

機関番号：37104
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20790342
 研究課題名（和文）Toll-like receptor 10のリガンド探索および機能解析
 研究課題名（英文）Functional analysis of Toll-like receptor 10

研究代表者
 清水 隆 (SHIMIZU TAKASHI)
 久留米大学・医学部・助教
 研究者番号：40320155

研究成果の概要（和文）：TLR10の機能を解析するためにTLR10を293T細胞に発現させた、その結果TLR10はリポタンパク質によるTLR2を介したNF-κB誘導を阻害することが明らかとなった。このことからTLR10はTLR2を競争的に阻害し、炎症を抑制することが示唆された。

*Mycoplasma pneumoniae*の接着が誘導する炎症誘導とTLR10の関連を検討したが、*M. pneumoniae*の接着による炎症誘導はTLR10非依存的で、ATPとP2X7receptorに依存的であった。

研究成果の概要（英文）：TLR10 expression in 293T cells suppressed the activation of NF-κB by lipoproteins through TLR2. This result indicates that TLR10 plays an important role to inhibit and control the inflammatory responses induced by TLR2.

We examined the relationship between TLR10 and TLR2 independent inflammatory responses induced by cytoadherence of *Mycoplasma pneumoniae*. The induction of TLR2 independent inflammatory responses by cytoadherence of *M. pneumoniae* was dependent of ATP and P2X7 receptor, but independent of TLR10.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：感染免疫

1. 研究開始当初の背景

近年、Toll-like receptor (TLR)と呼ばれる一連の受容体ファミリーが、細菌の菌体成分を認識し、細胞を活性化することが報告され、注目を集めている。これまでにTLR1からTLR11まで報告されており、TLRのリガンドとしてはLPSがTLR4、リポタンパク質がTLR1、2、6、ペプチドグリカンがTLR2、細

菌タンパク質がTLR5、11、DNAがTLR9、RNAがTLR3、7、8を介して刺激を細胞に伝えることが知られている。しかしながらTLR10はマウスには存在しておらず、ノックアウトマウスなどの作成が出来なかったことから、ほとんど解析がなされず、いまだにそのリガンドはわかっていない。TLR10はTLR2の補受容体であるTLR1やTLR6と相同

性高く、リポプロテインの認識に関与している可能性が考えられるが、これまでにそのような報告はない。

2. 研究の目的

TLR10 のリガンド及び機能解析することを目的とする。

3. 研究の方法

TLR10 の機能は TLR10 及び TIR ドメインを欠損させた DN TLR10 を 293T 細胞に発現させることで検討した。

炎症の誘導は NF- κ B の結合ドメインの下流にルシフェラーゼを結合させたレポーターベクターをトランスフェクトし、ルシフェラーゼの活性を計測することにより検討した。

炎症性サイトカインは ELISA 法により検討した。

4. 研究成果

TLR10 とリポプロテイン

TLR10 はリポプロテインを認識する TLR1, 2, 6 に配列が近いことから、TLR10 とリポプロテインの関連性をまず検討した。

TLR10 の全長を 293T 細胞に発現させ、マイコプラズマ由来のリポプロテインの N 末端部分を含むリポペプチド (FAM20) で刺激したところ、炎症反応の誘導は見られなかった。このことから TLR10 はリポプロテインの直接のレセプターではないことが示唆された。

TLR10 の TIR ドメインを欠損させたドミナントネガティブ (DN) TLR10 をリポプロテインのレセプターである TLR2 と共に 293T 細胞に発現させたところ、TLR2 を介したリポプロテインによる炎症反応の誘導が抑えられた (図1)。このことから TLR10 は TLR2 の補受容体として機能していると考えられた。

TLR10 の発現が TLR2 を介したリポプロテインの炎症誘導を促進するかを検討するために全長の TLR10 を TLR2 と共に 293T 細胞に発現させた。予想に反して全長の TLR10 の発現はリポプロテインによる炎症誘導を阻害した (図2)。このことから TLR10 は TLR2 のリポプロテイン認識を阻害することが示唆された。

