

TLR4 シグナル伝達を介して I 型インターフェロンを誘導するハーブ抽出物

ナカスジ ミサ-トギ

米国国立衛生研究所、Division of Developmental Biology:

Eunice Kennedy Institute of Child Health and Human Development メリーランド州 米国
金沢医科大学医学部再生医療学科、石川県; 金沢医科大学病院再生医療センター

<https://orcid.org/0000-0002-7424-4548>

トギ スミヒト

米国国立衛生研究所、Division of Developmental Biology:

Eunice Kennedy Institute of Child Health and Human Development メリーランド州 米国
金沢医科大学医学部再生医療学科、石川県; 金沢医科大学病院再生医療センター

<https://orcid.org/0000-0002-3189-8111>

サエキ ケイタ

米国国立衛生研究所、Division of Developmental Biology:

Eunice Kennedy Institute of Child Health and Human Development メリーランド州 米国

<https://orcid.org/0000-0002-0611-176X>

コジマ ヤスヒコ

NPO 法人インターフェロンハーブ研究所、東京、日本

オザト ケイコ

米国国立衛生研究所、Division of Developmental Biology:

Eunice Kennedy Institute of Child Health and Human Development メリーランド州 米国

DOI : <https://doi.org/10.29219/fnr.v66.5524>

要約

- ・インターナチュラル (INT) は、5 つの厳選された植物からの抽出物で構成される広く使用されているハーブである。
- ・INT は、マクロファージ、樹状細胞、および線維芽細胞で I 型インターフェロン (IFN) を強力に誘導した。
- ・INT は、Toll 様受容体 4 および TRIF / MyD88 経路を介して I 型 IFN 遺伝子の発現を誘導した。
- ・INT の高分子画分 (MW > 10,000) には、I 型 IFN 誘導活性が含まれていた。
- ・INT は線維芽細胞に対するウイルス感染を防御した。

概要

背景: インターナチュラル(INT)と呼ばれる5つのハーブ抽出物の混合物は、カボチャの種、紫ウコン、ハトムギ、トウモロコシの花柱、とケイヒから調整され、免疫を高める効果や健康全般に良いとされ、日本をはじめ各地で広く使用されている。使用事例により有効性が示されているが、INTの免疫力を高めるメカニズムは解明されていない。

目的: 本研究の目的は、INT がマウス骨髄由来マクロファージ(BMDM)でI型インターフェロン(IFN)を誘導するかどうか、そしてどのようなメカニズムで誘導するかを調査することであった。

試験デザイン: 我々は、INT または他の Toll 様受容体リガンド【細菌性リポ多糖 (LPS)、二本鎖 RNA (dsRNA)、ポリイノシン酸-ポリシチジル酸カリウム塩 (poly(I:C))、CpG オリゴヌクレオチド】で処理された BMDM における I 型 IFN (IFN β および IFN α) の誘導を測定した。

INT が Toll 様受容体 4 (TLR4) を介してシグナル伝達するかを調べるため、TLR4 特異的阻害剤を試験した。また INT が、TLR4 アダプター、toll/IL-1 受容体 (TIR) ドメイン含有アダプター (TRIF)、または骨髄分化因子 88 (MyD88) を利用するかについても詳しく試験し、TRIF-KO および MyD88-KO の BMDM における INT の IFN β 誘導について調べた。

次に、脳心筋炎ウイルス (EMCV) モデルを使って、INT が線維芽細胞に直接または間接的に抗ウイルス効果をもたらすかどうか調査した。

結果: 我々はまず、INT を BMDM に添加すると、2 時間以内に I 型 IFN (IFN β および IFN α) を強力に誘導することを観察した。INT による IFN 発現の誘導は、LPS と同様に TRIF/MyD88 アダプターを介してシグナル伝達をする TLR4 に媒介された。

INT 抽出物の高分子画分 (MW > 10,000) には、IFN 誘導活性が含まれていた。INT 処理された BMDM 上清はウイルス力価を低下させ、未処理の線維芽細胞を脳心筋炎ウイルス (EMCV) への感染から防御した。

結論: INT は、BMDM と他の細胞型で、I 型 IFN mRNA とタンパク質を誘導した。この誘導は、TRIF/MyD88 伝達経路を使ってシグナルを伝達する TLR4 に媒介された。

INT の高分子 (MW) 成分には I 型 IFN 誘導活性が含まれていた。INT 処理細胞の上清は抗ウイルス活性を示し、細胞を EMCV への感染から防御した。これらの所見は、INT が宿主の自然免疫を強化する新規の天然 IFN 誘導物質であることを示している。

キーワード: 漢方薬 (herbal medicine) ; インターフェロン (interferon) ; 病原体耐性 (pathogen resistance) ; マクロファージ (macrophages) ; Toll 様受容体 (Toll-like receptors)

引用: Food & Nutrition Research 2022, 66: 5524 – <http://dx.doi.org/10.29219/fnr.v66.5524>

著作権: © 2022 ナカスジトギ ミサ他 本論文は、Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) の条件下で配布されるオープンアクセス論文であり、元の研究を正しく引用しそのライセンスを記載する限りにおいて、第三者は商用を含むいかなる目的にも、あらゆる媒体や形式で複写や再配布し、再構成、変換、資料作成をすることが許可される

受領日: 2020 年 9 月 4 日; 修正日: 2021 年 4 月 29 日; 受理日: 2021 年 10 月 20 日;

公開日: 2022 年 1 月 28 日

利益相反および資金提供: すべての著者は利益相反のないことを宣言する。本研究は、アメリカ国立衛生研究所 (NIH) にある NICHD の intermural program (ZIA HD001310-34.) の支援を受けている

*オザト ケイコ

Division of Developmental Biology Eunice

Kennedy Institute of Child Health and Human Development

アメリカ国立衛生研究所 米国メリーランド州ベセスダ 20892 Email: ozatok@dir6.nichd.nih.gov

*すべての著者は本研究に等しく貢献した

I型インターフェロン (IFN) は広範な抗病原体活性を誘発するサイトカインである(1、2)。10種類以上のI型IFN遺伝子があり、ヒト染色体9番およびマウス染色体4番にそれぞれ集合している(3、4)。

これらの遺伝子はウイルス、病原体、およびそれらの分解成分に反応して活性化され、Toll様受動体 (TLR)など病原体を認識する受容体に関与する(5-8)。これらのリガンド-受容体相互作用は、最初にIFN β 発現を、次にIFN α 遺伝子誘導を活性化する(9、10)。I型IFNは、RNAウイルス、DNAウイルス、レトロウイルス、様々な細菌、および病原性真菌に対する自然耐性を示す(2)。I型IFNは自然免疫および獲得免疫を増強し、癌細胞増殖の抑制に作用する(11、12)。

I型IFN遺伝子は、人類史に記されるより前からある慣習(13、14)として、長い間、人間の多種多様な病気の治療に使われてきたハーブ製品などの天然物によって活性化される(13-19)。アロエや昆布を含む様々な植物からの抽出物は、抗ウイルス活性およびIFN誘導活性を示すか(15-17)、IFNの効力を増強することが報告されている(18)。その他のハーブ製品は抗腫瘍活性を有している(19)。

インターナチュラル(INT)は1950年代に小島保彦によって開発された。(*注1)

小島は、IssacsとLindenmannによるI型IFNの発見より前に(22)、ワクシニアウイルスに感染したウサギにおいて観察されたウイルス抑制因子を報告した(20、21)。

小島のその後の努力は、IFN誘導活性を持つハーブ混合物の発見と分離につながった。最終生成物であるINTは、カボチャの種、紫ウコン、ハトムギ、トウモロコシの花柱およびケイヒから調整された抽出物で構成されている。これらの植物由来物質は、他の何百もの植物をスクリーニングした後に選択された。現在、株式会社パラディアム(<http://paladium.co.jp/about/IFNinducer/#feature>)が厳しい品質管理のもとで製造するINTは、一般的な免疫を高めるための経口サプリメントとして、日本および世界各地に流通している。

