

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：37401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790100

研究課題名（和文） TLR シグナル制御分子 SIGIRR/TIR8 蛋白質の細胞内制御機構の解明

研究課題名（英文） Regulatory mechanism of SIGIRR/TIR8 expression in LPS-mediated signaling.

研究代表者

首藤 恵子 (SHUTO KEIKO)

崇城大学・薬学部・助教

研究者番号：70510692

研究成果の概要（和文）：SIGIRR/TIR8 は、TLRs や IL-1R による炎症性シグナルを抑制する分子である。本研究では、単球・好中球における LPS 刺激下の SIGIRR 発現解析を目的とした。その結果、LPS 刺激下の SIGIRR/TIR8 の発現量は時間・濃度依存的に減少し、この発現減少には、TLR4-p38 経路が重要であることが明らかになった。一方、SIGIRR/TIR8 の基底状態の発現は、転写因子 Sp1 により正に調節されており、LPS 依存性 TLR4-p38 経路は、SIGIRR/TIR8 プロモーターへの Sp1 の結合を抑制することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：SIGIRR/TIR8 is crucial for negative regulation of TLRs and IL-1R-mediated inflammatory signaling. Here, we confirmed the expression of SIGIRR/TIR8 during LPS stimulation in innate immune cells, including neutrophilic-differentiated and monocytic cell. As a results, SIGIRR/TIR8 gene and protein expression were down-regulated by LPS in both cell lines and primary cells. Furthermore, Our observations indicated that TLR4-p38 signal is critical for SIGIRR/TIR8 down-regulation. Finally, we clarified that Sp1 is a key factor that directly binds to the proximal promoter of SIGIRR/TIR8 gene and, consequently, regulates basal SIGIRR/TIR8 expression, which is negatively regulated by LPS-dependent TLR4-p38 pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1700,000	510,000	2210,000
2012 年度	1400,000	420,000	1820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3100,000	930,000	4030,000

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：SIGIRR/TIR8・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/TIR8 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。これまでの研究結果から、LPS による SIGIRR/TIR8 発現制御機構には、TLR4 シグナルを介した p38MAP キナーゼの活性化、及び転写因子 Sp1 のプロモーター上へのリクルート阻害が関与している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、これまで得た実験結果の信頼性を高め、より詳細なメカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

マウスマクロファージ細胞株 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 細胞に p38MAP キナーゼ阻害剤 SB203580 前処理し、LPS 処理後の SIGIRR 発現減少が阻害されるか否か検出した。更に p38MAP キナーゼを主に構成する p38alpha を siRNA でノックダウン後、LPS 処理後の SIGIRR/TIR8 発現減少が阻害されるか否か RAW264 細胞を用いて検出した。

次に健常人から単離したヒト単核球と好中球細胞を用いて、LPS 処理後の SIGIRR/TIR8 発現減少および p38MAP キナーゼ阻害剤 SB203580、p38MAP キナーゼ活性化剤 Anisomycin による SIGIRR/TIR8 発現減少への影響を検討した。

最後に、ヒト SIGIRR/TIR8 のプロモーターアッセイおよび ChIP アッセイにより、SIGIRR/TIR8 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

これまでの研究結果と相関して、RAW264 およ

び好中球様 HL60 細胞において、LPS 刺激により SIGIRR/TIR8 発現量は減少し、その減少は p38MAP キナーゼ阻害剤 SB203580 前処理により消滅した。同様に、p38MAP キナーゼのメイン構成サブユニットである p38alpha を siRNA を用いてノックダウンしたところ、LPS による SIGIRR/TIR8 発現減少は観察されなかった。更に、p38MAP キナーゼ活性化剤の Anisomycin 処理により、SIGIRR/TIR8 mRNA 発現量が減少した (Figure. 1)。

