

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890276

研究課題名（和文） Toll シグナル抑制分子 SIGIRR/TIR8 の発現調節・生合成機構の解明

研究課題名（英文） Expression regulation and synthetic pathway of SIGIRR/TIR8, a negative regulator of Toll like receptor signaling

研究代表者

首藤 恵子 (SHUTO KEIKO)

崇城大学・薬学部・助手

研究者番号：70510692

研究成果の概要（和文）：

SIGIRR/TIR8 は炎症応答に重要な Toll シグナルを抑制することが報告されているが、シグナル活性化時の SIGIRR 発現変化は未だ明らかでない。そこで本研究では、Toll シグナル活性化剤である LPS による SIGIRR 発現調節に関して検討を行った。その結果、LPS 刺激により SIGIRR の発現量が転写レベルで減少し、この減少はシグナル下流で活性化する p38MAP キナーゼおよびプロモーター上の転写因子 Sp1 を介する可能性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

SIGIRR/TIR8 has been reported to negatively regulate Toll-like receptor (TLR) signaling, that plays critical role for inflammatory response. However, precise mechanism responsible for the regulation of SIGIRR expression during TLR signaling remains obscure. In this study, we confirmed the regulation of SIGIRR expression by Lipopolysaccharide (LPS), which is well known as a TLR activator. As a result, LPS down regulated SIGIRR expression at transcriptional level. Moreover, p38 MAP kinase downstream of TLR signaling, and transcriptional factor Sp1 were possibly involved in LPS induced SIGIRR down-regulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：炎症制御

1. 研究開始当初の背景

およそ 11 種類のファミリーから成る Toll-like receptor (TLR) のシグナル活性化は、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一方、TLR シグナルを介した宿主細胞の過剰な免疫活性化は時に重篤な炎症性疾患を誘発する。従って、TLR シグナルを負に制御することは免疫制御および抗炎症の観点から極めて重要である。近年 TLR シグナル、中でも TLR4 シグナルの抑制分子として SIGIRR/TIR8 (single immunoglobulin domain containing IL1 related receptor/toll-IL1R8) が同定された。しかし、その発現は TLR4 シグナルを活性化する Lipopolysaccharide (LPS) によって一過性に減少した後に回復するという、他の TLR シグナル抑制分子とは異なる発現制御を受けることが報告されているのみであり、TLRシグナル活性化時のSIGIRR発現変化に関しては未だ多くの部分が明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では、LPS による SIGIRR 発現減少と、その調節機構に関して検討を行った。

3. 研究の方法

内在性 TLR4 を発現するマウスマクロファージ細胞株の RAW264 および 1.3% DMSO 処理によりヒト好中球様細胞に分化誘導したヒト前骨髄性白血病細胞株の HL60 細胞を LPS で刺激し、SIGIRR の mRNA 発現変化を定量した。更に、その発現減少が TLR4 依存性であるか確認するためにドミナントネガティブ変異体の TLR4 および TLR4 発現コンストラクトを用いて検討を行った。また、各種阻害剤を用いて、SIGIRR 発現減少に関与する TLR4 シグナル下流分子の同定を行った。最後に、ヒト SIGIRR プロモーターアッセイおよび ChIP アッセイにより、SIGIRR 発現減少に関与する転写因子の解析を行った。

4. 研究成果

過去の報告同様、RAW264 および好中球様 HL60 細胞両細胞において LPS 刺激により SIGIRR の mRNA 発現量は時間および濃度依存的に減少した。

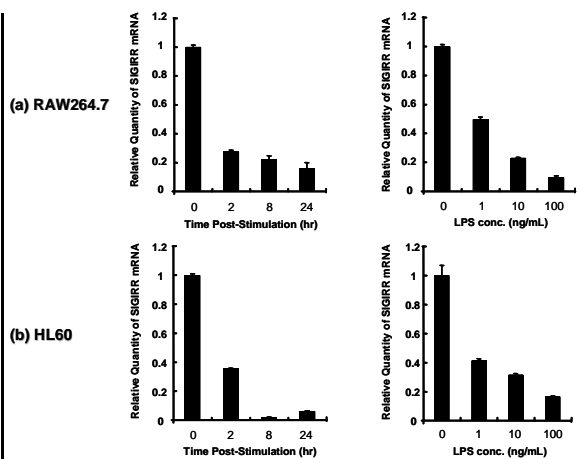


Figure.1 LPS down-regulates SIGIRR mRNA expression in RAW264.7 and neutrophilic HL60 cells.

次に SIGIRR 発現減少に LPS のレセプターである TLR4 が関与しているのか検討を行ったところ、SIGIRR 発現の減少は TLR4 の発現依存的であることを確認した。

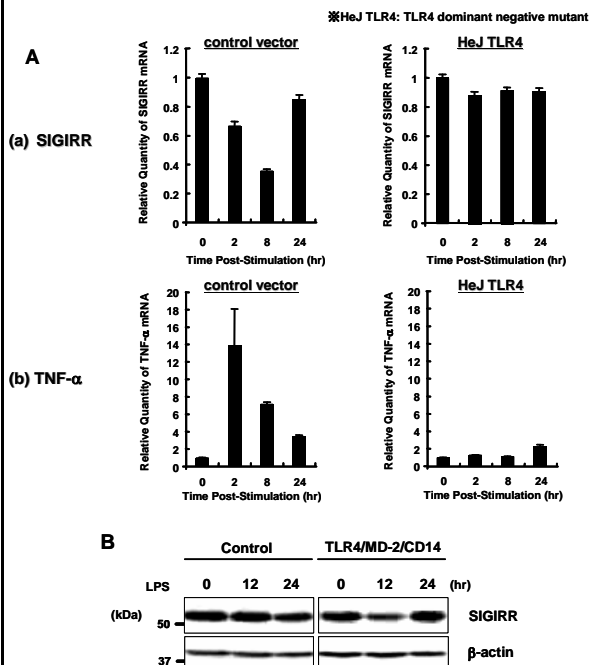


Figure.2 TLR4 is contributed for the LPS-induced SIGIRR down-regulation.

