

学 位 論 文 題 名

Comparison of biological activities of mycoplasmal
diacylated lipopeptide with those of *Escherichia coli*
lipopolysaccharide and its active entity, lipid A

（微生物由来リポペプチドとリピドAの歯肉線維芽細胞および
マクロファージ活性化能の比較）

学位論文内容の要旨

【目的】 *M. salivarium* はヒト正常歯肉線維芽細胞（HGF）とマクロファージを活性化し、Interleukin-6 (IL-6)、IL-8 など炎症性サイトカインの産生、ならびに細胞間接着分子 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) の発現を誘導することが報告されており、その活性部位は *M. salivarium* の細胞膜に結合しているリポタンパク質にあることが明らかとなっている。そのリポタンパク質の中でも特に活性化能の強い分子量 44kDa のリポタンパク質の活性部位は N 末端リポペプチド部分であり、その構造は S-(2,3-bisacyloxypropyl)CGD-PKHPKSFTIEWVD-である。本研究ではその構造をもとに合成したリポペプチド S-(2,3-bisacyloxypropyl)CGDPKHPKSF (FSL-1)ならびに大腸菌の細胞壁に存在するリポ多糖体 (LPS) およびその活性部位であるリピド A を用い、それぞれの HGF とマクロファージに対する活性化能を比較、検討した。

【方法】 HGF は 10% ウシ胎児血清 (FBS)、100 units/ml penicillin G ならびに 100 µg/ml streptomycin を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) でコンフルエントに達するまで培養した。マクロファージ系細胞株である THP-1、U937 および HL-60 細胞は 10%FBS、100 units/ml penicillin G ならびに 100 µg/ml streptomycin を含む RPMI-1640 培地で培養した。末梢血単核球 (PBMC) はヒト末梢血を採取し Ficoll-Paque を用いて遠心分離した。

活性化能の指標として HGF では IL-6 を、THP-1、U937、HL-60 ならびに PBMC では TNF-α を用い、測定法は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法を用いた。

細胞表面の Toll-like receptor 2 (TLR2)、TLR4 の発現は Phycoerythrin で標識した TLR2、TLR4 それぞれに対する抗体を用い、フローサイトメトリーにより測定した。

TLR4 の co-receptor である MD-2、また TLR の細胞内のシグナル伝達において重要なアダプター分子である MyD88 の mRNA 発現量の測定は RT-PCR 法により行った。

【結果】HGF および THP-1 細胞において FSL-1、大腸菌 LPS 刺激により濃度依存性に活性化されることが確認された。その活性化のレベルを比較したところ、HGF においては FSL-1 に比べ LPS の方が高い活性化能を有していたが、THP-1 細胞においては FSL-1 の活性化能の方が高いことが確認された。しかしながら正確に両者の活性化能を比較するためには両者をモル濃度で表す必要があり、溶液状態での LPS はモル濃度で表すことが出来ないため正確に両者を比較することは不可能であった。そこで、LPS の活性部位として知られているリピド A の構造をもとに合成した大腸菌型合成リピド A (compound 506) を用いて FSL-1 と比較することとした。LPS の場合と同じように、FSL-1 とリピド A で HGF を刺激し、産生される IL-6 の量を測定したところ、FSL-1 で刺激した場合には IL-6 の産生が確認されたが、リピド A で刺激した場合にはほとんど IL-6 の産生は見られなかった。

次に FSL-1 とリピド A によるマクロファージ系細胞の活性化を調べるために THP-1、U937、HL-60 細胞に protein kinase C の活性化させる働きのある Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) による前処理を行った後、FSL-1 とリピド A による刺激を行い、産生される TNF- α の量を測定した結果、3 種の細胞全てにおいて PMA 前処理により FSL-1 による TNF- α の産生が増強されることが確認され、U937 細胞においては PMA 処理によりリピド A の活性化能にも増強が見られることが確認された。

