

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月29日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591064

研究課題名（和文） 血管の内と外での病原体認識メカニズム

研究課題名（英文） Pathogen molecular pattern recognition mechanisms inside and outside of the blood vessel

研究代表者

福留 健司（FUKUDOME KENJI）

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：50284625

研究成果の概要（和文）：

マクロファージの鋭敏な LPS 応答は、膜結合型の CD14 とそれに依存するラフト形成による強力な TLR4 シグナル伝達によるものであることを示した。しかし、血中を循環している可溶化型の CD14 も、膜型程効率的ではないが LPS 認識を補佐する活性を有しているため、CD14 を発現していない血管内皮細胞や B 細胞においてもシグナル伝達が起こっている。LPS によって誘導されるトランスは、TLR4 シグナルがナイーブな B 細胞を分化させてしまうことで、抗原特異的の反応ができなくなってしまう結果であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We demonstrated that sensitive LPS-recognition by macrophages was due to the strong TLR4-signal transduction induced by raft-formation in the cells carrying membrane-associated CD14. The signal transduction was not so effective in CD14-negative cells such as B cells; however, it was significant to induce some responses. We discovered that LPS-tolerance was resulted by loss of antigen-presenting function in B cells differentiated by LPS-stimulation in the absence of antigen.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血液免疫学、モノクローナル抗体

1. 研究開始当初の背景

グラム陰性菌外膜の構成成分である lipopolysaccharide (LPS) は、サイトカイン、ケモカイン、脂質メディエーターの産生、免疫抗原認識に機能する補充シグナル分子の発現誘導、細胞の増殖など様々な生体反応を誘導する。LPS を検知する細胞表面受容体として、Toll-like receptor (TLR) ファミリーの TLR4 が同定されており、マク

ロファージや樹状細胞で詳細な機能解析が行われている。しかし、LPS に応答する細胞はこれらの抗原提示細胞には限られておらず、血管内皮を含むその他の細胞種の応答も生体防御に重要な役割を担っていることが予想される。特に血管内皮においては、LPS 応答を制御するシステムが存在することが示されているので、LPS に対する応答のメカニズムを明らかにする必要あ

る。これまでの研究において、TLR4 シグナル経路には複数の経路が存在し、下流において異なる遺伝子の誘導を行うことが示されている。我々は、これらの複数のシグナル経路が存在する意義と、細胞種間による応答の特異性を明らかにするために、TLR4/MD-2 複合体を認識する monoclonal antibody (mAb) を作成した。TLR ファミリーの中で、TLR4 はユニークな存在である。TLR4 が生理機能を発揮するためには会合分子である MD-2 を必要とする。実際に LPS を結合するのは TLR4 ではなく、MD-2 であり、LPS の病原性の有無は MD-2 への結合様式で決定される (Tsuneyoshi N. et al, 2005, *J. Immunology*)。最近、我々は TLR4 と MD-2 のノックアウトマウスから 6 種類の mAbs を樹立した。解析の結果、このうち 3 種類の抗体が細胞の応答を誘導するアゴニスト抗体であることが明らかになった (Ulung B. et al, *Hybridoma*, 2007)。このアゴニスト抗体を使った解析の結果、以下のような知見を得ている。

1. 6 種の抗体の中で、2 種は TLR4 を単独で認識する抗体で、4 種は複合体に反応する
2. TLR ノックアウトマウスから得た 2 種の抗体、UT12 と UT18 はアゴニスト活性を有する
3. MD-2 ノックアウトマウスから得られた UT22 もアゴニスト活性を有する
4. 3 種のアゴニスト抗体はすべて複合体を認識するが、UT22 が認識するエピトープは UT12,18 の認識するエピトープとは異なっている
5. すべてのアゴニスト抗体は NF- κ B の活性化を誘導し、サイトカインとケモカイン産生の産生、B 細胞の増殖を誘導する。
6. 一酸化窒素(NO)の産生は、UT12 と UT18 でだけ誘導され、UT22 は誘導しない
7. UT12 と UT18 は抗原特異的抗体産生に対してアジュバント活性を有するが、UT22 に関してはアジュバント活性を示さない

アゴニスト抗体はそれぞれ固有のエピトープを認識し、その認識部位の違いによって誘導される細胞と個体の応答が異なることが明らかになった。認識部位の違いにより、異なったシグナル経路が活性化されていることを示すものである。また、細胞

