

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 26 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15377

研究課題名(和文)キチンの新規受容体の同定とシグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文) Identification of chitin binding protein(s) and analysis of cellular signal transduction by stimulation of chitin.

研究代表者

斎藤 博久 (Saito, Hirohisa)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・研究所・副所長

研究者番号：40130166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ダニの外殻を構成する多糖類の一つであるキチンが、同時吸入のタンパク質抗原に対するアレルギー応答を誘導することを見出している。しかしながら、キチンによる免疫応答誘導に関わる受容体は良く分かっていない。今回、その解明を目的としてキチン結合タンパク質の同定を試みた。その結果、4種の結合タンパク質が同定された。今後、これら分子によるダニアレルギーなどの発症との関わるについて検討を行っていく予定である。

研究成果の概要(英文)：Although it is considered that chitin (a major component of the outer shell of house dust mite) can contribute to the induction of allergic responses, it still remains unclear the mechanism of cellular signal transduction by stimulation of chitin. In this study, we attempted to identify chitin binding proteins, and finally found four chitin-binding proteins. In the future, we will investigate the role of these molecules in development of house dust mite antigen-mediated allergic disorders.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アレルギー

1. 研究開始当初の背景

主要アレルゲンの一つであるダニアレルゲンが、Th2 応答を誘導することによりアレルギー応答を誘導することは良く知られている。ダニアレルゲンによる Th2 応答及びアレルギー応答誘導機構として、カビ胞子中の β -D-グルカンやダニ糞中のリポ多糖(LPS)、そしてアレルゲン自身のタンパク質分解酵素活性が知られるが、それ以外のメカニズムについては明らかとなっていない。

キチン(Chitin)はN-Acetyl-Glucosamineのポリマーで、自然界でCelluloseに次いで二番目に多量に存在する多糖類である。キチンはダニなどの節足動物、エビ・カニなどの甲殻類、ハチ・ゴキブリなどの昆虫類、カビなどの真菌類といったアレルゲンとなりうる代表的な生物の外殻に存在する。キチンのこのような局在から、キチンが何らかの自然免疫応答を惹起し、それに続くアレルギー応答誘導に関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

キチンはダニの外殻に豊富に存在する多糖類で、獲得免疫非依存的に好酸球性炎症を誘導できることから、ダニアレルギーの全く新しい誘導因子である可能性がある。これまでに申請者は、キチンによるアレルギー性喘息マウスモデルを確立している。マウスに生理食塩水、鶏卵白アルブミン(OVA)もしくはOVA+キチンの経鼻吸入により感作を行い、後日、OVAを再度、経鼻吸入させて気道炎症の誘導を試みた。その結果、野生型(WT)マウスでは、OVA単独の感作では、その後のOVA吸入による気道炎症は誘導されないのに対し、OVA+キチンの場合は気道炎症が誘導できることが明らかになった。また、その効果は、IL-4/13-STAT6経路に依存することを見出した。さらに、キチンの受容体として、TLR2やDectin-1が知られるが、このOVA・キチン誘導性気道炎症は、TLR2/4欠損マウスと野生型(WT)マウスで同程度に誘導されることが明らかとなっている。これらの結果より、キチンによるアレルギー応答誘導機構には、TLR以外の受容体や、全く新しいキチン結合性分子が関与している可能性がある。そこで、キチンによるシグナル伝達機構を明らかにする目的で、キチン結合タンパク質(CBP)をマウス肺より同定する。

3. 研究の方法

(1) 新規キチン結合タンパクの同定

新規キチン結合タンパク質の同定及び新規キチン受容体の同定を試みた。マウスの肺をホモジェネートし、1% Triton - X100により肺タンパク質を抽出した。この肺抽出液をキチンビーズと一晚反応させた。ビーズをスピンカラムに載せ、カラムに高濃度のキトオリゴ糖を滴下した。キトオリゴ糖によりキチン結合タンパク質を溶出した。これをアセトン沈殿により濃縮し、SDS-PAGEにより分離し

た。CBB染色後、得られたバンドを切り出した。ゲル内トリプシン消化後、LC-MS解析によりキチン結合タンパク質を同定した。

(2) キチン結合タンパク質の機能評価

同定されたCBPが、キチン依存的な自然免疫応答の活性化に關与するかをin vitro及びin vivoで検討する。これまでに、キチンが、IL-33依存的に骨髄由来樹状細胞(BMDC)を活性化して、IL-1 β 産生を誘導することを明らかとしている。そこで、CBPの市販リコンビナントタンパク質とキチンによる刺激で、BMDCによるIL-1 β 産生を誘導できるかELISA法で検討する(in vitro)。また、キチンをマウスに吸入させると、獲得免疫非依存的な気道炎症が惹起される。そこで、CBPの市販リコンビナントタンパク質とキチンをマウスに吸入させ、CBPのキチンによる気道炎症誘導における役割を検討する(in vivo)。

4. 研究成果

(1) 新規キチン結合タンパクの同定

今回の検討で、4種類のCBPを同定した(CBP1~4)。CBP1については、ES細胞を用いて当該遺伝子を欠損したマウスを樹立した。今後は、当該遺伝子欠損マウスを用いてキチンによるアレルギー誘導におけるCBP1の役割をin vivoで検討する。CBP2~4については、そのin vivoでの機能解析を目的として、CRISPR/Cas9システムにより遺伝子欠損マウスを順次作製し、それら分子の機能をin vivoで評価していく。

