

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 全反射レーザー蛍光顕微鏡（エバネッセント顕微鏡）を用いた
細胞膜における lipopolysaccharide (LPS) の分子挙動の解析

指導教官 松島 綱治 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士過程

社会医学専攻

氏名 刈間 理介

今日の医療の進歩にも関わらず、いまだに敗血症を合併した症例では高い死亡率を認めている。敗血症の原因としては、細菌感染によるものが全体の 85～90%を占めており、このうちグラム陰性桿菌においては、菌の外膜の構成成分である LPS が、敗血症の主な原因物質であることが知られてきた。

現在、LPS の受容体としては、GPI アンカー型受容体である CD14 と、細胞内ドメインが IL-1 受容体と極めて高いホモロジーをもつ TLR4 の、ふたつの受容体が知られている。このうち、CD14 は LPS 結合タンパク (LBP) と複合体を形成した LPS に対し高い親和性を持ち、細胞の LPS 感受性を高める働きをしていると考えられている。一方、TLR4 は MD2 と複合体を形成することで、LPS の刺激を細胞内に伝える機能をもっている。1999 年に TLR4 が LPS の受容体として明らかになって以来、LPS に対する細胞内シグナル伝達の分子機序がめざましく解明されてきた。しかし、細胞膜における LPS の分子挙動には依然として多くの不明な点が残されており、特に、LPS が CD14 に結合した後、細胞膜上でどのように TLR4 と相互作用するのか、そしてこの過程に MD2 がいかに機能しているのかに関しては、いまだ明らかにはされていない。さらには、近年多くのシグナル伝達系に関与すると考えられている細胞膜のリピドラフトが LPS やその受容体の分子挙動と細胞活性化にいかに関与しているかについても不明である。これらの細胞膜における LPS の挙動を解明することは、LPS が細胞を活性化する最初の過程を理解する上で重要であり、LPS による生体の炎症反応を

細胞膜レベルで制御する新しい治療法の開発に寄与する可能性が考えられる。本研究では、これらの問題点を解明する目的で、生体試料の分子挙動をリアルタイムに観察することが可能な光学技術であるエバネッセント顕微鏡 (total internal reflection microscope ; TIRFM) を用いて、ヒトマクロファージおよびヒト CD14、TLR4、MD2 を遺伝子導入し発現させた CHO 細胞の細胞膜における、Alexa594 蛍光分子で標識した LPS (Alexa594 LPS) の分子挙動の解析をおこなった。

まず、Alexa594 LPS が CD14 に特異的に結合するかを検討するために、形質導入していない CHO 細胞と、CD14 を単独で発現した CHO 細胞を用いて、Alexa594 LPS 投与後の細胞膜における蛍光像を比較した。その結果、10ng/ml の濃度で Alexa594 LPS を投与すると、Alexa594 LPS の輝点は LBP 存在下で CD14 を発現した細胞のみに有意に出現していた。このことより、LPS は細胞表面の CD14 に特異的に結合し、他の細胞膜の構造物には結合しないものと考えられた。

さらに、溶液中の Alexa594LPS の輝度分布を知るために、洗浄処理したスライドグラスに 10 ng/ml の濃度の Alexa594 LPS を含む溶液をのせ、スライドグラスに付着した輝点の輝度を測定した。その結果、複数個の Alexa594 に相当する輝度の高い輝点を多数認めており、10 個以上の Alexa594 に相当する輝度の高い大きな輝点も観察された。LPS は溶液中で凝集体を形成しやすいことも知られており、ここで観察された特に輝度が高く大きな輝点については、溶液中で LPS が凝集体を形成したものと考えられた。

次に、ヒト末梢血から単球を分離し、M-CSF 存在下で分化・誘導したヒトマクロファージに、最終濃度 10 ng/ml の Alexa594 LPS と 500ng/ml の LBP を投与した際の、細胞に結合した Alexa594 LPS の輝点の拡散係数と輝度を解析した。Alexa594 LPS 投与 5 分後のマクロファージでは、細胞膜上を速い速度で移動する輝点を認めた。この輝点の時間経過に対する平均二乗変移はほぼ直線的に増加しており、LPS が細胞膜上を自由拡散していることが示された。また、マクロファージに結合した Alexa594 LPS の輝点は 1~2 分子の Alexa594 の輝度に相当するものが多数で、最大でも Alexa594 の 6 分子に相当するものに留まっていた。凝集体を形成した LPS に対し CD14 と LBP をともに作用させると LPS が凝集体から解離するという報告もあり、LPS は溶液中で形成された凝集体のままでは細胞膜の CD14 に結合できず、はじめから凝集体を形成していない LPS または凝集体から解離した LPS のみが、LBP と複合体を形成した後に細胞膜の CD14 に結合するものと考えられた。

マクロファージに結合した輝点の時間経過による変化を検討すると、LPS 投与 30 分後では投与 5 分後と比較して輝度の高い輝点が増加していたことから、細胞膜に結合した LPS が時間経過とともに集合体を形成しているものと考えられた。また、LPS 分子の拡散係数に関して検討すると、輝度の高い輝点において LPS 投与 30 分後では投与 5 分後と比較して動きが遅い輝点が増加していた。この結果からは、LPS・CD14 複合体が集合体を形成しつつ、細胞膜上の他の分子と相互作用しあうことにより、その細胞膜上での運動速度を低下させている

