

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791161

研究課題名(和文) Toll-インターロイキン1受容体ドメインの結合特異性を利用した免疫抑制法の開発

研究課題名(英文) The development of immune-modulate molecule using the binding specificity of Toll-Interleukin-1 receptor domain

研究代表者

大西 秀典(OHNISHI, Hidenori)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60381620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：アダプター分子MyD88を標的とし、Toll-Interleukin-1受容体(TIR)ドメインの結合特異性を応用して、TLR及びIL-1ファミリーシグナルを調節する薬剤候補物質を開発することを目的としている。MyD88の優性阻害変異型(DN)にProtein transduction domain (PTD)を融合したPTD-MyD88-DNを大腸菌タンパク発現系で発現精製し、TLRシグナル伝達への影響を検討した。さらに蛋白の安定性を高めるためC203S-C280S(CS)変異を導入した。PTD-MyD88-DN-CSタンパクには、リガンド非依存性にNF- κ B活性の上昇効果が認められた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed the development of the molecule, which modulates the Toll-Interleukin-1 receptor (TIR) signaling using the binding specificity of TIR domain of MyD88. The dominant negative form (DN) of MyD88 fused with protein transduction domain (PTD) was purified with E. Coli protein expression system. In order to stabilize this protein, two cysteine amino acids of MyD88, C203 and C280, were mutated to serine (CS). PTD-MyD88-DN-CS protein caused the ligand-independent increase of transcriptional activity of NF- κ B.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：自然免疫

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自然免疫を惹起するための病原体構成成分特異的認識受容体である Toll 様受容体 (Toll like receptor : TLR) とサイトカイン IL-1/18/33 ファミリーの細胞内シグナル伝達経路は、大きくオーバーラップしており、ほぼ全ての TLR ファミリーと IL-1R ファミリーが共通の細胞内アダプター分子 MyD88 を介して、IRAK シリーズを活性化 TRAF6 をリン酸化 IKK 複合体のリン酸化 I B を分解し核内転写活性因子 NF- B を活性化した結果、種々の炎症性サイトカインを産生すると考えられている。我々は、現在までに MyD88 の Toll-Interleukin-1 受容体(TIR)ドメインの蛋白立体構造を溶液 NMR 法により決定し、リポポリサッカライド(LPS)を認識する TLR4 シグナルの下流で、MyD88 様アダプター分子 Mal/TIRAP との動的相互作用様式を決定している(Ohnishi et al. PNAS 2009)。興味深いことに、ヒトの MyD88 の遺伝子異常により、原発性免疫不全症の 1 カテゴリーであり IRAK4 欠損症に代表される自然免疫不全症をきたすことが最近報告されている(Bernuth et al. Science 2008)。つまり逆の考え方をすると MyD88 の機能を抑制することで、免疫抑制を引き起こすことができることになる。

TIR ドメインの機能解析の過程で、MyD88 の TIR ドメインには種々の TIR ドメインタンパク群に対して、結合特異性があることが明らかになった。すなわち、MyD88 は TLR1 や TLR4 とは直接相互作用せず、TLR2、Mal、TRAM とは直接相互作用可能である。従って、それぞれの TIR ドメインの相互作用についてヘテロ複合体解析を含む詳細なタンパク間相互作用を解析することにより、標的となるシグナル伝達経路の制御が可能になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、Toll 様受容体(TLR)シグナル伝達経路上の中心的なアダプター分子 MyD88 を標的とし、MyD88 と相互作用する受容体群及びアダプター分子群の Toll-Interleukin-1 受容体(TIR)ドメインとの直接相互作用を詳細に解析し、IL-1 ファミリー/TLR シグナルの流れを遮断・調節するような薬剤候補物質を開発することを目的としている。

3. 研究の方法

細胞内タンパクである MyD88 の優性阻害変異型(DN)を細胞内に外部から浸透させるためのドメイン(Protein transduction domain, PTD)を融合した PTD-MyD88-DN を大腸菌タンパク発現系で発現精製し、それによる TLR シグナル伝達への影響を検討する。

4. 研究成果

PTD-MyD88-DN の精製に成功したが、大腸菌由来のエンドトキシンの夾雑があり、このタンパクの機能評価が困難であった。そこで、機能評価の検討方法として以下の対策を行った。1. TLR1 及び TLR2、NF- B reporter gene 遺伝子が安定発現した細胞株を新たに導入した。2. MyD88-TIR タンパクが非還元環境ではドメイン構造の表面露出したシステインを介して S=S 結合により多量体を形成してしまうことが判明したため、システインをセリンに置換した C203S-C280S(CS)変異体を構築した。MyD88-DN は非還元環境では凝集するが、MyD88-DN-CS は非還元環境でも単量体で存在することが確認できた。一方で、MyD88-DN-CS は遺伝子レベルでの発現では、Pam3CSK4 による TLR1/2 シグナル経路の活性化を有意に抑制するが、PTD-MyD88-DN-CS タンパクを添加したところ、リガンド非依存性に NF- B 活性の上昇が認められた。

