

論文の内容の要旨

論文題目 The Analysis of the Role of Lipopolysaccharide (LPS) Signaling Molecules in the Molecular Action of LPS on the Plasma Membrane of Living Cell

和訳 Lipopolysaccharide (LPS)シグナル伝達分子が細胞膜における LPS の分子挙動に与える影響に関する解析

指導教員 松島 綱治 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

社会医学専攻

氏名 サミア ショウカット

グラム陰性桿菌の細胞壁外膜の構成物質である Lipopolysaccharide (LPS)は、宿主細胞に強い炎症反応を惹起する作用を持ち、グラム陰性桿菌による敗血症における全身性の炎症および臓器障害を発生させる主な起因物質であると考えられている。これまで、LPS に関する研究は数多く行われてきているが、LPS が宿主細胞の表面でいかなる分子挙動をとるかについては、全く知られていなかった。そこで、本研究では、生きた細胞の細胞膜における分子の動きを 1 分子レベルでリアルタイムに観察可能な全反射レーザー顕微鏡を用いて、*E.coli* 055:B5 由来の Alexa594 蛍光標識した LPS 20ng/ml をリコンビナント・マウス LPS Binding Protein (LBP) 1000ng/ml とともに培養したマウス腹腔マクロファージに投与し、LPS 投与後 5-15 分、25-35 分、55-65 分のマクロファージ細胞膜における LPS の分子挙動を観察し、その結果を解析した。さらに、LPS が宿主細胞の細胞膜に結合するために必要とされている LBP および CD14 のマクロファージ細胞膜における LPS の分子挙動への関わりを調べるために、LBP

非存在下での wild-type マウスのマクロファージ細胞膜における LPS の分子挙動と CD14 遺伝子欠損マウスから採取した腹腔マクロファージの細胞膜における LPS の分子挙動を観察した。次に、LPS が宿主細胞を刺激し炎症反応を惹起するうえで重要な働きをしている LPS 受容体である Toll-like 受容体 4 (TLR4) とそのアダプター分子である Myeloid Differentiation Protein-2 (MD2) および TLR4 の細胞内ドメインに結合し LPS の刺激を下流に伝達するシグナル分子である Myeloid Differentiation Factor 88 (MyD88) と TIR-Domain-Containing Adapter-Inducing IFN-beta (TRIF) が LPS のマクロファージ細胞膜における分子挙動にいかに関与しているかを調べるために、TLR4、MD2、MyD88 および TRIF 各々の遺伝子欠損マウスの腹腔マクロファージの細胞膜における LPS の分子挙動を観察し解析した。また、細胞膜に結合した LPS は細胞内に取り込まれ (LPS internalization) ゴルジ体へ集積することが知られているため、上記の各遺伝子欠損マウスの腹腔マクロファージにおける Alexa594 蛍光標識 LPS の internalization の wild-type 腹腔マクロファージとの差異を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

結果として、まず wild-type マウスの腹腔マクロファージ細胞膜では、LPS 投与後に時間依存的に Alexa594 蛍光標識 LPS の輝度が高い蛍光点が出現し、全ての輝点における輝度の平均値も LPS 投与後 5-15 分および 25-35 分に対して LPS 投与後 55-65 分で有意に増加 ($p<0.01$) していた。このことから、マクロファージ細胞膜に結合した LPS は、時間依存的に凝集体 (oligomer) を形成するものと考えられた。また、細胞膜上における LPS の運動速度を Alexa594 蛍光標識 LPS の輝点の拡散係数をもとに解析した結果、時間依存的に動きの遅い輝点が出現し、全ての輝点における拡散係数の対数の平均値も LPS 投与後 5-15 分に対して時間依存的に有意な低下 (25-35 分: $p<0.05$ 、55-65 分: $p<0.01$) を認めた。

一方で、LBP 非存在下の wild-type マウスの腹腔マクロファージおよび CD14 遺伝子欠損マウスの腹腔マクロファージにおいては、全反射レーザー顕微鏡による観察ではマクロファージ細胞膜における LPS の結合および運動をしめす輝点を全く認めず、この結果は LBP および CD14 が LPS の宿主細胞の細胞膜への結合に不可欠な分子であるというこれまでの知見を初めて生きた細胞においてリアルタイムな観察により証明することができた。

次に、TLR4、MD2、MyD88 および TRIF 各々の遺伝子欠損マウス

の腹腔マクロファージの細胞膜における LPS の分子挙動の観察にもとづく解析の結果、いずれの遺伝子欠損マクロファージにおいても、wild-type のマクロファージとは異なり、輝度の高い輝点の出現は認められず、LPS 投与後 55–65 分の全ての輝点における輝度の平均値も wild-type のマクロファージに対して有意に低値 ($p < 0.01$) であった。この傾向は TLR4 遺伝子欠損マクロファージおよび MD2 遺伝子欠損マクロファージにおいて特に顕著であり、両者とも MyD88 および TRIF 遺伝子欠損マクロファージに対しても LPS 投与後 55–65 分の輝度の平均値が有意に低下 ($p < 0.01$) していた。他方で、細胞膜における LPS の運動速度については、TLR4、MD2、MyD88 および TRIF 各々の遺伝子欠損マクロファージにおいて wild-type マクロファージと対比して拡散係数の小さな輝点の出現が少なく、LPS 投与後 55–65 分の全ての輝点における拡散係数の対数の平均値は、いずれの遺伝子欠損マクロファージについても wild-type マクロファージに対して有意に高値 ($p < 0.01$) を示した。この傾向は MyD88 遺伝子欠損マクロファージおよび TRIF 遺伝子欠損マクロファージにおいて特に顕著であり、MyD88 遺伝子欠損マクロファージでは TLR4 および MD2 遺伝子欠損マクロファージに対しても LPS 投与後 55–65 分における拡散係数の対数の平均値が有意に高かった ($p < 0.01$)。なお、共焦点レーザー顕微鏡による LPS internalization に関する検討では、wild-type 腹腔マクロファージと TLR4、MD2、MyD88 および TRIF 各々の遺伝子欠損腹腔マクロファージの間に明らかな変化は認められなかった。

本研究の結果から、通常の腹腔マクロファージにおいては、LPS は細胞膜に結合した後、時間依存的に運動速度が低下した LPS 分子が出現し、かつ一部は凝集体を形成することが示された。さらに、このマクロファージ細胞膜における LPS の運動速度の低下と凝集体形成には、LPS 受容体である TLR4 とそのアダプター分子である MD2 および LPS 刺激のシグナル分子である MyD88 と TRIF が、強く関与していることが明らかとなった。特に、LPS の細胞膜上での凝集体形成には細胞膜表面に発現されている分子である TLR4 と MD2 が強く関与しており、一方で細胞膜における LPS の運動速度低下には細胞内に存在するシグナル伝達分子である MyD88 および TRIF が強く関わっていた。全反射レーザー顕微鏡を用いた細胞のリアルタイム観察にもとづく本研究により、グラム陰性桿菌感染における敗血症の重要な起因物質である LPS の宿主細胞における細胞膜での分子挙

動と、その分子挙動への **LPS** 受容体および細胞内シグナル伝達分子の関わりを、初めて明らかにすることができた。本研究で示した細胞膜における **LPS** の分子挙動と **LPS** の宿主細胞に対する炎症惹起機序との関係については更なる検討を必要とするが、本研究は今後の **LPS** に関する研究に有意義な知見を提示できたものとする。