

平成 30 年 9 月 1 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09560

研究課題名(和文)好酸球特異的プロテアーゼPRSS33の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of PRSS33, a eosinophil-specific protease

研究代表者

松本 健治 (Matsumoro, Kenji)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・免疫アレルギー・感染研究部・部長

研究者番号：60181765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー性炎症において重要な役割を演じる好酸球が特異的かつ恒常的に発現するPRSS33 (Protease, serine, 33) の機能を検討した。その結果、recombinant PRSS33 (rPRSS33) が線維芽細胞における細胞外基質のmRNA発現をプロテアーゼ活性依存的に増強する事を見いだした。また、ダニ抗原の長期吸入(週5日x 6週間)による組織リモデリングモデルを用いてPRSS33 KOの影響を検討したが、組織像、2型炎症ともに全く影響は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the function of an eosinophil-specific proteases/proteinase protease serine 33 (PRSS33), in vitro and in vivo. GM-CSF-activated human eosinophils but not resting eosinophils were stained with anti-PRSS33 mAb, suggesting that PRSS33 is specifically expressed on the granular membrane of eosinophils. However, PRSS33 was not secreted to the supernatant even after stimulation with secretagogues. Recombinant PRSS33 protein (rPRSS33) created with a baculovirus system induced significant expression of collagen and fibronectin mRNAs in human fibroblasts at least in part via protease-activated receptor-2 activation. PRSS33 knockout mouse created by CRISPR/Cas9 system was employed to papain-inhalation model and long term-house dust mite-inhalation model, however, no significant effects were observed.

研究分野：免疫、アレルギー学

キーワード：好酸球 プロテアーゼ PRSS33

1. 研究開始当初の背景

吸入ステロイド剤の導入により気管支喘息の治療は近年著しく進歩し、大多数の症例の発作コントロールは旧来に比べて良好となりつつある。しかし、気管支喘息児に対する長期にわたる吸入ステロイド剤の二重盲検試験から、吸入ステロイド剤が気管支喘息の長期経過自体にはほとんど影響が無いことが報告され (NEJM 2006;354:1985-97)、このような慢性アレルギー性炎症反応による気道リモデリングの進行を阻止しうる新たな治療戦略が必要である可能性が強く示唆されている。

喀痰中の好酸球数が気管支喘息の病勢の把握に最も有用であることが Systematic Review で示されており (Cochrane Database Syst Rev 2007;CD005603)、近年では好酸球増多タイプの気管支喘息に対する抗 IL-5 抗体治療の有用性が再評価されている (J Allergy Clin Immunol 2014;133:921-3 および Lancet Respir Med. 2014)。好酸球は脱顆粒による組織傷害性の強い顆粒蛋白の放出やロイコトリエンの産生などを介してアレルギー性炎症反応における重要な効果細胞としての役割を演じるだけでなく、サイトカインやケモカインを産生放出して他の細胞 (免疫細胞を含む) の活性化を誘導し、type 2 inflammation を制御すると考えられているが、実際に好酸球がアレルギー性炎症局所で演じる役割の全貌は明らかになっていない。私達は 2008 年から「好酸球特異的な分子群の網羅的解析研究」(平成 20 年度科学研究費補助金 20591196) として、好酸球の活性化 (GM-CSF や固相化した secretory IgA 刺激) に伴う遺伝子発現変動を網羅的に解析し、好酸球が CCL23 や Amphiregulin を産生することを報告してきた (Int Arch Allergy Immunol 2009;149:S39-44 および Int Arch Allergy Immunol 2011;155:S34-39)。

今回私達は、好酸球が PRSS33 (Protease, serine, 33) を恒常的に発現する (タンパク量として 106 個あたり約 55 ng) ことを新たに見いだした。PRSS33 の mRNA は各種刺激によって変動しない。PRSS33 には二つの保存された protease 活性を有する domain があり (Fig 1)、その domain は全ての哺乳類に強く保存されていることから、何らかの重要な役割を演じることが示唆されるが、その機能は全く不明である。PRSS33 の保存された domain はヒト gamma tryptase (PRSS31) と最も高い同一性 (73%) を有している。gamma tryptase はマスト細胞のみに発現しており、ごく最近、ノックアウトマウスを用いた検討により、gamma tryptase が COPD や SDS 誘発腸炎などの病態に関与することが明らかとなっている (J Biol Chem. 2014;289:18214-27)。Fig. 1 二つの保存された domain を有する一方、マイクロアレイによる解析から、