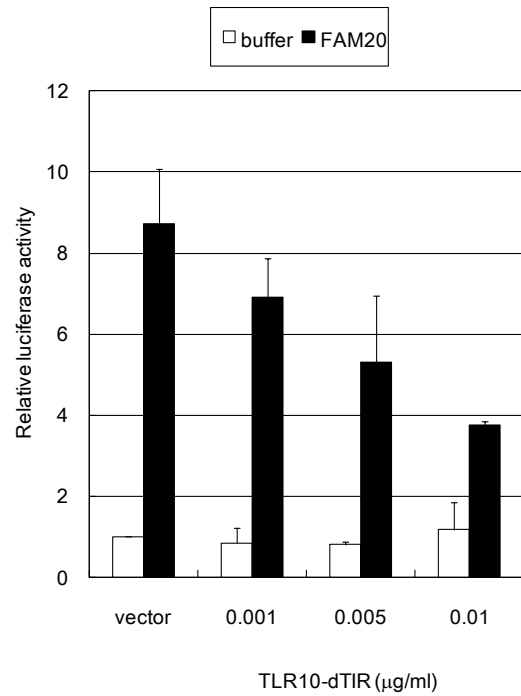


図1. TLR2 を介した NF- κ B 誘導における DN TLR10 の影響

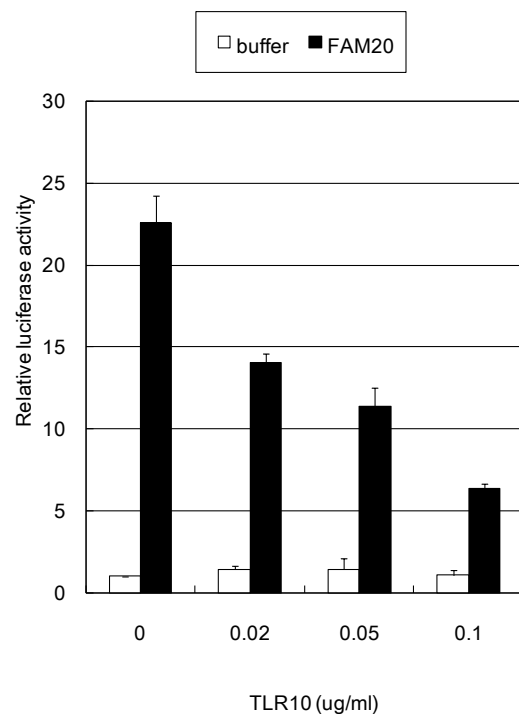


図2. TLR2 を介した NF- κ B 誘導における TLR10 の影響

TLR10がTLR2を介したリポプロテインによる炎症誘導を抑制するかどうかを確かめるために、siRNAやsiRNA発現プラスミド導入によるノックダウンを試みた。しかしながら、THP-1細胞においてTLR10をノックダウンするに至らなかった。

また、またリポプロテインとTLR10の結合を表面プラズモン共鳴センサーで測定するためにFLAGタグをつけたTLR10を発現させたが、解析に必要な十分な収量を得ることが出来なかった。

Mycoplasma pneumoniaeのTLR2非依存的な炎症誘導

Mycoplasma pneumoniae はヒトに肺炎を起こす細菌である。我々はこれまでに *M. pneumoniae* のリポプロテインが TLR2 を介して炎症を誘導することを報告してきた。さらに我々は THP-1 細胞において熱処理で不活化した *M. pneumoniae* や接着機能を欠損させた変異株 (M5、M6) では野生株 (M129) の生菌に比べ TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカインの産生が著しく減弱されることを見出した(図 3、4)。

