

「免疫難病・感染症等の先進医療技術」

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. 研究実施の概要

エンドトキシン (LPS, Lipopolysaccharide) の認識分子は、Toll-like receptor 4 (TLR4) と、TLR4に会合する分子MD-2からなることをこれまで明らかにしてきた。H15年度において、TLR4-MD-2とエンドトキシンとの結合を細胞レベルで明らかにした。さらに、結合後のTLR4-MD-2の2量体、多量体形成を検出することにも成功している。これらの結果から、TLR4-MD-2はLPSと結合したのちに、多量体を形成することで、シグナルが伝達されることを明らかにした。今後は、LPSの構造の違いによって同じTLR4-MD-2を刺激しても細胞の応答に違いが生じる事が明らかになっており、その違いを生じる分子機構について明らかにする。また、これまで確立してきたTLR4-MD-2に対するモノクローナル抗体を用いて、エンドトキシンショックの治療に使えるかどうか、マウスモデルを用いて調べる事も計画している。

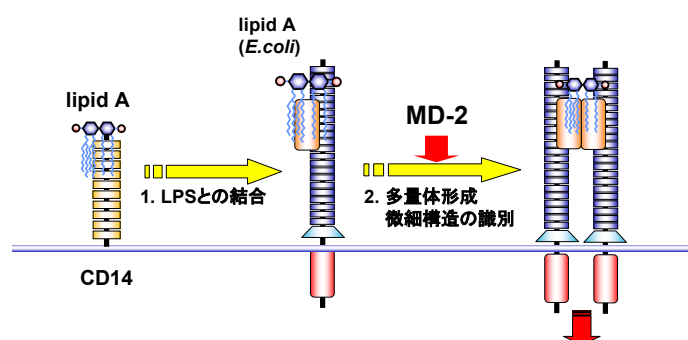
## 2. 研究実施内容

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。その認識分子は長い間なぞであったが、Toll-like receptor 4 (TLR4) と、我々がクローニングしたTLR4の細胞外ドメインに会合する分子MD-2からなることが明らかとなった。本年度は、TLR4-MD-2によるLPS認識機構を明らかにするために、TLR4-MD-2とLPSとの結合、およびその後の2量体、多量体形成について検討を進めた結果、以下のことが明らかとなった。

1. TLR4-MD-2とCD14を発現させた細胞株をLPSで刺激した後に、TLR4-MD-2を免疫沈降したところ、TLR4-MD-2とともにLPSが共沈降することを見出した。CD14は共沈されなかったこと、さらにMD-2単独とLPSとの結合がすでに報告されていることから、この結果はTLR4-MD-2とLPSとの直接結合を示すと考えられた。放射線標識したLPSの活性中心lipid Aを用いて結合を定量的に測定したところ、解離定数は3-10nMであった。
2. つぎにLPSとTLR4-MD-2との結合後、シグナルが伝達されるために多量体形成が必要と考えられていたので、その点について検討した。細胞株にCD14、MD-2と2種類の

異なるエピトープタグGFPとFlagをつけたTLR4を発現させ、その細胞株をLPSで刺激し、TLR4-GFPを免疫沈降し、TLR4-Flagの共沈降を調べた。その結果、刺激後15-45分で、一過性の共沈が認められた。LPSの拮抗剤ではTLR4-MD-2に結合するが、その後の共沈が認められないことから、この共沈がシグナル伝達と直接関連することが明らかとなった。

これらの結果から、TLR4-MD-2はLPSに直接結合し、多量体形成をすることで活性化シグナルが伝達されることが明らかとなった。TLRのリガンドはサイトカインと異なり、病原体の種類によってその構造が異なる。その違いをTLRは識別しうることが明らかとなっているが、その識別はリガンドの結合ではなく、その後の多量体形成で識別されることが明らかとなった。今後は多量体形成を制御する分子気候について明らかにすることで、TLRの病原体認識機構の解明を進める。



### 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：病原体糖脂質認識シグナル伝達機構の解明  
エンドトキシンショックの新たな治療法の開発

#### 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、助教授）
- ② 研究項目：TLR4/MD2シグナル伝達と脂質代謝機構

#### 佐藤グループ

- ① 研究分担グループ長：佐藤能雅（東京大学大学院薬学系研究科）
- ② 研究項目：X線解析に向けたMD2タンパク質などの発現と精製

#### 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

- Miyake, K. Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2. *Int Immunopharmacol.* 2003 1:119-128
- 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.* 2003 95:316-326
- T Matsunaga, N Takemoto, T Sato, R Takimoto, I Tanaka, A Fujimi, T Akiyama, H Kuroda, Y Kawano, M Kobune, J Kato, Y Hirayama, S Sakamaki, K Kohda, **K Miyake** & Y Niitsu. Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nat. Med.* 2003, 9:1158-1165
- Adib-Conquy M, Moine P, Asehounne K, Edouard A, Espevik T, **Miyake K**, Werts C, Cavaillon JM. Toll-like receptor-mediated tumor necrosis factor and interleukin-10 production differ during systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 168:158-164.
- S Akashi, S Saitoh, Y Wakabayashi, T Kikuchi, N Takamura, Y Nagai, Y Kusumoto, K Fukase, S Kusumoto, Y Adachi, A Kosugi, **K Miyake**. Lipopolysaccharide Interaction with Cell Surface Toll-like Receptor 4-MD-2: Higher Affinity than that with MD-2 or CD14. *J. Exp. Med.* 2003, 198: 1035-1042.
- Kimoto M, Nagasawa K, Miyake K. Role of TLR4/MD-2 and RP105/MD-1 in innate recognition of lipopolysaccharide. *Scand J Infect Dis.* 2003. 35:568-572.
- Miyake K. Endotoxin recognition molecules, Toll-like receptor 4-MD-2. *Semin Immunol.* 2004 16:11-16.

##### (2) 特許出願

H15年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：2件）