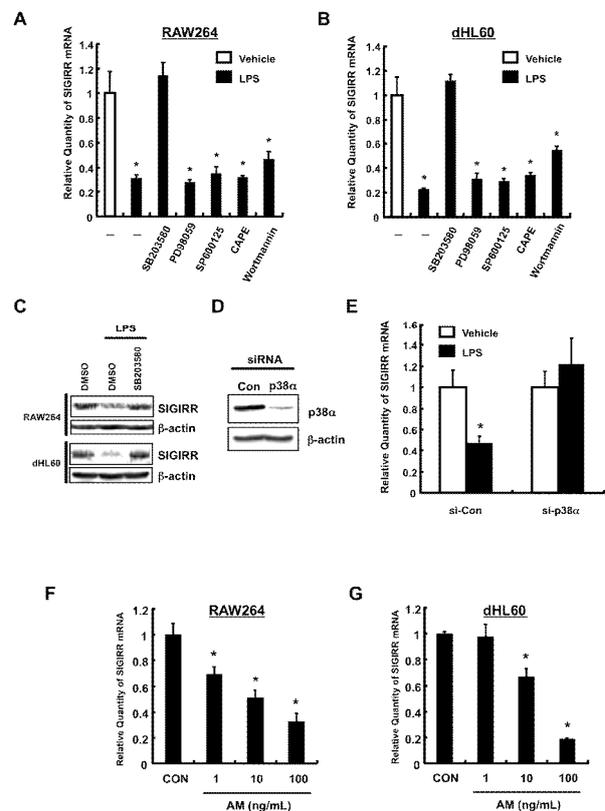


Figure.1 p38MAP kinase activation is crucial for LPS-induced SIGIRR/TIR8 down-regulation.

更に、健常人から単離したヒト単核球と好中球細胞を用いて同様の検討をしたところ、細胞株での実験結果と一致した (Figure. 2)。これらの結果から、LPS 誘導性の SIGIRR/TIR8 発現抑制には p38MAP キナーゼの活性化が重要であることが裏付けられた。

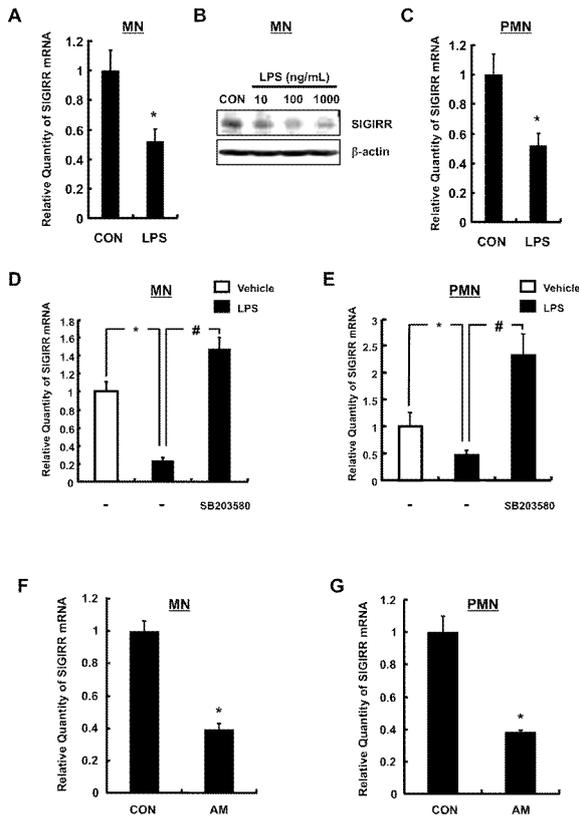


Figure.2 SIGIRR/TIR8 expression via p38 activation in primary mononuclear (MN) and polymorphonuclear (PMN) cells.

前年度までの検討から、LPS 刺激によりヒト SIGIRR/TIR8 プロモーター活性が減少することが明らかとなっている。そこで、LPS によるヒト SIGIRR/TIR8 プロモーター活性減少メカニズムを明らかにするために、プロモーターの Deletion および Point mutant を作製し、SIGIRR/TIR8 の定常発現維持に重要なプロモーター領域を探索した。

その結果、-172 から-163 に位置する転写因子 Sp1 の結合領域が SIGIRR/TIR8 発現に重要であると推測された。更にこの推測と一致して、Sp1 結合阻害剤であるミスラマイシン処理によりヒト SIGIRR/TIR8 プロモーター活性が減少した (Figure. 3)。

更に、ヒト好中球様細胞株 (dHL60)、健常人から単離したヒト単核球 (MN) および好中球細胞 (PMN) においてもミスラマイシン処理により SIGIRR/TIR8 mRNA 発現が減少した (Figure. 4)。最後に、Figure. 3 で明らかとなったプロモーター領域への Sp1 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 Sp1 結合が減少し、その減少は p38 阻害剤 SB203580 前処理により消失した (Figure. 4)