マクロファージ系細胞株における PMA 処理によるサイトカイン産生の増加が細胞表面の TLR2、TLR4 の発現と関係している可能性を考え、PMA による前処理が細胞表面における TLR2、TLR4 の発現にどのように影響をしているかを調べたところ、すべての細胞において PMA 未処理の場合でも TLR2、TLR4 とともに発現していることが確認され、その発現量が PMA 処理により増強されていることが分かった。mRNA レベルでの MD-2、MyD88 の発現を RT-PCR により調べたところ、MD-2 の発現は THP-1 細胞での発現がほかの細胞に比べ低いことが確認されたが、HL-60 細胞ではほぼ正常に発現していた。また、MyD88 の 3 種の細胞において発現量はほぼ同程度であった。これらの結果から PMA 処理により FSL-1 刺激による活性化能が増強されたことは説明可能であったが、U937 細胞において PMA 処理によりリピド A 刺激による活性化能にも増強が見られた原因については説明不可能であった。

次に、実験系における血清中に含まれる可溶性 CD14 が両者の活性化能に与える影響を考え、U937 細胞に対し、種々の濃度の血清を含んだ培地中で FSL-1、リピド A による刺激を行い、産生される TNF- α 量を測定した。その結果、PMA で処理した細胞において血清濃度依存性にリピド A による活性化が増強されることが確認された。一方それに対し、FSL-1 で刺激した場合には血清濃度が増加するとサイトカイン産生量が減少する傾向が見られた。

より生体内の状況に近い状態での比較を考え、PBMC に対して FSL-1、リピド A で刺激

した場合にはリピド A による活性が FSL-1 を上回っており、両者の活性化能は血清濃度に依存して増加していた。

本研究により、確立された単一の細胞株を用いた場合、FSL-1 は強い活性化能を示したが、リピド A はほとんど活性化能を持たないが、種々の細胞が含まれる PBMC を用いた場合にはリピド A の方が FSL-1 よりも活性化能が高くなることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 柴 田 健一郎
副 査 教 授 田 村 正 人
副 査 教 授 森 田 学
副 査 講 師 齋 藤 正 恭

学 位 論 文 題 名

Comparison of biological activities of mycoplasmal diacylated lipopeptide with those of *Escherichia coli* lipopolysaccharide and its active entity, lipid A

(微生物由来リポペプチドとリピドAの菌肉線維芽細胞および
マクロファージ活性化能の比較)

【提出論文の要旨】

我々はこれまでに *M. salivarium* がヒト正常歯肉線維芽細胞 (HGF) とマクロファージを活性化し、その活性物質は細胞膜に結合しているリポタンパク質であることを明かにした。また、特に活性化能の強い分子量 44kDa のリポタンパク質(LP44)を精製し、その活性部位である N 末端リポペプチド部分の構造を決定し、さらに、その構造に基づきリポペプチド S-(2,3- bisacyloxypropyl)CGDPKHPKSF (FSL-1)を合成した。

本研究では、FSL-1、大腸菌リポ多糖体 (LPS) およびその活性部位であるリピド A の HGF とマクロファージに対する活性化能を比較した。

HGF は DMEM (10% fetal bovine serum (FBS), 100 unit/ml Penicillin G、100 µg/ml streptomycin 含有)で、THP-1、U937 および HL-60 細胞は RPMI-1640 (10% FBS, 100 unit/ml Penicillin G、100 µg/ml streptomycin 含有)で培養した。末梢血単核球 (PBMC) はヒト末梢血を Ficoll-Paque を用いて遠心分離した。

活性化能は、HGF では IL-6 を、THP-1、U937、HL-60 ならびに PBMC では TNF-α を指標とし、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法で測定した。

細胞表面の Toll-like receptor 2 (TLR2)ならびに TLR4 の発現はフローサイトメトリーにより測定した。

TLR4 の co-receptor である MD-2、また TLR の細胞内のシグナル伝達において重要なア

アダプター分子である MyD88 の mRNA 発現量は RT-PCR 法で測定した。

HGF および THP-1 細胞は FSL-1、大腸菌 LPS 刺激により濃度依存的に活性化され、そのレベルは HGF では FSL-1 に比べ LPS の方が高かったが、THP-1 細胞では FSL-1 の活性化能が高かった。しかしながら、溶液状態での LPS はモル濃度で表すことが出来ないため正確に両者の活性を比較することは不可能である。そこで、LPS の活性部位として知られているリポド A 領域の構造をもとに合成したリポド A を用いて FSL-1 と比較したところ、FSL-1 で刺激した場合には HGF では IL-6 の産生が、また、THP-1 細胞では TNF- α の産生が確認されたが、リポド A ではほとんどこれらの産生が見られなかった。

