

熊本大学学術リポジトリ

Kumamoto University Repository System

Title	非莢膜保有型インフルエンザ菌感染依存的炎症応答シグナルに対するpirinおよびcAMP-PKA経路による負の調節機構の解明
Author(s)	田崎, 幸裕
Citation	
Issue date	2017-03-25
Type	Thesis or Dissertation
URL	http://hdl.handle.net/2298/37056
Right	

非莢膜保有型インフルエンザ菌および酸化ストレスによる炎症性メディエーターの発現抑制因子に関する研究

熊本大学大学院薬学教育部 医療薬学専攻
遺伝子機能応用学分野 田崎幸裕

グラム陰性菌である非莢膜保有型インフルエンザ菌 (*nontypeable Haemophilus influenzae*; NTHi) は、小児中耳炎の主な起因菌であり、成人では慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の増悪に働く。また、我々の研究グループではこれまでに、NTHi 感染による炎症反応において、NF- κ B および MAPK の一つである ERK の活性化が重要であることを明らかにしてきた。さらに、それらの調節機構の破綻によって引き起こされる過剰な炎症から生体を防御するための抑制メカニズムを解明することを目的に、負の調節因子である CYLD, MKP-1, IRAK-M などに着目して研究を行ってきた。このような背景から、新規の負の調節因子の探索およびその分子機構の解明は、新規抗炎症薬開発の観点からも極めて重要である。そこで本研究では、まず、鉄イオン結合タンパク質かつレドックスセンサーとしても知られる *pirin* そして細胞内セカンドメッセンジャーである cAMP の炎症反応に対する機能解析およびその分子機構について検討を行った。

1. NTHi および H₂O₂ 誘導性炎症性メディエーターにおける *pirin* の役割

細菌感染および酸化ストレスそれぞれ単独刺激による炎症反応の重要性については、これまでに数多くの報告がなされているが、それらの共刺激に対する分子機構の詳細については未だ不明な点が多い。そこで本研究では、まず、NTHi と H₂O₂ による共刺激がそれぞれの単独刺激と比較して炎症反応にどのような影響を及ぼすかについて検討した。その結果、共刺激によりそれぞれの単独刺激と比較して相乗的に炎症を誘導した。次に、その炎症誘導がどのような分子機構を介しているかを解明するために、転写因子 NF- κ B のサブユニットである p65 の Ser536 のリン酸化部位に着目した。これまでの報告から、Ser536 は p65 の C 末端転写活性ドメイン (TAD1) 内に存在し、転写活性化において重要な機能を担っており、さらに NTHi 感染によっても活性化されることがわかっている。そこで我々は、CRISPR/Cas9 システムを用いて p65 S536A ノックイン細胞を作製し、NTHi と H₂O₂ による相乗的な炎症誘導について検討した。その結果、その相乗的な炎症誘導が抑制されることが明らかになった。さらに、

pirin が NTHi と H₂O₂ による炎症反応に対してどのような影響を及ぼすかについて検討した結果、興味深いことに、NTHi と H₂O₂ それぞれの単独刺激および共刺激によって誘導された炎症が pirin によって負に制御されていることが pirin siRNA によるノックダウン実験および CRISPR/Cas9 システムによって作製した pirin KO 細胞において明らかになった。次に、pirin が NTHi と H₂O₂ による炎症誘導をどのように負に制御しているのかを検討した。その結果、pirin は p65 と直接相互作用し、p65 の Ser536 のリン酸化を負に制御することで NTHi と H₂O₂ による炎症反応を抑制していることが示された。

2. cAMP-PKA 経路による NTHi 誘導性 GM-CSF の発現抑制機構の解明

血球系前駆細胞を顆粒球やマクロファージに分化・増殖するサイトカインである granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) は、炎症や免疫反応において重要な役割を果たしている。我々の研究グループでは過去に、気道上皮細胞において、細胞内 cAMP 濃度を上昇させる PDE4B 阻害薬が NTHi 誘導性 GM-CSF を抑制することを報告しているが、中耳における詳細な分子機構については未だ明らかになっていない。まず、NTHi が中耳上皮細胞およびマウス中耳上皮において、MEK-ERK 経路を介して GM-CSF 発現を上昇させることが明らかになった。次に、cAMP が NTHi 誘導性の GM-CSF 発現にどのような影響を及ぼすかについて検討した結果、細胞内 cAMP 濃度の上昇が ERK の活性化を抑制することで、NTHi による GM-CSF 発現誘導を負に制御していることが明らかになった。さらに、cAMP の主な効果器分子として知られている protein kinase A (PKA) および exchange protein directly activated by cAMP (Epac) のどちらの分子が NTHi 誘導性の GM-CSF 発現を負に制御しているかについて検討を行った。その結果、cAMP-Epac 経路ではなく、主に cAMP-PKA 経路が MEK-ERK 経路を抑制することで NTHi による GM-CSF 発現誘導を負に制御していることが明らかになった。

以上、本研究の成果は、pirin が NF- κ B 依存的な炎症反応を抑制する新規の負の調節因子であることを初めて明らかにし、また、cAMP-PKA 経路による NTHi 誘導性 GM-CSF の発現抑制機構を初めて示した。以上のことから、pirin および cAMP-PKA 経路を標的にした新規抗炎症薬開発へ繋がる重要な基礎的知見である。