

論文内容要旨

The Lipopolysaccharide Mutant Re-LPS Is a Useful Tool for Detecting LPS Contamination in Rheumatoid Synovial Cell Cultures

(LPS 変異体である Re-LPS はリウマチ滑膜細胞培養における LPS 混入の検出に有用である)

Pathobiology, 2021, in press.

主指導教員：平田 信太郎 教授
(広島大学病院 リウマチ・膠原病学)

副指導教員：服部 登 教授
(医系科学研究科 分子内科学)

副指導教員：坂口 剛正 教授
(医系科学研究科 ウイルス学)

河野 紘輝

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

(研究の背景)

Toll-like receptor (TLR)は病原体関連分子パターンを認識する受容体で、自然免疫と獲得免疫の両者を引き起こす。TLRに起因する慢性炎症と、TLRと内因性リガンドの相互作用は、関節リウマチ(RA)をはじめとした多くの疾患で重要な役割を果たしている。

すなわち、RA患者の関節滑膜にはTLR4が過剰発現していることが知られており、そのシグナルがRAの病態に深く関与することが示唆されている。一方で、TLR4関連実験ではそのリガンドであるlipopolysaccharide(LPS)の混入に細心の注意を払わなければならない。

今回、我々はRAの滑膜細胞(RSC)を用いて、自己抗原であるシトルリン化フィブリノーゲン(cit-Fb)の効果を検討したところ、TLR4を介して、T細胞遊走ケモカインであるC-X-C motif chemokine ligand 10(CXCL10)の産生が誘導された。しかし、この効果はcit-Fb試薬に混入したLPSの影響であることが判明した。一方、混入したLPSによるCXCL10産生は、LPSの変異体であるRe-LPSにより完全に抑制されることを偶発的に見出した。このRe-LPSの抑制作用は、培養実験のLPS混入を簡便に検出する方法として有用かもしれない。そこで、本研究では、LPSおよびLPSの混入したcit-Fb試薬を用いて、RSCならびに健常人末梢血単球(PBMs)のサイトカイン産生に対するRe-LPSの効果を検討した。

(方法と結果)

RA患者の人工関節置換術時に得られた関節滑膜をコラゲナーゼ処理し、デッシュ付着細胞をRA滑膜細胞(RSC)として実験に使用した。まず、RSCにおけるcit-Fbのサイトカイン発現効果を遺伝子発現は定量的RT-PCR(qPCR)、蛋白発現はELISA法により評価した。RSCをcit-Fb試薬で刺激するとIFN β を介してCXCL10の発現が強く誘導され、その効果は濃度依存的であった。また、siRNA-TLR4でRSCのTLR4をノックダウンするとCXCL10とIFN β 発現は阻害され、cit-FbによるCXCL10の発現誘導はTLR4シグナルを介することが判明した。TLR4のシグナルは微量のLPSの混入によって影響をうけるため、LPSの中和活性を有するポリミキシンB(PMB)の効果を検討した。PMBは低濃度のcit-FbによるCXCL10遺伝子・蛋白発現を有意に抑制したが、高濃度のcit-FbではPMBの抑制作用を認めなかった。LPSは熱耐性であることが知られている。一方、cit-Fbは蛋白で、熱処理により変性を来し、活性は低下する。そこで、95 $^{\circ}$ C、15分間熱処理をして、cit-Fbの効果を検討した。コントロールとして用いたLPSは熱処理してもCXCL10、IL-6遺伝子発現誘導作用は抑制されなかった。一方、TNF α のCXCL10、IL-6遺伝子発現誘導作用は、熱処理により完全に抑制された。cit-Fb試薬では、IL-6の遺伝子発現は熱処理により影響を受けなかったが、CXCL10遺伝子発現は熱処理により有意の抑制を認めた。以上より、cit-Fb試薬へのLPS混入が強く示唆されたものの、cit-Fb自体の作用は否定できなかった。

LPSはリピッドA、コア多糖、O抗原多糖で構成されるが、O抗原多糖が欠失したLPS変異体(R-LPS)が知られており、R-LPSはコア多糖の付加の程度によりRa、Rc、Re-LPSに分類される。RSCとヒト末梢血単球における大腸菌由来Wild type(WT)-LPSとR-LPSのCXCL10発現誘導作用を検討すると、両培養系ともWT-LPSで強く誘導されたが、Rc、Re-LPSではほぼ認めなかった。

一方、Re-LPS は WT-LPS による CXCL10 の誘導を濃度依存性に抑制した。また、この抑制効果は *Salmonella* 由来 Re-LPS においても同様に認められた。さらに、Re-LPS は cit-Fb の CXCL10 発現誘導作用を濃度依存性に抑制した。また、末梢血単球においても、cit-Fb による IL-6、IL-8、CXCL10 の発現誘導を Re-LPS は有意に抑制した。最終的に、リムルス反応を用いた Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Assay により、cit-Fb 試薬 (1 µg/ml) から 0.3 ng/ml 相当の LPS 活性を認めた。

(考察)

RA の病態には TLR4 シグナルが重要な役割を担っているが、TLR4 関連実験では検体や試薬への LPS 混入が大きな問題となる。本実験で使用した cit-Fb 試薬は、そのシトルリン化に大腸菌由来の酵素 (PAD) を用いており、その際に LPS が混入した可能性が高い。

培養実験では微量に混入した LPS が結果に大きな影響を与えるが、その検出法には問題が多い。LAL アッセイは LPS 検出のための最も汎用される方法であるが、高価で特殊な機器を必要とし、簡易的に測定することは難しく、偽陰性となる可能性が指摘されている。また PMB は効果持続時間が短く、PMB 自体がサイトカイン誘導を引き起こすことが報告されている。LPS の熱処理に関しても、熱に敏感な菌株も存在する。

本研究では、RSC、末梢血単球の培養系で Re-LPS が WT-LPS のサイトカイン誘導に対して阻害的に働くことを明らかにした。さらに、Re-LPS は LPS の混入した cit-Fb 試薬のサイトカイン誘導作用を完全に抑制した。この Re-LPS の作用は培養実験における LPS の混入を迅速に検出するツールとして有用と思われる。