INTの抗ウイルス活性はウサギのワクシニアウイルス感染モデルにおいて示されたが、INTの生物学的活性と基礎的な作用機序は不明なままである。

今回、我々は、INTがマウス骨髄由来マクロファージ (BMDM) および他の細胞においてIFN β とIFN α 遺伝子発現を誘導し、ウイルス感染への防御となることを報告する。INTは細菌性リポ多糖 (LPS)と同様に、TRL4と相互作用し、TRL4を介してシグナル伝達することを示す。これらの所見は、INTが宿主の自然免疫を増強するIFNの強力な誘導物質であるという有力な根拠となる。

***注1：原文誤記：Internatural (INT) → Interferon**

「インターフェロンは1950年代に小島保彦らによって発見された。」訂正 (小島保彦)

根拠①：Wikipediaより、

<https://ja.wikipedia.org/wiki/%E5%B0%8F%E5%B3%B6%E4%BF%9D%E5%BD%A6>

根拠②：文部科学省HPアーカイブ 国立国会図書館が保存した2009年8月3日より

https://warp.da.ndl.go.jp/info:ndljp/pid/286794/www.mext.go.jp/b_menu/hakusho/html/hpaa200401/hpaa200401_2_018.html#tb1020101

材料および方法

INTの凍結乾燥粉末 (1.0 g) (株式会社パラディアム、日本)を10 mLの蒸留水で再構成し、90°Cで5分間加熱してから、3,000 rpmで10分間遠心分離した。不希釈抽出物をアミコンウルトラ (Amicon Ultra)-2遠心式フィルター10 Kデバイス (ミリポア (Millipore)、米国マサチューセッツ州ビレリカ)にかけ、

メーカーの指示に従って処理をした。

LPS (大腸菌 0111: B4 由来)、CpG (1826 ODN および 1585 ODN)、ポリイノシン酸-ポリシチジル酸 [poly(I:C)] 高分子量(HMW)、およびトランスフェクサン試薬 LyoVec™を InvivoGen (米国カリフォルニア州サンディエゴ)から購入した。これらの試薬を BMDM および他の細胞に、次の濃度で加えた: INT (500 倍 1,000 倍または 5,000 倍希釈)、LPS (200 ng/mL)、poly(I:C) (1 μ g/mL)、および CpG ODN (1 μ g/mL)。

TLR4 シグナル伝達の阻害を測定するため、BMDM を 3 μ M CLI-095 (InvivoGen) で 6 時間処理した後、INT または LPS で 2 時間処理した。LPS による試薬の汚染を調べるため、BMDM を、1 μ g/mL ポリミキシン B (PMB) (InvivoGen)の存在下または非存在下で、INT または TLR リガンドで処理した。

マウスと細胞培養

C57BL/6 マウス、C57BL/6 背景の骨髄分化因子 88 (MyD88)ノックアウト(KO)マウス、および Toll/IL-1 受容体 (TIR)ドメイン含有アダプター(TRIF)-ノックアウトマウス (C57BL/6J-Ticam1LPS/J)は、前述のとおり、米国メリーランド州ベセスダのアメリカ国立衛生研究所 (NIH) の国立小児保健発達研究所 (NICHD)の動物施設で維持されていた(10)。MyD88-KO マウスは審良静男博士から提供された(8)。TRIF-KO マウスは、ジャクソン研究所 (Jackson Laboratories) から購入された。

マウスが関わるすべての実験は、NICHD の動物実験委員会 (Institutional Animal Care and Use Committee) のガイドラインに従って実施された(試験プロトコル 14-044 および 17-044)。

BMDM は、記載通りに C57BL/6 マウス(1-3 ヶ月齢)から調整された(23)。簡潔に述べると、BM 細胞は、ダルベッコ改変イーグル培地/F12 培地 (コーニング (Corning)、米国 NY 州)で培養した。このとき、マクロファージコロニー刺激因子(20% [v/v])として、10%のウシ胎児血清、1% (v/v) の非必須アミノ酸 (Gibco、米国 CA 州)、ピリビン酸ナトリウム(Gibco)、l-グルタミン (Gibco)、10 mM の 2-メルカプトエタノール(Gibco)、抗生物質(ペニシリンまたはストレプトマイシン) (Gibco)、およびマウス線維芽細胞株 L929 細胞の培養から採取した上清を添加した。

5-7 日目に、細胞 (2 \times 10⁵/ウェル) を 24 ウェルプレートに加え、100 U/mL の遺伝子改変マウスの精製 IFN- β (R&D Systems、米国ミネソタ州ミネアポリス) と一晩プライミングした(24)。

BM 由来樹状細胞(DC) は、報告のとおり、10%ウシ胎児血清、1% (v/v) の非必須アミノ酸 (Gibco)、ピリビン酸ナトリウム(Gibco)、l-グルタミン (Gibco)、10 mM の 2-メルカプトエタノール(Gibco)、および抗生物質(ペニシリン/ストレプトマイシン) (Gibco)を添加し、200 ng/mL のヒト遺伝子組換え fms 様ロシキナーゼ3リガンド(Flt3L) (PeproTech、米国ロッキー・ヒルNJ州)とともに RPMI 1640 培地(Gibco) で培養された(25)。

この培養システムは、約 15%の CD11c+ (Biolegend、米国 CA 州サンディエゴ)、PDCA-1+ (eBioScience、米国サンディエゴ)、および B220+ (Biolegend) 形質細胞様樹状細胞(pDC)から構成される細胞集団を定期的に生成した。刺激として使用した pDC は、BD FACS Aria セルソーターを用いて分離された。マウス胚性線維芽細胞(MEF)、野生型 C57BL/6 マウスから採取した 15 日齢の胚から調整した (26)。

RT-qPCR 法による IFN mRNA の検出

IFN α 、IFN β 、および Il1 β mRNA は、記載のとおり、定量的逆転写 PCR 法 (RT-qPCR) を使って測定された(10、23)。転写レベルは、Gapdh のレベルに正規化され、データは誘導倍率で表される。プライマーは以下の通りであった(5' -3'):

Gapdh (Fw): GTGTTCTACCCCAATGT または CGTCCCGTAGACAAAATGGT

Gapdh (Rv): TGTGATCATACTTGGCAGGTTTC または TTGATGGCAACAATCTCCAC

IFN α (Fw): TCTGATGCAGCAGGTGGG

IFN α (Rv): AGGGCTCTCCAGACTTCTGCTCTG

*プライマーは、すべてのアイソフォーム、IFN α アイソフォームをコード化して配列を増幅した(9、10)。

IFN β (Fw): ACAGCACCAGCTTCTTCATCAG

IFN β (Rv): TCTTCAAAGGCTTTCATCTGCAA

I11b (Fw): AGTTGACGGACCCCAAAGA

I11b (Rv): GGACAGCCCAGGTCAAAGG

IFN のたんぱく質検出

IFN β タンパク質レベルは、記載のとおり(10、23)、VeriKine-HS Mouse IFN Beta Serum ELISA Kit(PBL Assay Science、米国 NJ 州ピスカタウェイ)を購入し酸素結合免疫吸着検定法(ELISA)を使って測定された。

脳心筋炎ウイルス感染とウイルス複製のアッセイ

MEF (1 プレートあたり 1×10^6) を 24 ウェルプレートに加えて 18 時間培養した。細胞に INT、TLR リガンドを感染前または感染後に処置し、また BMDM 上清でも処置を行った。細胞は洗浄され 40–57 時間培養された。

ウイルスが誘発する細胞溶解は、クリスタルバイオレット染色液を使って可視化した。脳心筋炎ウイルス(EMCV) (ATCC VR-1479) に感染した MEF の上清中のウイルス力価は、記載のとおり、プラークアッセイ法を使って決定された(26)。

結果

INT は、BMDM で IFN β と IFN α の発現を誘導する。

我々はまず、BMDM における、INT の IFN β mRNA 発現誘導能力を決定した。図 1a は、INT、LPS、poly(I:C)、および CpG 存在下での IFN β の時間レベルの比較を示す。1:1,000 に希釈された INT は、BMDM における IFN β 発現の誘導に最適であり、INT のこの希釈では、IFN β mRNA レベルは 2 時間で 40 倍より高くなった。LPS と poly(I:C) もまた 2 時間で IFN β ピークを誘導した。対照的に、CpG は始めの 2 時間の培養中、IFN β を有意に誘導しなかったが、24 時間後に誘導した。

