

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19790366

研究課題名（和文）TGF- $\beta$ 1によるTLRシグナル伝達系の制御機構の解明研究課題名（英文）Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 down-regulates Interferon Regulatory Factor 7 signaling

研究代表者

内記良一（NAIKI YOSHIKAZU）

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：10434622

研究成果の概要：

TLRは、微生物の構成成分を認識することにより、侵入する病原菌に対し、初期の免疫応答を引き起こす重要な役割を担っている。TLRによる免疫反応の収束において、TGF- $\beta$ 1が複数あるユビキチン・プロテアソーム系のうち、何がMyD88のユビキチン化を誘導しているのかを検討した。マクロファージ由来細胞株および上皮細胞由来細胞株を用いてTGF- $\beta$ 1処理を行い、細胞内でのシグナル伝達機構およびMyD88以外のTLR関連分子への影響について検討した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：免疫学・細胞

キーワード：細胞内シグナル伝達 TLR (Toll 様受容) TGF- $\beta$ 1

## 1. 研究開始当初の背景

免疫系細胞上に存在する Toll like receptor (TLR) は、病原菌の侵入に対するセンサーであり、その情報伝達経路は感染初期において病原菌を感知することによって活性化され、獲得免疫を強化することが近年明らかになった。TLR は TIR (TLR/IL-1 受容体) スーパーファミリーに属し、ウイルス、細菌、カビ、寄生虫の病原体特有の分子配列 (PAMPs) を認識する。しかし、過剰な反応は自己免疫疾患や慢性炎症の病因のひとつにも数えられる。抗炎症性タンパク質である Transforming

growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) は多様な生理活性を誘導するサイトカインであり、上皮系、血管系細胞で細胞増殖抑制因子として働く。また、TGF- $\beta$ 1 が過剰に産生されると繊維化疾患を誘導することが知られている。申請者は LPS によって誘導される TLR4 シグナルが TGF- $\beta$ 1 による Myeloid differentiation factor 88 (MyD88) のユビキチン化の誘導によって阻害されことを明らかにした (Naiki Y et al. 2005 Journal of Biological Chemistry)。これは TLR 関連タンパクがユビキチン化され、

負の免疫制御が行われることを示した最初の報告である。しかし、細胞内においてどのようにTGF-ベータ1からのシグナルがユビキチン・プロテアソーム系を制御し、MyD88のユビキチン化を誘導するのかが明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

TLRは、微生物の構成成分を認識することにより、侵入する病原菌に対し、初期の免疫応答を引き起こす重要な役割を担っている。TLRによる免疫反応の収束において、TGF-ベータ1が複数あるユビキチン・プロテアソーム系のうち、どれを用いてMyD88のユビキチン化を誘導しているのかを検討した。具体的な実験系としてマクロファージ由来細胞株および上皮細胞由来細胞株を用いてTGF-ベータ1処理を行い、細胞内でのシグナル伝達機構およびMyD88以外のTLR関連分子への影響について検討した。

本研究の目的は TGF-ベータ 1 による MyD88 のユビキチン化に着目し TLR のシグナル伝達機構について包括的に検討することにある。

## 3. 研究の方法

マクロファージ系細胞株RAW264.7を用い、TGFβ1を前投与し、各種TLRリガンド刺激後の細胞内での反応を解析した。

- (1) E3ユビキチンリガーゼ分子の中で、どの分子がTGF-ベータ1によって活性化されMyD88を分解するのかを同定する。RAW264.7を用い、TGF-ベータ1がTLRシグナル伝達を制御するメカニズムを明らかにするため、RAW264.7をTGF-ベータ1で刺激後リアルタイムPCRを用い、TGF-ベータ1投与量依存的、経時的なTLR2, TLR4, MyD88, TRIF related adaptor molecule (TRAM), Toll-interleukin 1 receptor domain containing adapter protein (TIRAP) よびTRIFのmRNA発現量を解析した。免疫沈降-ウエスタンブロッティング法もしくは通常のウエスタンブロッティング法によりTLR2, TLR4, MyD88, TRAM,

TIRAPおよびTRIFのタンパク発現量について解析した。さらに、TLRシグナル伝達系に含まれるどのリン酸化酵素の活性化がTGF-ベータ1によって影響されるのかを、Smad, リン酸化MAPキナーゼ (p38, JNK, およびERK1/2), PI3キナーゼ伝達系分子 (リン酸化したAkt) についてウエスタンブロッティング法によって明らかにした。TLRリガンド、すなわちLPS (TLR4), Pam3Cys (TLR2), Poly I:C (TLR3) によって誘導されるTLRシグナルに TGF-ベータ1がおよぼす影響を検討した。TGF-ベータ1の有無が各種TLRリガンドから誘導されるサイトカイン産生におよぼす変化について解析した。

- (2) TGF-ベータ1を投与後TGF-ベータ1受容体下流の主要なシグナル関連分子であるSmadとユビキチン・プロテアソーム系のシグナル調節について検討した。

## 4. 研究成果

TGF-ベータ1はCpGによって誘導されるI型インターフェロンの産生をIRF7の発現とリン酸化を阻害することにより制御し、またIRF7とTRAF6の相互作用にも影響をおよぼしていることが明らかになった。TGF-ベータ1はIRF7-TRAF6の相互作用を一過性に増強しており、これがIRF7の分解に関与していることが示唆された。TGF-ベータ1のTLRシグナル経路への関与は主に炎症を抑制させる方向に働き、生体防御のための炎症反応を適切な範囲に収める役割を果たしていることが示唆された。

## 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 1件)  
内記良一、横地高志 臨床免疫・アレルギー科, 51 (3): 262-265, 2009 査読無

〔学会発表〕（計 4 件）

1. 第 37 回 日本免疫学会
2. 第 54 回 毒素シンポジウム
3. 第 38 回 日本免疫学会
4. 第 81 回 日本細菌学会

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内記良一 (NAIKI YOSHIKAZU)  
愛知医科大学・医学部・助教  
研究者番号：10434622

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者