

SUMMARY :

REVIEW

TLR7 & TLR8: fraternal twins

PRODUCTS

Species-driven TLR7 and TLR8 responses

- HEK-Blue™ hTLR7 Cells
- HEK-Blue™ mTLR7 Cells
- HEK-Blue™ hTLR8 Cells
- HEK-Blue™ mTLR8 Cells
- CU-CPT9a: TLR8 specific inhibitor

Cytosolic sensing of intermediate metabolites of LPS

- ADP-Heptose
- HEK-Blue™ KO-ALPK1 Cells
- HEK-Blue™ KO-TIFA Cells
- HEK-Blue™ Null1-v Cells

Preventing contamination of primary cell cultures

- Primocin™

InvivoGen

ASIA

Unit 106, 1F,
15W Phase 3, Hong Kong Science Park,
Pak Shek Kok,
Hong Kong

T: +852 3622 3480
F: +852 3622 3483

info.hk@invivogen.com
www.invivogen.com

FEBRUARY 2020

TLR7 & TLR8: fraternal twins

Toll-like receptor (TLR) は、抗感染に対する免疫応答の開始で極めて重要な役割を担っており、細胞表面またはエンドソーム内において、異なる TLR が、個々の病原体関連分子パターン (PAMP) を認識します。TLR7 および TLR8 は、構造的に相同性があり、一本鎖 (ss) RNA ウィルスや合成塩基類似体を感じ取るエンドソーム受容体です。しかしながら、これら 2 種類の TLR には、機能的相違があります。

TLR7 と TLR8 は、エンドソームに分布することによって、食細胞内の細菌の RNA を探し出すことができます。これらが活性化すると、NF- κ B、AP1 および IRF- 介在下で I 型 IFN (IFN- α/β) と炎症性サイトカインが産生されます¹。構造解析の結果、TLR7 と TLR8 は、特異性が異なる 2 種類の結合サイトを持つことが明らかとなりました。結合サイト 1 は、TLR7 と TLR8 との間に高度に保存されており、ヌクレオシド (TLR7 のグアノシン (G) および TLR8 のウリジン (U)) または塩基類似体に結合します。TLR7 および TLR8 のリガンドに対する反応性の違いは、結合サイト 1 の特異的残基の存在によって裏付けられます。結合サイト 2 は、高度に保存されておらず、それぞれ U(U) モチーフのある ssRNA と、U(G) モチーフのある ssRNA に結合します^{2,3}。注目すべき点として、結合サイト 1 が占有していることにより、受容体の二量体の形成や、リガンド濃度に応じたシグナル伝達を可能とします。結合サイト 2 への ssRNA 結合は、シグナル伝達を可能とする TLR 二量体の形成には不十分ですが、結合サイト 1 の結合親和性を強く促進します^{2,3}。したがって、TLR7 および TLR8 は、全長 ssRNA ではなく、RNA- 分解生成物を識別するようです³。

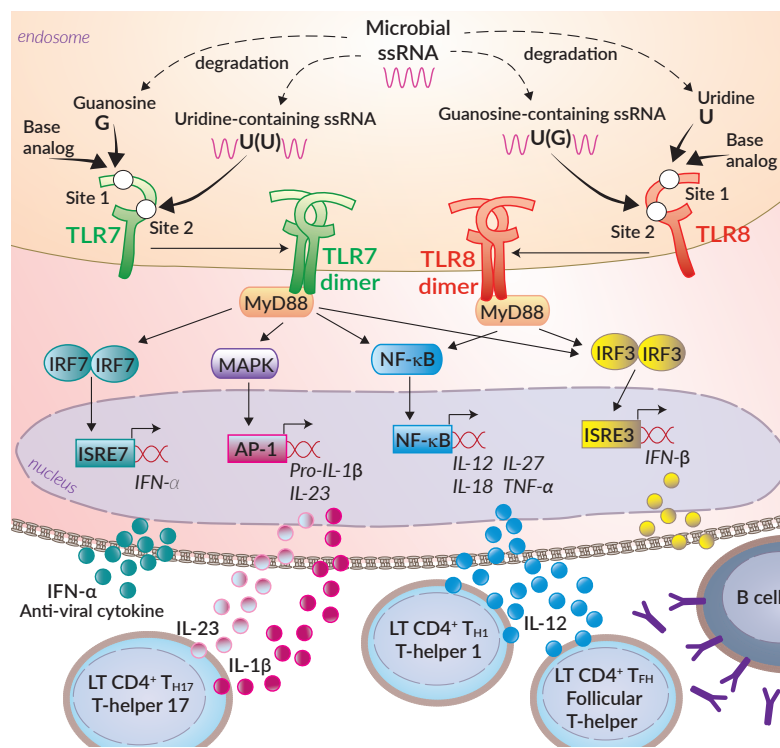
TLR8 は、当初、マウスでは機能的でないと考えられており、TLR7 ほど研究が行われてきませんでした⁴。特筆すべきこととして、TL8-506 すなわち合成アゴニスト VX-2337 の類似体を使用時はこの限りではありません (次のページを参照)。さらに、TLR13 は、マウスの TLR8 相同体であることが示唆されていました⁵。したがって、マウスの TLR7 と TLR8 に関して得られた知見は、ヒトの TLR7 と TLR8 に置き換えることはできません^{4,6}。しかしながら、ヒト TLR8 が微生物 RNA を認識し、微生物の存在を確認