PRSS33 は他の血球細胞には発現が無いことから、好酸球特有の何らかの機能を担うと考えられる。

2. 研究の目的

好酸球における PRSS33 タンパクの局在および recombinant PRSS33 タンパクの機能を in vitro で、ノックアウトマウスを用いて in vivo で検討する。

3. 研究の方法

a. 活性化好酸球の PRSS33 タンパクの局在の検討

PRSS33 が 1 回膜貫通型のタンパクであることから、活性化した好酸球で細胞表面に PRSS33 が発現し、活性を示すか否かを確認する。

b. バキュロウイルス系を用いて、recombinant PRSS33 タンパクを作成し、in vitro での機能解析を行う

バキュロウイルス系を用いて、recombinant PRSS33 タンパクを作成し、in vitro での機能解析を行う。PRSS33 は構造的にセリンプロテアーゼに類似しており、セリンプロテアーゼ活性を有すると推察される。気管支喘息病態を考慮し、in vitro で PRSS33 を各種気道構成細胞に添加し、その影響を検討する。特に beta tryptase が気道平滑筋の増殖を促進する (J Immunol 2008;181:5001-7) ことから、リモデリング関連の影響を特に詳細に検討する。

また、protease-activated receptor-2 (PAR-2) の活性化は type 2 inflammation において重要な役割を演じることが知られていることから、PRSS33 の基質特異性、特に PAR-2 の活性化の有無を検討する。

c. PRSS33 ノックアウトマウスの作成とその機能解析

国立成育医療研究センター研究所システム発生・再生医学研究部との協力により (Sci Rep. 2014;4:5396) CRISPR/Cas9 システムを用いて PRSS33 ノックアウトマウスを作成する。顕著な好酸球浸潤と気道リモデリングをきたす、6 週間のダニ吸入による気管支喘息モデル (Eur J Pharmacol. 2008;578:87-96) を用いて、PRSS33 の機能を検討する。

4. 研究成果

a. 活性化好酸球の PRSS33 タンパクの局在の検討

PRSS33 タンパクは好酸球の細胞膜に透過処理を施さなければ染色されない。一方、10 ng/ml GM-CSF で 24 時間処理し、脱顆粒が誘導された好酸球表面には強く発現されることから、resting の好酸球の顆粒膜に一致して (Eosinophilic cationic protein と同じ部位に発現) あり、脱顆粒による顆粒膜と細胞膜の癒合によって細胞表面に発現すると考えられる。(図 1)

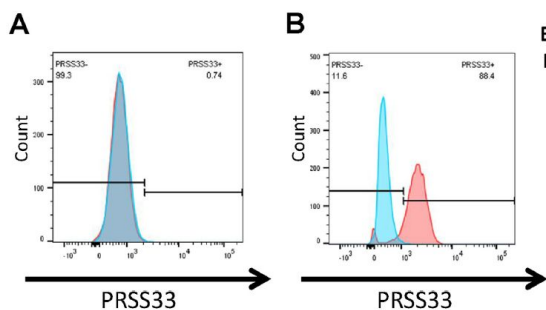


図1 PRSS33 の発現を細胞透過処理をせずに検討。A:刺激無し、B:GM-CSF 24時間刺激後

b. recombinant PRSS33 タンパクの機能解析
バキュロウイルス系を用いて作成した recombinant PRSS33 (rPRSS33) タンパクを用いて各種気道構成細胞に与える影響を検討し、rPRSS33 が線維芽細胞における extracellular matrix protein (ECM) の mRNA 発現をプロテアーゼ活性依存的に増強する事を見いだした。また、この ECM の発現増強は、protease inhibitor や PAR2 antagonist の存在下で有意に減弱することから、rPRSS33 はプロテアーゼ活性を持ち、少なくとも一部は線維芽細胞の PAR2 を活性化することによって ECM の発現増強を誘導すると考えられた。(図2)