種によっても応答する抗体が異なっている。これらの発見は、LPS 以外にフィブリノーゲン、ヘパラン硫酸、ヒアルロン酸、HMGB-1 等の Internal ligands が TLR4/MD-2 に結合して、細胞応答を誘導することから考えても合理的である。病原体を駆逐するための応答と、恒常性を維持するための応答が画一的であるということは考えにくいので、リガンドの違いによって誘導するシグナルの種類を変化させていると考えた方が良い。今回得られたアゴニスト抗体で、あるものは LPS のように作用し、別のものは Internal ligands を模している可能性がある。

2. 研究の目的

グラム陰性菌感染では、菌体の血管内侵入によって劇的な症状の悪化が見られることから、循環系の内外で、TLR4/MD-2 の LPS 応答に差異がある可能性がある。LPS の認識機構は他の Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) とは異なっている。TLR4/MD-2 はそれ単独で、LPS を認識することが出来ず、他の分子の共役によってはじめて機能を発揮することが可能になる。血管外の組織に存在するマクロファージには膜型の CD14(mCD14)が発現している。組織中の LBP/BPI family 分子の機能によって細菌外膜から引き抜かれた LPS が、マクロファージ上の CD14 に結合することで、TLR4/MD-2 による認識が可能となると考えられている。一方、血液およびリンパ液中には、LPS-binding protein (LBP) と可溶化型の CD14(sCD14)が存在し、その役目を担っている。LBP は、細菌外膜から LPS を引き抜き、CD14 に引き渡す。sCD14 は、LPS と複合体を形成し安定化させて、TLR4/MD-2 複合体に提示する。この一連の反応において、LBP と MD-2 は病原性の LPS に対して、非病原性の LPS よりも高い親和性を示す (Kohara, J. et al, 2006, *Protein Expr Purifi*, Tsuneyoshi, N. et al. 2005, *J. Immunology*)。このように血中においては、液性成分によって LPS が特異的に効率よくプロセスされるために、CD14 陰性の細胞であっても LPS の認識が行える。ところが、sCD14 と mCD14 によって仲介される細胞応答に明らかに違いがあることを見出した。mCD14 を高発現しているマクロ

ファージや樹状細胞の応答と、mCD14 を発現していない血管内皮細胞や B 細胞の応答の違いを明らかにする必要がある。

本研究で明らかにする事柄

1. 3 種類のアゴニスト抗体が誘導するシグナル経路を特定する
2. LPS 以外のリガンドによってその経路が選択的に動員されるのかを明らかにする
3. mCD14 のシグナル伝達への関与を明らかにする
4. リコンビナント sCD14 と LBP 及びそれらの変異体を作成したので、TLR シグナルへの影響を解析する

3. 研究の方法

細胞内における TLR シグナルが複数経路存在することが知られているが、その生理的な意味合いについては説明されていない。我々が確立したアゴニスト抗体によって得られている結果は、この現象を明らかにする突破口となるはずである。TLR シグナルによって誘導される様々な細胞応答が、リガンドの種類、細胞種によって必要に応じて使い分けられている可能性を示すものである。このような可能性は当然予想されたことであるが、現在までその解析は不可能であった。LPS を含めすべてのリガンドは、TLR4/MD-2 以外に様々な分子と結合することが知られており、その相互作用がシグナル伝達に影響を与えることが知られているからである。これに対して、アゴニスト抗体は純粋に TLR4/MD-2 からのシグナルだけを誘導するので、実用的な解析ツールとして使用できる。得られている 3 種のアゴニスト抗体はそれぞれ特徴的な細胞応答を誘導し、異なるエpitepを認識している。結合する場所により、作用する細胞種が変化し、誘導される反応も異なるということである。従って、認識構造と誘導できるシグナル経路の関連が明らかに出来る。TLR4/MD-2 には様々なリガンドが結合することが報告されているので、それぞれのケースを模しているアゴニスト抗体が得られていると思われる。

また、LPS の認識に関しては循環系の外と中で共役する分子が異なっているために、誘導されるシグナルも異なっている可能性がある。TLR4 に関するこれまでの研究は、その殆どが抗原提示細胞に関するもの

で、LPS そのもので細胞を刺激した結果である。我々の解析結果では、特に mCD14 存在下での抗原提示細胞の刺激は全経路を同時に活性化するもので、sCD14 存在かでの血管内皮や B 細胞で起こる現象と異なっている。アゴニスト抗体では、選択的にシグナル経路を活性化出来るので、血管内皮細胞や B 細胞に発現している TLR4/MD-2 複合体の生理機能に関して新たな知見が得られるはずである。