最も高い IFN β 誘導は poly(I:C) で観察され、次いで LPS、INT、そして CpG であった。図 1b は、上記の試薬で処理された BMDM の上清中の IFN β タンパク質の量を示している。LPS と poly(I:C) による生成量より少ないものの、INT 処理された細胞も 10 pg/mL を超える量の IFN β を生成した。

我々は次に、INT による IFN α 誘導を調べた。図 1c のデータは、LPS および poly(I:C) よりも低いものの、INT が BMDM で IFN α mRNA を誘導したことを示している。

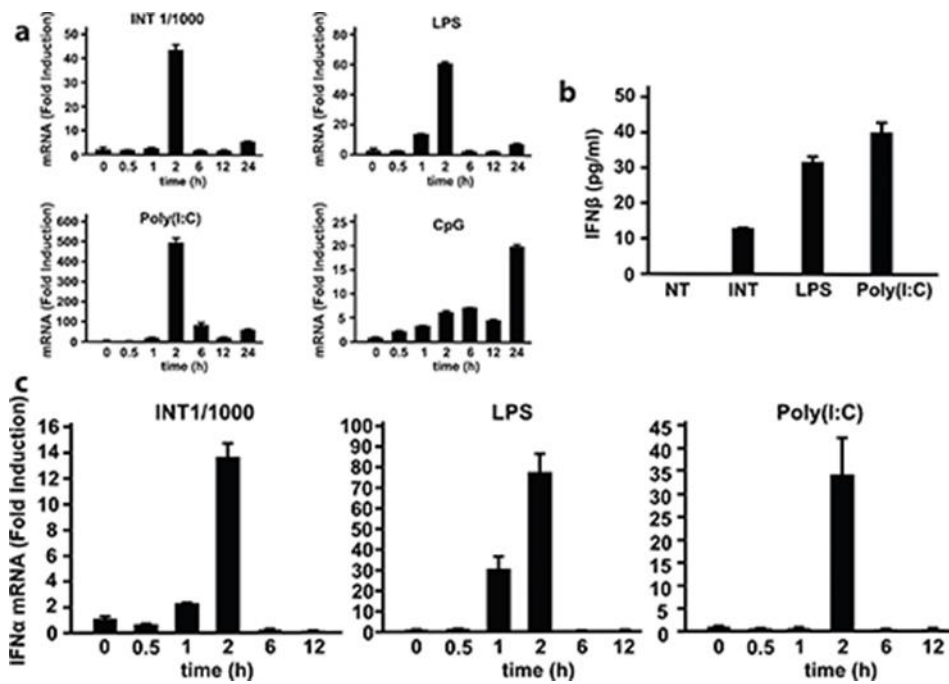


図 1. インターナチュラル(INT) は、骨髄由来マクロファージ(BMDM)で I 型インターフェロン(IFN)の発現を誘導する。(a) BMDM は INT (希釈率 1:1,000)、リポ多糖(LPS) (200 ng/mL)、ポリイノシン酸-ポリシチジル酸[poly(I:C)] (1 μ g/mL)、および CpG (ODN 1826, 1 μ g/mL) で処理された。IFN β 転写は RT-qPCR を使って測定され、Gapdh 測定値に規格化し倍数誘導値として表された。値は、技術的重複の平均 \pm SD (標準偏差) を表す。

以下、3 回行った試験の代表例の結果を示す。

(b) 上記濃度の INT、LPS、または poly(I:C) で BMDM を処理し、24 時間後の培養物から採取した上清中の IFN β タンパク質の酵素結合免疫吸着検定法の分析。値は、技術的重複の平均 \pm SD を表す。以下、2 回行った試験の代表例の結果を示す。(c) INT および他のリガンドで処理された BMDM 中の IFN α mRNA レベル。値は、技術的重複の平均 \pm SD を表す。

以下、3 回行った試験の代表例の結果を示す。

TLR4 を介した INT のシグナル

TLR4 は 2 つのアダプター、TRIF および MyD88 を介して LPS とシグナルを結合するが、poly(I:C) を認識する TLR3 は、TRIF を介して排他的にシグナルを伝達する (23、27-30)。TLR9 を含む他の TLR は、CpG に結合し、MyD88 を活用するが、TRIF は活用しない (27、28)。リガンド結合とアダプター活性化は IFN β 遺伝子転写をもたらす、続いて複数の IFN α 遺伝子が誘導される (9)。

INT による IFN 誘導を介在するシグナル伝達経路を識別するため、アダプター MyD88 または TRIF に欠けるマウスからの BMDM を調べた。図 2a (左のパネル) に示すとおり、INT は野生型 (WT) 細胞で 2 時間で 100 倍以上 INT を誘導した。TRIF-KO 細胞での INT の IFN β 誘導は、WT 細胞よりもはるかに低かった。一方、MyD88-KO 細胞での IFN β 誘導は、ほんのわずかの減少であった。LPS も、WT 細胞で 2 時間後に 200 倍以上 IFN β mRNA を誘導した (図 2a、中央左のパネル)。INT 同様、この誘導は TRIF-KO 細胞で顕著に減少したが、MyD88-KO 細胞での減少は控えめであった。この結果は、核内因子 κ B (NF- κ B) が MyD88 を介してシグナル伝達し、TNF および IL-1 などの炎症性サイトカインを活性化すると同時に、LPS が TRIF にシグナル伝達して、IRF3 により IFN が活性化されることを示した Palsson-

McDermott と O'Neill の報告と一致している(30)。以前にも、我々は別の TLR4 リガンドで、IFN 誘導が TRIF に対する強い依存を観察した(23、29)。TLR3 リガンドの Poly(I:C)は、WT 細胞において2時間で300倍以上 IFN β を誘導した。この誘導は予測通り、TRIF-KO 細胞で阻害された。対照的に TLR9 のリガンドである CpG は、2 時間で有意なレベルで IFN β 発現を誘導しなかった (Y 軸のスケールの違いを参照) (図 2a 右のパネル)。ピーク誘導はその後 24 時間で観察された(データ記載なし)。INT による IFN β 誘導の経時変化と TRIF アダプターへの強い依存性をあわせると、LPS の IFN 誘導との類似性が示され、INT が TLR4 を介してシグナル伝達する可能性が示唆される。

