

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2007 ~ 2008
 課題番号： 1 9 7 9 0 3 2 6
 研究課題名 (和文) Liposome を用いた LPS の認識機構に関する研究
 研究課題名 (英文) The recognition mechanism of liposomal LPS
 研究代表者
 井上 浄 (INOUE JOE)
 北里大学・理学部・助教
 研究者番号： 00433714

研究成果の概要： LPS のシグナル伝達は MyD88 と TRIF の 2 つを介した経路が存在する。本研究で新たに開発した LPS-liposome が TRIF 経路のみを活性化することを明らかとし、さらにその活性化にはクラスリン依存性のエンドサイトーシスが重要であることを示した。この LPS-liposome による活性化は、これまで TRIF 経路活性化に必須とされている CD14 を必要としないことから、通常の LPS の認識において CD14 がクラスリン依存性エンドサイトーシスと強く関連することが予測される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野： 医歯薬学
 科研費の分科・細目： 基礎医学・細菌学
 キーワード： 病原性

1. 研究開始当初の背景

リポ多糖 (lipopolysaccharide; LPS) はグラム陰性菌の細胞壁外膜を構成し、強く免疫細胞を活性化する。その強い活性のため多くの疾患との関連が指摘されており、これまでの多くの研究から LPS 認識分子の同定が進み、中でも TLR4 (toll-like-receptor 4) や MD-2、CD14 などを含むこれら LPS 認識分子群の研究が盛んに行われている。

近年、これら LPS 認識分子群の相互作用により LPS のシグナル伝達が制御されてい

るとの報告がなされた (Nature Immunology, 2005, 6, 565-570)。リポ多糖はその糖鎖部分の長さに応じて、S (smooth) 型と R (rough) 型の 2 種類に分類でき、双方ともリピド A およびコア領域を含み、S 型においてはこのコア領域に O 抗原多糖がさらに結合している。長い糖鎖を持つ S 型 LPS (S-LPS) は CD14 の存在下でのみ、そのシグナルが伝達され、アダプター分子である MyD88 および TRIF の両方を介し、TNF- α 、IL-6 および IFN- β 産生を誘導する。これに対し R 型 LPS (R-LPS) は CD14 存在下においては S 型と

同様の反応を示すがCD14の非存在下であっても、MD-2とTLR4を介したMyD88のシグナル伝達経路が活性化されTNF- α 、IL-6を産生し、この時TRIFを介したシグナル伝達は動かず、結果IFN- β は産生しない。

以上の結果は、CD14がTLR4を介したIFN- β 産生に重要な役割を果たしていることを示しているが、CD14自身は細胞内シグナルドメインを持たないため、これらLPSによるTLR4からのシグナル伝達機構には未だ不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

前述のような背景のもと、S-LPSとR-LPSを用いることでCD14を介したIFN- β 産生の評価系を確立し、CD14^{-/-}マウスおよび新たに開発したLPS封入liposome(LPS-liposome)を用いることで、その解析を進める。

LPS-liposomeはliposome内にS-LPSおよびR-LPSを封入することで、細胞内へ効率良くLPSを導入することができる。この時、通常のLPS刺激の場合と比較し、LPS-liposomeでは細胞膜表面上でのTLR4やCD14との相互作用は、ほとんど起こらず細胞内へと取り込まれることが推測される。これまでの研究から、このLPS-liposomeはマウスマクロファージからのTNF- α およびIL-6産生を全く誘導しないが、IFN- β を誘導することが明らかとなっている。

そこで本研究では、このLPS-liposomeを用い、LPSの取り込み機構やCD14関与、シグナル伝達機構等を*in vitro*で解析し、その後これら免疫応答をノックアウトマウス等を用い*in vivo*で解析することで、細菌感染時における生体の認識機構やLPS認識分子群の新たなメカニズムの解明を行う。