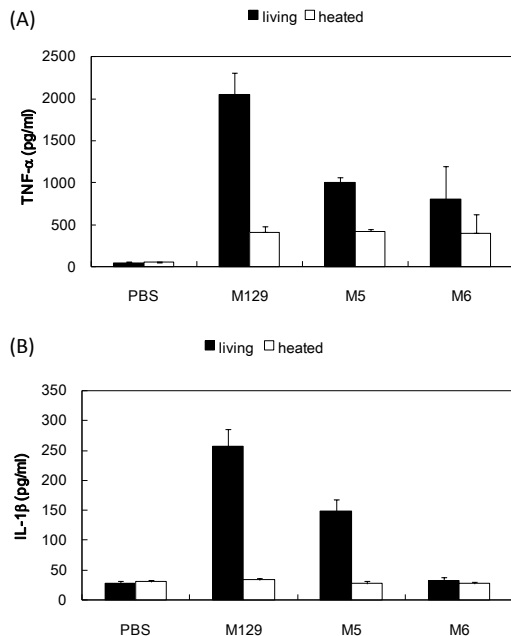


図 3. THP-1 細胞における生菌と熱処理菌の TNF- α (A)及び IL-1 β (B)の誘導

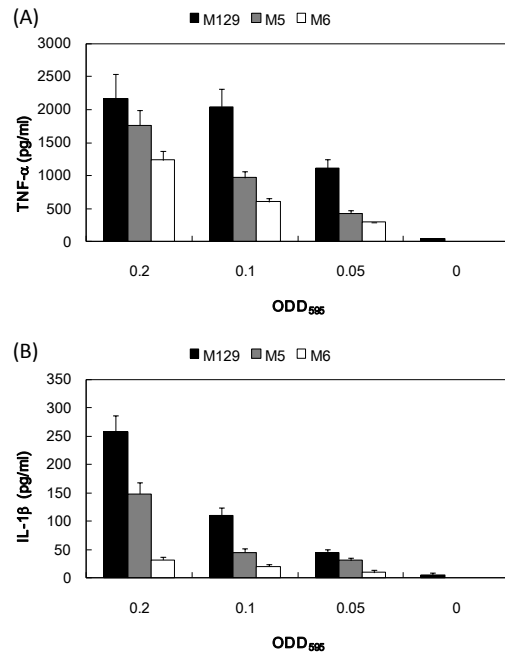


図 4. THP-1 細胞における生菌と接着変異体の TNF- α (A)及び IL-1 β (B)の誘導

また、抗 TLR2 抗体存在下においても野生株の生菌は強い炎症を誘導するが、接着変異株はサイトカインの産生が抗体により完全に抑制されることが明らかとなった (図 5)。このことから *M. pneumoniae* の接着などの生体反応が TLR2 非依的に炎症を誘導することが示唆された。

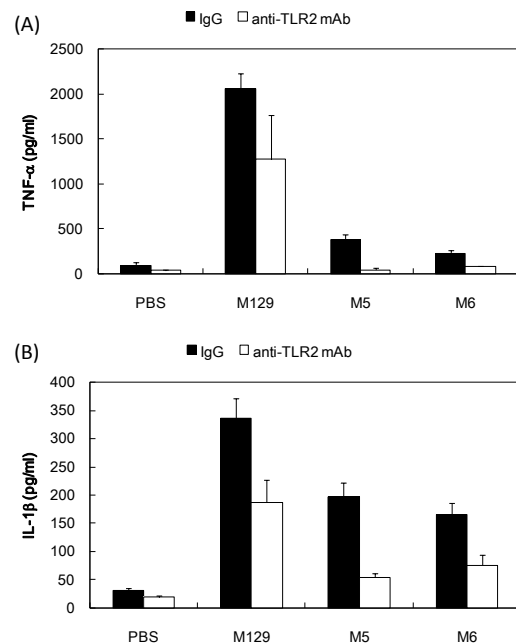


図 5. 抗 TLR2 抗体存在下における TNF- α (A)及び IL-1 β (B)の誘導

そこで我々はこの TLR2 非依存的な炎症誘導が TLR10 を介して起こっているかどうかを検討した。293T に全長の TLR10 を発現させ、*M. pneumoniae* の生菌を換算させたが、炎症誘導は見られなかった。このことからこの *M. pneumoniae* の炎症誘導は TLR10 非依存的に起こっていることが明らかとなった。

我々はこの TLR2 非依存的な炎症誘導が ATP のレセプターである P2X7 レセプターの阻害剤である oxidized ATP によって阻害されることや、接着能を有した *M. pneumoniae* が ATP を強く誘導することを見出した(図 6, 7)。