する主要センサーであると記述している報告とともに、構造解析によって裏付けられた TLR8 に新たな関心が寄せられています⁷。

TLR7 と TLR8 は、異なる発現パターンを呈します。TLR7 は、基本的には、形質細胞様樹状細胞 (pDCs) で発現しますが、B 細胞や骨髄性細胞にも発現が認められます¹。TLR8 は、pDCs や B 細胞には存在しませんが、骨髄性細胞では高発現が認められます¹。このことは、TLR7 と TLR8 が微生物と遭遇した時に異なる免疫応答を媒介するように進化してきたことを示唆しています。pDCs では、ウィルスに感染すると、TLR7 を介して IFN- α の産生が誘発されます^{1,6}。しかし、単球細胞では、TLR7 と TLR8 が活性化することにより、T_H17 細胞および T_H1 細胞を増殖させるサイトカインである、IL-1 β および IL-12 の発現が誘発されます⁸。pDCs では、細菌に感染すると、TLR7 によって IFN- α の産生を誘導しますが、骨髄性細胞におけるその役割は、未だ明らかではありません⁶。その一方で、TLR8 は、骨髄性細胞における微生物 RNA の「最適」センサーであると考えられます^{6,7}。

TLR8 が、『ワクチンにおける弱毒性細菌の経験に基づく使用』と、『優れたワクチンの効能を実現するための、T_H1 細胞および T_H17 細胞誘導性液性免疫の既知の必要性』との間のミッシングリンクであるとする集中的エビデンスが存在しています。生細菌もしくは死滅していない細菌の RNA は、ヒト単球細胞による IL-12 の TLR8- 依存性産生を誘発するので、T_H17 細胞の分化が促進されます⁹。さらに、疫学的分析の結果、一塩基多型を通じたヒト TLR8 の機能獲得が、生細菌ワクチン (BCG) に対する応答でのより優れた防御免疫につながる事が指摘されています⁷。最後に、TLR8 は、ヒト新生児食細胞が TLR8 リガンドだけに応答することから、新生児の免疫で固有の役割を果たしているようです⁹。

TLR7 と TLR8 との間の機能的相違を適正に把握すれば、炎症性疾患、自己免疫疾患、がん性疾患の治療を目的とした、非常に優れた薬剤や補助薬として、より強力な、特異的毒性の低い分子の開発が可能となるはずです。