3. 研究の方法

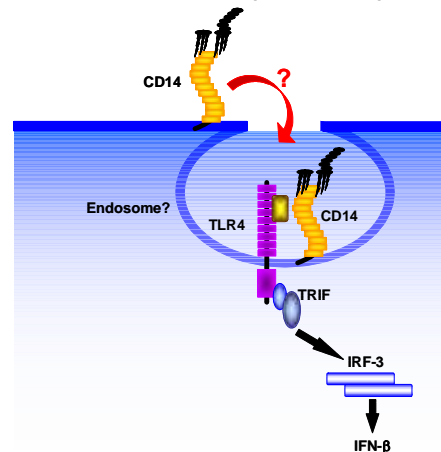
(1) 2007年

マウスから採取したマクロファージを用い、S-LPS、R-LPSおよびLPS-liposomeで刺激した後、TNF- α 、IL-6およびIFN- β 等のサイトカイン産生を指標にそれぞれのLPSの特徴を再確認する。その後、その評価系にCD14のblocking抗体を加えることでLPS-liposomeによるIFN- β 産生に対するCD14の関与を明らかにする。

IFN- β 産生にCD14が関与しない場合

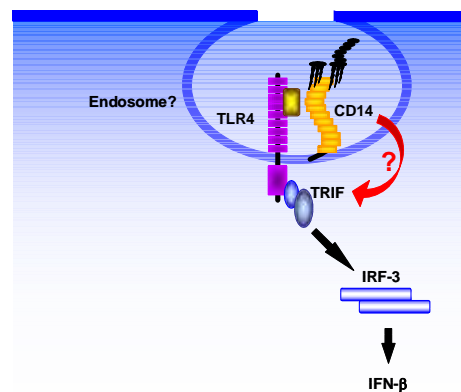
この場合、細胞内へLPSが効率よく取り込まれることがIFN- β 産生に重要であると予想されるため、通常のLPS刺激の場合にはCD14がこの細胞内への取り込みに関与している可能性が示唆される。そこで次に、蛍光標識したLPS

およびLPS-liposome、さらにCD14のblocking抗体を用いることでLPSの細胞内への取り込みについて評価を行う(下図参照)。



IFN- β 産生にCD14が関与する場合

この場合、LPSの細胞内への取り込みにCD14が関与している可能性は低く、むしろTRIFを介したシグナル伝達への関与が考えられる。しかしながら、LPS-liposomeは通常のLPSと比較し細胞表面上のレセプターと結合する可能性は低いいため、LPSによるIFN- β 産生は、LPSが細胞内に何らかの理由によって取り込まれ、その後細胞内においてCD14を介しTRIFの経路で産生されると考えられる。そこで次に、蛍光標識したLPSおよびLPS-liposome、蛍光標識したanti-CD14 mAbを用い、両蛍光の細胞内の局在を追うことでその評価を行う(下図参照)。



その後、いずれの場合においても細胞内シグナル伝達、特にMyD88およびTRIFから下流の経路に焦点を当て解析を行う。さらに、他のTLRを介したIFN- β 産生においてエンドソームやリソソームの重要性も示されている(Nature, 2005, 434, 1035-40)。liposomeを用いることでTLRリガンドの局在を変化させることが可能となるため、これらの関与についても詳細に検討を行っていく。

また、LPSに関する様々な分子のノックアウトマウス(TLR4やCD14など)のマクロファージを用い、より正確にかつ詳細に研究

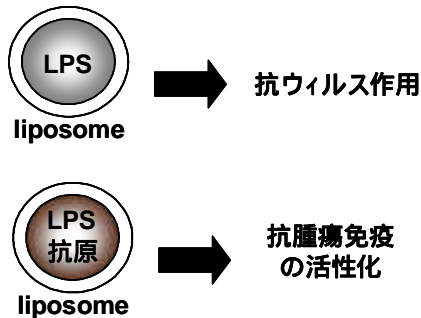
を進めて行く。

(2) 2008 年

*in vivo*における研究に焦点を当て進めていく。LPSを生体に投与した場合、TNF- α 等に代表される炎症性サイトカインが大量に誘導され、エンドトキシンショックや敗血症などの致死的な炎症反応が誘導されるばかりでなく、その強力な作用ゆえに様々な免疫疾患との関連が報告されている。

しかしながら、これまでの研究から LPS-liposomeは *in vitro*において全く TNF- α 産生を誘導せず、この制御を *in vivo*においても検討する必要がある。また、本研究の1年目に得られた結果と合わせて、*in vitro*で見られたLPS認識分子群の相互作用によるTNF- α 、IL-6およびIFN- β などのサイトカイン産生の制御が *in vivo*においても見られるかについて検討を行い、細菌感染時における生体のLPS認識機構についてより詳細に研究を行う。

