

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 病原体糖脂質認識シグナル伝達機構の解明

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名

研究代表者

三宅 健介（東京大学医科学研究所 教授）

主たる共同研究者

小杉 厚（大阪大学大学院医学系研究科 助教授 平成 13 年 12 月～平成 16 年 3 月）

佐藤 能雅（東京大学大学院薬学系研究科 教授）

深瀬 浩一（大阪大学大学院理学研究科 教授）

3. 研究内容及び成果：

我々の免疫システムは、病原体に対して、応答するか否か、またどのような免疫応答を誘導するか、という決定を瞬時に下している。そのような決定に大きく関わっている分子が病原体センサーである。代表的なセンサーである Toll-like receptor (TLR)は、細胞外の病原体を細胞表面で、あるいは細胞内に取り込み、エンドソーム・リソソームで認識する。病原体センサーが感染の際の炎症反応誘導に大きく関与していることを考慮すると、炎症反応を制御する治療法の標的分子として病原体センサーが注目される。本研究においては、病原体センサーの中でも TLR、特にグラム陰性菌の膜成分である LPS (lipopolysaccharide)を認識する TLR4/MD-2 について、その LPS 認識機構を生化学的、構造学的な手法で解明し、LPS 応答の新たな制御法の可能性を探った。さらに TLR4/MD-2 に対する抗体などを用いた制御法の可能性を探るための基礎的な研究を進めた。具体的には、以下の点について、進めてきた。

(1) TLR4/MD-2 による LPS 認識機構の解明

グラム陰性菌の膜を構成する糖脂質である LPS は強い免疫応答を誘導する。そのためにエンドトキシンショックをはじめとする多くの疾患への関与が指摘され、精力的に研究が進められてきた。この LPS 認識機構を解明するために、レセプターである TLR4/MD-2 と LPS との結合などを、生化学的な手法を用いて検討した。TLR4/MD-2 を免疫沈降すると、リガンドである LPS が共沈することが明らかとなった。この結合は膜面型の CD14 を必要とし、TLR4 単独では、そのような結合は認められなかったことから、MD-2 が LPS との結合に重要であることがわかった。放射性同位元素を標識した LPS を用いて、その結合を定量化すると、Dose 依存性で飽和する特異的な結合であることがわかった。その解離定数は約 3-10nM であった。

LPS と結合した後に、TLR4 をエピトープタグに対する抗体で免疫沈降すると、別のエピトープタグをつけた TLR4 も免疫沈降されることから、LPS 刺激によって TLR4 同士が会合する、すなわち、TLR4-oligomerization が誘導されていることが明らかとなった。TLR4-oligomerization は、LPS に特異的で、15-45 分をピークとする一過性のものであった。この現象によって細胞内のシグナル伝達ドメインの dimerization が活性化され、シグナルが伝達されることが予想される。これらの結果から、LPS 認識は 1)リガンド結合、2)リガンド依存性の TLR4-clustering の 2 段階で進むことが明らかとなった。この 2 つの段階に MD-2 が関与しているか否かを明らかにするために、LPS 応答が低下する MD-2 のアラニン置換ミュータントを用いて調べたところ、LPS との結合に 59 番目のグリシンが、その後の TLR4-clustering に 126 番目のフェニルアラニンと 129 番目のグリシンがそれぞれ特異的に重要であることが明らかとなった。この結果は、MD-2 が LPS 結合、TLR4-clustering の両方に必要

であること、そしてその2つのステップをそれぞれ別々に制御していることを示している。

上述の生化学的解析とともに、佐藤グループを中心に、MD-2の構造解析を現在進めており、リガンドとMD-2との複合体の結晶構造の決定に成功している。この結果から、リガンド結合、TLR4-clusteringに必要とされるアミノ酸の役割が明らかとなることが予想される。現在構造解析の結果の報告を準備している。

深瀬グループはLipid Aおよびその誘導体を合成し、我々に供給するとともに、Lipid Aの構造と活性の相関を明らかにすることで、LPS認識機構の解明に寄与することを目指している。

(2) TLR4に対する抗体を用いた、エンドトキシンショック治療法の開発

LPS認識機構の解明と並行して、LPSレセプターであるTLR4/MD-2に対するモノクローナル抗体が、LPSによる炎症応答を制御できるかどうかについての検討も進めた。その結果、LPSとD-galactosamineで誘導される肝細胞アポトーシスによるエンドトキシンショックをTLR4に対する抗体であるSa15-21が予防しうることがマウスモデルによって明らかとなった。その作用機序を検討したところ、抗体がTLR4/MD-2を介して肝細胞を活性化しアポトーシス抑制遺伝子の発現を誘導し、アポトーシスから回避させる可能性が示唆された。TLR4/MD-2の機能を抗体によって制御することで、エンドトキシンショックの状態を制御しうることが示された。