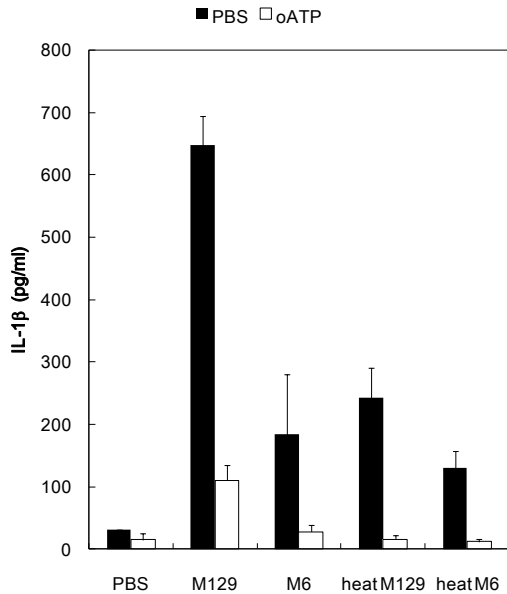


図 6. THP-1 細胞における IL-1β 産生に対する oATP の影響

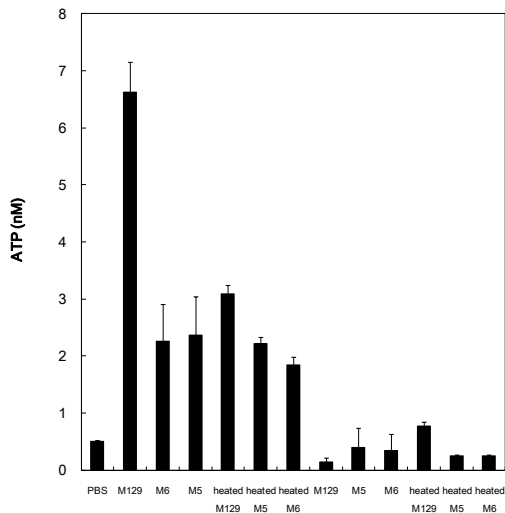


図 7. THP-1 細胞における ATP の産生

これらのことから *M. pneumoniae* の接着が宿主細胞から ATP を誘導し、その ATP が P2X7 レセプターに結合することにより細胞内のタンパク質複合体である inflammasome が活性化され、炎症が誘導されることが示唆された。

我々はこれらの結果をまとめて 2011 年に immunology に投稿した。

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)

1. Shimizu T, Kida Y, Kuwano K
Cytoadherence-dependent induction of inflammatory responses by *Mycoplasma pneumoniae*.
Immunology. 2011, in press

[学会発表] (計 13 件)

1. 清水 隆, 木田 豊, 桑野 剛一
Mycoplasma pneumoniae の接着に依存的な炎症誘導
第 63 回細菌学会九州支部総会
2010 年 09 月 03 日
2. 清水 隆, 三室仁美
Helicobacter pylori の炎症誘導リポプロテインの同定
第 5 回細菌学・若手コロッセウム
2010 年 08 月 27 日
3. Shimizu T, Kida Y, Kuwano K
Cytoadherence-dependent Induction of Inflammatory Responses by *Mycoplasma pneumoniae*
第 18 回国際マイコプラズマ学会
2010 年 07 月 13 日
4. 清水 隆, 木田 豊, 桑野 剛一
Mycoplasma pneumoniae の接着に依存的な炎症誘導
第 37 回日本マイコプラズマ学会
2010 年 06 月 10 日
5. 清水 隆, 木田 豊, 桑野 剛一
Mycoplasma pneumoniae の接着に依存的な炎症誘導
第 83 回日本細菌学会総会
2010 年 03 月 28 日
6. Shimizu T, Kida Y, Kuwano K
Inflammation-inducing lipoproteins of

pathogenic mycoplasmas
第4回アジアマイコプラズマ学会
2009年11月03日

7. 清水 隆、木田 豊、桑野 剛一
Mycoplasma pneumoniae の接着に依存的な炎症誘導
第4回細菌学・若手コロッセウム
2009年10月27日

8. 清水 隆、木田 豊、桑野 剛一
炎症を誘導する病原性マイコプラズマのリポタンパク質
第62回細菌学会九州支部総会
2009年09月04日

9. 清水 隆、木田 豊、桑野 剛一
接着に依存的な *Mycoplasma pneumoniae* の炎症誘導
第36回日本マイコプラズマ学会
2009年06月04日

10. 清水 隆、木田 豊、桑野 剛一
Mycoplasma genitalium 由来リポタンパク質による Toll-like receptor シグナルの活性化
第82回日本細菌学会総会
2009年03月12-13日

11. Shimizu T, Kida Y, Kuwano K
Inflammation-inducing lipoproteins of
Mycoplasma pneumoniae
第9回日韓微生物シンポジウム
2008年10月17日

12. Shimizu T, Kida Y, Kuwano K
Inflammation-inducing lipoproteins of
Mycoplasma pneumoniae
第17回国際マイコプラズマ学会
2008年07月08日

13. 清水 隆、木田 豊、桑野 剛一
Ureaplasma parvum 由来リポタンパク質による Toll-like receptor シグナルの活性化
第35回日本マイコプラズマ学会
2008年05月31日

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表

清水 隆 (SHIMIZU TAKASHI)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号：40320155

(2)研究分担者
なし
研究者番号：

(3)連携研究者
なし
研究者番号：