次に LPS による SIGIRR 発現減少に TLR4 下流に存在するどのシグナル分子が関与してい

るのか、各種阻害剤を用いて検討を行った。その結果、LPSによって活性化されるTLR4シグナル下流のp38MAPキナーゼが重要であることが示唆された。

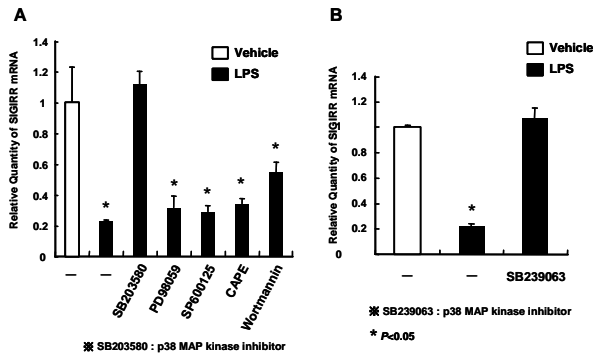


Figure.3 p38 MAP kinase activation is crucial for LPS-induced SIGIRR down regulation in neutrophilic HL60 cell.

次にLPSによるヒトSIGIRRプロモーター活性への影響を検討した。その結果、ヒト好中球様のHL60細胞からクローニングしたヒトSIGIRRプロモーター活性はLPS刺激によって顕著に減少したことから、LPSは転写レベルでSIGIRR発現を抑制することが示された。

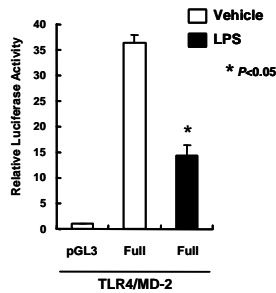


Figure.4 LPS down-regulates human SIGIRR promoter activity in HeLa cell.

LPSによるヒトSIGIRRプロモーター活性の減少メカニズムを明らかにするために、まずSIGIRRの定常発現維持に重要なプロモーター領域を探索したところ、-172から-163に存在する転写因子Sp1の結合領域がSIGIRR発現に重要であると推測された。

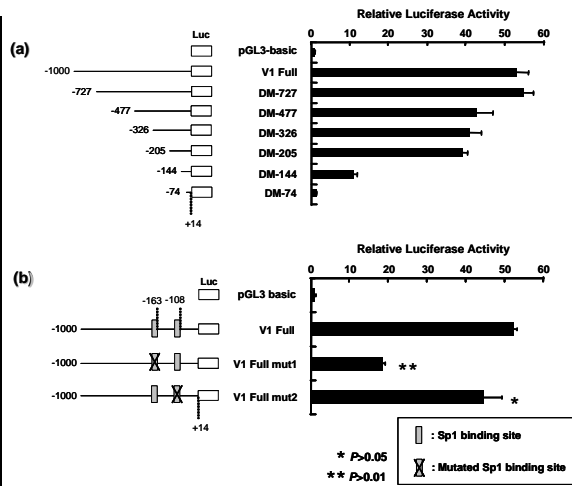


Figure.5 Basal promoter activity of human SIGIRR through putative Sp1 binding site

次にその領域へのSp1の結合がLPS刺激により影響を受けるか否かChIPアッセイにより検討した。その結果、LPS刺激によりヒトSIGIRRプロモーター上へのSp1の結合が減少することを確認した。

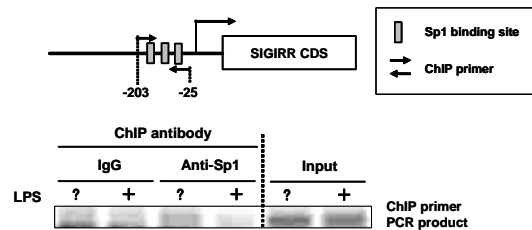


Figure.6 LPS inhibits Sp1 binding on human SIGIRR promoter.

以上の結果から、LPSによるTLRシグナル活性化時において、SIGIRR/TIR8はp38MAPキナーゼおよびSIGIRRプロモーター上への転写因子Sp1の結合減少によりその発現が抑制される可能性が示唆された。

他のTLRシグナル抑制分子の多くがTLRシグナル活性化時に発現誘導される一方、SIGIRRは発現低下するという発現調節の違いは非常にユニークである。今後p38MAPキナーゼとSp1との関連性を中心に更に詳細な分子機構が明らかになれば、LPSにより惹起される免疫応答機構または敗血症などの炎症性疾患の発症機構の解明のための一助となると思われる。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計2件)

① 首藤恵子

Lipopolysaccharide decreases SIGIRR/TIR8

gene expression possibly by suppressing Sp1 via TLR4-p38 MAP kinase pathway

Tri-society Annual Conference 2009 of the Society for Leukocyte Biology, International Cytokine Society, and International Society for Interferon and Cytokine Research.

2009. 10. 21

Lisbon, Portugal, Lisboa Congress Center

② 首藤恵子

LPSによるTollシグナル抑制分子SIGIRRの発現低下とその分子機構の解明

第26回日本薬学会九州支部大会

2009. 12. 12

九州大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

首藤 恵子 (SHUTO KEIKO)

崇城大学・薬学部・助手

研究者番号：70510692