さらに発展させた研究として、ワクチンアジュバントの開発を行っていく予定である。LPS-liposomeはTNF- α やIL-6産生は全く誘導しないもののIFN- β 産生を誘導する能力があり、この特徴から *in vivo*において安全に抗ウイルス作用を誘導できることが期待される。さらにLiposomeにはLPSなどの糖脂質ばかりでなく、抗原などのタンパク質を同時に封入することが可能であり、腫瘍抗原などを同時に封入することにより抗腫瘍免疫の活性化も可能であると考えられる。これらについても検討を進める。



4. 研究成果

(1) 2007 年

リポ多糖 (LPS) の認識には様々な分子の関与が報告されており、中でも TLR4 はそのシグナルを細胞内へと伝える重要なレセプターの一つである。LPS による TLR4 を介したシグナル伝達は MyD88 ならびに TRIF を介した経路が報告されているが、本研究によって TRIF 依存経路のみを活性化する

LPS-liposome の開発に成功した。

この LPS-liposome は LPS と比較して、TNF および IL-6 産生を誘導しないが、type1-IFN 産生を誘導することをマウスマクロファージで確認した。LPS による type1-IFN 産生は CD14 に依存することが報告されているため、ワイルドタイプのマウスおよび CD14 ノックアウトマウス、さらに S-form および R-form-LPS の組み合わせを利用し、TRIF 依存経路の CD14 の関与について検討を行ったところ、S-form、R-form に関わらず type1-IFN 産生は CD14 に依存することが確認できた。驚くことにこの系において LPS-liposome は、CD14 ノックアウトマウスのマクロファージにおいて、S-form、R-form に関わらず type1-IFN 産生を誘導することを明らかとした。

これらの結果はすなわち、LPS による TRIF 依存経路のシグナル伝達には、LPS が CD14 によって細胞内に取り込まれることが重要であり、他方 LPS-liposome は CD14 が存在しなくても効率良く細胞内に取り込まれるため、TRIF 依存経路のみが活性化されることを強く示唆するものである。

さらに LPS-liposome の取り込み経路について詳細な検討を行ったところ、クラスリン依存性のエンドサイトーシスで取り込まれ、且つ late endosome マーカーと重ならないことから、early endosome における認識が重要であることを見出している。今後、その詳細なメカニズムの解明を行っていく。

(2) 2008 年

これまでの研究において、LPS-liposome は S-form および R-form に関わらず、CD14 ノックアウトマウスにおいても TRIF 依存経路を活性化させることを明らかにしてきた。

これまでの多くの報告から、TRIF 依存経路の活性化には CD14 が必須であることが示されてきたが、本研究において TRIF 依存経路の活性化にはクラスリン依存性のエンドサイトーシスが必須であることが明らかとなった。すなわち、CD14 は S-form および R-form の LPS をクラスリン依存性のエンドサイトーシスで取り込むことにより TRIF 経路を活性化させていることが示唆される。実際に、他の研究グループからも同様の報告が示されている (Nat. Immunol. 2008)。

これらの知見に加え、TRIF 依存経路のみを活性化する LPS-liposome のワクチンアジュバント効果についても検討を行った。モデル抗原を封入した LPS-liposome を新たに調製し、その効果について抗原特異的な免疫応答を指標に検討したところ、血清中の抗体産生が強く誘導され、特に Th1 型の免疫応答の増強が認められた。この効果は CD14 ノックアウトマウスにおいても認められている。今後

はこの詳細なメカニズムについて検討を進め、安全で効果的なワクチンアジュバントの開発を目指す。

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)

井上 浄、井手上隆一、高橋大輔、久保田政宏、熊沢義雄、Liposomal glycosphingolipids activate natural killer T cell-mediated immune responses through the endosomal pathway. Journal of Controlled Release. 査読有り、133, 18-23 (2009)

[学会発表](計1件)

井上 浄、渡辺幸子
LPSの細胞内認識とシグナル伝達機構に関する検討、特定領域研究「感染現象のマトリックス」第7回感染症沖縄フォーラム、平成21年2月12日～14日、沖縄県那覇市

[その他](計1件)

ホームページ等
<http://www.kitasato-u.ac.jp/sci/resea/eibutsu/bogyo/research.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 浄 (INOUE JOE)
北里大学・理学部・助教
研究者番号：00433714