

論文の内容の要旨

論文題目 Endotoxin tolerance の機構解析についての研究

-合成 LPS receptor agonist による耐性誘導ならびに Toll-like
receptor を介した刺激伝達経路の検討-

指導教官 上西紀夫 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成12年4月入学

医学博士過程

代謝栄養・内分泌外科学専攻

氏名 畑尾 史彦

要旨

[背景]

生体に過度の侵襲がおこるとサイトカインが過剰に増強した状態となり、その結果、後に臓器障害などが引き起こされる危険性がある。“予定された侵襲”である待機手術において、周術期の過度の炎症反応を抑制することが出来れば、術後の臓器障害などを軽減出来る可能性がある。亜致死量の endotoxin (Lipopolysaccharide: LPS) の前投与を行うと、引き続いて致死量の endotoxin を暴露した際の炎症反応は軽減し、その結果として生存する、という現象は endotoxin tolerance として知られているが、そのメカニズムはまだ十分には明らかにされていない。この現象に着目し、術前に tolerance を誘導することで手術侵襲の軽減がなし得るかということについて検討してきた。これまでも endotoxin tolerance という現象を応用して炎症反応や臓器障害などを抑制

するという試みは古くから報告されているが、未だ実用には至っていない。その理由は以下の 2 点が挙げられる。1) tolerance を誘導するために必要な刺激として LPS を用いるならば、それ自体に毒性が存在する。2) tolerance の誘導は結果的に生体の免疫防御に必要な炎症反応までも抑制された状態になってしまい、かえって有害である可能性が否定できない。よって tolerance のメカニズムが十分に明らかにならないと生体に有利かどうか分からないため臨床応用が難しい。

近年、macrophage などの細胞表面上に LPS などの微生物構成成分を特異的に認識する Toll-like receptor (TLR) が存在し、自然免疫系において重要な役割を担っていることが明らかになり、LPS をめぐるシグナル伝達のメカニズムの解明は急速に発展しており、endotoxin tolerance のメカニズムについても分子レベルでの解明が期待できる段階に近づきつつある。

[目的]

実験 1) 毒性を軽減した薬剤を用い、かつ免疫反応の過度の抑制を起さずに endotoxin tolerance の誘導がなされるか検討する(*in vivo*)。

実験 2) LPS 刺激での耐性誘導は毒性が強い点に限界があるので、他の TLR 刺激薬によって LPS 活性に対する cross tolerance が成立するかどうかについて検討する(*in vitro*)。

実験 3) 各 TLR 刺激によって、TLR signaling に共通する細胞内刺激伝達経路に関わる蛋白がどのような変化がもたらされるのかを検討することで耐性獲得のメカニズムの解明を図る(*in vitro*)。

[方法]

実験 1) ラットに LPS または低毒性の lipid A 誘導體である ER-803058 (ER) による前処置をして、後に致死量の LPS を投与し、生存率および血漿中のサイトカイン濃度を測定した。

実験 2) 培養細胞 (mouse macrophage like cell line: RAW 264 cell) に対して TLR2, TLR3, TLR4, TLR9 の各刺激薬で前処理を行った後に、LPS で刺激し、TNF- α および NO を測定した。

実験 3) RAW 264 cell に対して TLR2, TLR3, TLR4, TLR9 の各刺激薬で刺激し、細胞質内の刺激伝達物質として重要な Interleukin-1 receptor associated kinase (IRAK) の蛋白レベルを測定した。

[結果]

実験 1) LPS 0.02 mg/kg/bw による前処置をした群は、対照群において全例が死亡する致死量 (25 mg/rat) の LPS を投与した場合、70% が生存した。同じ濃度の ER にて前処置をした群では、その毒性 (生物活性) が低い (図 1) にもかかわらず 90% が生存した (図 2)。また、致死量 LPS 投与 2 時間後の血漿中の TNF- α 濃度を比較すると、対照群と比較して LPS 群では有意に抑制されていたのに対し、ER 群では低値を示す傾向にはあったが、統計学的有意差は見られず抑制の程度は軽いことが示唆された。(図 3)

実験 2) TLR2, TLR 4, TLR 9 の前処理によって一部の例外 (TLR2 の刺激の一部で、高濃度刺激をした場合抑制されなかった) を除いて TNF- α の産生が抑制された。また、TLR 3, TLR 4, TLR 9 の前処理によって NO の産生が抑制された。