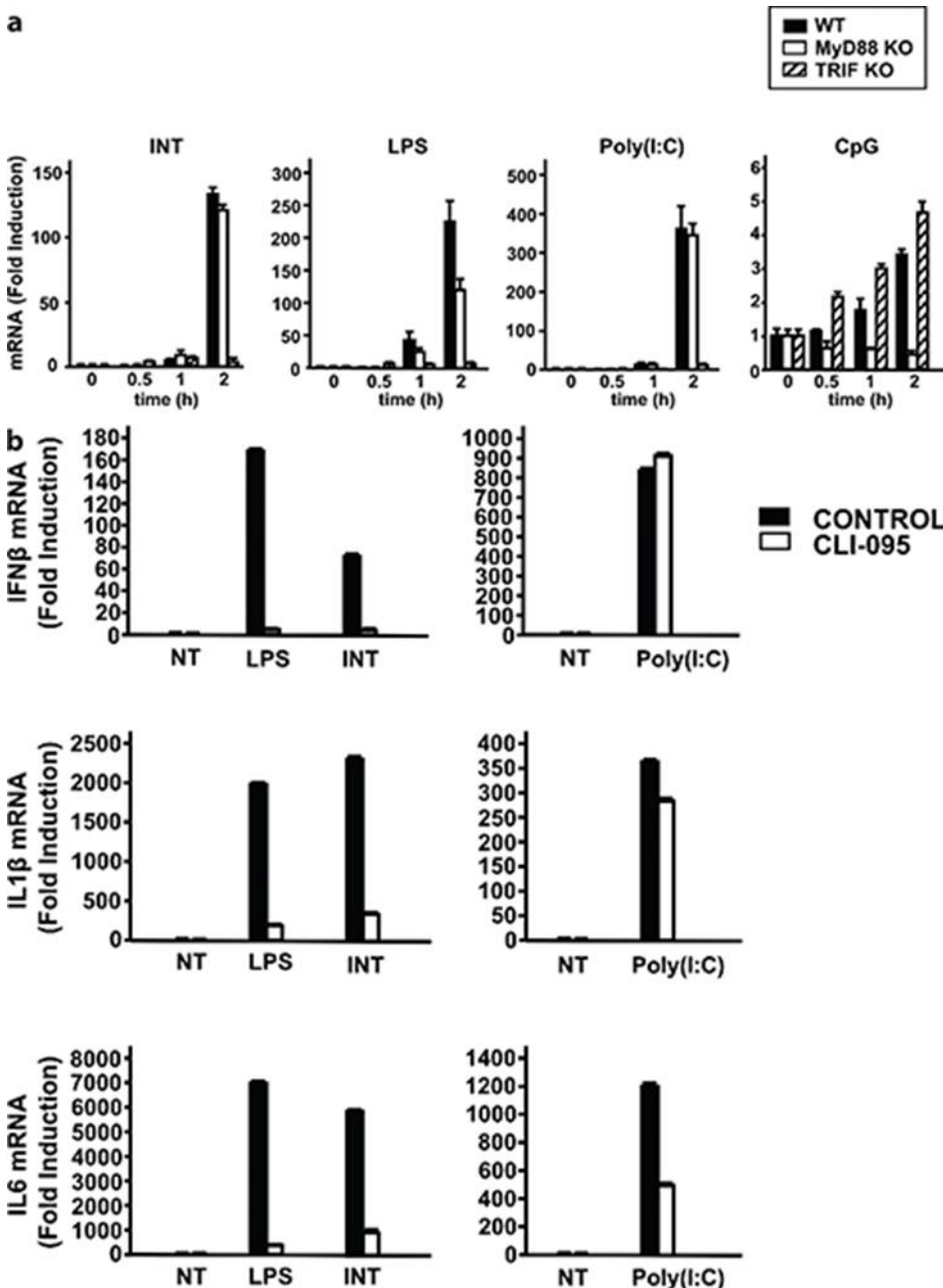


図2. インターナチュラール(INT)は TLR4 を介してシグナル伝達する。値は技術的重複の平均 \pm SD を表す。以下、2 回行った試験の代表例の結果を示す。(a) 野生型 C57BL/6 マウス、MyD88-KO マウス、または TRIF-KO マウス(C57BL/6 背景)から分離された骨髄由来マクロファージ (BMDM) で INT、リポ多糖 (LPS)、ポリイノシン酸ポリシチジル酸[poly(I:C)]および CpG による IFN β 発現の誘導。BMDM は、

INT (1:1,000 希釈)、LPS (200 ng/mL)、poly(I:C) (1 μ g/mL) または CpG (1826 ODN、1 μ g/mL) で 0-2 時間処理された。

図 1 に示すとおり、IFN β mRNA レベルが測定された。(b) IFN β 発現(上)、IL1 β 発現(中央)と IL-6 発現(下)の誘導に対する TLR4 阻害剤 CLI-095 の効果。BMDM は、CLI-095 (3 μ M) の存在下と非存在下で、INT、LPS、または poly(I:C) で 6 時間処理された。

INT が TLR4 を介して作用する可能性をさらに調べるため、TLR4 特異阻害剤 CLI-095 の効果を検証した (31、32)。INT または他の TLR リガンドを加える 6 時間前に、CLI-095 を BMDM に加えた。CLI-095 は INT および LPS による IFN β 誘導を完全に阻害した(図 2b、左のパネル)。しかし、CLI-095 は IFN β mRNA の poly(I:C) 誘導を阻害しなかった(図 2b、右のパネル)。我々は、INT が LPS および poly(I:C) と同様に、IFN β に加えて IL-1 β と IL-6 mRNA を誘導することも観察した。INT と LPS による IL-1 β と IL-6 の誘導もまた CLI-095 に阻害されたが、poly(I:C) による誘導は阻害されなかった。これらの結果は、INT が TLR4 を介してシグナル伝達することを示している。

我々の調整する INT に LPS が含まれており、CLI-095 が混入 LPS の活性を阻害する可能性を排除するため、LPS のリポド A 部分に結合して活性を中和する PMB の効果を調べた(33、34)。PMB (1 ng/mL) は、LPS が誘導する IFN β および IL-1 β 発現を無効にしたが、INT によるこれらのサイトカインの誘導には影響しなかった。(図 3)。これらの結果は、TLR4 の活性化と、INT による IFN β および他の炎症性サイトカインの誘導が、LPS 汚染によるものではないことを示している。

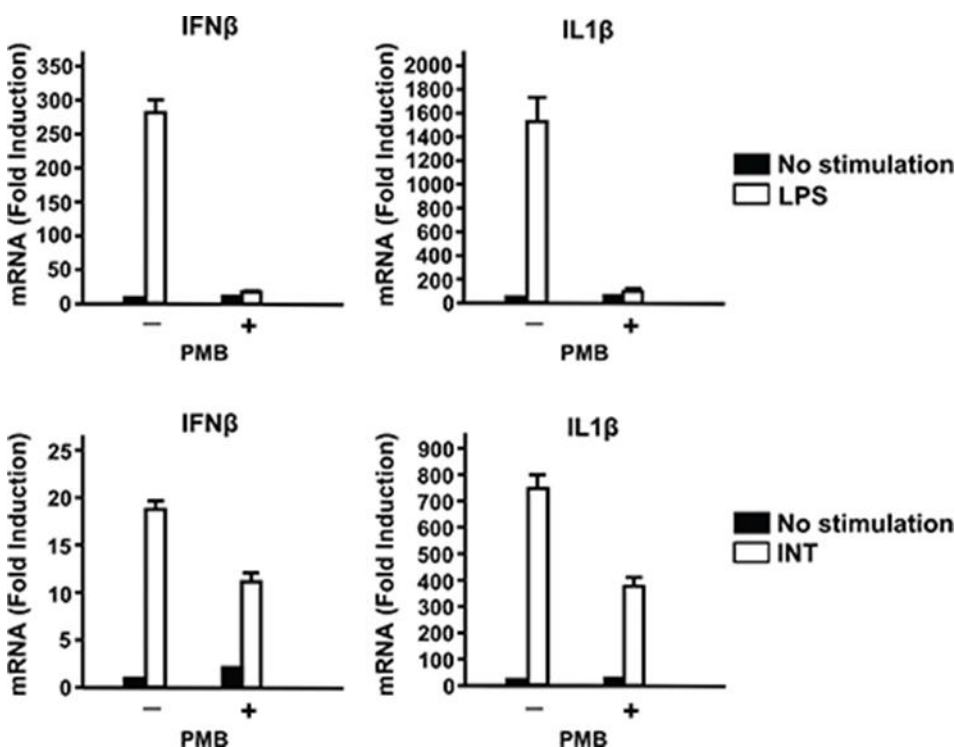


図 3. IFN β と IL1 β は、ポリ多糖 (LPS) 汚染ではなく、インターナチュラル(INT)の刺激で誘導される。INT または LPS による IFN β と IL1 β の発現誘導に対するポリミキシン B (PMB) の効果が示されている。骨髄由来マクロファージは PMB の存在下または非存在下で、INT または LPS で 2 時間処理された。これらの値は技術重複の平均値 \pm SD を示す。

以下、3 回行った試験の代表例の結果を示す。

INT は、pDC および MEF において、IFN α および IFN β を適度に誘導する。

INT が IFN を誘導する細胞の範囲を評価するため、INT の I 型 IFN 誘導能力について、形質細胞様樹状細胞(pDC) と MEF を試験した。

pDC は、ウイルス感染やその他の刺激に反応して、高レベルの I 型 IFN を生成するが(35、36)、BMDM より低いレベルで TLR4 を発現するため、LPS には適度に反応した(25、35)。MEF およびその他の線維芽細胞は様々なレベルの TLR4 を発現し、I 型 IFN を誘導する LPS への反応は軽度であった(37)。我々は Flt3L 存在下で BM 細胞から pDC を生成し、蛍光活性化細胞選別装置 (FACS) を使って分離した(38)。図 4a の FACS プロファイルは、CD11c+PD、CA-1+、および B220+ pDC の母集団を示している。pDC を INT、LPS、または poly(I:C) で処理し、IFN β および IFN α の誘導を調べた(図 4b)。INT と LPS は適度の量の IFN を誘導し、1 日後 (23 時間) にピークに達した(図 4b、左および右のパネル)。一方、CpG は両方の IFN をはるかに高いレベルで誘導し、12 時間と 23 時間でピークに達した。(図 4b、中央のパネル)。

