

令和元年6月11日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08291

研究課題名(和文) IL-37およびSIGIRR膜上発現安定化を基盤とした嚢胞性線維症への治療応用

研究課題名(英文) Therapeutic application to cystic fibrosis based on IL-37 and stabilized cell surface expression of SIGIRR

研究代表者

首藤 恵子 (SHUTO, Keiko)

崇城大学・薬学部・講師

研究者番号：70510692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：嚢胞性線維症(CF)は慢性呼吸器炎症が主病変の遺伝性疾患であるが、その病態形成の一つとして炎症性シグナルを伝達するToll-like receptors (TLRs)のシグナル抑制分子の発現又は機能が低下していることが挙げられる。本研究ではTLRシグナル抑制分子SIGIRRとそのリガンドである抗炎症性サイトカインのIL-37bに着目し、CFにおける抗炎症性IL-37b-SIGIRR経路の機能解析を行った。その結果、CF細胞では変異型SIGIRRの発現が上昇することで正常型SIGIRRの細胞膜上発現量が低下し、IL-37bによる抗炎症作用が消失していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年CFの原因遺伝子に対する治療薬が認可され根治治療への期待が高まる一方、未だ解決できない問題として挙げられているのが、CF患者の多くで認められる感染症およびそれに伴う慢性炎症である。故にCF炎症の分子基盤の解明および感染・炎症を調節する因子の探索は、今後ますます重要となることが予想される。本研究は、未だCF研究領域において報告のないSIGIRRおよびIL37bを標的とした新たな炎症治療薬法を模索する初めての試みである。

研究成果の概要(英文)：Cystic Fibrosis (CF) is an inherited disorder characterized by chronic airway inflammation, which is partly due to the defective expression or function of negative regulators of toll-like receptor (TLR) that induce inflammatory signaling. In this study, we focused on SIGIRR and anti-inflammatory cytokine IL-37b, which work as a negative regulator of TLR signaling and its ligand respectively, and functionally analyzed anti-inflammatory IL-37b-SIGIRR pathway in CF. As a result, anti-inflammatory activity via IL-37b-SIGIRR pathway was abrogated in CF airway epithelial cells due to the augmented expression of mutant SIGIRR, which causes the decrease in its cell surface expression in CF.

研究分野：細胞生物学、分子生物学、薬理学

キーワード：嚢胞性線維症(CF) SIGIRR IL-37b

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

嚢胞性線維症 (Cystic Fibrosis; CF) はクロライドイオンチャネルである CFTR を原因遺伝子とする常染色体劣性遺伝性疾患である。CF 患者の 9 割以上に難治性の気道感染症と呼吸不全を伴う慢性呼吸器炎症が見られ、多くの患者が約 40 歳に達するまでに死亡する。その主な原因は、進行性の呼吸器の閉塞、慢性的な細菌感染とそれに伴う持続的炎症であるが、これは気道上皮組織において CFTR の機能低下または変異 CFTR の存在が細胞内外環境を著しく変化させることに起因するものである。これまでに、CF 気道上皮細胞における易炎症性質には様々な病原微生物に対する免疫応答において重要な役割を果たす Toll-like receptors (TLRs) シグナルの過剰活性化およびシグナル抑制分子の発現 (引用文献①) および機能低下 (引用文献②) が一因であるとの報告があるが、特に CF における TLRs シグナル抑制分子に関する詳細は未だ不明な部分が多い。

SIGIRR (別名 TIR8 又は IL-1R8) は Toll-IL-1 receptor (IL-1R) superfamily に属する I 型膜貫通タンパク質で、TLR による炎症性シグナル伝達を抑制する。その細胞外領域には一つの immunoglobulin ドメインが存在し、抗炎症性サイトカインである IL-37b がリガンドとして機能することで抗炎症作用を発揮することが最近明らかとなった (引用文献③)。つまりこの報告は SIGIRR を外因的に活性化することで炎症を抑制することが可能であることを示唆しており、CF における IL-37b-SIGIRR 経路の機能解析は CF 病態形成を理解し、新たな炎症治療法を確立する上で重要である。

2. 研究の目的

以前の検討結果から、CF 細胞特異的に SIGIRR 細胞膜上発現量が低下していることが明らかとなった。そこで本研究期間では、SIGIRR 細胞膜上発現量低下に伴い IL-37b-SIGIRR 経路を介した抗炎症作用が破綻しているか否か正常および CF 細胞間で比較すること、更に CF 細胞での SIGIRR 細胞膜上発現低下メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