4. 研究成果

特に膜結合型の CD14 が、効率的な TLR4 シグナルに寄与するラフト形成に必要であること示されたので、このことによりマクロファージでの鋭敏な反応が説明できるものと思われる(文献1)。しかし、血中を循環している可溶化型の CD14 も、膜型程効率的ではないが LPS 認識を補佐する活性を有しているので、D14 を発現していない血管内皮細胞や B 細胞においてもシグナル伝達が起こっている。

また、マウスにおいて、LPS によってトレランスが誘導されることが知られていたが、我々はこの現象が、TLR4 に対するアゴニスト抗体によっても誘導されることを明らかにした。さらにこの現象は、LPS トレランスに関して従来から説明されてきた様な抗原提示機能の抑制ではなく、TLR4 シグナルがナイーブな B 細胞を分化させてしまうことで、抗原特異的の反応ができなくなってしまう結果であることを明らかにした(文献6)。

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 6 件、全て査読あり)

1. Nurlaely MR, Fukudome K, Tsuneyoshi N, Bahrun U, Tsukamoto H, Yanagibashi T, Nagai Y, Takatsu K, Ohta S, Kimoto M.: Inhibition of antibody production in vivo by pre-stimulation of Toll-like receptor 4 before antigen priming is caused by defective B cell priming and not impairment in antigen presentation. *Int Immunol.* 25(2):117-128, 2013.
2. Tsukamoto H, Fukudome K, Takao S, Tsuneyoshi N, Ihara H, Ikeda Y, Kimoto M.: Multiple potential regulatory sites of TLR4 activation induced by LPS as revealed by novel inhibitory human TLR4 mAbs. *Int Immunol.* 190(1):195-204, 2013.
3. Minhas N, Xue M, Fukudome K,

- Jackson CJ: Activated protein C utilizes the angiopoietin/Tie2 axis to promote endothelial barrier function. FASEB J. 2010;24(3):873-81.
4. Centelles MN, Puy C, López-Sagaseta J, Fukudome K, Montes R, Hermida J: Blocking endothelial protein C receptor (EPCR) accelerates thrombus development in vivo. Thromb Haemost. 2010 Jun;103(6):1239-44.
 5. Uchihashi K, Aoki S, Shigematsu M, Kamochi N, Sonoda E, Soejima H, Fukudome K, Sugihara H, Hotokebuchi T, Toda S: Organotypic culture of human bone marrow adipose tissue. Pathol Int. 2010;60(4):259-67.
 6. Tsukamoto H, Fukudome K, Takao S, Tsuneyoshi N, Kimoto M: Lipopolysaccharide-binding protein-mediated Toll-like receptor 4 dimerization enables rapid signal transduction against lipopolysaccharide stimulation on membrane-associated CD14-expressing cells. Int Immunol. 2010 ;22(4):271-80.

[学会発表] (計3件)

1. Rachmawati NM, Fukudome K, Tsuneyoshi N, Uleng B, Ohta S, Kimoto M: Inhibition of primary but not secondary humoral immune responses by pre-injection of an agonistic anti-TLR4/MD-2 antibody. 第40回日本免疫学会 2011.11.28, 千葉市, 173
2. Rachmawati NM, Uleng B, Fukudome K, Kimoto M: Agonistic anti-TLR4 monoclonal antibodies function as immunoadjuvants. 第14回国際免疫学会議 2010.8.27, 神戸市, 001-49
3. Tsukamoto H, Fukudome K, Takao S, Tsuneyoshi N, Kimoto M: Lipopolysaccharide-binding protein-mediated Toll-like receptor 4 dimerization enables rapid signal transduction against lipopolysaccharide stimulation on membrane-associated CD14-expressing cells. 第14回国際免疫学会議 2010.8.27, 神戸市, 001-27

[図書] (計0件)

[その他]

ホームページ

<http://www.biomol.med.saga-u.ac.jp/immunol/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福留 健司 (FUKUDOME KENJI)
佐賀大学・医学部・准教授
研究者番号: 50284625

(2) 研究分担者

木本 雅夫 (KIMOTO MASAO)
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号: 40153225

研究分担者

常吉 直子 (TSUNEYOSHI NAOKO)
佐賀大学・医学部・客員研究員
研究者番号: 80336114