

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 20 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15515

研究課題名(和文)キチナーゼ様タンパク質を介したキチンシグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of signal transduction mechanisms by chitin through Chitinase-like proteins.

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) 2,600,000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。さらに、キチンによる炎症誘導に関わりうるキチナーゼ様分子をマウス肺より同定している。しかしながら、膜結合型受容体をはじめ、キチン/キチナーゼ様タンパク質複合体のシグナル伝達下流分子は不明である。そこで本研究では、キチン/キチナーゼ様タンパク質複合体に対する膜結合型受容体の同定を試みた。その結果、同定された分子はいずれも細胞内に局在するものであり、シグナル伝達に関与しうる分子は含まれなかった。したがって、スクリーニング方法の変更が必要と考えられた。

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. Previously, we identified a Chitinase-like protein as a signal transducer molecule of chitin. In this study therefore, we attempted to identify membrane receptors for the complex of chitin/Chitinase-like protein, but could not clarify the molecule. In the future, we should change the method of screening for identification of the receptors for chitin and Chitinase-like protein complex.

研究分野：免疫学、アレルギー学

キーワード：キチン Th2 アレルギー

1. 研究開始当初の背景

アレルギーの原因物質(アレルゲン)として、室内環境中のダニ(ヒョウヒダニ)が最も高頻度となっている。これまでに同定されたダニアレルゲンの多くがプロテアーゼであることから、アレルギーの誘導機構として、ダニ抗原自身のプロテアーゼ活性が想定されている。他方、ダニ外殻の主要な構成成分としてキチン(Chitin)が知られる。キチンはN-アセチル-グルコサミンのポリマーで、無害とされていることから、その誘導体が人工皮膚やコンタクトレンズの材料として利用されている。しかしながら、キチンを大量に吸入すると、獲得免疫非依存的な機構で、喘息様の気道炎症が惹起されることがNature誌に報告された。このことから、キチンがダニアレルギーの誘発に関与している可能性が考えられる。そこで、マウスに生理食塩水、鶏卵白アルブミン(OVA)、キチンもしくはOVA+キチンの経鼻吸入により感作を行い、後日、OVAを再度、経鼻吸入させることにより、アレルギー性気道炎症の誘導を試みた。その結果、OVA+キチン感作マウスでのみ強い気道炎症が誘導され、さらに、その気道炎症はIL-4/IL-13-STAT6経路依存的であることが明らかとなった。これらの結果は、キチンがアレルギー性気道炎症を誘導できることを示しており、キチンがダニアレルギーの新規誘発機構である可能性が考えられる。

2. 研究の目的

キチンを吸入するとT細胞やB細胞を介さない気道炎症が惹起されることから、キチンを認識する何らかの受容体が存在すると考えられる。これまでに、キチンのシグナル伝達を担う受容体としてToll-like receptor 2 (TLR2)やDectin-1が報告されている。しかしながら、これらの受容体を欠損するマウスでも、キチン吸入による気道炎症は野生型マウスと同程度に惹起されることから、キチンによるアレルギー誘導には新規のキチン受容体が関与すると考えられる。そこで、新規のキチン受容体の同定を目的として、キチンビーズを用いたアフィニティクロマトグラフィとLC-MS解析により、キチン結合タンパク質(chitin-binding protein; CBP)をマウス肺より同定した。これまでの検討から、その中の一つである可溶性分子CBP1(分子名は伏せる)が、キチンによる免疫細胞の活性化や、キチン吸入による気道炎症の惹起に関与していることが明らかとなった。しかしながら、CBP1は可溶性分子であり、キチン/CBP1複合体の下流には何らかの膜結合型受容体が存在すると考えられる。そこで、本研究では、キチンによるシグナル伝達機構の解明を目的として、キチン/CBP1複合体の下流分子の同定を試みた。

3. 研究の方法

接着細胞であるCOS-7細胞に、plasmid型の発現ベクターを用いたマウス肺cDNAライブラリーを、リポフェクション法により遺伝子導入した。強制発現後、EDTA処理によりCOS-7細胞を再浮遊させる。リコンビナントCBP1を予め固相化し、さらにFCSを含むHBSSバッファーでblockingしたディッシュにCOS-7細胞をキチンと共に播種し、4で2時間インキュベートする。ディッシュ底面をバッファーでやさしく洗浄し、キチン存在下でディッシュ底面のリコンビナントCBP1に結合したCOS-7細胞クロンのplasmidを抽出する。得られたplasmidを大腸菌にトランスフォーメーションし、plasmidを増幅する。再びCOS-7細胞に遺伝子導入し、これら一連の操作を4回繰り返す。その結果、キチン存在下でディッシュ底面のリコンビナントCBP1に結合する分子のcDNAを含むCOS-7細胞クロンが濃縮されることが期待される。最終的に得られた各クロンのplasmidについて、insert cDNAのシーケンスを行う。得られた各insert cDNAの塩基配列についてBLAST検索を行い、キチン存在下でCBP1と結合する分子の同定を目指す

