

「免疫難病・感染症などの先進医療技術」

平成13年度採択研究代表者

三宅 健介

(東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野 教授)

「病原体糖脂質認識シグナル伝達機構の解明」

## 1. 研究実施概要

自然免疫における病原体認識機構における中心的分子としてToll-like receptor (TLR)が発見され、長い間なぞであったエンドトキシン (LPS, Lipopolysaccharide) の認識分子もTLR4であることが明らかになった。我々はTLR4に会合する分子MD-2を発見し、H14年度において、MD-2の役割を明らかにするためにMD-2欠損マウスを作成し、そのLPS応答性を検討したところ、TLR4欠損マウスと同様にまったくLPSに応答しないことが明らかになった。したがって長い間検索されてきたエンドトキシン認識分子はTLR4とMD-2からなることが明らかとなった。今後は、LPSとTLR4-MD-2との結合、認識機構を明らかにする必要がある。

## 2. 研究実施内容

エンドトキシン (LPS, Lipopolysaccharide) はグラム陰性菌の外膜を構成する糖脂質である。さまざまな病原体成分の中でも最も強く免疫機構を活性化する。その認識機構は長い間なぞであったが、Toll-like receptor 4がエンドトキシンシグナルを伝えることが明らかとなった。我々はTLR4の細胞外ドメインに会合する分子MD-2を発見し、TLR4のエンドトキシン認識にMD-2が重要であると主張して来た。本年度において、TLR4によるエンドトキシン認識におけるMD-2の重要性を検討した。具体的には正常細胞や、個体レベルにおいてMD-2がLPS応答に必要かどうか、検討するためにMD-2欠損マウスを作成し、そのLPS応答性を検討した。その結果、以下の点が明らかになった。

1. B細胞、マクロファージ、樹状細胞などの正常免疫細胞はLPS刺激によってCD86などの補助刺激分子の発現増強、増殖応答、サイトカイン産生などが誘導される。MD-2を欠損したこれらの細胞はまったくLPSに応答せず、これらのLPS応答が検出されなかった。図1に、骨髄由来マクロファージの結果を示す。マクロファージは病原体成分によって活性化され、IL-6などのサイトカインを産生する。MD-2欠損マクロファージはLPSの活性中心であるLipid A刺激ではIL-6産生がまったく検出できなかったが、ペプチドグリカン (PGN) や非メチル化DNA (CpG) 刺激でのIL-6産生は野生型と変わらなかった。

2. 個体レベルでのLPS応答としてLPSを投与したときのサイトカインを測定した。MD-2欠損マウスではTNF(Tumor necrosis factor)やIL-6などの産生が検出されたが、MD-2欠損マウスではまったく検出されなかった。また図2に示すようにグラム陰性菌であるネズミチフス菌を感染させ、生存を調べたところ、野生型では10匹中9匹生存したときにMD-2欠損マウスではすべて6日以内に死んでしまった。また実験的に誘導したエンドトキシンショックでは逆に抵抗性を示し、野生型はすべて死滅したのに対し、MD-2欠損マウスは生き残った。

これらの結果から、LPS認識にTLR4ばかりでなく、MD-2も必須であることが明らかとなった。またエンドトキシンショックがMD-2欠損マウスで誘導されないことから、MD-2がエンドトキシンショック治療薬開発の標的分子としての可能性が有ることも明らかになった。

図1

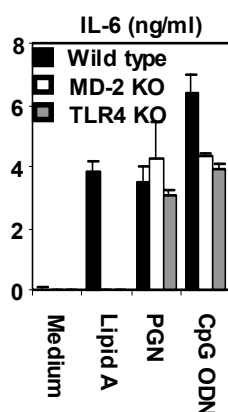
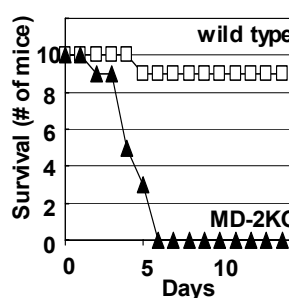


