

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09508

研究課題名(和文) 抗アレルギー治療新規ターゲット分子としてのMAPキナーゼフォスファターゼの解析

研究課題名(英文) Identify a role of DUSP16 as a new therapeutic target of allergy

研究代表者

千葉 紀香 (Chiba, Norika)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：00468050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、細胞内シグナル伝達に関わるMAPキナーゼフォスファターゼであるDUSP16のアレルギーにおける役割の解析を目的とした。

アレルギー喘息モデルでは、野生型C57BL/6に対してDUSP16ノックアウトでは抗原の経気道投与による発作マーカーである気道内の細胞数が減少する傾向がみられた。また、I型アレルギーに関係する免疫細胞であるマスト細胞の抗原刺激や細菌由来成分による活性化や、骨髄由来マスト細胞の増殖にDUSP16が重要であることが示唆された。以上のことから、DUSP16はマスト細胞の増殖や分化に重要な役割を果たし、アレルギー喘息治療の重要なターゲット分子に成り得ると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アレルギー喘息などのアレルギー疾患は現代社会において世界的にも増加していることが知られており、また、その症状から患者のQOL (Quality of life) を酷く低下させることから、より効果的な治療法の開発や確立は急務である。

本研究では、アレルギー喘息モデル動物による比較や、アレルギーに関与するマスト細胞の増殖や活性化にDUSP16が重要であることが分かり、DUSP16が新たなアレルギー喘息治療のターゲットに成り得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Our goal of this study is identifying a role of DUSP16, a MAPK phosphatase, in allergy as a therapeutic target. We analyzed allergic asthma animal model using DUSP16 knockout and wildtype mice. The number of infiltrate cells into bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in asthmatic DUSP16 KO was relatively reduced in comparison with wild type. Also bone marrow-derived mast cells (BMMCs) were obtained from DUSP16 KO and wildtype. Both BMMCs were cultured in mast cell differentiation medium, and DUSP16 KO BMMCs showed slower growth than wildtype BMMCs. Also, DUSP16 gene expression in either antigen- or endotoxin-stimulated BMMCs was increased at early time point. Thus, DUSP16 may play an important role in mast cell proliferation and differentiation and DUSP16 would be a new therapeutic target for allergic asthma.

研究分野：免疫学

キーワード：マスト細胞 アレルギー喘息

## 1. 研究開始当初の背景

アレルギー喘息は、本来ならば生体には無害な物質により惹起される深刻な気道疾患であるが、細菌などの感染によっても増悪されることが近年の研究で明らかになっている。また、アレルギー喘息は患者の生命を脅かすだけでなく、日常生活における Quality of Life (QOL) を著しく損なう疾患として知られている。過去 30 年間のアレルギー喘息の有病率が成人では 3 倍、小児では 5 倍と顕著に上昇し、アレルギー喘息に対する新たな治療・予防法の確立は現代社会において急務である。

アレルギー喘息の発症機序としては、本来は無害であるはずの物質(アレルゲン)がマスト細胞上の IgE 抗体に認識され結合し、IgE 抗体の受容体である Fc $\epsilon$ R の活性化を引き起こし、続いて起こる化学伝達物質の放出により生じる I 型アレルギーが主体となっていることが知られている。鍵となる IgE 産生には、CD4 陽性 T 細胞から分化するエフェクターヘルパー T 細胞 (Th) のうち II 型 (Th2) が重要となる。古典的には、I 型 Th 細胞 (Th1) がインターフェロン (IFN $\gamma$ ) 産生を介してウイルスや細胞内寄生細菌、がん細胞を標的とした免疫を活性化するのに対し、Th2 は IL-4/5/13 などの Th2 サイトカインを分泌し、IgE などの抗体産生を増強することによって寄生虫や細胞外感染細菌などを標的とする免疫を活性化する。Th1/Th2 は各々のサイトカインによって拮抗的に制御されており、例えば IL-4 は Th1 分化を阻害し Th2 分化を促進するポジティブフィードバックが働いており、このことより一旦体内の Th1/Th2 バランスが恒常性を失って Th2 側に傾くと、そこから Th2 環境が過剰に進行することとなり、このことはアレルギー疾患が難治である理由の 1 つとされている。

P38、ERK、JNK で構成される MAP キナーゼファミリーは、上流の MAP kinase kinase (MKK) からのリン酸化を受け活性化し、Dual specificity phosphatase (DUSP) による脱リン酸化で不活性化する。我々が以前報告した DUSP16 は、MAP キナーゼのうち JNK に強い基質特異性を示す唯一の DUSP であり、さらにマクロファージにおいては LPS による炎症性サイトカインの産生を抑制する働きがあることや、CD4 陽性 T 細胞ではその Th1 分化を抑制する働きがあることを示した。

