

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：37401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860062

研究課題名(和文) 難治性気道炎症疾患におけるSIGIRR発現・機能調節の分子基盤とその治療応用

研究課題名(英文) Molecular basis of SIGIRR expression and regulatory function in Cystic Fibrosis and its therapeutic approach

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：嚢胞性線維症(CF)は呼吸器の慢性炎症が主病変の常染色体劣性遺伝性疾患であるが、炎症を惹起しやすい要因の一つとしてTLRシグナル抑制分子の発現量低下が挙げられる。本研究では未だCFにおいて報告のないTLRシグナル抑制分子SIGIRRに着目し、正常とCF細胞におけるSIGIRR発現量を全細胞と細胞膜上レベルで比較した。その結果、全細胞では正常およびCF細胞におけるSIGIRR発現量に大きな差異はなかったが、CF細胞膜上のSIGIRR発現量は正常細胞と比して著しく低下していた。今回の結果から、CF細胞においてSIGIRRの細胞膜上への発現効率又は膜上での安定性が低下していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cystic Fibrosis (CF) is an autosomal recessive inherited disorder characterized by chronic airway inflammation, which is partially due to the defective expression of negative regulators of TLRs signaling. In this study, we compared the expression levels of SIGIRR, a negative regulator of TLRs signaling, between normal (non-CF) and CF airway epithelial cells. Our data indicated that the cell surface level of SIGIRR was clearly decreased in CF compared with normal, although there was no difference regarding SIGIRR expressions at whole cell levels. This result suggests that SIGIRR is inefficiently or unstably expressed on CF cell surface compared with normal.

研究分野：薬理学、細胞生物学

キーワード：CF SIGIRR

1. 研究開始当初の背景

嚢胞性線維症 (CF) はクロライドイオンチャネルである CFTR を原因遺伝子とする常染色体劣性遺伝性疾患である。CF 患者の 9 割以上に進行性の呼吸器閉塞と慢性的な細菌感染、それに伴う持続的な炎症があるとされるが、これは気道上皮組織において CFTR の機能低下または変異 CFTR の存在が細胞内外環境を著しく変化させることに起因するものである。これまでに、CF 気道上皮細胞における易炎症性質に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 Toll-like receptors (TLRs) シグナルの過剰活性化およびそのシグナル抑制分子の発現低下・機能不全が一因であるとの報告があるが、特に CF における TLRs シグナル抑制分子の関する詳細は未だ不明な部分が多い。

SIGIRR (又名を TIR8, IL-1R8) は肺・腸管・腎臓等の上皮系組織や血球細胞で発現が高い型膜貫通蛋白質である。これまでに SIGIRR は幅広い TLRs シグナルを抑制することがノックアウトマウスを用いた種々の炎症病態モデルにおいて証明されてきたが、CF における SIGIRR に関する報告はこれまでにない。また SIGIRR は細胞外に 1 つの immunoglobulin domain を持つリガンド不明のオーファンレセプターとして認知されていたが、近年そのリガンドが抗炎症性サイトカインの IL-37b であることが明らかとなった(引用文献)。この報告は SIGIRR を外因的に活性化することで炎症を抑制することが可能であることを示唆しており、CF における IL37b-SIGIRR 経路の機能解析は CF 病態形成を理解し、新たな炎症治療法を確立する上でも重要である。

2. 研究の目的

本研究期間ではまず CF 又は CF 様細胞において SIGIRR が正常に機能しているか否か、SIGIRR 発現量を全細胞および細胞膜上レベルで検出し、正常細胞と比較する。

3. 研究の方法

細胞株や初代培養細胞を含めた種々の正常・CF 細胞間における SIGIRR mRNA とタンパク質発現を定量的 RT-PCR 法およびウェスタンブロッティング法を用いて比較した。更に両細胞間における SIGIRR タンパク質の安定性をタンパク質翻訳阻害剤である Cycloheximide (CHX) を用いて比較した。最後に様々な正常・CF 又は CF 様細胞間における SIGIRR の細胞膜上発現量を、ピオチン化法を用いて比較した。

4. 研究成果

我々が過去に報告した LPS に加え、緑膿菌等の感染性刺激や壊死性腸炎等の炎症性疾患において SIGIRR 発現量が減少することがこれまでに報告されている(引用文献)。そこで CF 細胞においても同様に SIGIRR 発現量が減少しているか否か初代培養細胞を含めた 3 つの正常および CF 細胞ペアにおける SIGIRR の mRNA 発現量を比較した。その結果、全ての細胞のペアにおいて SIGIRR mRNA の発現量は CF 細胞において顕著に低下していた (Figure.1)。

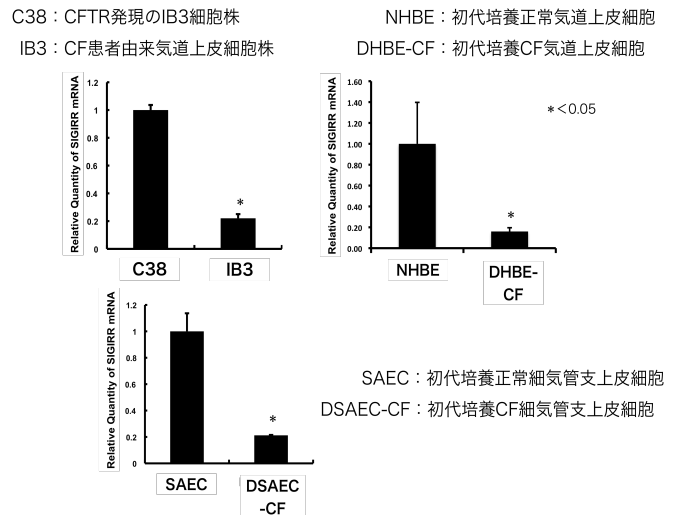


Figure.1 正常・CF 細胞間における SIGIRR mRNA 発現量の比較

次に同じ細胞ペアで SIGIRR タンパク質発現量を比較したところ、mRNA レベルでの結果とは異なり、正常および CF 細胞間で大きな発現量の違いは認められなかった (Figure.2)。

