

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：37401
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2021
課題番号：19K07114
研究課題名(和文) 嚢胞性線維症特異的スプライスバリエント発現調節機序の解明と新規治療戦略の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the regulation mechanism of cystic fibrosis-specific splice variant expression and development of novel therapeutic strategies

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：嚢胞性線維症(CF)は慢性呼吸器炎症を呈する難治性疾患であるが、その一因として、病原微生物に対する免疫応答に重要なToll様受容体(TLRs)のシグナル過剰活性化が報告されている。抗炎症性サイトカインのIL-37をリガンドとするSIGIRRはTLRの炎症性シグナルを抑制する膜貫通タンパク質であり、CF気道上皮細胞では、SIGIRRのスプライスバリエントによりその正常型(WT-SIGIRR)の細胞膜上発現が抑制されていることが明らかとなった。そこで本研究では、WT-SIGIRRの細胞膜上発現を回復させるため、その発現を特異的に誘導する新規化合物の探索を行ったところ、分子X阻害剤が同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CF気道上皮細胞において分子X阻害剤によりWT-SIGIRRを特異的に発現誘導する事は、分子X family阻害剤が持つ細胞毒性等の副作用を軽減しながらIL-37による抗炎症作用を回復させる為に有用である可能性が示唆された。本知見は、抗炎症分子SIGIRRを強力に発現誘導する標的を明らかにした初めての報告であり、CF気道炎症に対する新たな治療戦略を提起するものである。

研究成果の概要(英文)：Cystic Fibrosis (CF) is a hereditary disorder typically characterized by infection-associated chronic lung inflammation. Toll-like receptors (TLRs) are innate immune receptors that sense pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and their excessive or prolonged activation is considered as one of the mechanisms for CF hyperinflammatory phenotype. SIGIRR is a transmembrane protein acting as a negative regulator of multiple TLR signaling pathways after stimulation with anti-inflammatory cytokine IL-37, a ligand for SIGIRR. We have recently demonstrated the defective surface expression of full-length SIGIRR (WT-SIGIRR) in CF airway epithelial cells due to its splicing variant 8-SIGIRR, suggesting impaired IL-37-dependent anti-inflammatory activity. In order to restore its surface expression in CF cells, we performed screening analysis and revealed that factor X inhibitor is a specific inducer for WT-SIGIRR.

研究分野：細胞生物学、薬理学

キーワード：嚢胞性線維症 SIGIRR スプライスバリエント IL-37 化合物探索

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 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 の変異により発症する常染色体劣性遺伝性疾患である。CFTR の欠損または機能不全により細胞内外環境が著しく変化し、その患者の多くは慢性的な細菌・ウイルス気道感染による IL-8 を軸とした好中球優位の持続的炎症と過剰な粘液貯留、およびこれらの症状に伴う気道閉塞を呈し、若年で呼吸不全により死に至る。特に 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て重要な役割を果たす Toll-like receptors (TLRs) のシグナル過剰活性化 (引用文献) やシグナル抑制分子の発現低下 (引用文献) が一因であるとの報告があるものの、その詳細について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 型膜貫通タンパク質であり、TLRs に加えて IL-1R、IL-18R、ST2 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 1 つの immunoglobulin ドメインが存在し、抗炎症性サイトカインの IL-37 がリガンドとして結合して抗炎症作用を発揮する (引用文献) ことから、SIGIRR を外因的に活性化することにより炎症を抑制するという新たな炎症治療法の可能性が期待される。

2. 研究の目的

これまでの研究結果から、CF 気道上皮細胞において正常型 SIGIRR (WT-SIGIRR) の細胞膜上発現量が低下し、それに伴い IL-37 による抗炎症作用が消失していること、更に CF 気道上皮細胞ではエキソン 8 が欠損したスプライスバリエーションである $\Delta 8$ -SIGIRR の発現量が増加し、そのドミナントネガティブ作用により WT-SIGIRR の細胞膜上発現が抑制されることが明らかとなった。そこで本研究では、WT および $\Delta 8$ -SIGIRR の発現バランス異常を是正する新規物質を探索・同定し、WT-SIGIRR 細胞膜上発現量増加により消失した IL-37 の抗炎症作用を回復させる CF の新規抗炎症療法の基盤を確立することを目的に、種々の検討を行った。