1. Georg P. & Sander L.E., 2019. Innate sensors that regulate vaccine responses. *Curr. Opin. Immunol.* 59:31.
2. Zhang Z. et al., 2018. Structural analyses of Toll-like receptor 7 reveal detailed RNA sequence specificity and recognition mechanism of agonistic ligands. *Cell Rep.* 25:3371.
3. Tanji H. et al., 2015. Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22:109.
4. Heil F. et al., 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8. *Science.* 303:1526.
5. Choo M.K. et al., 2017. TLR sensing of bacterial spore-associated RNA triggers host immune responses with detrimental effects. *J. Exp. Med.* 214:1297.
6. Eigenbrod T. & Dalpke A.H., 2015. Bacterial RNA: an underestimated stimulus for innate immune responses. *J. Immunol.* 195:411.
7. Ugolini M. et al., 2018. Recognition of microbial viability via TLR8 drives T_H1 cell differentiation and vaccine responses. *Nat. Immunol.* 19:386.
8. De Marcken M. et al., 2019. TLR7 and TLR8 activate distinct pathways in monocytes during RNA virus infection. *Sci. Signaling.* 12:eaaw1347.
9. Levy O. et al., 2006. Unique efficacy of Toll-like receptor 8 agonists in activating human neonatal antigen-presenting cells. *Blood.* 108:1284.

Species-driven TLR7 and TLR8 differential responses

InvivoGen 社では、ヒトもしくはマウスの TLR7 または TLR8 を刺激したときの細胞の応答を評価するための、HEK293 由来のレポーター細胞各種を提供しています。これらの細胞株は、異なる応答プロファイルを示します。TLR7 および TLR8 は、刺激性リガンドに応じて異なる応答を介在します。さらに、同じリガンドで活性化された TLR (7 または 8) で、2 つの動物種 (ヒトとマウス) の相違を観察することができます。

Human and murine TLR7 or TLR8 reporter cells

- HEK-Blue™ hTLR7 Cells
- HEK-Blue™ mTLR7 Cells
- HEK-Blue™ hTLR8 Cells
- HEK-Blue™ mTLR8 Cells

HEK-Blue™ hTLR7、mTLR7、hTLR8 もしくは mTLR8 細胞は、ヒト胚腎臓 (HEK293) 細胞株に由来しています。これらは、対応する TLR および NF- κ B/AP1 誘導型分泌性胎盤アルカリホスファターゼ (SEAP) レポーター遺伝子を発現します。TLR7 もしくは TLR8 の刺激による SEAP の産生レベルは、HEK-Blue™ Detection 培地を使ったアッセイで迅速に決定できます。これらの細胞は、Blasticidin と Zeocin™ でセクションが可能です。

Response profiles	R848	Imiquimod	ssRNA40/ LyoVec™	TL8-506
	TLR7/8	TLR7	TLR8	TLR8
HEK-Blue™ hTLR7 cells				
HEK-Blue™ mTLR7 cells			*	*
HEK-Blue™ hTLR8 cells				
HEK-Blue™ mTLR8 cells	**		**	

* mTLR7 and mTLR8 share strong homology and may have evolved to detect a broad overlapping range of ligands.