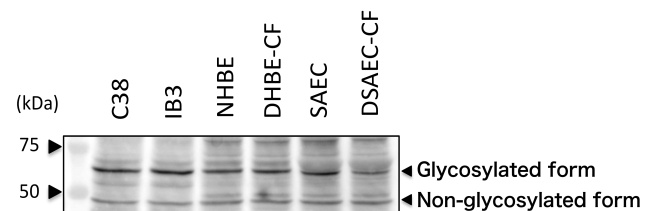


Figure.2 正常・CF 細胞間における SIGIRR タンパク質発現量の比較

この一見矛盾した結果がなぜ得られたのが明らかにするために、C38 (正常) および IB3 (CF) 細胞にトランスフェクションにより SIGIRR タンパク質を過剰発現させた後にタンパク質翻訳阻害剤である Cycloheximide (CHX) を処理し、経時的な SIGIRR タンパク

質の分解を検出した。その結果、正常細胞と比較してCF細胞におけるSIGIRRタンパク質の安定性が上昇していた (Figure.3)

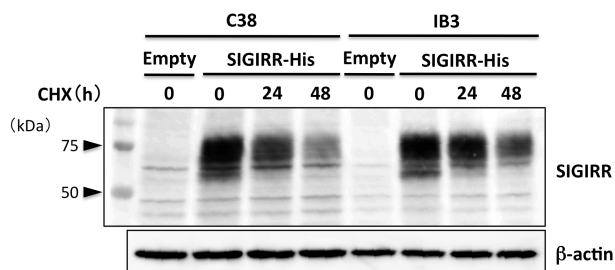


Figure.3 正常・CF 気道上皮細胞間におけるSIGIRRタンパク質の安定性の比較

細胞外に処理したIL-37bがSIGIRRを介して抗炎症作用を示したという最近の報告(引用文献)から、SIGIRRの抗炎症作用には全細胞内発現量よりも細胞膜上における発現量が重要であると考えられる。そこで次に、ビオチン化法を用いて正常・CF細胞間におけるSIGIRR細胞膜上発現量の比較を行った。その結果、CF細胞におけるSIGIRR細胞膜上発現量が著しく減少していた (Figure.4)

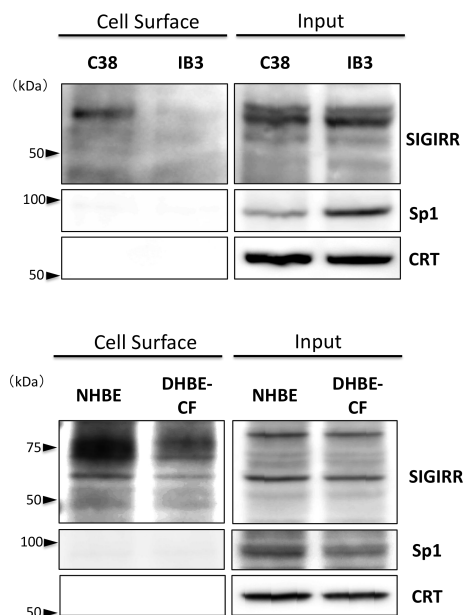


Figure.4 正常・CF 気道上皮細胞間におけるSIGIRRタンパク質細胞膜上発現量の比較

以前よりCFTRの機能不全によって上皮型ナトリウムチャネルであるENaCが過剰活性化することがCFにおける細胞内外環境変化の一因であるとの報告があり、事実、呼吸器特異的ENaCトランスジェニックマウスはCF様の病態を呈する(引用文献)。この知見を踏まえ、最後にヒト気道上皮細胞株である16HBEとそのENaC過剰発現細胞株

でSIGIRRの細胞膜発現量を比較した。その結果、16HBEのENaC過剰発現細胞におけるSIGIRR細胞膜上発現量は16HBE細胞を比較して著しく減少していた (Figure.5)

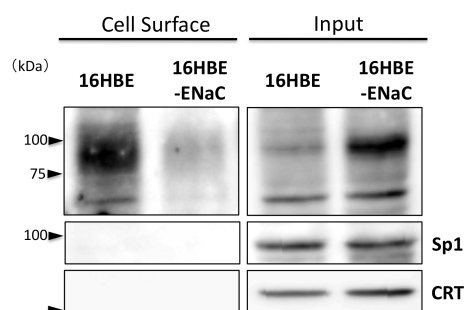


Figure.5 正常・CF様気道上皮細胞間におけるSIGIRRタンパク質細胞膜上発現量の比較

引用文献

Nold-Petry CA, et al. (2015) IL-37 requires IL-18R and IL-1R8 to carry out its multi-faced anti-inflammatory program on innate signal transduction. *Nat Immunol*(16)4:354-365.

Riva F, et al. (2012) TIR8/SIGIRR is an interleukin-1 receptor/toll like receptor family member with regulatory functions in inflammation and immunity. *Front Immunol*(3)322.

Li S, et al. (2015) Extracellular forms of IL-37 inhibit innate inflammation in vitro and in vivo but require the IL-1 family decoy receptor IL-1R8. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(8):2497-2502.

Mall M, et al. (2004) Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic-fibrosis like lung disease in mice. *Nat Med*(10):487-493.

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

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