

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16日現在

機関番号：82601
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22790421
 研究課題名（和文） TLRシグナル抑制分子群の機能解析および敗血症治療薬への応用に関する研究
 研究課題名（英文） Studies of novel inhibitors of TLR signal
 研究代表者
 杉山 圭一（SUGIYAMA KEI-ICHI）
 国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部・室長
 研究者番号：80356237

研究成果の概要（和文）：本研究は、新規な TLR シグナル抑制分子群の性質を明らかにし、最終的には敗血症治療薬への同分子群の活用を目指し行った。米国一国においてさえ年間 20 万名もの死亡者数を数える敗血症の治療薬開発に利用可能なシーズとしての観点から、新規な TLR シグナル抑制分子群の機能解析を行った。その結果、まず敗血症治療薬候補分子として特許化したペプチド「STM28」の作用点が細胞膜上にあることを明確にした。また、マイコトキシンの 1 種である Deoxynivalenol については、TLR シグナルの伝達に関わるアダプター分子の 1 つである MyD88 への作用を介して同シグナルを抑制することが示唆された。さらに、同じくマイコトキシンの 1 種である Citrinin による TLR4 シグナルの抑制作用が確認された。今回検討した TLR シグナル抑制分子群について、これらの成果は敗血症治療薬のリードコンパウンドとしての各分子に対し貴重な知見を提供したと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Lipopolysaccharide (LPS) is a component of the membrane of Gram-negative bacteria, and a ligand for Toll-like receptor 4 (TLR4). LPS is generally considered to be a dominant pathogenic element in Gram-negative bacterial infection, and can lead to sepsis. Sepsis progresses to severe sepsis and septic shock. Around 750,000 cases of sepsis occur in the United States of America per year, and at least 225,000 of these are lethal. In spite of the high mortality rate, effective drugs to improve the lethality of sepsis have not been created. A peptide (STM28) which inhibited LPS-induced nuclear factor- κ B activation in macrophage cells have isolated. In this study, it is revealed that STM28 has no effect on intracellular TLR-mediated signaling pathways. On the other hand, deoxynivalenol, trichothecene mycotoxin, inhibits the LPS-induced nitric oxide and interferon- β production. The present study also shows that this toxin inhibits MyD88-dependent pathway via TLR4. Moreover, I found that citrinin, which is a mycotoxin, down-regulates LPS signaling. These results suggest that STM28 and these toxins may have utility as a novel therapeutic agent for bacterial sepsis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	0	1,100,000
2011年度	1,000,000	0	1,000,000
2012年度	900,000	0	900,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	0	3,000,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細菌学(含真菌学)

キーワード：TLR・ペプチド・マイコトキシン・敗血症

1. 研究開始当初の背景

TLR シグナルの無秩序な亢進がその一因となる敗血症は、米国一国においてさえ年間 20 万名もの死亡者数に達する疾病でありながら、有効な治療薬は上市されていないのが現状である。

2. 研究の目的

敗血症治療薬候補分子として特許化した Toll-like receptor 4(TLR4)結合性ペプチド「STM28」とその変異体、並びに発がん性が認められていないマイコトキシンである Deoxynivalenol(DON)の TLR シグナルへの抑制効果を知的アドバンテージとして、これら TLR シグナル抑制分子群の機能解析を実施すると同時に、同分子群を敗血症の治療薬のリードコンパウンドとしてブラッシュアップを進め、臨床試験への供試を目指した。

本研究課題は、自然免疫を担う TLR シグナルの制御を指向しているとも換言でき、敗血症のみならず、TLR シグナルの破綻により誘発される可能性を有する各種免疫系疾患（アレルギーや自己免疫）の治療法に対する新たな知見も副次的にもたらす可能性も視野に入れ研究を実施した。

3. 研究の方法

細胞培養

ヒト胚性腎細胞 HEK-293 およびマウスマクロファージ様細胞株 RAW264 は、10%非働化仔ウシ血清 DMEM にて、37°C、5%CO₂条件下で培養した。

MTT アッセイ（細胞毒性）

MTT 試薬（Cell Proliferation Kit I；Roche Diagnostics Basel, Switzerland；Cat. No. 1 465 007）を用いて測定した。リファレンス波長には OD₆₅₀ を使用した。得られた OD₅₅₀

–OD₆₅₀ の値を細胞増殖活性とし、CIT 非存在下におけるコントロールの値を 100%として細胞増殖活性を評価した。

Nitric oxide (NO) 測定

NO₂/NO₃ Assay Kit-(Colorimetric)-Griess Reagent Kit-(Dojindo)を用いて NO 量を測定した。

トランスフェクション

HEK-293 へのトランスフェクションには、各種プラスミドをリン酸カルシウム法によりトランジェントにトランスフェクションした。

Western Blotting

細胞抽出液を 10% SDS-ポリアクリルアミドゲルに供し電気泳動後、転写用メンブレンにブローディング、一次抗体反応、二次抗体反応後、化学発光によりシグナルを検出した。