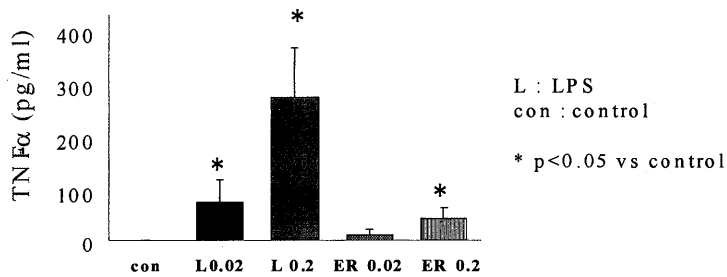


図 1

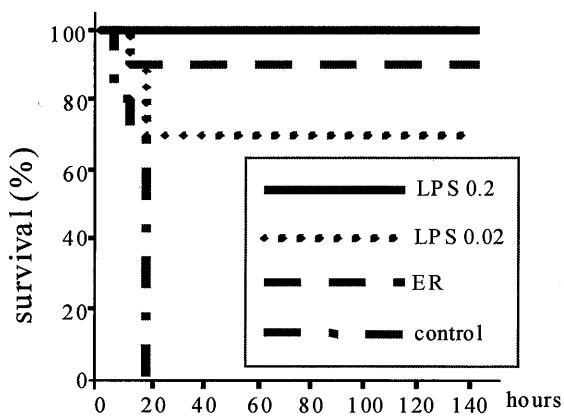


図 2

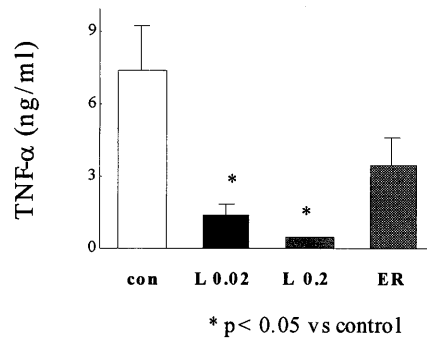


図 3

実験 3) TLR2, TLR 4, TLR 9 の刺激によって IRAK-1 および IRAK-4 の down regulation が見られた (図 4). IRAK-4 の down regulation は IRAK-1 よりも遅れて見られた. また, IRAK-4 mRNA の発現には変化が見られず, 分解産物と考えられる band の出現すること, およびこの現象が蛋白分解酵素阻害薬, NF-κB 阻害薬などによって阻害されることが示された.

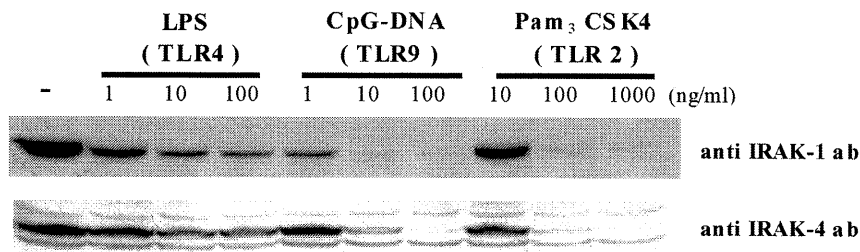


図 4

[考察]

1) ER は毒性が低いにも関わらず, 前処置に用いると致死量の LPS 投与に対しても高い抵抗性を示した. この結果はこの低毒性である lipid A 誘導体によっても endotoxin tolerance の誘導がなされたことを示している. また, この際に TNF-α の産生は LPS の前処置と比較するとその抑制は軽度であった. すなわち耐性誘導後の免疫反応の低下は軽度であり, tolerance を誘導する薬剤とし

て LPS より優れている可能性があることを示している。

2) TLR2, TLR4, TLR9 が刺激されると、そのシグナルはアダプター分子 MyD88 を介する経路 (MyD88-dependent pathway) を経て、NF- κ B などの転写因子が活性化され TNF- α などの炎症性サイトカインが産生される。また、TLR3 と TLR4 の刺激は TRIF を介する経路にて、Interferon の活性化を誘導し、NO の産生に影響を与えると考えられる。また、一部の TLR9 刺激が Interferon を誘導するという報告もある。実験 2 においてシグナル伝達を共有する TLR 間では概ね cross tolerance が成立した。すなわち LPS 以外の薬剤によっても LPS 刺激に対して耐性誘導がなされることが示唆された。

3) 実験 2. の結果から、cross tolerance のメカニズム解明にはシグナル伝達に関与するそれぞれの mediator の及ぼす影響などを含めた更なる研究が必要であると考え、細胞質内の刺激伝達物質として重要な IRAK の蛋白レベルを測定し、その結果 IRAK-4 の down regulation という新しい知見が得られた。この現象は TLR2, TLR4, TLR9 刺激によって引き起こされ TLR3 刺激では見られなかった。すなわち MyD88-dependent pathway が関与することを示唆している。また、刺激によっても IRAK-4 mRNA レベルに変化が見られなかった点と、刺激によって分解産物と思われる小さい分子量の蛋白が出現したことから、この現象は IRAK-4 の産生抑制ではなく分解によって見られると考えられる。さらに、MyD88-dependent pathway において IRAK-4 よりも下流に位置すると考えられる IRAK-1 の活性化よりも遅れて IRAK-4 の分解が見られる点から IRAK-1 の活性化の後に feedback として起きている可能性を検討した。その結果、蛋白合成阻害剤と NF- κ B 阻害剤は、ともに IRAK-4 蛋白の減少を抑制することが示され、IRAK-1 活性化の下流で起きる NF- κ B の活性化およびタンパク合成が IRAK-4 蛋白の減少に関係していることが示唆された。IRAK-4 は TLR signaling において必須と考えられている。従って刺激に応じて IRAK-4 蛋白の分解が起きてその機能を失うことになれば、TLR signaling は阻害されることを意味する。すなわちこれは前章で示した TLR2, TLR4, TLR9 刺激によっておきる tolerance に関係しているものと考えられる。

[結論]

- 1) ラットに ER-803058 による前処置をすると致死量 LPS に対して、免疫反応の過度な抑制をせずに高い抵抗性をもたらした。
- 2) シグナル伝達経路を共有する TLR 間では概ね cross tolerance が成立した。すなわち LPS 以外の薬剤を用いても LPS 刺激に対して耐性誘導がなされることが示唆された。
- 3) 長時間の TLR 刺激によって、TLR シグナル伝達に重要であると考えられている IRAK-4 が分解されることを見出し、これが cross tolerance に寄与する可能性を示した。