

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860854

研究課題名(和文) アレルギー疾患発症の解明に向けたToll様受容体10を介したシグナル伝達経路解析

研究課題名(英文) The analysis of TLR10 signaling pathway for elucidating the pathogenesis of allergic diseases.

研究代表者

久保田 一生 (Kubota, Kazuo)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10526940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトToll like receptor (TLR)10に着目し、プロテオミクス解析によりTLRに関わるアレルギー疾患の病態解明を目的とした基礎的研究を行った。TLRファミリー分子の細胞内TIRドメイン間の相互作用をミミックする実験系の構築のために、TIRドメインに強制二量体化させる別のドメインを付加した融合タンパクを作成、生理活性の有無を検討した。TLR1とTLR2の組み合わせで最適化した条件で、TLR6とTLR2ではNF- κ B転写活性は増強したがTLR10とTLR2では活性は上昇しなかった。TLR10はTLR2シグナル経路におけるNegative regulator機能を持つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the pathophysiology of allergic diseases associated with Toll like receptor (TLR) signaling through basic research by proteomics analysis of human TLR10. We have attempted to establish an in vitro experimental system to mimic the interaction between intracellular Toll/IL-1 receptor (TIR) domains of TLR family including TLR10. The production and the analysis of the chimeric TIR proteins derived from different TLRs fused with an additional domain to N-terminus for forced dimerization was performed to investigate whether these fusion proteins possess bioactivity. First, the optimization experiment was performed using TLR1 and TLR2. In the similar condition, TLR2 combined with TLR6 could activate NF- κ B signaling. On the other hand, the NF- κ B activation induced by TLR2 combined with TLR10 was not observed. These results suggest that TLR10 may play as a potent negative regulator in TLR2 signaling pathway.

研究分野：自然免疫

キーワード：自然免疫 Toll様受容体

1. 研究開始当初の背景

病原体由来成分を認識する受容体である Toll 様受容体 (TLR) のシグナル伝達経路の異常は、原発性免疫不全症やアレルギー疾患の発症に関与しているとされる。例えば TLR 下流の IRAK4 や MyD88 の欠損により化膿性細菌に対する易感染性が生じることが判明しているし、TLR2 の R753Q 多型も同様にブドウ球菌等に対する易感染性やアトピー性皮膚炎との関連性が報告されている。また、TLR10 の I775L と気管支喘息との関連についても報告されている。

研究者の所属する施設では以前から MyD88 や IL-18 のタンパク立体構造解析を通じて免疫異常疾患の病因解明に取り組んでいるが、それらの経験を元にプロテオミクス解析を利用して、いまだそのリガンドやシグナル伝達経路が十分解明されていないヒト TLR10 の機能を解析することが可能ではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究ではヒト TLR10 の機能に着目し、プロテオミクス解析を利用して免疫不全症やアレルギー疾患等の TLR 関連疾患の病態解明を最終目的とした基礎的研究を行った。

3. 研究の方法

TLRs の細胞内 TIR ドメイン間の相互作用を精製されたりコンビナントタンパクで再現することが困難であったため、細胞内、試験管内でミミックする実験系の構築を試みた。TLR1, TLR2, TLR6, TLR10 を対象としてそれぞれの TIR ドメインに強制二量体化させる別のドメイン N1, N2 を N 末端に付加した融合タンパクのコンストラクトを作成した。大腸菌及びほ乳類培養細胞にてこれら融合タンパクの発現系を構築した。次いで、N1, N2 は低分子 X の介在により強制二量体化が誘導されるため、融合タンパク中の TIR ドメイン分子も近接することになり、生理活性をミミックすることが理論上可能となるので、それらを検証することとした。

4. 研究成果

まずはモデルケースとして TLR1, TLR2 について検討を行った。ドメイン N1 付加 TLR1-TIR ドメインとドメイン N2 付加 TLR2-TIR ドメインのリコンビナントタンパクの精製に成功した。これらは低分子 X により強制的に安定二量体化された。さらにドメイン N1 付加 TLR1-TIR ドメインとドメイン N2 付加 TLR2-TIR ドメインを HEK293 細胞に発現させ、低分子 X を添加することにより転写因子 NF- κ B 活性の上昇が確認された。この転写活性の上昇は、N1 あるいは N2 と TIR ドメイン間の Linker 配列の長さに依存していることも判明した。次いで TLR6, TLR10 についてもそれぞれドメイン N1 付加の発現系を構築し、同様の細胞内相互作用ミミック実験を行ったところ、TLR6 についても TLR1 同様 NF- κ B 活性を有しているのに対して、TLR10 は NF- κ B 活性上昇はみられなかった。