(3) TLR4に会合する新規分子のクローニング

TLR4に会合する新規の分子の検索を行い、TLR4の細胞内局在を制御する分子としてPRAT4A(Protein Associated with Tlr4 A)をクローニングした。この分子の機能を解析するためにPRAT4A遺伝子を細胞株においてsilencingしたところ、TLR4/MD-2の細胞表面での発現が低下し、LPS応答性も低下した。現在この分子についての解析をノックダウン細胞株、ノックアウトマウス作成を通じて進めているが、TLR4ばかりでなく、ほかのTLRの応答性も制御している可能性が示唆されている。複数のTLRの制御を考える上で、新たな標的分子となりうる可能性がある。

これらの解析を通して、TLR4/MD-2によるLPS認識機構を生化学的、構造学的に解明するとともに、その制御法の可能性を検討してきた。さらには、TLR4/MD-2そのものではなく、その局在を制御することで、LPS応答性を制御しうる分子をクローニングし、新たな標的分子の可能性を示すことができた。本研究で得られた結果は、自然免疫に関連する分子を標的とした新たな免疫制御法の開発に貢献しうると我々は期待している。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

TLR4/MD2によるLPS認識機構の解明、TLR4に会合する新規分子PRAT4Aの同定、TLR4等の細胞表面移行の機構解明、Lipid Aの病原細菌による違い等、最近になり多くの興味ある成果が出ており、今後が期待される。

これらの研究成果は、論文発表(海外52件)、口頭発表:ポスター発表を含む(海外28件、国内55件)として発表されている。Nature Immunol. 2件、Nat. Med、J. Exp. Med.などの国際的に評価の高い学会誌や国際会議に多くの優れた研究成果を発表している。特許は国内2件、海外1件出願した。

下記は中でも特筆すべきものである。

- 1) LPS認識は、①リガンド結合、②リガンド依存性のTLR4-clusteringの2段階で進むことを示した。また、MD-2は、LPS結合、TLR4-clusteringの両方に必要で、かつ別々に制御していることを明らかにした。
- 2) TLR2,TLR4,TLR9の発現に新規分子PRAT4が必須であることを初めて示した。PRAT4A分子は、TLR/MD2の細胞内局在を制御する分子として、また複数のTLRの制御機構を解明する糸口として、エンドトキシンシ

ック治療法の新たな標的分子として期待される。

- 3) エンドトキシン誘発敗血症のモデル系を樹立し、TLR4に対する抗体がエンドトキシンショックを予防しうることを示した。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

本研究では、長い間謎であったLPSのレセプターがTLR4とMD-2からなることを明らかにした。さらに、MD-2がリガンドとの結合、TLR4-clusteringを制御することを示し、最終的にMD-2とLPSの活性中心であるlipid Aとの複合体の構造を決定することに成功した。本研究成果は、病原体認識機構を分子レベルで解明した最初のものである。

エンドトキシンショックなど、LPSが関係する疾患の治療法に向けた研究では、TLR4/MD-2に対する抗体がエンドトキシンショックの予防に効果があることを示した。また、ヒトTLR4に対する抗体を用いて、ヒトへの応用の試みが始まっている。さらに本研究で明らかにした、MD-2の構造から、MD-2を標的とした新たな薬剤の開発につながることを期待される。

実際の感染における病原体認識では、ひとつの病原体が複数のTLRリガンドをもち、免疫細胞も複数のTLRが同時に発現している。本研究では、TLRに会合する分子PRAT4A (Protein associated with TLR4)をクローニングし、TLR応答性の制御機構の解明する糸口を提示した。この分子の解析は、細胞レベルでの病原体応答の制御機構の解明に貢献するものと期待される。

LPSの研究はドイツを中心に始まったが、その活性中心であるLipid Aの構造決定は日本でなされた。その認識の中心分子であるMD-2の発見者である三宅らは、本研究でMD2のLPSへの結合様式、反応性、MD2KOマウス、MD2とLPSの共結晶など、MD2の研究の発展に中心的な役割を果たしてきた。LPS研究における日本の貢献を示すことができた。

4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

本研究における成果は、短期間で得られてものではなく、長い時間を要するものである。その間、5年の長きにわたってCRESTによりサポートされ、次の展開への足がかりをつかむことができた。

本研究を通じて多くの若手研究者が育成された。ポスドクの楠本は大阪大谷大学薬学部の助教授に就任した。