

学位論文題名

Lipopolysaccharide(LPS)が惹起するHepG2における
LPS-binding protein(LBP)の産生機構およびLBP
ファミリーの構造と機能についての研究

学位論文内容の要旨

序論

1. LPSが惹起するヒト培養肝細胞HepG2におけるLBP産生機構について: LPS(リポ多糖)はグラム陰性菌外膜の主要構成成分の一つであり、感染によって血中に侵入した細菌の外膜から遊離したLPSは、重篤な炎症反応を引き起こす。これまでの研究から、この反応機構には主にCD14およびLBPの2つのタンパク質が関与することが明らかとなっている。CD14は単球やマクロファージ系細胞の分化抗原として知られる分子量55 KのGPIアンカー型タンパク質であり、LPSレセプターとして機能する。またLBPは分子量60 Kの血漿タンパク質で、LPS-LBP複合体を形成後LPSを速やかにCD14へ運搬する。その結果、細胞内情報伝達が生じ、TNF- α やIL-1, 6などの炎症性サイトカインが放出される。

LBPは炎症時に肝細胞での産生が著しく亢進する急性期タンパク質としても知られている。その産生機構として、LPS-LBP刺激によりマクロファージから放出された炎症性サイトカインが肝細胞に作用してLBPの産生を促進するというモデルが示唆されているが、その詳細は不明である。筆者は、LPS-LBPが肝細胞を直接刺激することで、迅速なLBP産生が生じるという機構を想定した。そして、この機構の有無を検証する目的で種々の解析を行った結果、得られた知見を1に示す。

2. LBPおよびBPIの分子内遊離SH基がLPS結合活性に及ぼす影響について: LBPと同じファミリーに属するBactericidal/permeability-increasing protein(BPI)は、グラム陰性菌に特異的な抗菌タンパク質(分子量55 K)であり、好中球の脱顆粒反応により体液中に放出される。ヒトLBPとBPIは一次構造上45%の相同性を示し、いずれもLPS結合部位近傍に遊離SH基を1個保持することが知られている(LBP: Cys-61およびBPI: Cys-132)。また、BPIのLPSに対する親和性(Kd=10 nM)はLBPより10倍高いことが報告されている。そこで、筆者はLBPとBPIのLPSに対するKdの違いが遊離SH基の位置の違いに起因する可能性を考えた。そして、この機構の詳細を明らかにする目的で解析を行った結果、得られた知見を2に示す。

結果および考察

1. LPSが惹起するヒト培養肝細胞HepG2におけるLBP産生機構について

1) HepG2におけるCD14の発現: 抗CD14モノクローナル抗体を用いてHepG2のフローサイトメトリー解析、およびHepG2由来のtotal RNAを用いたRT-PCRを行った結果、HepG2におけるCD14の発現が認められ、また、PI-PLC処理によりこれがGPIアンカー型であることが示された。さらに、HepG2に対するLBP依存的なFITC-LPSの結合活性が認められた。

2) LPS-LBP刺激したHepG2におけるLBP産生とCD14発現の解析: HepG2をLPSとLBPを含む無血清培地中で37°Cで1時間刺激し、PBSで洗浄後、何も含まない無血清培地中で種々の時間培養し、培養上清中のLBP産生をCHO-CD14とFITC-LPSを用いたLBP assayで、またHepG2のCD14発現量を1)に示したフローサイトメトリー解析で測定した。また、HepG2

由来 total RNA を用いた半定量的 RT-PCR により、LBP および CD14 mRNA 発現を解析した。その結果、LPS-LBP は HepG2 を有為に活性化し、LBP 産生と CD14 発現を亢進することが明らかになった。また抗 CD14 モノクローナル抗体を用いた解析から、LPS-LBP 刺激による HepG2 の活性化は CD14 依存的であることが示された。

3) HepG2 に対する LPS-LBP の priming の効果 : 2) に示した方法で、HepG2 を LPS-LBP 刺激(priming)した後、さらに IL-6 と TNF- α を含む無血清培地中で培養し、LBP 産生および CD14 発現を解析した。その結果、LPS-LBP で priming した HepG2 をさらにサイトカインで刺激することで、LPS-LBP あるいはサイトカイン単独刺激と比較して、HepG2 の活性化が増強することが示された。

以上の結果、LPS が惹起する肝細胞での LBP 産生機構として、(1) LPS-LBP が CD14 を介して肝細胞を活性化し、LBP 産生および CD14 発現を亢進する、(2) 産生された LBP および CD14 は肝細胞およびマクロファージの活性化をさらに亢進する、(3) LPS-LBP で priming された肝細胞は、活性化マクロファージが産生する炎症性サイトカインでさらに刺激され、LBP 産生と CD14 発現が劇的に増強する、というカスケード機構が示された。

2. LBP および BPI の分子内遊離 SH 基が LPS 結合活性におよぼす影響について

1) 各変異体の CHO-K1 細胞での発現と精製 : LBP および BPI の遊離 Cys を Ser または Ala に置換した変異体(LBP-C61S, BPI-C132A), またはそれぞれの遊離 Cys の位置を交換した変異体(LBP-C61S/A132C, BPI-F61C/C132A)の cDNA を作製した。これらを、発現ベクターに連結後、CHO-K1 細胞に形質導入し、得られた細胞株の培養上清から各変異体を精製し、以降の解析に用いた。

