高村(赤司)祥子 脂質会合分子による自己抗体産生への影響 日本臨床免疫学会
2012年9月28日 京王プラザホテル(東京都新宿区)(招待講演)

山川奈津子 ヒト TLR4 多型における TLR4 の応答性 感染症若手フォーラム
2012年2月3日 長崎県伊王島

高村(赤司)祥子 MD-1 は抗リン脂質抗体産生を制御している 感染症若手フォーラム
2012年2月3日 長崎県伊王島

Natsuko Yamakawa Human TLR4 polymorphism influence cell surface expression and responses of TLR4 日本免疫学会総会 2011年11月28日 幕張メッセ(千葉県千葉市)

Sachiko Akashi-Takamura MD-1 regulates the production of anti-phospholipid antibody 日本免疫学会総会 2011年11月27日 幕張メッセ(千葉県千葉市)

21. Shibata Takuma Intracellular TLR4/MD-2 in macrophages senses LPS and induces a unique set of TLR4 responses 日本免疫学会総会 2011年11月27日 幕張メッセ(千葉県千葉市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 教室:

<http://www.aichi-med-u.ac.jp/M-I2/index.html>

大学：<http://www.aichi-med-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高村 祥子(赤司 祥子)(TAKAMURA, Sachiko)

愛知医科大学 医学部・教授

研究者番号：00325599

(2)研究分担者

なし。

(3)連携研究者

なし。

(4)研究協力者

山川 奈津子 (YAMAKAWA, Natsuko)