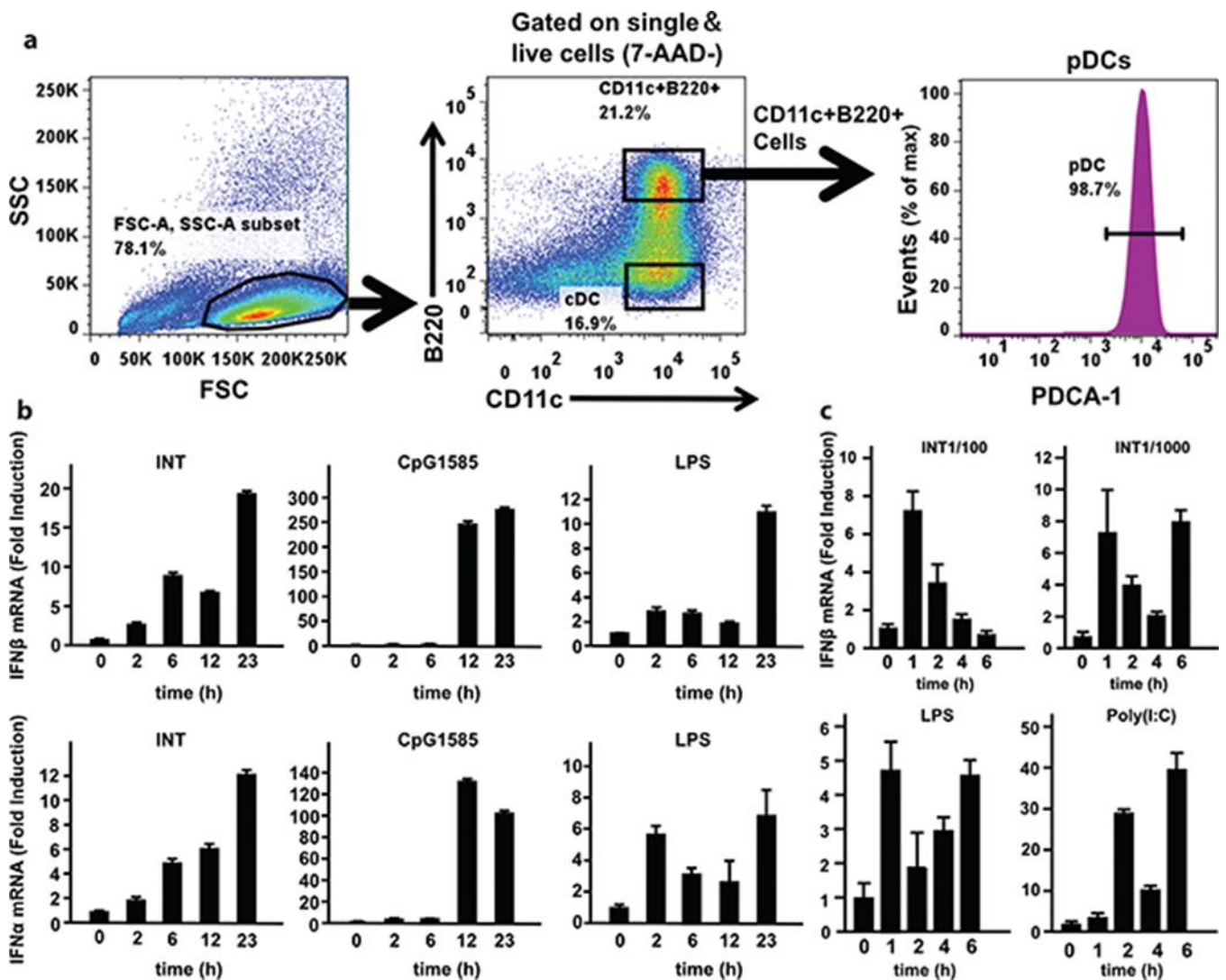


図 4. 形質細胞様樹状細胞(pDC)およびマウス胚性線維芽細胞(MEF)における I 型インターフェロン (IFN) 発現の誘導に対するインターナチュラル(INT)の効果。(a) Flt3L を使用した骨髄培養から生成された pDC の蛍光活性化細胞選別分析。CD11c+、PDCA-1+、および B220+細胞の集団(丸で囲まれた部分)を分

類して、INT による IFN 発現の誘導について試験した。

(b)INT および他のリガンドで処理された pDC における I 型 IFN mRNA の RT-qPCR 分析。データは 2 回行った試験の平均±SD を示す。(c) MEF をリガンドで処理し、IFN β mRNA レベルを (b) に記載のとおり測定した。値は技術的重複の平均±SD を示す。

以下、3 回行った試験の代表例の結果を示す。

図 4c (上のパネル) に示すとおり、INT も 1/100 と 1/1,000 希釈の MEF 両方で中程度の IFN β を誘導し、異なる時間経過を示した。IFN β 全体のレベルは INT によるものよりも低いですが、この誘導パターンは LPS によるものと類似している (図 4c、下のパネル)。ここで観察された LPS による弱い IFN 誘導は以前の報告と一致している (37)。しかし、poly(I:C) はかなり高レベルで IFN β を誘導した (図 4c、下のパネル)。

これらの結果は、INT が TLR4 を介するシグナル伝達と一致する方法で、複数の細胞型において I 型 IFN 発現を刺激することを示している。

INT の高分子量成分は I 型 IFN 遺伝子発現を活性化する

INT の分子特性の評価を開始するため、INT の有効成分のおおよその分子量 (MW) を調べた。超遠心分離システムを使って、INT を 10,000 分子量以上と以下に分画した。2 つの画分を、IFN β と IFN α の誘導について調べた (図 5)。高分子画分は、分画しない INT と同等またはそれ以上のレベルで IFN α と IFN β の両方を誘導することがわかった。一方、低分子画分は、IFN α または IFN β のいずれも有意な量を誘導しなかった。

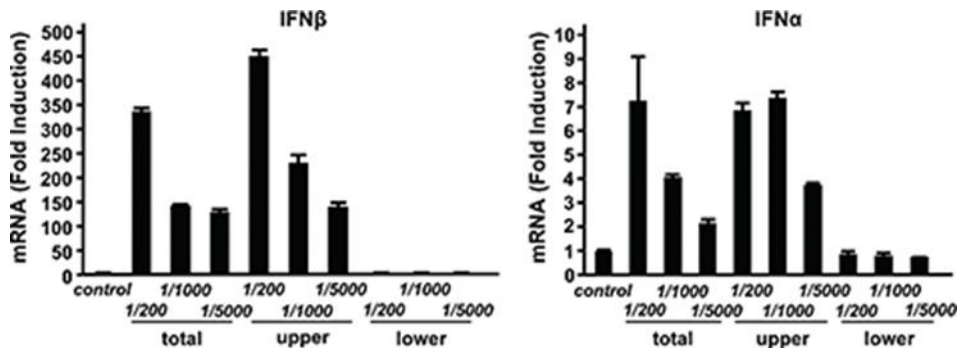


図 5. インターナチュラル (INT) の高分子量成分は、I 型インターフェロン (IFN) 誘導を刺激する。INT は、10,000 分子量をカットオフとする限外ろ過システムを使って、高分子量成分と低分子量成分に分画した。各画分において、骨髄由来マクロファージにおける IFN β および IFN α mRNA の発現誘導能力を調べた。合計：未分画 INT、上位：>10,000 分子量、低位：<10,000 分子量。値は技術的重複の平均値±SD を示す。

以下、2 回行った試験の代表例の結果を示す。

INT は I 型 IFN を介して EMCV 感染に対する耐性を宿主に付与する

INT にウイルス感染から細胞を保護する特性があるかを確認するため、我々は次に MEF の EMCV 感染に対する INT の効果を検証した。(図 6a) (39)。INT の抗ウイルス活性は、MEF において 2 つの方法で評価された。まず、MEF を直接 INT に暴露した。次に MEF を、INT 処理した BMDM の上清に暴露した。

INT の活性を LPS および poly(I:C) の活性と比較した。図 6a の実験図に示すとおり、INT、LPS、および poly(I:C)、または BMDM 上清で処理した MEF を EMCV に 40–48 時間感染させ、MEF 細胞溶解またはウイルス感染した MEF の上清からウイルス力価を測定して、抗ウイルス活性を評価した。