正常・CF の気道上皮細胞株又は初代培養気道上皮細胞を用いて、TLR3 リガンドである Poly(I:C) 誘導性 IL-8 分泌量が IL-37b 処理により減少するのか、ELISA 法を用いて定量した。加えて、IL-37b により活性化が抑制された細胞内シグナル伝達分子をウェスタンブロッティング法にて同定した。その際、前駆体 IL-37b (PIL-37b) と N 末端から 45 個のアミノ酸が欠損した Val146IL-37b (VIL-37b) の 2 種類を IL-37b として用いた。SIGIRR 細胞膜上発現低下の要因として考えられた SIGIRR スプライズバリエーションである $\Delta 8$ -SIGIRR の発現は、半定量的 RT-PCR 法、ウェスタンブロッティング法を用いて検出し、 $\Delta 8$ -SIGIRR 過剰発現による野性型 SIGIRR (WT-SIGIRR) の細胞膜上発現量はビオチン化法を用いて検出した。WT-SIGIRR と WT および $\Delta 8$ -SIGIRR 共発現における各々の細胞内局在を免疫蛍光染色法にて確認した。

4. 研究成果

CF 細胞特異的な SIGIRR の細胞膜上発現量低下に伴い IL-37b-SIGIRR 経路による抗炎症作用が消失しているか否か、正常・CF 気道上皮細胞間で比較した。その結果、正常細胞株および初代培養細胞では特に PIL-37b 処理により Poly(I:C) 誘導性 IL-8 分泌量が低下したが、CF 細胞ではその低下が観察されなかった (Figure. 1)。更に、細胞内シグナル伝達分子について検討したところ、正常細胞および初代培養細胞では PIL-37b 処理により Poly(I:C) 誘導性 JNK のリン酸化が抑制されたが、CF 細胞ではその現象が認められなかった (data not shown)。

次に正常および CF 細胞における SIGIRR タンパク質発現の詳細解析を行ったところ、CF 細胞では WT-SIGIRR よりも分子量が低い SIGIRR タンパク質が高発現しており、Exon 8 が脱落した $\Delta 8$ -SIGIRR と同程度の分子量であった (Figure. 2)