3. 研究の方法

CF 気道上皮細胞株の IB3-1 に対して約 300 種類の既存化合物を処理し、WT および $\Delta 8$ -SIGIRR の mRNA、タンパク質発現量を定量的 RT-PCR 法、ウェスタンブロットティング法にて検出した。また、増加した WT-SIGIRR の細胞膜上発現量の検出にはビオチン化法、WT および $\Delta 8$ -SIGIRR 各転写産物コピー数の絶対量の検出にはデジタル PCR 法を用いた。TLR3 リガンドの poly(I:C) 誘導性 IL-8 分泌は ELISA 法を用いて定量した。

CF 気道上皮細胞株の IB3-1 および CFBE に対して各分子 X family 特異的阻害薬を処理、または分子 X siRNA を導入し、WT および $\Delta 8$ -SIGIRR の mRNA、タンパク質発現量を定量的 RT-PCR 法、ウェスタンブロットティング法にて検出した。

4. 研究成果

まず WT-SIGIRR の発現や機能を特異的に増強する新規化合物を探索・同定するために、CF 気道上皮細胞株の IB3-1 に対して約 300 種類の既存化合物を処理し、WT および $\Delta 8$ -SIGIRR の mRNA 発現量を検出した。その結果、化合物 X および化合物 Y が WT-SIGIRR を増加させた一方、 $\Delta 8$ -SIGIRR にはほとんど影響を与えなかった。同様の作用はタンパク質レベルにおいても確認され、WT-SIGIRR の細胞内発現増加に伴い、その膜上発現の増加も認められた。

化合物 X および Y は、分子 X family 阻害作用を有することが知られている。そこで、化合物 X および Y による WT-SIGIRR 特異的な発現誘導が分子 X family 阻害に起因するものであるのか明らかにするため、分子 X family 阻害薬の化合物 Z を IB3-1 細胞に処理したところ、WT-SIGIRR の増加と $\Delta 8$ -SIGIRR の低下が mRNA およびタンパク質レベルで認められた (Figure.1)。WT および $\Delta 8$ -SIGIRR の各転写産物コピー数においても同様の結果が得られたことから、WT-SIGIRR 特異的な発現増加は分子 X family 阻害により誘導され、特に化合物 Z は同時に $\Delta 8$ -SIGIRR を低下させるスプライススイッチ作用を有する可能性が示唆された。

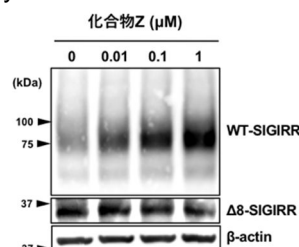


Figure.1 化合物ZによるWT-SIGIRR特異的発現誘導

更に、化合物 Z を前処理した細胞においてのみ IL-37 の添加による poly(I:C) 誘導性 IL-8 分泌の抑制が認められたことから、化合物 Z による WT-SIGIRR 特異的発現誘導は CF 気道上皮細胞における IL-37 の抗炎症作用を回復させる可能性が示された。

その一方、化合物 Z の広範な分子 X family 阻害による細胞毒性と IL-8 のベースライン上昇も共に観察されたことから、このような副作用を軽減する為、次に WT-SIGIRR 特異的発現誘導に關与する分子 X の同定を試みた。その結果、共に CF 気道上皮細胞株である IB3-1 および CFBE において、分子 X 阻害剤の化合物 A のみが WT-SIGIRR の発現を増加させ、