** The addition of poly(dT) rescues the responses to ssRNA40, and various TLR7/8 agonists¹.

Specific TLR8 inhibitor

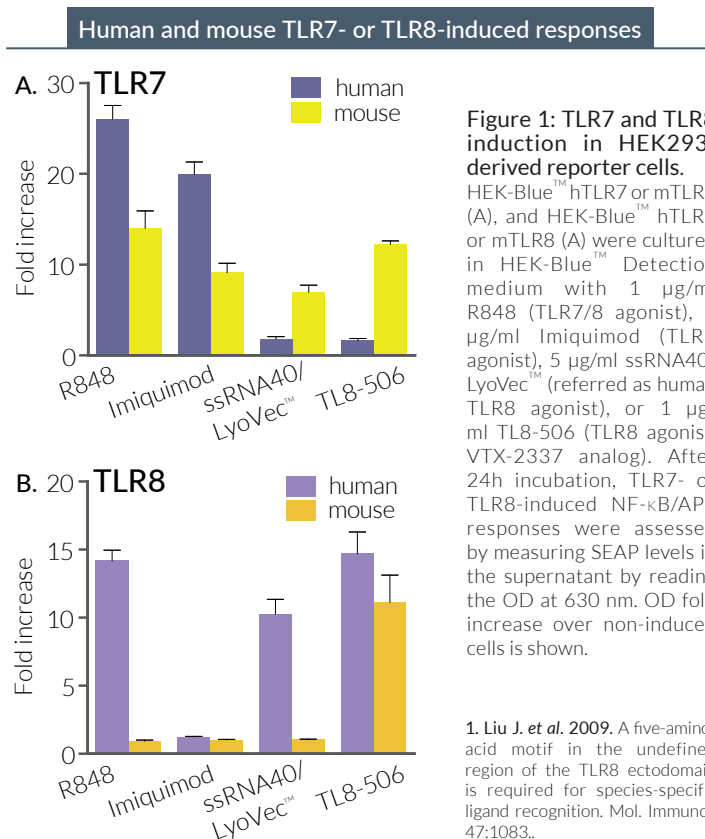
- CU-CPT9a **NEW**

InvivoGen 社では、TLR8 の強力な選択的阻害剤²³である CU-CPT9a を提供しています (図 2)。CU-CPT9a は TLR8 二量体に結合し、これを静止状態に安定させるので、この二量体のコンフォメーション変化を防ぐことができます。この TLR8 拮抗薬は、他の TLR、特に密接に関係する TLR7 によって誘導される応答に影響を与えることなく、TLR8 の活性化と、それに続く NF- κ B の活性化を遮断します² (図 2)。

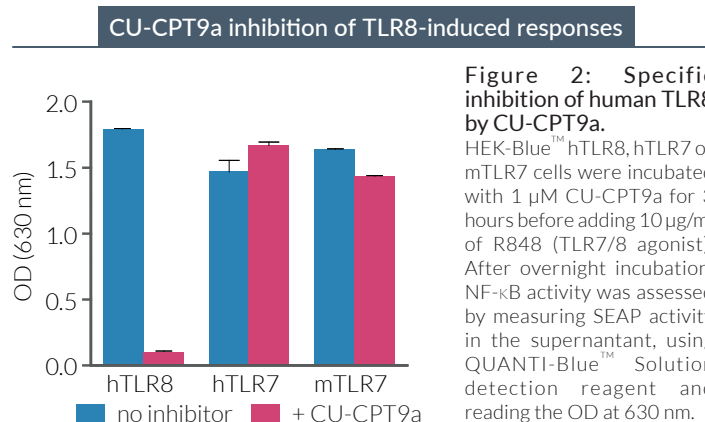


www.invivogen.com/cucpt9a

PRODUCT	QUANTITY	CAT. CODE
HEK-Blue™ hTLR7 Cells	3-7 x 10 ⁶ cells	hkb-htlr7
HEK-Blue™ mTLR7 Cells	3-7 x 10 ⁶ cells	hkb-mtlr7
HEK-Blue™ hTLR8 Cells	3-7 x 10 ⁶ cells	hkb-htlr8
HEK-Blue™ mTLR8 Cells	3-7 x 10 ⁶ cells	hkb-mtlr8
R848 (Resiquimod)	500 µg	tlr-r848
Imiquimod (R837)	500 µg	tlr-imqs
ssRNA40/LyoVec™	4 x 25 µg	tlr-lrna40
TL8-506	500 µg	tlr-tl8506
CU-CPT9a	10 mg	inh-cc9a



www.invivogen.com/hek-blue-tlr



2. Zhang, S. *et al.* 2018. Small-molecule inhibition of TLR8 through stabilization of its resting state. *Nat. Chem. Biol.* 14(1):58-64. 3. Moen, S.H. *et al.* 2019. Human Toll-Like Receptor 8 (TLR8) is an important sensor of pyogenic bacteria and is attenuated by cell surface TLR signaling. *Front. Immunol.* 10. 1209.

For more information on TLR7 and TLR8 ligands



www.invivogen.com/tlr78-ligands

Cytosolic sensing of intermediate metabolites of LPS

ALPK1-TIFA シグナル伝達経路は、LPS- 中間代謝産物である ADP-Heptose のセンシングにより病原性グラム陰性菌の存在を監視する、新規かつ重要な細胞質サーベイランス経路です。この経路に関する研究の促進を支援するため、InvivoGen 社では、検証済のノックアウト (KO) 細胞や合成 ADP-Heptose を含む一連の製品を提供しています。