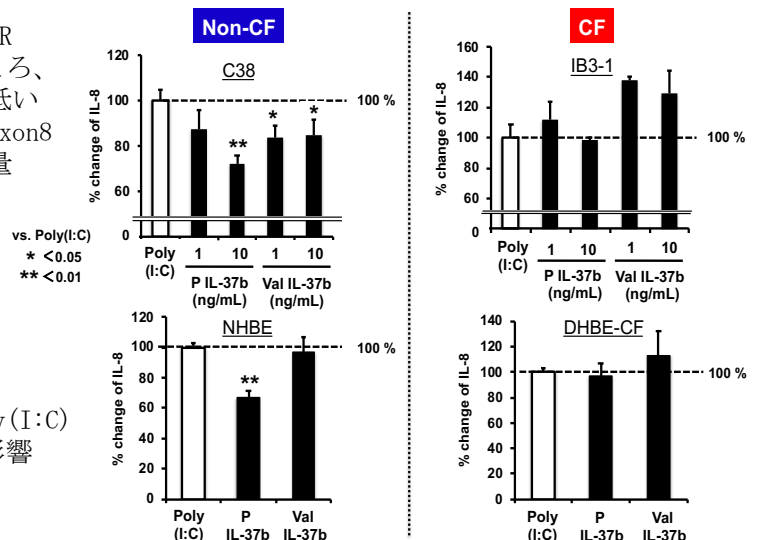


Figure. 1 正常・CF 細胞間における Poly(I:C) 誘導性 IL-8 分泌量に対する IL-37b の影響

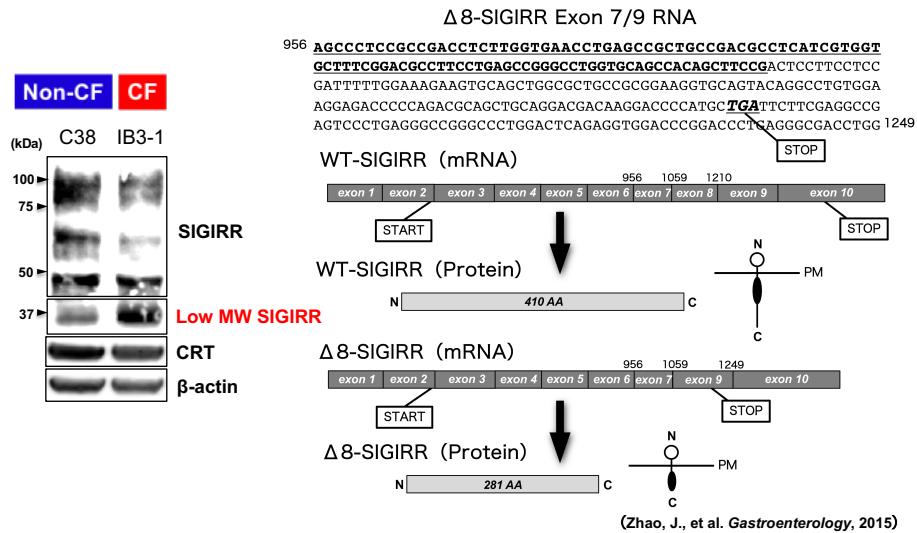


Figure. 2 正常・CF 細胞間における低分子量 SIGIRR 発現と Δ8-SIGIRR 生成過程

Figure. 2 の結果と一致して、CF 細胞における Δ8-SIGIRR mRNA 発現量は正常細胞と比して高かった (Figure. 3)。更に CF 細胞では Δ8-SIGIRR の分解も遅延していた (Figure. 3) ことから、CF 細胞における Δ8-SIGIRR 発現は mRNA およびタンパク質レベルで正に制御されていることが明らかとなった。