図2



### 3. 研究実施体制

#### 三宅グループ

①研究分担グループ長：三宅 健介（東京大学医科学研究所感染遺伝学分野、教授）

②研究項目：MD-2、MD-1、RP105KOマウスの解析

LPS認識機構の解明

MDタンパクの構造解析

LPS認識機構と免疫難病との関連

#### 小杉グループ

①研究分担グループ長：小杉 厚（大阪大学医学部保健学科病態生体情報学講座、助教授）

②研究項目：LPS認識に伴うTLR4MD-2複合体の構造的変化の解析

LPS認識と細胞膜ラフトとの関連の解析

TLR4MD-2シグナル伝達と脂質代謝機構との関連

#### 4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

##### (1) 論文発表

- Nagai, Y., S. Akashi, M. Nagafuku, M. Ogata, Y. Iwakura, S. Akira, T. Kitamura, A. Kosugi, M. Kimoto, and K. Miyake. Essential role of MD-1 in lipopolysaccharide responsiveness and Toll-like receptor 4 distribution. *Nat. Immunol.* 3:667-672, 2002.
- Yasuda, K., M. Nagafuku, T. Shima, M. Okada, T. Yagi, T. Yamada, Y. Minaki, A. Kato, S. Tani-ichi, T. Hamaoka, and A. Kosugi. Fyn is essential for tyrosine phosphorylation of Csk-binding protein/ phosphoprotein associated with glycolipid-enriched microdomains in lipid rafts in resting T cells. *Journal of Immunology* .169:2813-2817, 2002.
- Tanimura, N., M. Nagafuku, Y. Minaki, Y. Umeda, F. Hayashi, J. Sakakura, A. Kato, Douglas R. Liddicoat, M. Ogata, T. Hamaoka, and A. Kosugi. Dynamic changes in the mobility of LAT in aggregated lipid rafts upon T cell activation. *Journal of Cell Biology*. Vol.160, Num.1, 125-135, 2003.
- Miyake, K. Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and Toll-like receptor4-MD-2: unique roles for MD-2. *International Immunopharmacology*. 1:119-128, 2003.

##### 共同研究論文

- Matsumoto, M., S. Kikkawa, M. Kohase, K. Miyake, and T. Seya. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 293: 1364-1369, 2002.
- Triantafilou M, Miyake K, Golenbock DT, Triantafilou K. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J. Cell. Sci.* 115:2603-2611, 2002.
- Ando, I., Y. Tsukumo, T. Wakabayashi, S. Akashi, K. Miyake, T. Kataoka, and K. Nagai.

Safflower polysaccharides activate the transcription factor NF- $\kappa$ B via Toll-like receptor 4 and induce cytokine production by macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 2: 1155-1162, 2002.

- Duesberg U, von dem Bussche A, Kirschning C, Miyake K, Sauerbruch T, Spengler U.

Cell activation by synthetic lipopeptides of the hepatitis C virus (HCV)-core protein is mediated by toll like receptors (TLRs) 2 and 4. *Immunol Lett.* 84:89, 2002.

- Abel B, Thieblemont N, Quesniaux VJ, Brown N, Mpagi J, Miyake K, Bihl F, Ryffel B.

Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *J Immunol.* 169:3155-3162, 2002.

- Ogawa T, Asai Y, Hashimoto M, Takeuchi O, Kurita T, Yoshikai Y, Miyake K, Akira S.

Cell activation by Porphyromonas gingivalis lipid A molecule through Toll-like receptor 4- and myeloid differentiation factor 88-dependent signaling pathway. *Int. Immunol.* 11:1325-1332, 2002.

- Hijiya N, Miyake K, Akashi S, Matsuura K, Higuchi Y, Yamamoto S. Possible involvement of toll-like receptor 4 in endothelial cell activation of larger vessels in response to lipopolysaccharide. *Pathobiology.* 70:18-25, 2002.

- Okamoto M, Oshikawa T, Tano T, Ohe G, Furuichi S, Nishikawa H, Ahmed SU, Akashi S, Miyake K, Takeuchi O, Akira S, Moriya Y, Matsubara S, Ryoma Y, Saito M, Sato M. Involvement of Toll-Like Receptor 4 Signaling in Interferon-gamma Production and Antitumor Effect by Streptococcal Agent OK-432. *J. Natl. Cancer Inst.* 95:316-326, 2003.

(2) 特許出願

1 件