The new PAMP on the block

• ADP-Heptose **NEW**

InvivoGen 社では、グラム陰性菌外膜の必須コンポーネントであるリポポリサッカライド (LPS) の生合成において中間代謝される糖のひとつ、ADP-Heptose を合成し、精製しました。ADP-Heptose は、細胞質のパターン認識受容体 (PRR) である ALPK1 に結合する強力な病原体関連分子パターン (PAMP) であり、NF- κ B 経路を介した TIFA 依存性の炎症誘発性応答を誘導します⁴。ADP-Heptose は、細菌分泌系とエンドサイトーシスされた細菌によって宿主細胞の細胞質に送達されます。他の LPS 中間代謝物である HBP は、ALPK1 活性に酵素変換が必要だけでなく、その送達には細孔形成剤の使用が必要ですが、ADP-Heptose はこれとは異なり、宿主の細胞膜内に自由に侵入できます⁴。

InvivoGen 社の ADP-Heptose は最高品質であり、同社の HEK-Blue™ Null1-v ならびに HEK-Blue™ KO-ALPK1 および KO-TIFA 細胞系に対する機能性を検証済です (下記参照)。

4. Zhou, P. et al. 2018. Alpha-kinase 1 is a cytosolic innate immune receptor for bacterial ADP-heptose. *Nature* 561, 122-126.

 www.invivogen.com/adp-heptose

ALPK1 and TIFA reporter cell lines

- HEK-Blue™ KO-ALPK1 Cells **NEW**
- HEK-Blue™ KO-TIFA Cells **NEW**
- HEK-Blue™ Null1-v Cells

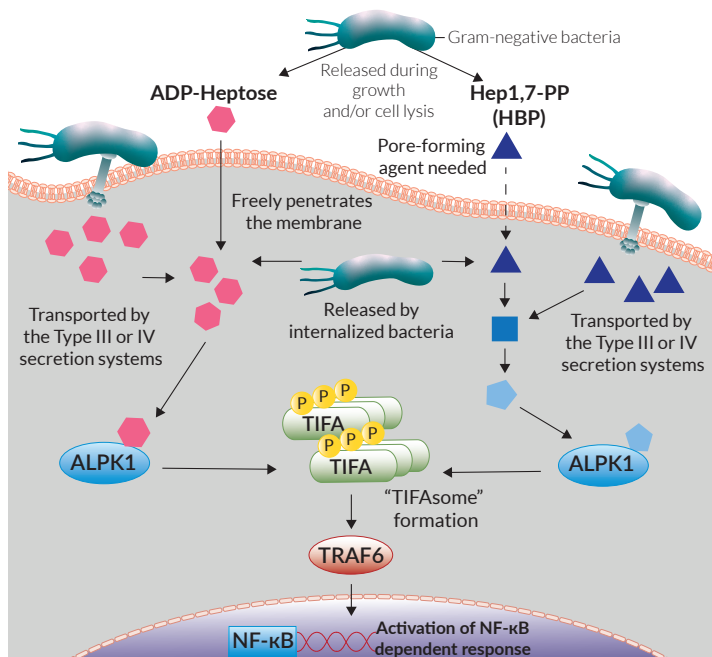
HEK-Blue™ Null1-v 細胞は、ヒト胚腎臓 (HEK)-293 細胞系由来で、NF- κ B- 誘導性プロモーターの制御下で分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP) を発現します。したがって、HEK-Blue™ Null1-v 細胞は、ADP-Heptose に応答します。ADP-Heptose の濃度が高くなると、これらの細胞は用量依存的に SEAP を産生します。この産生は InvivoGen 社の SEAP 検出薬である HEK-Blue™ Detection あるいは QUANTI-Blue™ Solution を使って容易に監視できます。

これに対し、HEK-Blue™ KO-ALPK1 および HEK-Blue™ KO-TIFA 細胞は、ADP-Heptose に応答せず、ヒト (h) TNF- α などの他の NF- κ B- 誘発性サイトカインに応答します。これらの細胞は、それぞれ ALPK1 および TIFA 遺伝子の安定的ノックアウト (KO) により、HEK-Blue™ Null1-v 細胞を改変し作成されたものです。これらの細胞は、Zeocin™ によりセレクションが可能です。

