

論文の内容の要旨

論文題目 **LPS に誘導される炎症を抑制する新規化合物ペド
ペプチン、オギペプチンの発見と作用機序の解析**

氏名 中島（上妻） 志保

Lipopolysaccharide (LPS) に代表されるエンドトキシンは、自然免疫システムを刺激し、炎症反応を惹起する。LPS は、感染を伴う敗血症などの病態において、その引き金や増悪因子となる。敗血症ショックの死亡率は未だ高いことが問題であり、新しい治療薬のニーズは依然高い。そこで我々は、微生物培養サンプルより、LPS に誘導される炎症を抑制する化合物の探索をおこなった。

LPS は可溶性 cluster of differentiation 14 (sCD14) あるいは細胞膜上に glycosylphosphatidylinositol でアンカリングされた膜型 CD14 (mCD14) を介して、細胞膜上の Toll-like receptor 4 (TLR4) と myeloid differentiation 2 (MD-2) の複合体に結合する。TLR4 は細胞内にシグナルドメインを有しており、アダプター分子との会合を介して細胞内にシグナルを伝達する。まず、LPS が細胞に作用するための第一段階である細胞への結合に着目し、再構築系で各分子の寄与を調べた。LPS が結合性を示さない HEK293T 細胞に、mCD14、TLR4、MD-2 を一過性に発現させ、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識した LPS の結合性を検討した。その結果、mCD14 を導入した細胞に FITC-LPS が結合性を示し、TLR4 と MD-2 の共発現による上乗せ効果は見られなかったことから、LPS と CD14 の相互作用が重要であることが示された。そこで次に、LPS 阻害剤の探索を目的として、LPS と CD14 タンパク質との相互作用を検出するアッセイ系を構築した。アッセイ系をハイスループット化することを前提に、sCD14 を用いて、*in vitro* で fluorescence resonance energy transfer (FRET) で検出する系の条件検討をおこなった。具体的には、ビオチン標識した LPS と LANCE-Europium 標識した抗 myc 抗体、myc タグを付けたヒト sCD14 とストレプトアビジン標識した XL665 の溶液を各々用意して混合し、LPS と CD14 の相互作用によって近接した LANCE-Europium と XL665 の間で生じるエネルギー遷移による蛍光を測定するのみの簡便な系とした。相互作用を検出するためには血清の添加が必要であり、ウシ血清を 2.4% 添加して用いた。蛍光が時間に依存して増加し、また、LPS 結合物質として汎用される polymyxin B (PMB) が反応を濃度依存的に阻害したことから、構築したアッセイ系が妥当なものであると確認した。

阻害剤の探索は、微生物培養液約 6 万サンプルを対象とし、384 ウェルプレートを用いてハイ

スループットスクリーニングを実施した。微生物の中には LPS 類縁物質を生産するものがあることが知られている。類縁物質による LPS 拮抗作用は、LPS 濃度が上がるほど効果が減弱するデメリットがある。よって我々は、スクリーニングヒットに対してリムルス試験をおこない、LPS 類縁物質を除外した。最終的に、2 系統の阻害化合物群を獲得した。活性に基づいて単離精製を行い、構造決定したところ、それぞれ環状デブシペプチドおよび環状ペプチドの新規化合物であり、ペドペプチン A、B、C およびオギペプチン A、B、C、D (図 I) と命名した。生産菌は新規の菌であり、*Pedobacter* sp. SANK 72003 および *Pseudoalteromonas* sp. SANK 71903 と命名した。