ウイルスを介した細胞溶解の結果は図 6b に示されている。各実験から得られたウイルス力価は図 6c に示す。IFN β をポジティブコントロールとし、PBS をネガティブコントロールとして評価した(図 6b および c の NT)。

INT または LPS を直接添加すると、測定可能な細胞溶解によって証明されるとおり、ウイルス感染に対してわずかな防御しか得られなかった。ウイルス力価は NT 対照よりわずかに低かった。予想した通り、IFN β の添加は細胞溶解に対して完全な防御をもたらし、ウイルス力価は数桁低くなった。

一方、poly(I:C)を直接添加すると、細胞溶解が減少しウイルス力価も低くなり、INT および LPS に比べるとより高い抗ウイルス活性をもたらした

。この結果は poly(I:C)が INT または LPS よりも IFN β の誘導能力が高いことと一致している(図 4c)。

直接添加した場合、INT は中程度の抗ウイルス活性を示したが、INT 処理の BMDM 上清では、細胞溶解が大幅に減少しウイルス力価が NT の未処理対照群より約 10 倍低下し、大幅な防御効果が示された。図 6b)。INT の抗ウイルス活性を裏付けるため、EMCV 感染前と感染後に INT を添加する試験を行い、また BMDM 上清についても試験を実施した。(図 6c)。INT が BMDM に継続的に存在すると、細胞溶解とウイルス力価がさらに低下し、NT の約 1,000 分の 1 に低下したため、より強力な抗ウイルス活性を得られることがわかった。したがって、INT は、I 型 IFN を産生することによって、ウイルス感染した MEF を直接保護し、INT を添加した BMDM 上清処置では、上清中に IFN を分泌して間接的に MEF を防御する。

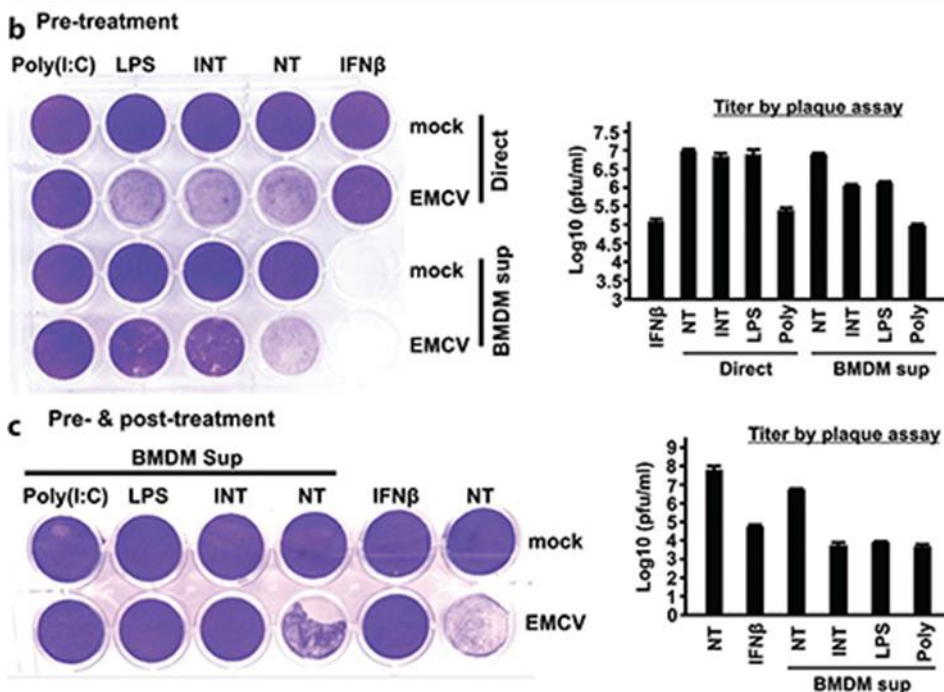
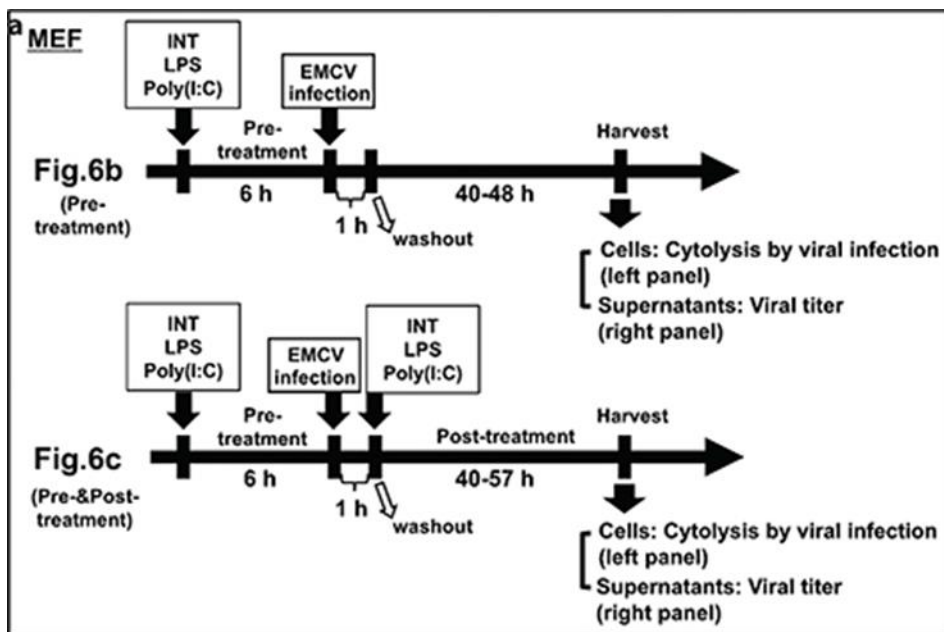


図 6. インターナチュラル(INT)の上清は、脳心筋炎ウイルス(EMCV) 感染に対して防御効果を発揮する。値は技術的な重複の平均±SD を表す。

以下、3 回行った試験の代表例の結果を示す。

- (a) 試験プロトコル。マウス胚線維芽細胞(MEF)を INT で処理し、感染多重度=0.00001/ウェルで 1 時間 EMCV に感染させた。クリスタルバイオレット染色を使用して、ウイルス誘導による細胞溶解を、40-57 時間後に観察し、プラークアッセイを使用して MEF 上清のウイルス力価を測定した。(b) 左: 24 ウェルプレート(1 × 10⁵ 細胞/ウェル)の MEF を INT で処理 (直接、上)、または骨髄由来マクロファージ (BMDM) 上清で、示されたリガンドとともに 6 時間処理した。次に、細胞を EMCV に 1 時間感染させ、40-48 時間培養した。ウイルス誘導性の細胞溶解を、上記のとおり、クリスタルバイオレット染色で観察した。NT は処理なし。IFN β はコントロールとして機能した。右は、上清のウイルス力価のプラークアッセイ。(c) EMCV 感染直後に BMDM 上清を MEF に添加し、その後細胞を 40-57 時間培養した。細胞溶解とプラークアッセイは、(b)に記載されているとおりに実施した。

考察

我々はこの研究から、日本やその他各地で自然免疫を高めるため一般の人達に広く使用されているハーブ抽出物 INT が、BMDM やその他の細胞で I 型 IFN の発現を誘導することを報告する。この活性を通じて、INT は MEF をウイルス感染から防御した。小島とその共同研究者ら (associates) は 40 年以上前に INT がウサギのモデルでワクシニアウイルスの増殖を阻害することを見出しており、これらの試験結果とも一致している(20、21)。I 型 IFN は、ウイルス、細菌および寄生虫による感染への幅広い阻害活性を發揮する(2)。I 型 IFN は自然免疫および獲得免疫を強化し、炎症、心血管疾患、自己免疫疾患、さらにガンなどの慢性疾患の発症を調節する(11、12、40)。

INT は LPS (エンドトキシン) を含まず、その IFN 誘導活性は抽出物の高分子画分に存在していた。INT は TLR 経路、特に TLR4 を通してその効果を發揮した。この結論は、TLR4 特異的阻害剤である CLI-095 が IFN 誘導を無効にすることから得られた。