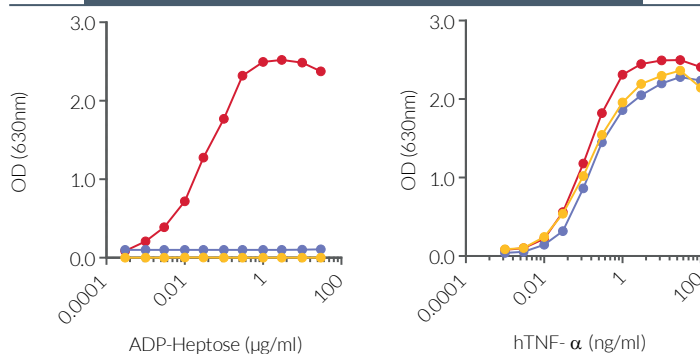
 www.invivogen.com/ko-alkp1-tifa-cells

PRODUCT	QUANTITY	CAT. CODE
ADP-Heptose	250 μ g	tlrl-adph
HEK Blue™ KO-ALPK1 Cells	3-7 x 10 ⁶ cells	hkb-koalkp
HEK Blue™ KO-TIFA Cells	3-7 x 10 ⁶ cells	hkb-kotifa
HEK Blue™ Null1-v Cells	3-7 x 10 ⁶ cells	hkb-null1v

ADP-Heptose induced ALPK1-TIFA signaling



NF- κ B responses of ALPK1 and TIFA reporter cells



● HEK-Blue™ Null1-v ● HEK-Blue™ KO-ALPK1 ● HEK-Blue™ KO-TIFA

Figure 3: NF- κ B response in HEK293-derived ALPK1 and TIFA reporter cells. HEK-Blue™ Null1-v, KO-ALPK1, and KO-TIFA cells were incubated with increasing concentrations of (A) ADP-Heptose (0-100 μ g/ml) and (B) human (h) TNF- α (0-100 ng/ml) in HEK-Blue™ Detection, a cell culture medium for SEAP detection. After overnight incubation, the NF- κ B response was assessed by measuring the activity of SEAP in the supernatant. OD was read at 630 nm.

Other products you may need

HEK-Blue™ Detection	SEAP detection medium	#hb-det2
QUANTI-Blue™	SEAP detection reagent	#rep-qbs
Rec. hTNF- α	Recombinant human cytokine	#rcyt-htnfa
Zeocin™	Selective antibiotic	#ant-zn-1

Prevention of contamination in primary cell cultures

● Primocin™

初代細胞培養は、使用する細胞自体や周囲の環境による微生物汚染の脅威に常に曝されています。細胞汚染防止に役立つよう、InvivoGen 社では、細胞を傷つけずに微生物を死滅させる広範囲にわたる抗生剤、Primocin™ を提供しています。

- ❖ **広範な効果:** 細菌、マイコプラズマ、真菌を死滅させます
- ❖ **安全性:** 初代細胞に対して無毒です
- ❖ **信頼性:** 文献で頻繁に引用されています



Primocin™ は、細菌汚染から初代細胞培養を完全に保護するよう設計された抗生剤です。本製剤には、グラム陽性菌、グラム陰性菌、ならびにマイコプラズマでの DNA 複製およびタンパク質の合成を遮断する化合物が含まれています。さらに、細胞膜を介したイオン交換を阻止することにより真菌を特異的に標的にする化合物も含まれています。Primocin™ は、推奨濃度で使用した場合には、初代細胞に対し無毒です。

Use of Primocin™ in primary cell cultures

Primocin™ は、様々な文献において数多くの初代培養の保護剤として使用されている実績があります。

● Differentiated cells

Primocin™ は、数種類の分化ヒトおよびマウス細胞の単離ならびに培養で重要であることが示されています。このような細胞には、繊維芽細胞¹、アストロサイト²、NK 細胞³ などがあり、末梢血単核細胞 (PBMC) や抽出組織などの様々なソースに由来する細胞があります。

● Pluripotent stem cells

人工多能性幹細胞 (iPSC) の長期培養において、Primocin™ が、細菌感染やマイコプラズマ感染の防御に役立ちます。この製品は、幹細胞の培養およびリプログラミングを通じて使用される、「必須の添加物」と定義されています⁴。