考察：本研究で開発した PTD-MyD88-DN-CS は、NF- B 転写活性を亢進させる機能を有していた。pcDNA3.1+により細胞内に発現させたタンパクと、PTD により導入したタンパクでは細胞内の局在に差異が生じ、結果として炎症応答への機能修飾様式が異なるものと推測される。

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11件)

1: Yamamoto T, Tsutsumi N, Tochio H, Ohnishi H, Kubota K, Kato Z, Shirakawa M, Kondo N. Functional assessment of the mutational effects of human IRAK4 and MyD88

genes. *Mol Immunol*. 査読有. 2014 Mar;58(1):66-76.

2: Ebisawa M, Nishima S, Ohnishi H, Kondo N. Pediatric allergy and immunology in Japan. *Pediatr Allergy Immunol*. 査読有. 2013 Nov;24(7):704-14.

3: Yoshioka T, Nishikomori R, Hara J, Okada K, Hashii Y, Okafuji I, Nodomi S, Kawai T, Izawa K, Ohnishi H, Yasumi T, Nakahata T, Heike T. Autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency caused by a novel NFKB1A mutation, p.Ser36Tyr, presents with mild ectodermal dysplasia and non-infectious systemic inflammation. *J Clin Immunol*. 査読有. 2013 Oct;33(7):1165-74.

4: Kubota K, Ohnishi H, Teramoto T, Matsui E, Murase K, Kanoh H, Kato Z, Kaneko H, Seishima M, Kondo N. In vitro analysis of the functional effects of an NLRP3 G809S variant with the co-existence of MEFV haplotype variants in atypical autoinflammatory syndrome. *J Clin Immunol*. 査読有. 2013 Feb;33(2):325-34.

5: Hori T, Ohnishi H, Teramoto T, Tsubouchi K, Naiki T, Hirose Y, Ohara O, Seishima M, Kaneko H, Fukao T, Kondo N. Autosomal-dominant chronic mucocutaneous candidiasis with STAT1-mutation can be complicated with chronic active hepatitis and hypothyroidism. *J Clin Immunol*. 査読有. 2012 Dec;32(6):1213-20.

6: Nada M, Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Kimura T, Kubota K, Yamamoto T, Kamatari YO, Tsutsumi N, Shirakawa M, Kondo N. Molecular analysis of the binding mode of Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain proteins during TLR2 signaling. *Mol Immunol*. 査読有. 2012 Oct;52(3-4):108-16.

7: Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Kawamoto N, Kimura T, Kubota K, Yamamoto T, Funasaka T, Nakano H, Wong RW, Shirakawa M, Kondo N. TRAM is involved in IL-18 signaling and functions as a sorting adaptor for MyD88. *PLoS One*. 査読有. 2012;7(6):e38423.

8: Ohnishi H, Teramoto T, Iwata H, Kato Z, Kimura T, Kubota K, Nishikomori R, Kaneko H, Seishima M, Kondo N. Characterization of NLRP3 variants in Japanese cryopyrin-associated periodic syndrome patients. *J Clin Immunol*. 査読有. 2012 Apr;32(2):221-9.

9: Morita H, Kaneko H, Ohnishi H, Kato Z, Kubota K, Yamamoto T, Matsui E, Teramoto T, Fukao T, Kasahara K, Kondo N. Structural property of soybean protein P34 and specific IgE response to recombinant P34 in patients with soybean allergy. *Int J Mol Med*. 査読有. 2012 Feb;29(2):153-8.

10: Ohnishi H, Miyata R, Suzuki T, Nose T, Kubota K, Kato Z, Kaneko H, Kondo N. A rapid screening method to detect autosomal-dominant ectodermal dysplasia with immune deficiency syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 査読有. 2012 Feb;129(2):578-80.

11: Funato M, Kaneko H, Ohkusu K, Sasai H, Kubota K, Ohnishi H, Kato Z, Fukao T, Kondo N. Refractory chronic pleurisy caused by *Helicobacter equorum*-like bacterium in a patient with X-linked agammaglobulinemia. *J Clin Microbiol*. 査読有. 2011 Sep;49(9):3432-5.