レポーターアッセイ

各種レポーター遺伝子を RAW264 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションには FuGene HD (Roche Diagnostics) を使用した。細胞はセルスクレイパーで掻き取り、ルシフェラーゼ活性を測定した。測定には Dual-Luciferase® Reporter Assay kit (Promega KK) を使用した。

4. 研究成果

初年度は、STM28 と DON の TLR シグナル抑制機序について解析を進めた。ヒト胚性腎細胞 HEK 293 に NF-κB のレポーター遺伝子をトランスフェクションし、同時に強制的に TLR 4 細胞内ドメインを会合させシグナルを惹起するキメラ分子、もしくは MyD88、TRIF 等の TLR のシグナル伝達を担う分子群を過剰発現させることにより惹起される NF-κB レポーター活性の上昇に及ぼす STM28 の影

響を検討した。その結果、これら分子の過剰発現により誘導される NF- κ B レポーター活性に対して STM28 は抑制作用を示さなかった。従って、STM28 の作用点は少なくとも細胞内には存在しないことが強く示唆された。本結果と、STM28 が TLR4 の細胞外ドメインとの相互作用を指標に単離されたことに矛盾はない。一方、DON の TLR シグナル抑制作用についても、HEK293 細胞において MyD88 過剰発現により誘導される NF- κ B 依存性レポーター活性に対する影響を指標に検討した。その結果、MyD88 過剰発現により誘導される NF- κ B 依存性レポーター活性の上昇を DON は抑制しうることが明らかとなった。これより、DON はアダプター分子 MyD88 以降の TLR シグナル伝達系路に対して阻害的作用を呈することが示唆された。

次年度は、DON の同伝達系阻害部位の同定を試みた。マウスマクロファージ様細胞 RAW264 を DON 存在下において Lipopolisaccharide (LPS) で刺激し TLR4 の細胞内シグナル伝達に対する影響を検討した。TLR4 細胞内シグナル伝達の下流に存在する LPS 誘導性 NF- κ B 依存性レポーター活性の DON による濃度依存的な抑制が確認された。また、転写因子 NF- κ B の活性化に關与する LPS 誘導性 IRAK-1 のリン酸化も DON が抑制することも確認した。更に、TLR4 分子のアダプター分子であり、同シグナル伝達に關与する MyD88 を DON がダウンレギュレーションする可能性を見いだした。即ち、TLR4 シグナルを構成する 2 経路のうち、MyD88 を介するシグナル伝達経路については、MyD88 のダウンレギュレーションが DON による TLR4 シグナル抑制の分子基盤の一つである可能性が示唆された。本結果は、これまでに明らかにした DON による TLR9 等の TLR4 以外の MyD88 依存経路を介したシグナル伝達経路に対する DON の阻害作用と矛盾しない。

最終年度は、マウスマクロファージ様細胞 RAW264 を用いて、マイコトキシンの 1 種 citrinin (CIT) の TLR4 シグナル伝達系への影響を解析した。LPS 誘導性一酸化窒素 (NO) 産生に対する CIT の作用は、細胞毒性が認められない濃度域において濃度依存的な抑制

作用となることが明らかとなった。LPS 誘導性 NO 産生を触媒する誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) の発現レベルも NO 産生に対する作用と同様に CIT により抑制されることが確認された。また LPS による iNOS レポーター活性の誘導を CIT は阻害した。得られた結果は、CIT も敗血症治療薬のリードコンパウンドとしてのポテンシャルを有することを示唆している。

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 2 件)

1. 杉山圭一: ペプチドによるエンドトキシン毒性の制御, 食品加工技術. **32**, 27-35 (2012) .
2. 杉山圭一: 免疫毒性からみたマイコトキシンの, 防菌防黴. **40**, 459-466 (2012) .

[学会発表] (計 3 件)

1. 杉山圭一: エンドトキシンと TLR レセプター～ペプチドによる敗血症の治療～、第 35 回機能性食品用ペプチド研究会、2012 年 8 月 21 日
2. 杉山圭一: カビ毒からみたグローバルレベルの環境変化と食の安全性～感染症とカビ毒の意外な関係～、日本食品科学工学会、2011 年 9 月 10 日
3. 杉山圭一: 敗血症治療薬としてのエンドトキシンシグナル阻害分子に関する研究 (日本エンドトキシン・自然免疫研究会奨励賞 受賞講演)、第 16 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会、2010 年 11 月 13 日

[図書] (計 1 件)

1. 杉山圭一: 敗血症治療薬としてのエンドトキシンシグナル阻害分子に関する研究, エンドトキシン・自然免疫研究 14 - 自然免疫と生体防御 -. 福井博、谷徹、嶋田紘 (編) . 31-35 医学図書出版株式会社. (2011) .

6. 研究組織

(1) 研究代表者
()

研究者番号：

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：