(2) キチン結合タンパク質の機能評価

同定されたCBPがキチン依存的な自然免疫応答の活性化に關与するかをin vitro及びin vitroで評価した。まず、マウス骨髄由来樹状細胞(BMDC)をメディアム、キチン、CBP1もしくはCBP1+キチンで刺激すると、CBP1+キチン刺激でのみ、BMDCによるIL-1 β 産生が誘導された。この結果から、CBP1がキチンに対するセンサー分子としてキチンのシグナル伝達機構に關与しうると考えられた。次に、野生型(WT)マウスに生理食塩水、キチン、CBP1もしくはCBP1+キチンを経鼻的に1回だけ投与すると、CBP1+キチン投与マウスでのみ、気道への強い顆粒球浸潤が誘導された。これらの結果から、CBP1がキチンに対するセンサー分子として、キチンによる気道炎症誘導に關与しうると考えられた。これらの結果から、キチン-CBP1複合体が結合すると推測される、何らかの細胞膜上の受容体が、キチンによるアレルギー誘導に關与すると考えられた。

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 10 件)

Takeda T, Unno H, Morita H, Futamura K, Emi-Sugie M, Arae K, Shoda T, Okada N, Igarashi A, Inoue E, Kitazawa H, Nakae S, Saito H, Matsumoto K, Matsuda A. Platelets constitutively express IL-33 protein and modulate eosinophilic airway inflammation. J Allergy Clin Immunol. 2016 In press. 査読有

Shoda T, Matsuda A, Arai K, Shimizu H, Morita H, Orihara K, Okada N, Narita M, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K, Nomura I. Sera of patients with infantile eosinophilic gastroenteritis showed a specific increase in both thymic stromal lymphopoietin and IL-33 levels. J Allergy Clin Immunol. 2016 In press. 査読有

Shoda T, Futamura K, Orihara K, Emi-Sugie M, Saito H, Matsumoto K, Matsuda A. Recent advances in understanding the roles of vascular endothelial cells in allergic inflammation. Allergol Int. 2016 65:21-9 査読有

Horimukai K, Morita K, Narita M, Kondo M, Kabashima S, Inoue E, Sasaki T, Niizeki H, Saito H, Matsumoto K, Ohya Y. Transepidermal water loss measurement during infancy can predict the subsequent development of atopic dermatitis regardless of filaggrin mutations. Allergol Int. 2016 65:103-8 査読有

Morita H, Arae K, Unno H, Toyama S, Motomura K, Matsuda A, Suto H, Okumura K, Sudo K, Takahashi T, Saito H, Matsumoto K, Nakae S. IL-25 and IL-33 Contribute to Development of Eosinophilic Airway Inflammation in Epicutaneously Antigen-Sensitized Mice. PLoS One. 2016 10: e0134226 査読有

Morita H, Arae K, Unno H, Miyauchi K, Toyama S, Nambu A, Oboki K, Ohno T, Motomura K, Matsuda A, Yamaguchi S, Narushima S, Kajiwara N, Iikura M, Suto H, McKenzie AN, Takahashi T, Karasuyama H, Okumura K, Azuma M, Moro K, Akdis CA, Galli SJ, Koyasu S, Kubo M, Sudo K, Saito H, Matsumoto K, Nakae S. An Interleukin-33-Mast Cell-Interleukin-2 Axis Suppresses Papain-Induced Allergic Inflammation by Promoting Regulatory T Cell Numbers. Immunity. 2015 43:175-86 査読有

Kamemura N, Takashima M, Morita H,

Matsumoto K, Saito H, Kido H. Measurement of allergen-specific secretory IgA in stool of neonates, infants and toddlers by protection against degradation of immunoglobulins and allergens. J Med Invest. 2015 62: 137-44 査読有

Horimukai K, Hayashi K, Tsumura Y, Nomura I, Narita M, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K. Total serum IgE level influences oral food challenge tests for IgE-mediated food allergies. Allergy. 2015 70: 334-7 査読有

Funaki S, Nakamura T, Nakatani T, Umehara H, Nakashima H, Okumura M, Oboki K, Matsumoto K, Saito H, Nakano T. Global DNA hypomethylation coupled to cellular transformation and metastatic ability. FEBS Lett 2015 589: 4053-60 査読有

Ebihara T, Azuma M, Oshiumi H, Kasamatsu J, Iwabuchi K, Matsumoto K, Saito H, Taniguchi T, Matsumoto M, Seya T. Identification of a polyI:C-inducible membrane protein that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. J Exp Med. 2015 212: 1337 査読有

〔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

- 1 . 斎藤 博久
- 2 . SAITO HIROHISA
- 3 . 国立研究開発法人国立成育医療研究センター
- 4 . 研究所
- 5 . 副所長
- 6 . 研究者番号 : 40130166

(2)研究分担者
なし

- (3)連携研究者
- 1 . 中江 進
 - 2 . NAKAE SUSUMU
 - 3 . 東京大学 医科学研究所
 - 4 . システムズバイオロジー分野
 - 5 . 准教授
 - 6 . 研究者番号 : 60450409

- 1 . 須藤カツ子
- 2 . SUDO KATSUKO
- 3 . 東京医科大学
- 4 . 動物実験センター
- 5 . 講師
- 6 . 研究者番号 : 50126091

- 1 . 松本健治
- 2 . MATSUMOTO KENJI
- 3 . 国立研究開発法人国立成育医療研究センター
- 4 . 研究所 免疫アレルギー・感染研究部
- 5 . 部長
- 6 . 研究者番号 : 60181765

- 1 . 中島 英規
- 2 . NAKAJIMA HIDEKI
- 3 . 国立研究開発法人国立成育医療研究センター
- 4 . 研究所 マスクリーニング研究室
- 5 . 研究員
- 6 . 研究者番号 : 30450620

(4)研究協力者
なし