単離精製したペドペプチンとオギペプチンの生物活性を評価した。スクリーニングに用いた *in vitro* FRET アッセイでは、LPS と CD14 の相互作用を、ペドペプチンは 11-47 nM、オギペプチンは 4.1-6.0 nM の IC₅₀ 値で強力に阻害した。HEK293T 細胞への FITC-LPS の結合に対して、ペドペプチンは 10 μM でほぼ完全に抑制したが、オギペプチンは最大で 50% 程度の抑制にとどまった。そこで、LPS 刺激に対する細胞応答を、ペドペプチンとオギペプチンがどの程度抑制できるか調べた。細胞応答の評価には、内在性に LPS 受容体を発現する細胞株を用い、LPS 刺激により誘導されるサイトカイン産生を指標とした。具体的には、ヒト単球系細胞株 U937 細胞をマクロファージ様細胞に分化させて LPS 刺激し、産生される tumor necrosis factor-α (TNF-α) を測定した。ペドペプチンとオギペプチンは、TNF-α の産生を IC₅₀ 値がそれぞれ 0.1-0.3 μM、0.3-0.5 μM で抑制した。また、高濃度域では両化合物群ともほぼ完全に TNF-α の産生を抑制した。完全に抑制する濃度域でいずれも細胞障害活性を示さなかったことから、サイトカイン産生阻害は単なる細胞毒性によるものではないと考えられた。

ペドペプチン、オギペプチンの薬効を動物モデルで調べた。C3H/HeN マウスに LPS を静脈内投与し、血中の TNF-α の濃度上昇に対する化合物の効果を検討した。LPS 投与から 1 時間後に採血して ED₅₀ 値を求めたところ、ペドペプチンは 0.61-0.80 mg/kg、オギペプチンは 0.12-0.39 mg/kg であった。以上より、動物でも LPS の作用を抑制することがわかった。

次に、ペドペプチン、オギペプチンの作用の選択性に関して評価した。感染微生物から放出される病原体構成成分などの因子は、pathogen-associated molecular pattern molecules (PAMPs) と総称され、LPS はグラム陰性菌の細胞外膜に由来する。その他の PAMPs としては、グラム陽性菌由来のペプチドグリカンやグラム陰性菌および陽性菌由来のリポプロテインなどが挙げられ、その受容体は TLR2、TLR2/1 であることが知られる。そこで、前述の U937 細胞の系を用いて、ペプチドグリカンと、リポプロテインを模した合成リポペプチドである Pam₃CSK₄ に誘導されるサイトカインに対する化合物の抑制作用を調べた。その結果、ペドペプチン、オギペプチンは、LPS 刺激による TNF-α の産生を選択的に阻害することがわかった。

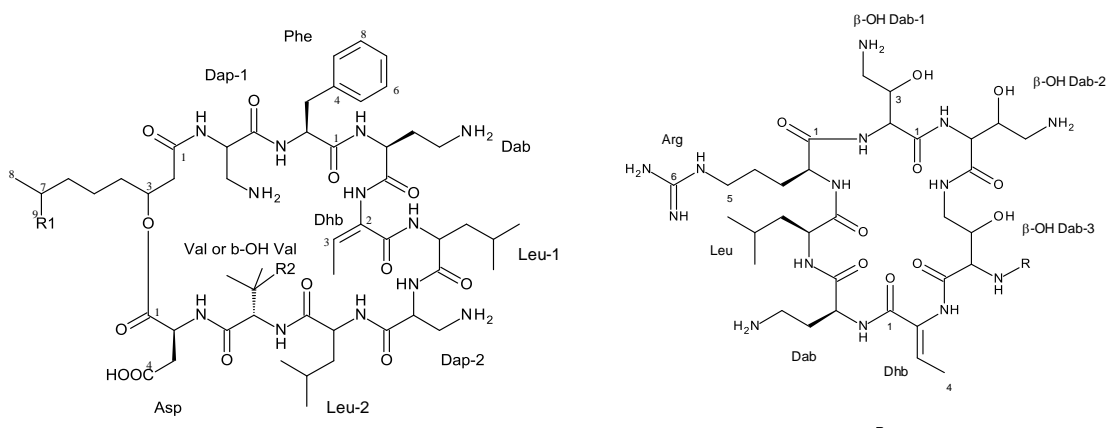
ペドペプチン、オギペプチンによる LPS 阻害の作用機序について検討した。サイトカイン産生抑制効果は LPS に選択性があることが示されたことから、LPS に対して直接結合する可能性があると考えられた。そこで、表面プラズモン共鳴法を用いて固相化した LPS に対する相互作用の有無を検討した。その結果、両化合物群とも濃度依存的なシグナル増強が検出され、LPS に直接結合することが示された。