考察: TIR ドメインの相互作用について、細胞内で本来の TLRs のリガンド認識をミミックする実験系が細胞内、試験管内で構築できた。また、TLR10 は TLR1 と細胞外ドメイン構造は極めて相同性が高く、TLR2 との組み合わせでリガンド認識能を有しているとされるが、細胞内では NF- κ B 活性誘導能を持たないことが明らかとなった。従って、TLR10 は TLR2 シグナル経路における Negative regulator 機能を有しているのではないかと推測される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

Kubota K, Ozeki M, Hori T, Kanda K, Funato M, Asano T, Fukao T, Kondo N: Facial palsy as an unusual presenting symptom associated with acute myeloid leukemia. *Pediatr Int.* 2014;56:e37-40
査読あり
DOI: 10.1111/ped.12384.

Kubota K, Ohnishi H, Teramoto T, Kawamoto N, Kasahara K, Ohara O, Kondo N. Clinical and genetic

characterization of Japanese sporadic cases of periodic Fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and adenitis syndrome from a single medical center in Japan. J Clin Immunol. 2014;34:584-93. 査読あり
DOI: 10.1007/s10875-014-0043-2.

Yamamoto T, Tsutsumi N, Tochio H, Ohnishi H, Kubota K, Kato Z, Shirakawa M, Kondo N: Functional assessment of the mutational effects of human IRAK4 and MyD88 genes. Mol Immunol. 2014;58:66-76. 査読あり
DOI: 10.1016/j.molimm.2013.11.008.

〔学会発表〕(計 6件)

川本 美奈子, 大西 秀典, 川本 典生, 山本 崇裕, 久保田 一生, 大塚 博樹, 寺本 貴英, 深尾 敏幸: 食道潰瘍を反復した1型高IgE症候群の1例 第52回日本小児アレルギー学会、2015年11月21日～22日、奈良県奈良市

大西 秀典, 川本 典生, 川本 美奈子, 笹井 英雄, 山本 崇裕, 久保田 一生, 木野村 依子, 桑原 秀次, 上野 たまき, 深尾 敏幸: 家族性地中海熱様の発作を反復する TNFRSF1A-Thr611Ile バリエントの1例 第25回日本小児リウマチ学会総会、2015年10月9日～11日、石川県金沢市

大西 秀典, 久保田 一生, 寺本 貴英, 川本 典生, 笹井 英雄, 深尾 敏幸: 当院で診断した PFAPA 症候群の孤発症例の解析、第24回日本小児リウマチ学会総会、2014年10月3日～5日、宮城県仙台市

川本 典生, 松井 永子, 平山 耕一郎, 久保田 一生, 山本 崇裕, 大西 秀典, 木全 かおり, 篠田 紳司, 加藤 善一郎, 近藤 直実: 家族歴・遺伝多型による食物アレルギーの予知・予測についての検討、第26回日本アレルギー学会春季臨床大会、2014年5月9日～11日、京都府京都市

大西 秀典, 寺本 貴英, 久保田 一生, 加藤 善一郎, 近藤 直実: カナキヌマブで治療した家族性寒冷自己炎症性症候群の1家系の免疫プロファイルの推移、第25回日本アレルギー学会春季臨床大会、2013年5月11日～12日、神奈川県横浜市

川本 典生, 松井 永子, 平山 耕一郎, 久保田 一生, 山本 崇裕, 大西 秀典, 木全 かおり, 篠田 紳司, 加藤 善一郎, 近藤 直実: 食物アレルギー発症に関わる家族歴・遺伝因子についての検討、第25回日本アレルギー学会春季臨床大会、2013年5月11日～12日、神奈川県横浜市

〔図書〕(計 2件)

大西 秀典, 久保田 一生: 遺伝性自己炎症疾患の臨床像と診断フローチャート、Journal of Environmental Dermatology and Cutaneous Allergology、7巻3号 Page169-176、2013年

大西 秀典, 山本 崇裕, 久保田 一生, 堀 友博: クローズアップ 新しい子どもの病気】免疫不全<新し 発見された疾患 自然免疫関連分子の異常による免疫不全、小児内科、45巻6号 Page1142-1145、2013年

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 一生 (KUBOTA, Kazuo)
岐阜大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：10526940

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：