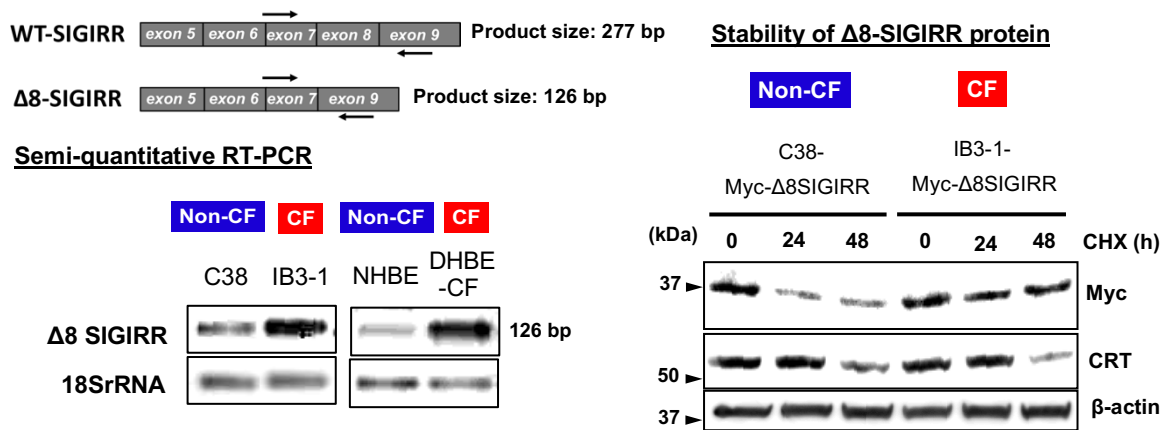


Figure. 3 正常・CF 細胞間における Δ8-SIGIRR mRNA 発現とタンパク質半減期の比較

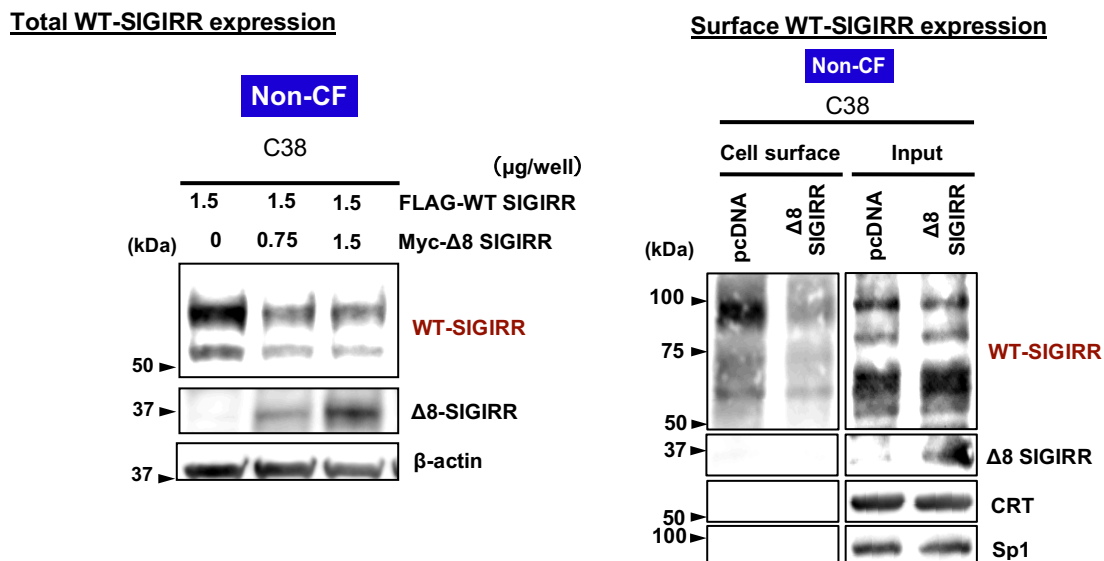


Figure. 4 Δ8-SIGIRR 過剰発現による WT-SIGIRR 発現への影響

最後に $\Delta 8$ -SIGIRRの発現量増加はWT-SIGIRRにどのような影響を及ぼすのか検討を行った。その結果、 $\Delta 8$ -SIGIRRの発現量依存的にWT-SIGIRRのMaturationが阻害され、 $\Delta 8$ -SIGIRRの過剰発現により内在性WT-SIGIRRの細胞膜上発現量が低下した(Figure. 4)。更にWT-SIGIRR単独とWTおよび $\Delta 8$ -SIGIRRの共発現下における各SIGIRR細胞内局在を観察したところ、単独発現下ではWT-SIGIRRは細胞膜上まで到達した一方、共発現下ではWT-SIGIRRは $\Delta 8$ -SIGIRRと小胞体付近において共局在し、その細胞膜上への発現が抑制されていた(data not shown)。

以上の結果より、CF特異的なSIGIRR細胞膜上発現の低下とそれに伴う炎症抑制性IL-37b-SIGIRR経路の破綻(減弱)に、 $\Delta 8$ SIGIRRによるドミナントネガティブ作用が関与することが明らかになった。本知見は、SIGIRRのスプライススイッチがCF呼吸器炎症を増悪化することを示唆する初めての報告である。

〈引用文献〉

- ① Blohmke C.J., et al. (2008) Innate immunity mediated by TLR5 as a novel anti-inflammatory target for cystic fibrosis lung disease. *J Immunol.* (180)7764-73.
- ② Kelly C., et al. (2013) Expression of nuclear factor- κ B inhibitor A20 is altered in the cystic fibrosis epithelium. *Eur Respir J.* (6)1315-23.
- ③ Nold-Petry CA., et al. (2015) IL-37 requires the receptors IL-18R α and IL-1R8(SIGIRR) to carry out its multifaceted anti-inflammatory program upon innate signal transduction. *Nat Immunol.* (4)354-65.

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計6件)

K. Ueno-Shuto, S.Kamei, MA.Suico, H.Kai, Y.Uchida, N.Tokutomi, T Shuto.
A splice switch in SIGIRR causes a defect of Poly(I:C)-dependent anti-inflammatory IL-37b-SIGIRR negative feedback loop in cystic fibrosis airway epithelial cells.
第92回日本薬理学会年会, 2019年3月14日(大阪市)

首藤恵子、亀井竣輔、内田友二、甲斐広文、徳富直史、首藤剛
嚢胞性線維症気道上皮細胞におけるSIGIRRスプライスアイソフォームの発現上昇とその炎症調節における役割
第71回日本薬理学会西南部会, 2018年11月17日(福岡市)

K. Ueno-Shuto, S.Kamei, MA.Suico, H.Kai, Y.Uchida, N.Tokutomi, T Shuto.
Poly(I:C)-dependent anti-inflammatory IL-37b-SIGIRR negative feedback loop is defective in cystic fibrosis airway epithelial cells.
North American Cystic Fibrosis Conference 2017, 2017年11月3日(Indianapolis, USA)

首藤恵子、亀井竣輔、内田友二、甲斐広文、徳富直史、首藤剛
嚢胞性線維症気道上皮細胞における炎症抑制性IL-37b-SIGIRR axis破綻
第34回日本薬学会九州支部大会, 2017年11月25日(熊本市)

K. Ueno-Shuto, S.Kamei, MA.Suico, H.Kai, Y.Uchida, N.Tokutomi, T Shuto.
Poly(I:C)-dependent anti-inflammatory IL-37b-SIGIRR negative feedback loop is defective in cystic fibrosis airway epithelial cells.
15th Cytokines & Inflammation Conference, 2017年2月6日(San Diego, USA)

首藤恵子、亀井竣輔、内田友二、甲斐広文、徳富直史、首藤剛
嚢胞性線維症気道上皮細胞における炎症抑制性IL-37b-SIGIRR axis破綻
第69回日本薬理学会西南部会, 2016年11月26日(松山市)

〔その他〕

6. 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 甲斐広文

ローマ字氏名: KAI Hirofumi