

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460551

研究課題名(和文)細胞内DNAセンサー蛋白とエンドトキシン応答クロストーク

研究課題名(英文) Crosstalk between pifitlin-a and LPS-mediated inflammatory response

研究代表者

横地 高志 (Yokochi, Takashi)

愛知医科大学・医学部・名誉教授

研究者番号：20126915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：pyhin1は、これまでウイルスなどに由来する外来DNAの細胞内センサーとして知られていたが、本研究によって、エンドトキシン刺激でMyD88非依存性経路のNF-kappaB依存性に誘導されること、刺激にตอบสนองして誘導されるインターフェロン- γ や一酸化窒素を減少させることから、エンドトキシンシグナルのネガティブレギュレーターであることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The regulatory action of mouse pyhin1 on LPS-induced inflammatory response was examined. LPS augmented the pyhin1 mRNA expression in murine RAW 264.7 macrophage cells and peritoneal macrophages. The augmentation of pyhin1 mRNA expression was abolished by parthenolide, a NF- κ B inhibitor. Silencing of pyhin1 with small interfering RNA reduced the production of IFN- γ and NO. However, pyhin1 silencing did not affect the production of TNF- α , IL-6, IL-10 and prostaglandin E2. Reduced IFN- γ production by pyhin1 silencing caused inactivation of STAT1 and reduced expression of IRF1. Pyhin1 silencing inhibited the expression of TRAF6, TBK1 and TRIF, which trigger IFN- γ production in the MyD88-independent pathway. Taken together, mouse pyhin1 was suggested to be a NF- κ B-responsible gene in response to LPS and positively regulate LPS-induced IFN- γ and NO production through up-regulating the MyD88-independent signaling pathway.

研究分野：細菌学(含真菌学)

キーワード：エンドトキシン pyhin1 MyD88非依存性 NF-kappaB インターフェロン- γ LPS 一酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

敗血症ショックは、現在も相変わらず高い致命率（30%以上）を示し、その治療は困難を伴う。我が国でも、数万人以上が罹患し、一万人以上が死亡していると推定されている。このため、適切な治療法の確立が、敗血症対策として重要な課題である。エンドトキシンショックは、エンドトキシンがTLR4を介してシグナル経路を活性化し、炎症性メディエーターを過剰に産生させて誘導される。このエンドトキシンによるシグナル活性化の制御は、炎症性メディエーターの過剰産生を阻止し、致死性エンドトキシンショックの予防を可能にする。

我々はマクロファージをエンドトキシン（LPS）で刺激し、活性化する遺伝子群にPYHIN1があることを偶然見出した。その後、RAW264.7マクロファージ細胞をLPSで刺激するとPYHIN1遺伝子の転写が活性化することを確認した。さらに small interfering (si) RNA を用いて、PYHIN1 遺伝子発現を特異的に抑制したところ、LPS 刺激によるインターフェロン（IFN- γ ）産生や一酸化窒素（NO）産生が減少することを見出した。このことから、細胞内DNAセンサー蛋白質であるPYHIN1とエンドトキシン応答が密接に関わり合っている可能性が示唆された。いままで、PYHIN1とエンドトキシンとの相互作用による報告はなく、全くの新知見であり、エンドトキシンによる炎症制御という観点からも興味深い。この遺伝子の機能を利用することにより、エンドトキシンショックの制御の可能性を探った。

2. 研究の目的

予備的実験から、LPS刺激によって細胞内DNAセンサー蛋白質が増加すること、それがLPS誘導性の炎症性メディエーターを増強することを見出した。そこで、細胞内DNAセンサー蛋白質とエンドトキシン応答の相互作用を解析し、細胞内DNA監視機構による自然免疫制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

（1）エンドトキシン刺激マウスマクロファージ株 RAW264.7 における PYHIN1 遺伝子発現のメカニズム解析

エンドトキシン刺激による PYHIN1 mRNA の発現をリアルタイム PCR 法で解析する。

エンドトキシン濃度による PYHIN1 mRNA の発現量を検討する。

エンドトキシン刺激による PYHIN1 mRNA の発現を経時的に解析する。

生理的な腹腔マクロファージでも調べた。

（2）エンドトキシン刺激による PYHIN1 を誘導するシグナル伝達経路の解析

シグナル伝達経路を MyD88 依存、非依存活性化経路に区別して、様々なシグナル分子阻害剤を処理し、PYHIN1 遺伝子発現に関わるシグナル分子を推測した。

NF- κ B に依存することが推測されているため、NF- κ B 阻害剤、I κ B dominant negative mutant を用いて、NF- κ B を介することを確かめた。