LPS は最も広く研究される TLR4 リガンドである(5-7)。グラム陰性菌の成分である LPS は環境中に広く存在し、感染によって内部で生成され得るため、深刻な健康上の脅威を引き起こす可能性がある(41、42)。量によっては、急性のエンドトキシンショックや敗血症など生命を脅かす状態を引き起こす。さらに、LPS に一度暴露するといわゆる「耐性」をもたらす恐れがある。その場合、宿主はその後の LPS 暴露に対して深刻な無反応状態に陥るため感染リスクが高まる。Lipid A は LPS の活性部分であり、lipid A に結合すると二量体になる MD-2 との複合体で TLR4 に結合する(43)。LPS は、IFN に加えて、炎症の原因である IL-1 や IL-6 などの炎症性サイトカインを誘導する。

本研究において、INT と LPS は TRIF の IFN 誘導には TRIF に対して同様の強い依存性を示したが、MyD88 については、ほとんど依存しなかった。INT と LPS は、IFN 誘導に同様の時間経過と同様の細胞に対し特異性を示した。これらの結果は、INT が TLR4 を介してシグナル伝達することを示しており、TLR4 特異的阻害剤である CLI-095 に対する同一の感受性によってさらに裏付けられた。したがって、INT は TLR4/MD-2 に結合し、IRF3/IRF7 および NF- κ B を活性化して IFN と炎症性サイトカインを誘導する可能性がある(5-7)。しかし、INT が間接的に TLR4 に作用して、下流のシグナル伝達に影響する可能性は排除できない(44)。

緑茶、クルクミン、甘草、合成ネオセプチン-1 など、植物由来を含む様々な天然のリガンドや合成加工物が、TLR4/MD-2 と相互作用する(43、45)。これらのリガンドは TLR4 のアゴニストまたはアンタゴニストとして機能する(43)。転写結果に影響を与える天然のハーブ(草木由来)リガンドが、TLR4 に頻繁に関与していることも考えられる。INT と他のリガンドの生物学的活性をさらに分析することで、自然免疫反応についてより深くより広い理解が得られるだろう。

参考文献

1. Kaur S, Uddin S, Plataniotis LC. インターフェロンシグナル伝達における PI3 'キナーゼ経路。J インターフェロンサイトカイン解像度 2005; 25:780-7。土井: [10.1089 / jir.2005.25.780](https://doi.org/10.1089/jir.2005.25.780)
2. MacMicking JD 細胞自律免疫におけるインターフェロン誘導性エフェクターメカニズム。Nat Rev Immunol 2012; 12:367-82。土井: [10.1038 / nri3210](https://doi.org/10.1038/nri3210)
3. Chen J, Baig E, Fish EN I 型インターフェロン間の多様性と関連性。J インターフェロンサイトカイン解像度 2004; 24:687-98。土井: [10.1089 / jir.2004.24.687](https://doi.org/10.1089/jir.2004.24.687)
4. van Pesch V, Lanaya H, Renauld JC, Michiels T. マウス α インターフェロン遺伝子ファミリーの特性。J Virol 2004; 78:8219-28。土井: [10.1128 / jvi.78.15.8219-8228.2004](https://doi.org/10.1128/jvi.78.15.8219-8228.2004)
5. Kawai T, Akira S. Toll 様受容体および RIG-I 様受容体シグナル伝達。Ann NY Acad Sci 2008; 1143:1-20。土井: [10.1196 / annals.1443.020](https://doi.org/10.1196/annals.1443.020)
6. オニール LA, ボウイ AG 5 つのファミリー: Toll 様受容体シグナル伝達における TIR ドメインを含むアダプター。Nat Rev Immunol 2007; 7:353-64。土井: [10.1038 / nri2079](https://doi.org/10.1038/nri2079)
7. オニール LA, ゴーレンボック D, ボウイ AG Toll 様受容体の歴史-自然免疫の再定義。Nat Rev Immunol 2013; 13:453-60。土井: [10.1038 / nri3446](https://doi.org/10.1038/nri3446)
8. 足立 O, 河合 T, 武田 K, 松本 M, 筒井 H, 坂上 M 他 MyD88 遺伝子の標的破壊は、IL-1 および IL-18 を介した機能の喪失をもたらします。イミュニティ 1998; 9:143-50。土井: [10.1016 / s1074-7613\(00\)80596-8](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80596-8)
9. マリー I, ダービン JE, レビー DE インターフェロン調節因子-7 を介した正のフィードバックによる別個のインターフェロンアルファ遺伝子の示差的ウイルス誘導。Embo J 1998; 17:6660-9。土井: [10.1093 / emboj / 17.22.6660](https://doi.org/10.1093/emboj/17.22.6660)
10. テーラー P, タムラ T, コング HJ, クボタ T, クボタ M, ボルギ P, 他 樹状細胞における I 型インターフェロン誘導のフィードバック段階には、インターフェロン調節因子 8 が必要です。Immunity 2007; 27:228-39。土井: [10.1016 / j.immuni.2007.06.009](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.06.009)
11. Corrales L, Glickman LH, McWhirter SM, Kanne DB, Sivick KE, Katibah GE など。腫瘍微小環境における STING の直接活性化は、強力で全身的な腫瘍の退縮と免疫をもたらします。Cell Rep 2015; 11:1018-30。土井: [10.1016 / j.celrep.2015.04.031](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.031)
12. Doherty MR, Cheon H, Junk DJ, Vinayak S, Varadan V, Telli ML など。インターフェロンベータは、トリプルネガティブ乳がんのがん幹細胞の特性を抑制します。Proc Natl Acad Sci USA 2017; 114:13792-7。土井: [10.1073 / pnas.1713728114](https://doi.org/10.1073/pnas.1713728114)
13. Ji HF, Li XJ, Zhang HY 天然物と創薬。何千年もの古代の医学的知識は、癌や認知症との闘いにおいて、私たちに新しく強力な薬の組み合わせに導くことができますか? EMBO 担当者 2009; 10:194-200。土井: [10.1038 / embor.2009.12](https://doi.org/10.1038/embor.2009.12)
14. ペトロフスカ BB. 薬用植物の使用法の歴史的レビュー。Pharmacogn Rev 2012; 6:1-5。土井: [10.4103 / 0973-7847.95849](https://doi.org/10.4103/0973-7847.95849)
15. Lin CW, Wu CF, Hsiao NW, Chang CY, Li SW, Wan L, et al. アロエエモジンは、日本脳炎ウイルスおよびエンテロウイルス 71 に対する抗ウイルス活性を持つインターフェロン誘導剤です。Int J Antimicrob Agents 2008; 32:355-9。土井: [10.1016 / j.ijantimicag.2008.04.018](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.04.018)