〔学会発表〕(計4件)

1: Hidenori Ohnishi, Takahide Teramoto, Zenichiro Kato, Kazuo Kubota, Hideo Kaneko, and Naomi Kondo. Characterization of NLRP3 Variants in Japanese Cryopyrin-associated Periodic Syndrome Patients. AUTOIMMUNITY 2012(第8回国際自己免疫疾患学会), May 9-13, 2012, Granada, Spain.

2: Hidenori Ohnishi, Zenichiro Kato, Takeshi Kimura, Kazuo Kubota, Takahiro Yamamoto, Naomi Kondo: Molecular analysis of signal transduction pathway of IL-18, related with allergic condition. The 22nd Congress of Interasma Japan / North Asia, July 6-7, 2012, Fukuoka Japan.

3: Hidenori Ohnishi, Naotaka Tsutsumi, Takahiro Yamamoto, Hidehito Tochio, Zenichiro Kato, Kazuo Kubota, Masahiro

Shirakawa, Naomi Kondo. The functional assessments of mutational effect of human IRAK4 and MyD88 gene. APAPARI 2012, October 19-21, 2012, Taipei, Taiwan.

4: Hidenori Ohnishi: Gene polymorphisms in innate immune signaling pathways associated with allergic disease. Asia Pacific Association of Pediatric Allergy, Respiriology and Immunology 2011 (APAPARI 2011), 48th Annual Meeting of Japanese Society of Pediatric Allergy and Clinical Immunology (48th JSPACI) October 28-30, 2011, Fukuoka, Japan.

〔図書〕(計 14 件)

1: 深尾敏幸、大西秀典: メバロン酸キナーゼ欠損症 別冊日本臨床 先天代謝異常症候群 (第 2 版) 上, 日本臨床社, 2012;386-391.

2: 近藤直実、大西秀典、渡邊倫子: 原発性免疫不全症の概念と分類, および自己炎症性疾患・自然免疫不全症・近縁疾患の位置づけ 自己炎症性疾患・自然免疫不全症とその近縁疾患, 診断と治療社, 2012;2-31.

3: 大西秀典: 自己炎症性疾患・自然免疫不全症の病因・病態と診断フローチャート 自己炎症性疾患・自然免疫不全症とその近縁疾患, 診断と治療社, 2012;53-59.

4: 加藤善一郎、大西秀典、近藤直実: 自己炎症性疾患総論 自己炎症性疾患・自然免疫不全症とその近縁疾患, 診断と治療社, 2012;62-66.

5: 大西秀典: 自然免疫不全症総論 自己炎症性疾患・自然免疫不全症とその近縁疾患, 診断と治療社, 2012;103-107.

6: 加藤善一郎、大西秀典、近藤直実: ヒトパピロームウイルス易感染症 自己炎症性疾患・自然免疫不全症とその近縁疾患, 診断と治療社, 2012;115-116.

7: 久保田一生、山本崇裕、大西秀典: (家族性)単純ヘルペス脳炎 自己炎症性疾患・自然免疫不全症とその近縁疾患, 診断と治療社, 2012;117-120.

8: 堀友博、大西秀典: 慢性皮膚粘膜カンジ

ダ症を伴う免疫不全症 自己炎症性疾患・自然免疫不全症とその近縁疾患, 診断と治療社, 2012;121-125.

9: 堀友博、大西秀典: カンジダ感染と外胚葉異形成を伴う自己免疫性多腺性内分泌不全症 自己炎症性疾患・自然免疫不全症とその近縁疾患, 診断と治療社, 2012;169-171.

10: 寺本貴英、大西秀典、近藤直実: Castleman 病 自己炎症性疾患・自然免疫不全症とその近縁疾患, 診断と治療社, 2012;185-187.

11: 堀友博、大西秀典: 慢性皮膚粘膜カンジダ症(STAT1 異常症) 自己炎症性疾患・自然免疫不全症とその近縁疾患, 診断と治療社, 2012;218-219.

12: 大西秀典: 易肺炎球菌感染症 自己炎症性疾患・自然免疫不全症とその近縁疾患, 診断と治療社, 2012;242-243.

13: 久保田一生、大西秀典: MEFV 遺伝子と炎症性疾患 自己炎症性疾患・自然免疫不全症とその近縁疾患, 診断と治療社, 2012;258-259.

14: 大西秀典: 免疫異常疾患に対する免疫療法と抗体療法-その 3-自己炎症性疾患に対する生物学的製剤 アレルギー疾患の免疫療法と分子標的治療, 診断と治療社, 2012;136-139.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 秀典 (OHNISHI, Hidenori)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・助教
研究者番号: 60381620

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者
()

研究者番号：