PYHIN1 発現を導く NF- κ B を活性化させる上流のシグナル分子を dominant negative mutant を用いて明らかにし

た。

(3) エンドトキシン誘導炎症性メディエーター産生における PYHIN1 の関与

RAW264.7 マクロファージ細胞に、PYHIN1 siRNA を導入後、TNF- α 、IL-6、IL-10 産生を ELISA 法で測定した。siRNA 処理マクロファージをエンドトキシン刺激し、活性酸素、NO 産生を測定した。

siRNA 処理マクロファージをエンドトキシン刺激し、ケモカイン、HMGB1 産生を測定した。

(4) PYHIN1 による炎症性メディエーター産生調節のメカニズムの解析

PYHIN1 siRNA 導入マクロファージを用いて、PYHIN 遺伝子の抑制がエンドトキシンシグナルに及ぼす影響を解析した。siRNA 処理マクロファージをエンドトキシンで刺激し、各シグナル分子の発現状況やリン酸化を Western blot 法で解析し、どのシグナル分子の活性化に依存しているのか決定した。PYHIN1 がインターフェロン- γ 産生を抑制する結果を予備的に得ているので、IRF3 や IKK- ϵ 、TRAF3 といったインターフェロン- γ 転写に関連するシグナル分子の活性化を調べた。

PYHIN1 が作用する分子の特異的阻害剤で PYHIN1 の活性の再現を検討した。

4. 研究成果

近年の報告から、細胞内 DNA センサー蛋白質 PYHIN1 がエンドトキシン (LPS) シグナルにクロストークする可能性が示唆されたので、LPS 刺激で誘導されるシグナル伝達制御の可能

性を調べた。最初に、LPS 刺激に依存して pyhin1 の発現が変化するか調べたところ、RAW264.7 マクロファージ細胞株を LPS 刺激すると、PYHIN1 mRNA の発現が増強された。この増強はマウス腹腔マクロファージでも認められることから、生理的意義があると考えられたので、その役割と誘導メカニズムを調べた。siRNA により PYHIN1 をノックダウンすると、LPS 誘導性のインターフェロン- γ や一酸化窒素 (NO) の誘導が増強され、LPS シグナルを制御する可能性が示唆された。関連するシグナル伝達経路を調べたところ、MyD88 依存性シグナル経路に影響は見られなかったが、非依存性シグナル伝達経路が増強されていた。実際、そのシグナル伝達分子である TRAF6、TBK1、TRIF の発現増強が確認された。さらに、この増強は NF- κ B 阻害剤で抑制されることから、NF- κ B シグナル依存性に増強されると考えられた。以上の結果から、PYHIN1 は LPS 刺激によって、MyD88 依存性に増強されると考えられた。すなわち、本研究は、PYHIN1 はウイルスなどの細胞内の外来センサーであるだけでなく、LPS 刺激で誘導された炎症反応の過剰な応答を定常状態へ引き戻す調節機能を持つ可能性を初めて明らかにした。

5. 主な発表論文

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

1. Odkhue E, Mendjargal A, Koide N,

Naiki Y, Komatsu T, Yokochi T.
Lipopolysaccharide downregulates the
expression of p53 through activation of
MDM2 and enhances activation of nuclear
factor-kappa B. Immunobiology.

2015 Jan;220(1): 136-41.

doi:10.1016/j.imbio. 2014.08.010.

2 . Odkhuu E, Koide N, Tsolmongyn B,
Jambalganiin U, Naiki Y, Komatsu T,
Yoshida T, Yokochi T. Involvement of
redox balance in in vitro osteoclast
formation of RAW 264.7 macrophage cells
in response to LPS. Innate Immun. 2015
Feb;21(2):194-202. doi: 10.1177/
1753425914524242.

3 . Koide N, Kaneda A, Yokochi T,
Umezawa K. Inhibition of RANKL- and
LPS-induced osteoclast
differentiations by novel NF- B
inhibitor DTCM-glutarimide. Int
Immunopharmacol. 2015 Mar;25(1):162-8.
doi:10.1016/j.intimp.2015.01.004.

4 . Kato Y, Kamiya H, Koide N, Odkhuu
E, Komatsu T, Watarai A, Kondo M, Kato
K, Nakamura J, Yokochi T. Irbesartan
attenuates production of high-mobility
group box 1 in response to
lipopolysaccharide via downregulation
of interferon- production. Int
Immunopharmacol. 2015
May;26(1):97-102. doi:10.1016/
j.intimp.2015.03.015.

5 . Naiki Y, Komatsu T, Koide N,
Dagvadorji J, Yoshida T, Arditi M,
Yokochi T. TGF 1 inhibits the
production of IFN in response to CpG DNA

via ubiquitination of TNF
receptor-associated factor(TRAF)6
Innate Immun. 2015 Oct;21(7):770-7.
Epub 2015 Jul 29. doi:10.1177/
1753425915596844.

6 . Ando T, Komatsu T, Naiki Y, Yokochi
T, Watanabe D, Koide N. Pretreatment
of LPS inhibits IFN- -induced STAT1
phosphorylation through SACS3 induced
by LPS. Biomed Pharmacother. 2015
Dec;76:1-5. doi:10.1016/j.biopha.
2015.10.019.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

[出願状況] (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

[取得状況] (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

横地高志 (YOKOCHI TAKASHI)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 2 0 1 2 6 9 1 5

(2) 研究代表者

()

研究者番号

(3) 連携研究者

()

研究者番号