可能性が考えられた。

次に、CHO 細胞にヒト CD14 のみを単独に発現した場合と、ヒト CD14 とヒト TLR4 およびヒト MD2 を発現した場合で、Alexa594 LPS の分子挙動の変化について検討した。その結果、CD14 とともに TLR4・MD2 複合体を発現した場合には輝度が高く運動速度の遅い輝点が増加していたのに対して、CD14 のみを発現した場合には輝度が高い輝点は認められたが、これらの輝点は運動速度が大きく、細胞膜上で静止しているように見える輝点の出現はきわめて制限されていた。このことより、LPS が CD14 に結合し集合体形成したのちに細胞膜上で運動速度を低下させ停止する過程には、TLR4・MD2 複合体との相互作用が強く関与しているものと考えられた。しかしながら、CD14 のみを発現し TLR4・MD2 複合体の発現を伴わない場合でも、Alexa594 分子複数分に相当する輝度の高い輝点が認められたことより、CD14 強制発現細胞においては、LPS の集合体形成は TLR4 の存在の有無とは無関係に生じるものと考えられた。

さらに、MD2 の発現が LPS の細胞膜における分子挙動に与える影響について、ヒト CD14 とヒト TLR4 のみを発現した CHO 細胞とヒト CD14、ヒト TLR4 およびヒト MD2 複合体を発現している CHO 細胞を用いて Alexa594 LPS の分子挙動を検討した。MD2 遺伝子欠損マウスが致死量の LPS に抵抗性を示し、この遺伝子欠損マウス由来の細胞も LPS に反応性を示さなかったという報告があり、MD2 は生体における LPS 認識機構にきわめて重要なはたらきをしているものと考えられる。しかし、今回の TIRFM を用いた Alexa594 LPS の細胞膜における分子挙動解析では、輝度分布および運動速度の低下と輝点の静止に関して、MD2 の発現の有無に伴う LPS の分子挙動にはあきらかな違いは認められなかった。このことから、少なくともヒト CD14 とヒト TLR4 を強制発現させた CHO 細胞においては、ヒト MD2 の発現の有無は LPS の分子挙動に影響を与えないものと考えられた。NF κ B の活性化をみたルシフェラーゼアッセイで CD14 と TLR4 のみを発現させた CHO 細胞においても、LPS による NF κ B の活性化が認められており、TLR4 が強制発現により多量に細胞膜に発現している状態では、MD2 の発現は必ずしも LPS・CD14 複合体と TLR4 の相互作用に不可欠なものではないものと考えられた。

近年、コレステロールとスフィンゴ脂質に富む細胞膜の構成領域であるリポドラフトには多くのシグナル伝達物質が会合していることが報告され、リポドラフトに種々の GPI アンカー蛋白が濃縮されていることが知られている。CD14 についてもリポドラフトへの局在が示されており、単球系細胞株に methyl- β -cyclodextrin (MCD) で脱コレステロール処理を加えリポドラフトを壊すと、LPS に対する細胞の反応性が低下することも報告されている。しかし、LPS の細胞刺激の過程で、リポドラフトがいかに関与しているかについては明らかではない。そこで、MCD で処理をしたヒトマクロファージの LPS の細胞膜における分子挙動の変化を解析し、リポドラフトが細胞膜における LPS の分子挙動への関与について検討した。その結果、MCD で前処理したマクロファージでは未処理のマクロファージと比較して輝度の高い輝点

の出現が著明に減少していた。この結果から、マクロファージ細胞膜のリピドラフトが LPS・CD14 複合体の集合体形成の場となっていることが示唆された。

最後に、LPS で前処理することにより細胞の LPS 反応性が一定の期間低下する、いわゆる LPS トレランスの状態にある細胞の細胞膜における LPS 分子挙動の変化の有無について、ヒトマクロファージを用いて検討した。この LPS 反応性低下の機序については、近年、OCS1/JAB や IRAK-M などの細胞内の分子が LPS 刺激にともない発現誘導され、これらが阻害分子として作用することにより LPS の細胞活性化を抑制することが明らかにされた。これらの報告からは、LPS トレランスが細胞膜の受容体レベルの変化ではなく、細胞内のシグナル伝達系における変化であると考えられる。今回の TIRFM による解析でも、LPS で前処理したマクロファージと未処理のマクロファージとの間に Alexa594 LPS の分子挙動に明らかな違いは認められず、LPS トレランスが細胞膜レベルでの変化によるものでないことを強く支持する結果であった。

今回の細胞膜における LPS の分子挙動に関する TIRFM を用いた解析により、10 ng/ml の濃度では LPS が CD14 に特異的に結合し、細胞膜上を自由拡散しつつ、集合体を形成することが明らかとなった。また、この集合体形成には細胞膜のリピドラフトが強く関わっていることが示唆された。さらに、TLR4・MD2 複合体との相互作用が集合体を形成した LPS の細胞膜上の運動速度の低下に関わっていることが推測された。しかし、CHO 細胞で、MD2 発現の有無により LPS の分子挙動には明らかな変化は認められず、LPS 刺激認識における MD2 の役割については今後の検討を要するものと考えられた。今後さらに検討を進めることで、LPS による細胞活性化機序を細胞膜レベルでより詳しく理解し、さらにはグラム陰性桿菌感染症における炎症を細胞膜レベルで制御する治療法の開発に寄与できる可能性があるものと考えられる。

また、TIRFM は、その解像度の高さリアルタイムな観察が可能なことから、生体分子の観察において近年特に注目されてきた光学技術の一つである。しかし過去の報告の多くが、抽出したタンパク質の細胞外での挙動に関する解析や、EGFP などの蛍光タンパクを融合した分子を強制発現させた細胞における観察によるものであった。本研究は、蛍光標識した LPS を用いヒトマクロファージにおける分子挙動を観察するという、より実際の生体現象に近い状態で TIRFM による生体分子観測を試み、一定の有意義な知見を得ることができた。このように生体から得た細胞に対し蛍光リガンドや蛍光抗体を投与し TIRFM で分子挙動を解析する手法は、今後の医療の現場においても細胞膜および受容体レベルでの疾患の原因の解明や診断への応用が可能であると期待される。