4. 研究成果

固相化CBP1に結合したクロンのplasmidについて、insert cDNAのシーケンスを行った。その結果、アデニル酸シクラーゼやATP合成酵素のような酵素、プラコグロビンやダイニンなど細胞の構造タンパク質、さらにはアペリンやサイモシンなどの生理活性物質等、様々なインサートDNAが同定された。以下に同定した遺伝子のgene symbolを列挙する。

Adcy3, Hsd11b1, Atp5sl, Got1, Fars2, Rps9, Rbm3, Jup, Smim14, Hbb-b1, Ptma, Sc5d, Atp8a1, Mcfd2, Edf1, S100a6, Cfp97

しかしながら、実験毎に同定される分子種には全く再現性がなく、panning法により選抜されるクロンは、固相化CBP1もしくは固相に非特異的に結合しているに過ぎないと考えられた。また、同定されたこれらの遺伝子は全て、膜結合型受容体をコード出来ないほど短い遺伝子である。plasmid型の発現ベクターではクローニングできる塩基サイズに制限が大きく、今回使用したcDNAライブラリーには膜型受容体をコードする大きさの遺伝子がほとんど含まれていないと推測された。したがって、キチン/CBP1複合体の下流分子の同定を目指すのであれば、スクリーニング法の抜本的な変更が必要であると考えられた。

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 14 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 In Press.
2. Shoda T, Futamura M, Yang L, Narita M, **Saito H**, Ohya Y. Yogurt consumption in infancy is inversely associated with atopic dermatitis and food sensitization at 5 years of age: A hospital-based birth cohort study. *J Dermatol Sci* 2017;**86**:90-6.
3. Ogasawara T, Hatano M, Satake H, Ikari J, Taniguchi T, Tsuruoka N, Watanabe-Takano H, Fujimura L, Sakamoto A, Hirata H, Sugiyama K, Fukushima Y, Nakae S, Matsumoto K, **Saito H**, Fukuda T, Kurasawa K, Tatsumi K, Tokuhisa T, Arima M. Development of chronic allergic responses by dampening Bcl6-mediated suppressor activity in memory T helper 2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;**114**:E741-E50.
4. Natsume O, Kabashima S, Nakazato J, Yamamoto-Hanada K, Narita M, Kondo M, Saito M, Kishino A, Takimoto T, Inoue E, Tang J, Kido H, Wong GW, Matsumoto K, **Saito H**, Ohya Y. Two-step egg introduction for prevention of egg allergy in high-risk infants with eczema (PETIT): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2017;**389**:276-86.
5. Morita H, Nakae S, **Saito H**, Matsumoto K, K. IL-33 in clinical practice: size matters? *J Allergy Clin Immunol* 2017 Accepted.
6. Yamamoto-Hanada K, Futamura M, Yang L, Shoda T, Narita M, Kobayashi F, **Saito H**, Ohya Y. Preconceptional exposure to oral contraceptive pills and the risk of wheeze, asthma and rhinitis in children. *Allergol Int* 2016;**65**:327-31.
7. 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;**138**:1395-403.
8. 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;**138**:299-303.
9. Shoda T, Futamura M, Yang L, Yamamoto-Hanada K, Narita M, **Saito H**, Ohya Y. Timing of eczema onset and risk of food allergy at 3 years of age: A hospital-based prospective birth cohort study. *J Dermatol Sci* 2016;**84**:144-8.
10. 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.
11. Morita H, **Saito H**, Matsumoto K, Nakae

S. Regulatory roles of mast cells in immune responses. *Semin Immunopathol* 2016;**38**:623-9.

12. Konishi M, Tachibana Y, Tang J, Takehara K, Kubo T, Hashimoto K, Kitazawa H, **Saito H**, Ohya Y. A Comparison of Self-Rated and Female Partner-Rated Scales in the Assessment of Paternal Prenatal Depression. *Community Ment Health J* 2016;**52**:983-8.

13. 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.

14. Arae K, Morita H, Matsumoto K, **Saito H**, Nakae S. INTERLEUKIN-33 IN ALLERGIC DISEASES. *Arerugi* 2016;**65**:1269-76.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

なし

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 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
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

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
中江 進 (NAKAE SUSUMU)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：60450409

松本健治 (MATSUMOTO KENJI)
国立研究開発法人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・部長
研究者番号：60181765

須藤カツ子 (SUDO KATSUKO)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号：50126091

(4)研究協力者
()