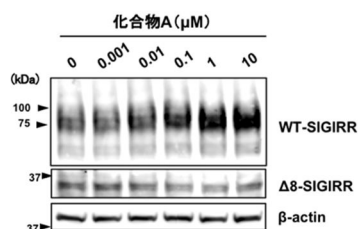


Figure.2 化合物AによるWT-SIGIRR特異的発現誘導

8-SIGIRR には影響を与えなかった (Figure.2)。分子 X ノックダウン時にも同様な結果が得られ、分子 X 阻害やノックダウンによる細胞毒性や IL-8 のベースライン上昇は認められなかった。以上の結果から、CF 気道上皮細胞において分子 X 阻害により WT-SIGIRR を特異的に発現誘導する事は、副作用を軽減しながら IL-37 による抗炎症作用を回復させる為には有用である可能性が示唆された。本知見は、抗炎症分子 SIGIRR を強力に発現誘導する標的を明らかにした初めての報告であり、CF 気道炎症に対する新たな治療戦略を提起するものである。

引用文献

- Greene CM., et al.(2008) Toll-like receptors as therapeutic targets in cystic fibrosis lung disease. *Expert Opin. Ther. Targets*.12(12):1-15.
- Kelly C., et al. (2013) Expression of nuclear factor- κ B inhibitor A20 is altered in cystic fibrosis epithelium. *Eur Respir J*.(6)1315-23.
- 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

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fujikawa H, Sakamoto Y, Masuda N, Oniki K, Kamei S, Nohara H, Nakashima R, Maruta K, Kawakami T, Eto Y, Takahashi N, Takeo T, Nakagata N, Watanabe H, Otake K, Ogata Y, Tomioka NH, Hosoyamada M, Takada T, Ueno-Shuto K, Suico MA, Kai H, Saruwatari J, Shuto T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Higher Blood Uric Acid in Female Humans and Mice as a Protective Factor Against Pathophysiological Decline of Lung Function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 387
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox9050387	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Haruka Fujikawa, Taise Kawakami, Ryunosuke Nakashima, Aoi Nasu, Shunsuke Kamei, Hirofumi Nohara, Yuka Eto, Keiko Ueno-Shuto, Toru Takeo, Naomi Nakagata, Mary Ann Suico, Hirofumi Kai, Tsuyoshi Shuto.	4. 巻 43
2. 論文標題 Azithromycin inhibits constitutive airway epithelial sodium channel activation in vitro and modulates downstream pathogenesis in vivo.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 725-730
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b19-01091	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirofumi Nohara, Ryunosuke Nakashima, Shunsuke Kamei, Haruka Fujikawa, KeikoUeno-Shuto, Taisei Kawakami, Yuka Eto, Mary Ann Suico, Jian-DongLi, Hirofumi Kai, Tsuyoshi Shuto.	4. 巻 524
2. 論文標題 Intratracheal GLP-1 receptor agonist treatment up-regulates mucin via p38 and exacerbates emphysematous phenotype in mucus hypersecretory obstructive lung diseases.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 332-339
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.01.081	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kentaro Oniki, Hirofumi Nohara, Ryunosuke Nakashima, Yui Obata, Narumi Muto, Yuki Sakamoto, Keiko Ueno-Shuto, Tadashi Imafuku, Yu Ishima, Hiroshi Watanabe, Toru Maruyama, Koji Otake, Yasuhiro Ogata, Mary Ann Suico, Hirofumi Kai, Tsuyoshi Shuto, and Junji Saruwatari.	4. 巻 10
2. 論文標題 The DsbA-L gene is associated with respiratory function of the elderly via its adiponectin multimeric or antioxidant properties.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5973
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-62872-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林 恵、中嶋 竜之介、高橋 宜暉、那須 葵、岸本 朋樹、首藤 恵子、Mary Ann Suico、甲斐 広文、首藤 剛
2. 発表標題 正常および慢性閉塞性肺疾患モデルにおける抗ウイルス免疫抑制分子 PD-L1 の発現変動
3. 学会等名 第38回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------