LPS は、血清存在下では LPS binding protein (LBP) と結合しており、CD14 と相互作用する際も LPS-LBP-CD14 の複合体を形成している。そこで次に、化合物が LPS と LBP の相互作用を阻害するかどうか、*in vitro* FRET アッセイ系を構築して評価した。その結果、オギペプチンは LPS と LBP の結合を阻害するが、ペドペプチンはきわめて弱いレベルでしか阻害しないことがわかった。

LPS に結合する化合物やタンパク質、ペプチドは今までに複数報告されており、その中には細菌外膜構造を不安定化させることで抗菌活性を有するものが存在する。そこで、ペドペプチン、オギペプチンについて抗菌活性の有無を調べた。その結果、いずれも抗菌活性を示し、グラム陰性菌に対してグラム陽性菌より低濃度で増殖阻害する傾向が認められた。

以上の結果を受けて、ペドペプチンとオギペプチンについて、LPS 結合物質と構造の比較をおこなった。具体的には抗生物質 PMB、Limulus anti-LPS factor (LALF) などと、アミノ酸配列を比較した。Hoess らは、LALF の結晶構造解析によって、LALF loop (中央に 2 つの塩基性アミノ酸が位置し、陽性荷電残基と疎水性残基が交互に並ぶモチーフ) が LPS 結合領域であり、このモチーフは、LBP や PMB にも存在すると報告した(Hoess, *et al. EMBO J.* **12**, 3351-3356 (1993))。ペドペプチンとオギペプチンに関してもアミノ酸配列の比較をしたところ、両化合物群にも類似した配列があり、なかでもオギペプチンがモチーフとしての条件をより満たすと推察された。

以上のように我々は、微生物培養液よりペドペプチンおよびオギペプチンを発見、単離精製し、生物活性を明らかにした。両化合物群は、LPS に対する生物の免疫応答 (TNF- α 産生) に関しては類似の作用を示したが、LPS の結合性 (LPS の細胞への結合、LPS の LBP への結合) に関しては異なるプロファイルを示した。抗生物質としての観点からも、これら新規化合物の発見は重要な意味を持つと言える。ペプチド性の抗生物質ポリミキシン類は、近年の深刻な多剤耐性菌の蔓延に対して、最後の砦とされていた。しかし最近、ポリミキシン類に対する耐性遺伝子が同定された。そのような状況下、我々が発見したペドペプチン、オギペプチンは、LPS に誘導される炎症を抑制するのみならず、抗菌活性を有する化合物であり、医療現場でニーズの高い敗血症治療薬として有用な性質を備えていると言える。我々が提供したこれらのペプチド性抗生物質の構造や生物活性に関する知見、および LPS 阻害剤探索のストラテジーが、新たな薬剤の開発に生かされ、本研究が医療に貢献することを望む。



- | | |
|--------------|--------------------|
| pedopeptin A | $R_1=CH_3, R_2=OH$ |
| pedopeptin B | $R_1=CH_3, R_2=H$ |
| pedopeptin C | $R_1=H, R_2=OH$ |

- | | |
|-------------|--|
| ogipeptin A | |
| ogipeptin B | |
| ogipeptin C | |
| ogipeptin D | |

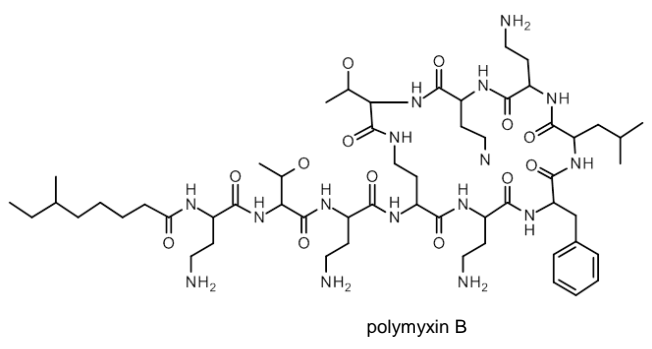


図 I ペドペプチン、オギペプチン、およびポリミキシン B (参考) の構造