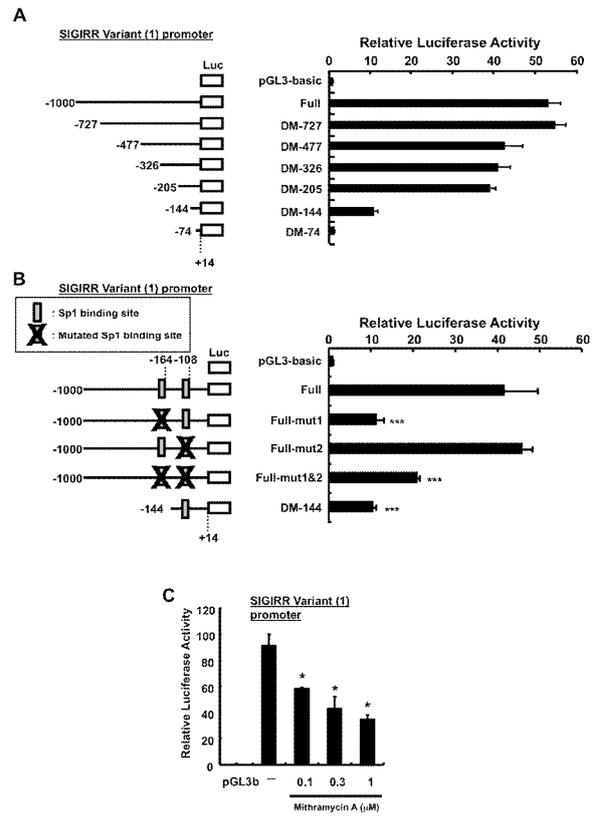


Figure. 3 Sp1 binding site between -173 and -164 is responsible for basal human SIGIRR/TIR8 promoter activity.

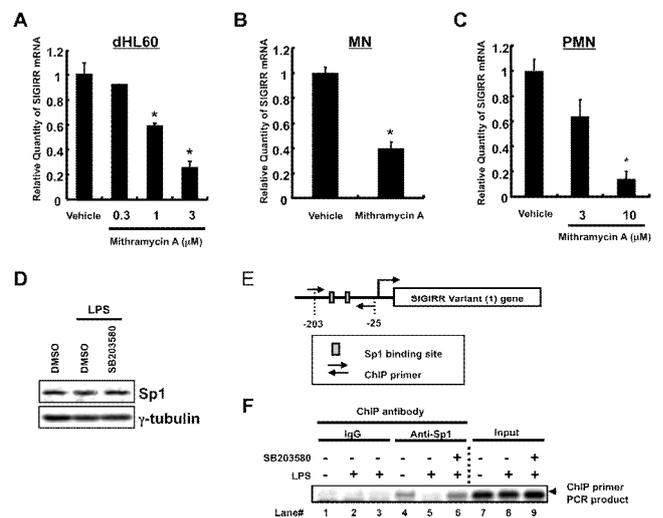


Figure. 4 TLR4-p38 pathway inhibits Sp1 dependent human SIGIRR/TIR8 gene expression.

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)

[学会発表] (計 2 件)

① 首藤 恵子, 首藤 剛, 佐藤 美希, 佐藤 圭創, Mary Ann Suico, 内田 友二, 徳富 直史, 甲斐 広文

LPS 刺激下の単球・好中球における Ig および TIR ドメイン含有受容体 SIGIRR の発現および機能解析

第 85 回日本生化学会大会

2012. 12. 16

マリンメッセ福岡 (福岡)

② Keiko Ueno-Shuto, Tsuyoshi Shuto, Miki Sato, Keizo Sato, Mary Ann Suico, Yuji Uchida, Naofumi Tokutomi, and Hirofumi Kai
Lipopolysaccharide decreases SIGIRR expression by suppressing Spl via TLR4-p38 MAP kinase pathway in monocytes and neutrophils

第 35 回日本分子生物学会年会

2012. 12. 12

マリンメッセ福岡 (福岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

首藤 恵子 (SHUTO KEIKO)

崇城大学・薬学部・助教

研究者番号 : 70510692