2) LBP および BPI 変異体を用いた LPS 結合活性の比較 : カプトガニ血球由来の LPS 感受性セリンプロテアーゼ前駆体 Factor C を用いた測定系により各変異体の LPS 結合活性を比較した。その結果、LBP-C61S および BPI-C132A の LPS 結合活性は、wild-type (wt) と比較してそれぞれ約 1/10 と 1/2 に低下した。一方、LBP-C61S/A132C および BPI-F61C/C132A の活性は、それぞれ wt と同程度であった。

3) 蛍光偏光法を用いた各変異体と FITC-LPS との結合速度の解析 : 各変異体を FITC-LPS と共に 37°C で反応し、蛍光偏光度の経時的変化を Beacon 2200 を用いて解析した。その結果、LBP 変異体については顕著な違いは認められなかったが、BPI は LBP と比較して迅速な LPS 結合性を示し、さらに BPI-C132A と BPI-F61C/C132A が緩慢な性質に変化した。

4) LBP 変異体の LBP 活性および BPI 変異体の抗菌活性の比較 : LBP の LBP 活性および BPI の抗菌活性に対する遊離 SH 基の影響を検討した結果、LBP と BPI のいずれにおいても、LPS と結合した後に示す機能には遊離 Cys は関与しないことが明らかになった。

まとめ

筆者は本研究により以下のことを明らかにした。

1) について

1. これまで単球やマクロファージ系細胞にのみ発現が認められていた CD14 が HepG2 においても発現しており、これが GPI アンカー型であることをはじめて明らかにした。
2. LPS-LBP は CD14 を介して HepG2 を強力に刺激し、LBP 産生と CD14 発現を促進した。
3. LPS-LBP で priming した HepG2 をさらにサイトカイン刺激することにより、HepG2 における LBP 産生と CD14 発現の亢進が増強することが示された。

2) について

1. LBP と BPI の分子内遊離 Cys は LPS との結合活性に関与しており、その影響は LBP の分子内遊離 Cys の方が大きいことが示された。また、位置は重要ではないことが示唆された。
2. BPI の示す迅速な LPS 結合活性に分子内遊離 Cys が関与しており、その位置も重要であることが示唆された。
3. LPS と複合体を形成した後の LBP の CD14 への LPS 運搬活性、および BPI の抗菌活性には分子内遊離 Cys は関与しないことが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 澤 滋 治
副 査 教 授 野 村 靖 幸
副 査 助 教 授 高 橋 和 彦
副 査 助 教 授 大 熊 康 修

学位論文題名

Lipopolysaccharide(LPS) が惹起する HepG2 における LPS-binding protein(LBP) の産生機構および LBP ファミリーの構造と機能についての研究

LPSは大腸菌やサルモネラ菌に代表されるグラム陰性菌外膜の主要な構成成分の一つであり、生体に侵入したグラム陰性菌から遊離したLPSは血液凝固反応や多臓器機能不全、発熱反応に代表される炎症反応を惹起し、重篤な場合は敗血症を誘発して死にいたらしめる場合もある。

このLPSが惹起する炎症反応は、LPSが血漿蛋白質LBPと複合体を形成し、マクロファージのLPS受容体, CD14,に結合することにより開始される。LPS刺激を受けたマクロファージから各種のサイトカインが遊離され、炎症を惹起する。LBPは炎症時に血中濃度が上昇する急性期蛋白質であり、その機構はマクロファージ由来のサイトカインが肝細胞を刺激することによると考えられてきた。

本博士論文の前半部は、肝培養細胞HepG2を用いたLPSの炎症惹起機構に関する解析結果であり、以下のような成果を挙げている。

- 1 ; LPS受容体のCD14がマクロファージ以外にも肝細胞にも発現していること。
- 2 ; LPSはLBP複合体としてHepG2を強力に刺激し、LBP産生とCD14発現を亢進させた。
- 3 ; LPS-LBPで前刺激したHepG2をサイトカイン刺激すると、HepG2におけるLBP産生とCD14発現が急激に亢進すること。

これらの知見は、LPSの作用機構として、マクロファージを介さない直接的な肝細胞活性化を提唱するものであり、極めて独自性の高い研究成果といえる。

本論文の後半部は、LBPと同様にLPS結合活性を示す白血球内蛋白質,BPI,とLBPとの構造・機能の相違に関する解析結果であり、以下のような研究成果を挙げた。

- 1 ; LBPおよびBPIの分子内遊離Cys残基はLPSに対する結合活性に関与しており、その影響はLBPの方が大きい。
- 2 ; BPIはLBPと比較して迅速なLBP結合活性を示し、この迅速な結合活性に分子内遊離SH基が関与している。
- 3 ; LPS-LBP複合体を形成した後のLBPのCD14へのLPS運搬活性には、分子内Cys残基は関与しない。
- 4 ; BPIは抗菌活性があるが、この活性には遊離SH基は関与しない。

上記の研究成果は、LPSによる種々の炎症応答を制御する医薬品の開発研究に有力な手がかりを与えうるものであり、博士（薬学）の学位に値する業績と評価した。