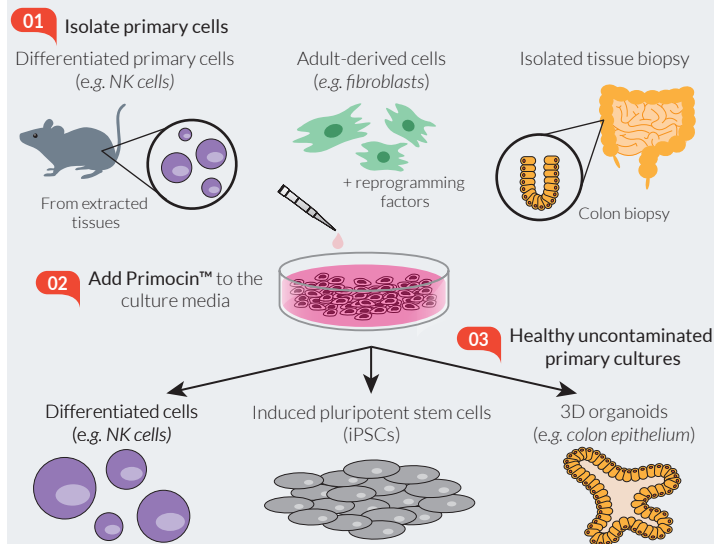
● Organoid cultures

3D 細胞培養やオルガノイド培養に関する研究分野が興り、それが活発になっている現在、Primocin™ は、それらの培養段階で必要不可欠な保護手段として、その極めて重要な役割が示されています。本製品は、結腸上皮性オルガノイドや上皮性悪性腫瘍オルガノイド⁵ のほか、膀胱がん、乳がん、前立腺がんのオルガノイド⁶ の培養に定常的に使用されています⁶。

世界の研究者たちは、時間と費用の損失という大きな犠牲を生む微生物汚染から貴重な初代培養を守るため、Primocin™ に信頼を寄せています。

1. Ferrer-Mayorga, G. et al. 2019. Vitamin D and Wnt3A have additive and partially overlapping modulatory effects on gene expression and phenotype in human colon fibroblasts. *Sci Rep* 9, 8085. 2. Grabner, G.F. et al. 2016. Deletion of Monoglyceride Lipase in Astrocytes Attenuates Lipopolysaccharide-induced Neuroinflammation. *J Biol Chem* 291, 913-923. 3. Garcia-Beltran, W.F. et al. 2016. Open conformers of HLA-F are high-affinity ligands of the activating NK-cell receptor KIR3DS1. *Nat Immunol* 17, 1067-1074. 4. Park, S. et al. 2018. Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells Using a Defined, Feeder-Free Reprogramming System. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 45, e48. 5. Urbischek, M. et al. 2019. Organoid culture media formulated with growth factors of defined cellular activity. *Sci Rep* 9, 6193. 6. Xu, H. et al. 2018. Organoid technology and applications in cancer research. *J Hematol Oncol* 11, 116.

Primary cell cultures and Primocin™



Where does contamination come from?

汚染源は様々ですが、ラボの作業員や汚染した装置(ウォーターバス、インキュベータ、実験用ガラス器具)などが含まれます。残念なことに、動物やヒトの組織から細胞を単離する際、共生フローラおよび/または不顕性感染によるコンタミネーションはつきものです。InvivoGen 社では、細菌、マイコプラズマ、真菌など広範な微生物を阻止して根絶する、利用実績の高い抗生剤カクテルを提供しています。

Protect your cells with InvivoGen

No matter the type of contamination you want to prevent or eradicate, InvivoGen has the solution.

- ❖ **Normocin™** Anti-microbial agent #ant-nr-1
- ❖ **Plasmocin™** Anti-mycoplasma agent #ant-mpt-1
- ❖ **Fungin™** Anti-fungal agent #ant-fn-1



www.invivogen.com/cell-culture-contamination

PRODUCT	QTY	CAT. CODE
Primocin™	500 mg (10 x 1 ml)	ant-pm-1



www.invivogen.com/primocin

InvivoGen

Europe Tel: +33 562 71 69 39
USA Tel: +1 888 457 5873
Asia Tel: +852 3622 3480

Fax: +33 562 71 69 30
Fax: +1 858 457 5843
Fax: +852 3622 3483

info.eu@invivogen.com
info@invivogen.com
info.hk@invivogen.com