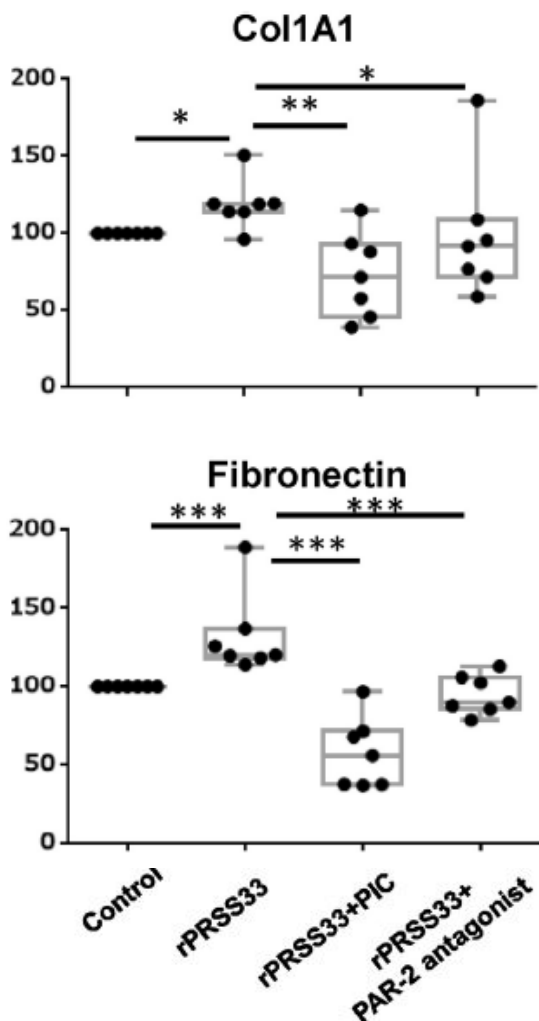


図2 recombinant PRSS33 でヒト正常線維芽細胞を 24 時間刺激後の mRNA 発現量を qPCR にて測定。PIC: protease inhibitor cocktail

c. PRSS33 ノックアウトマウスの作成とその機能解析

CRISPR/Cas9 システムを用いて、PRSS33 の Exon 3 に 2 塩基の欠失を認める (Off target 変異無し) ノックアウトマウス (PRSS33 KO) を得た。経気道的に Protease 抗原である papain を 3 日間連続投与して惹起される IL-33 依存性の好酸球性炎症を用いて、PRSS33 KO での好酸球の遊走、生存などを確認したところ、Wild type の場合と全く同様の好酸球の組織内浸潤と生存延長が PRSS33 KO においても認められた。このことから、PRSS33 KO の好酸球の脱顆粒以外の機能は WT と同等であることが強く示唆された。更に、ダニ抗原の長期吸入 (週 5 日 x 6 週間) による組織リモデリングモデルを用いて PRSS33 KO の影響を検討したが、全く影響は認められなかった。

PRSS33 と最も homology が高い分子である Gamma tryptase (マスト細胞に発現) は、デキストラン硫酸 (DSS) 誘導マウス腸炎モデルの病態に重要な役割を演じていることが報告されている。そこで、同モデルを用いて PRSS33 KO の影響を検討したが、肉眼的及び組織学的検索の結果、PRSS33 KO の影響は認められなかった。

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 1 件)

1. Toyama S, Okada N, Matsuda A, Morita H, Saito H, Fujisawa T, Nakae S, Karasuyama H, Matsumoto K. Human eosinophils constitutively express a unique serine protease, PRSS33. Allergol Int. 2017;66:463-71

[学会発表](計 0 件)

[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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

松本 健治 (Kenji Matsumoto: 国立成育医療研究センター研究所 免疫アレルギー・感染研究部)

研究者番号：60181765

(2)研究分担者)

()

研究者番号：

(3)連携研究者

外山 扇雅 (Sumika Toyama: 国立成育医療研究センター研究所 免疫アレルギー・感染研究部)

研究者番号： 50805893