次に、FSL-1 ならびにリポド A のマクロファージ系細胞に対する活性化能を調べるために THP-1 細胞以外に U937 ならびに HL-60 細胞を用いた。これらの細胞を protein kinase C の活性化剤である phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で前処理した後、FSL-1 とリポド A で刺激し、産生された TNF- α の量を測定した。その結果、3 種の細胞全てにおいて PMA 前処理により FSL-1 の活性化能の増強がみられたが、リポド A の活性化能の増強は U937 細胞以外ではみられなかった。

マクロファージ系細胞株の PMA 処理の細胞表面の TLR2 ならびに TLR4 の発現に及ぼす影響を調べたところ、それらの発現は共に PMA 処理により増強された。mRNA レベルでの MD-2 ならびに MyD88 の発現を RT-PCR により調べたところ、MD-2 の発現は THP-1 細胞での発現が低かったが、HL-60 ならびに U-937 細胞ではほぼ正常であった。また、MyD88 の発現量は 3 種の細胞すべてでほぼ同程度であった。これらの結果から、PMA 処理により FSL-1 刺激による活性化能の増強は TLR の発現の増強で部分的には説明可能であったが、HL-60 細胞において PMA 処理により、TLR4 の発現が増強されているにも拘わらず、リポド A の活性化能の増強が見られなかった原因については説明できなかった。そこで、実験系に用いた血清中に含まれる可溶性 CD14 が両者の活性化能に与える影響を考え、U937 細胞に対して、種々の濃度の血清を含んだ培地中で FSL-1、リポド A による刺激を行い、産生される TNF- α 量を測定した。その結果、PMA で処理した細胞において血清濃度依存性にリポド A による活性化が増強されることが確認されたが、FSL-1 で刺激した場合には血清濃度が増加するとサイトカイン産生量が減少する現象が見られた。この現象は *M. salivarium* が殆どの人の口腔に常在し、LP44 に対する抗体の影響ではないかと推測している。

より生体内の状況に近い状態での生物活性を比較するために、PBMC を FSL-1 ならびにリポド A で刺激した。その結果、リポド A の活性化能が FSL-1 のそれを上回っており、また、両者の活性化能は血清濃度に依存して増加することがわかった。

以上の結果から、FSL-1 は確立された単一の単球系細胞株に対しては LPS より強い活性

化能を示し、種々の細胞が含まれる PBMC に対してはリポド A が FSL-1 より活性化能を示すことが示唆された。

審査委員からの質問として、

- 1) ジアシルリポペプチド FSL-1 の合成方法について
- 2) *M. salivalium* とヒト歯肉線維芽細胞との直接的な関連の有無について
- 3) PMA による処理方法について
- 4) マクロファージ系の細胞株間にも FSL-1、リポド A による活性化に差があることの理由について
- 5) LPS による刺激ではサイトカインの産生が見られたのに対し、リポド A の場合ではほとんど見られなかったことの理由等についての質問があったが、論文提出者はそれぞれに的確に解答した。

これまで、細菌のもつ内毒素 LPS は毒素としてだけでなく、人の免疫力を上げるアジュバントとしての研究もなされてきたが、その毒性のために人体への応用はなされていない。本研究結果は、微生物由来リポタンパク質ならびにリポペプチドが LPS と同様な生物活性を有していることを明らかにしただけでなく、その生物活性が標的細胞によっては LPS よりも強く、また、PBMC に対しては毒性は低いことを示唆していることから、リポタンパク質ならびにリポペプチドのアジュバントとしての可能性をも示唆するものであり、臨床応用の面でも評価できる内容である。

よって、学位申請者は博士(歯学)の学位授与に値するものと判断し、主査ならびに副査は合格と判定した。