16. Yue Y, Li Z, Li P, Song N, Li B, Lin W, et al. エンテロウイルス 71 に対する *Laminaria japonica* からの多糖類の抗ウイルス活性。Biomed Pharmacother 2017; 96:256–62。土井: [10.1016 / j.biopha.2017.09.117](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.117)
17. Lin LT, Hsu WC, Lin CC 抗ウイルス天然物とハーブ薬。J Tradit Complement Med 2014; 4:24–35。土井: [10.4103 /2225-4110.124335](https://doi.org/10.4103/2225-4110.124335)
18. Huang XY, Huang ZL, Wang L, Xu YH, Huang XY, Ai KX, 他 ハーブ化合物「SongyouYin」は、ヌードマウスの肝細胞癌の緩和的切除によって誘発される転移能の増強を阻害するインターフェロンアルファの能力を強化しました。BMC Cancer 2010; 10:580。doi: [10.1186 / 1471-2407-10-580](https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-580)
19. ハン・C、カワタ・M、ハマダ・Y、コンド・T、ワダ・J、アサノ・K 他 抑肝散の抗腫瘍効果の可能性の分析。J ナットメッド 2019; 73:468–79。土井: [10.1007 / s11418-019-01283-x](https://doi.org/10.1007/s11418-019-01283-x)
20. 小島恭子、橋本秀樹、渋谷直樹。ウサギおよびウサギリンパ系細胞におけるエンドトキシン誘導インターフェロンの産生に対するインターフェロンのプライミング効果。Ann NY Acad Sci 1980; 350:632。doi: [10.1111 / j.1749-6632.1980.tb20693.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1980.tb20693.x)
21. 橋本秀樹、渋谷直樹、小島康夫。ウサギリンパ系細胞培養におけるエンドトキシン誘導インターフェロンの産生様式。II。明らかに非誘導性の細胞に対するインターフェロンのプライミング効果。Microbiol Immunol 1979; 23:1033–6。土井: [10.1111 / j.1348-0421.1979.tb00533.x](https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1979.tb00533.x)
22. Ozato K, Uno K, Iwakura Y. インターフェロンへの別の道: 長野康一の旅。J インターフェロンサイトカイン解像度 2007; 27:349–52。土井: [10.1089 / jir.2007.9988](https://doi.org/10.1089/jir.2007.9988)
23. Ayithan N, Bradfute SB, Anthony SM, Stuthman KS, Dye JM, Bavari S など。エボラウイルス様粒子は、トル様受容体およびインターフェロンシグナル伝達経路を介して I 型インターフェロンおよび炎症性サイトカインの発現を刺激します。J インターフェロンサイトカイン解像度 2014; 34:79–89。土井: [10.1089 / jir.2013.0035](https://doi.org/10.1089/jir.2013.0035)
24. Ivashkiv LB, Donlin LT I 型インターフェロン応答の調節。Nat Rev Immunol 2014; 14:36–49。土井: [10.1038 / nri3581](https://doi.org/10.1038/nri3581)
25. 辻村 H、田村 T、尾里 K. 最先端: IFN コンセンサス配列結合タンパク質/ IFN 調節因子 8 は、I 型 IFN 産生形質細胞様樹状細胞の発達を促進します。J Immunol 2003; 170:1131–5。土井: [10.4049 / jimmunol.170.3.1131](https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.3.1131)
26. 鎌田 R、ヤン W、チャン Y、パテル MC、ヤン Y、大田 R 他 インターフェロン刺激はクロマチンマークを作成し、転写記憶を確立します。Proc Natl Acad Sci USA 2018; 115:E9162–71。土井: [10.1073 / pnas.1720930115](https://doi.org/10.1073/pnas.1720930115)
27. 山本 M、佐藤 S、ヘミ H、植松 S、星野 K、海翔 T 他 TRAM は、トル様受容体 4 を介した MyD88 非依存性シグナル伝達経路に特異的に関与しています。Nat Immunol 2003; 4:1144–50。土井: [10.1038 / ni986](https://doi.org/10.1038/ni986)
28. 山本 M、佐藤 S、ヘミ H、星野 K、海翔 T、三条 H 他 MyD88 に依存しないトル様受容体シグナル伝達経路におけるアダプター TRIF の役割。科学 2003; 301:640–3。土井: [10.1126 / science.1087262](https://doi.org/10.1126/science.1087262)
29. 竹内修、晃 S. パターン認識受容体と炎症。Cell 2010; 140:805–20。土井: [10.1016 / j.cell.2010.01.022](https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022)
30. Pålsson-McDermott EM, O'Neill LA リポ多糖受容体、Toll 様受容体-4 によるシグナル伝達。免疫学 2004; 113:153–62。土井: [10.1111 / j.1365-2567.2004.01976.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01976.x)

31. li M、Matsunaga N、Hazeki K、Nakamura K、Takashima K、Seya T、etal. 新規シクロヘキセン誘導体、エチル(6R)-6-[N-(2-クロロ-4-フルオロフェニル)スルファモイル]シクロヘキセン-1-エン-1-カルボキシレート(TAK-242)は、トール様受容体 4 を介したものを選択的に阻害します細胞内シグナル伝達の抑制によるサイトカイン産生。Mol Pharmacol 2006; 69: 1288–95。土井: [10.1124/mol.105.019695](https://doi.org/10.1124/mol.105.019695)
32. Kawamoto T、li M、Kitazaki T、Iizawa Y、Kimura H. TAK-242 は、細胞内ドメインによって媒介されるトール様受容体 4 シグナル伝達を選択的に抑制します。Eur J Pharmacol 2008; 584: 40–8。土井: [10.1016/j.ejphar.2008.01.026](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.01.026)
33. Domingues MM、InácioRG、Raimundo JM、Martins M、Castanho MA、SantosNC。ポリミキシン B と LPS 凝集体および膜モデルシステムとの相互作用の生物物理学的特性。生体高分子 2012; 98: 338–44。土井: [10.1002/bip.22095](https://doi.org/10.1002/bip.22095)
34. Cardoso LS、Araujo MI、GóesAM、PacíficoLG、Oliveira RR、OliveiraSC。ヒトサイトカイン分析におけるマンソン住血吸虫組換えタンパク質の LPS 汚染の阻害剤としてのポリミキシン B。Microb Cell Fact 2007; 6: 1。doi: [10.1186/1475-2859-6-1](https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-1)
35. 劉 YJ。IPC: プロの 1 型インターフェロン産生細胞および形質細胞様樹状細胞前駆細胞。Annu Rev Immunol 2005; 23: 275–306。土井: [10.1146/annurev.immunol.23.021704.115633](https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115633)
36. Dalod M、Salazar-Mather TP、Malmgaard L、Lewis C、Asselin-Paturel C、BrièreF、etal. ウイルス感染に対するインターフェロンアルファ/ベータおよびインターロイキン 12 の応答: invivo での樹状細胞サイトカイン発現を調節する経路。J Exp Med 2002; 195: 517–28。土井: [10.1084/jem.20011672](https://doi.org/10.1084/jem.20011672)
37. Yoshimi R、Chang TH、Wang H、Atsumi T、Morse HC、3rd、Ozato K。遺伝子破壊研究により、線維芽細胞における NF- κ B 依存性サイトカイン発現における TRIM21 / Ro52 の非冗長な役割が明らかになりました。J Immunol 2009; 182: 7527–38。土井: [10.4049/jimmunol.0804121](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804121)
38. Brawand P、Fitzpatrick DR、Greenfield BW、Brasel K、Maliszewski CR、De Smedt T。Flt3 リガンド補充骨髓培養から生成されたマウス形質細胞様樹状細胞は未成熟 APC です。J Immunol 2002; 169: 6711–9。土井: [10.4049/jimmunol.169.12.6711](https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.12.6711)
39. Carocci M、Bakkali-KassimiL。脳心筋炎ウイルス。病原性 2012; 3: 351–67。土井: [10.4161/viru.20573](https://doi.org/10.4161/viru.20573)
40. カラス MK。臓器標的自己免疫および炎症性疾患における I 型インターフェロン。関節炎 Res Ther 2010; 12 Suppl 1 (Suppl 1): S5。土井: [10.1186/ar2886](https://doi.org/10.1186/ar2886)
41. マンフォード RS。グラム陰性菌のリポ多糖の感知: 人間の病気の決定要因? 感染免疫 2008; 76: 454–65。土井: [10.1128/iai.00939-07](https://doi.org/10.1128/iai.00939-07)
42. Biswas SK、Lopez-Collazo E。エンドトキシン耐性: 新しいメカニズム、分子、および臨床的意義。Trends Immunol 2009; 30: 475–87。土井: [10.1016/j.it.2009.07.009](https://doi.org/10.1016/j.it.2009.07.009)
43. Peri F、Calabrese V。合成および天然化合物によるトール様受容体 4 (TLR4) 調節: 最新情報。J Med Chem 2014; 57: 3612–22。土井: [10.1021/jm401006s](https://doi.org/10.1021/jm401006s)
44. Lancaster GI、Langley KG、Berglund NA、Kammoun HL、Reibe S、EstevezE など。TLR4 が飽和脂肪酸の受容体ではないが、マクロファージ代謝を再プログラミングすることによって脂質誘発性炎症を媒介するという証拠。Cell Metab 2018; 27: 1096–110.e5。土井: [10.1016/j.cmet.2018.03.014](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.014)

45. Wang Y, Su L, Morin MD, Jones BT, Whitby LR, SurakattulaMM など。LPS との類似性のない合成アゴニストによる TLR4 / MD-2 の活性化。Proc Natl Acad Sci USA 2016; 113:E884–93。土井：[10.1073 / pnas.1525639113](https://doi.org/10.1073/pnas.1525639113)