以上より、DUSP16 は基質特異的かつ細胞種によって特異的な働きをする可能性が高く、生体内での免疫反応の制御因子として働いている可能性が示唆されていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞内シグナル伝達分子である MAPK フォスファターゼである DUSP16 (別名 MKP-M、JNK 特異的フォスファターゼ) のアレルギー喘息治療の新規ターゲット分子としての可能性を提示することを目的とした。特に、I 型アレルギーの要であるマスト細胞における DUSP16 の役割に着目した。

## 3. 研究の方法

### (1) アレルギー喘息動物モデルによる解析

当研究室で作製した DUSP16 ノックアウトマウスとそのコントロールマウスである C57BL/6 マウスを用いて気道感作によるアレルギー喘息モデルマウスを作製し、解析、比較した。

### (2) 培養細胞を用いた in vitro による解析

マスト細胞の細胞株である MC/9 に IgE-抗原によるクロスリンク刺激と菌体成分である Lipopolysaccharide (LPS) による刺激を行い、その後の遺伝子発現を解析した。また、前述の DUSP16 ノックアウトマウスと C57BL/6 マウスの骨髄細胞を分化培地で培養して得られた骨髄分化マスト細胞を観察した。

#### 4. 研究成果

(1) C57BL/6 マウスと DUSP16 マウスにハウスダストマイト(HDM)水溶液の経気道投与を数回実施し、一定期間置いたのち HDM 水溶液の経気道感作を行って喘息の発作状態を誘導した。その状態のマウスから肺胞洗浄液 (Bronchoalveolar lavage fluid; BALF) を回収し、BALF 中の細胞数と、また肺の RNA を回収して重要なサイトカインの発現量を比較した (図 1)。

C57BL/6 (WT) では HDM による感作と発作誘導によって BALF 中の細胞数が増加しているのに対し、DUSP16 ノックアウト (KO) では微増に留まっていた。また、アレルギー喘息で重要な役割を果たすことが知られている IL-13 の発現量は、喘息誘導を行った WT と KO では、KO は WT に比べて優位に低い値を示すことが確認された。これは、DUSP16 をノックアウトすることがアレルギー喘息の軽減に影響すると考えられる。

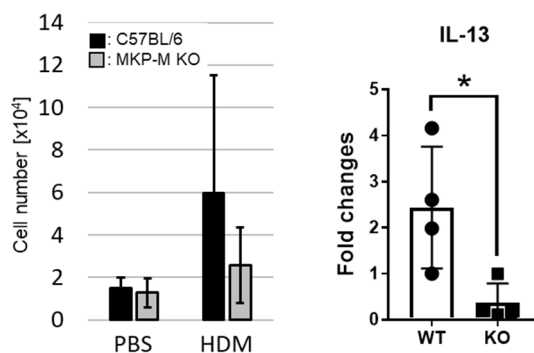


図 1: HDM 感作による喘息モデルマウスの BALF 細胞数と肺における IL-13 発現の比較

(2) マウスマスト細胞株である MC/9 に Anti-DNP IgE を結合させ、そこに抗原である DNP-BSA を加えクロスリンク刺激したものと LPS による刺激、そして PMA/ionomycin による刺激を行い、それぞれ DUSP16、IL-13、TNF- $\alpha$  の発現を確認した (図 2)。

また、どちらの遺伝子発現も刺激後 1 ~ 2 時間後にピークがみられた (data not shown)。興味深いことに、抗原刺激では IL-13、DUSP16 両分子の遺伝子発現の増強がみられたが、LPS では DUSP16 の発現がより高くなることが観察された。

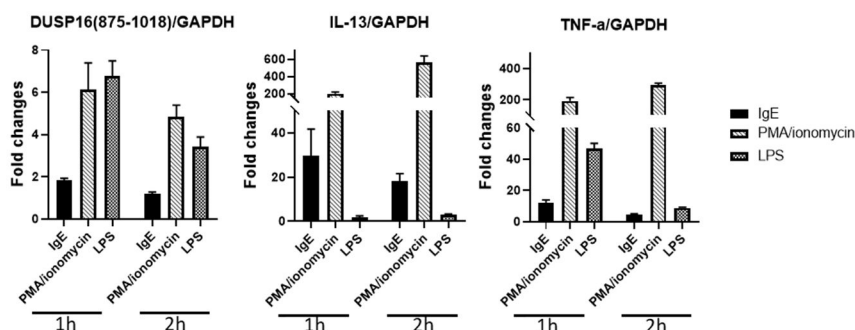


図 2: MC/9 における各種刺激によるサイトカインと DUSP16 の発現

さらに、WT と KO から得た骨髄マスト細胞の一定期間培養後における細胞数に差がみられた (約 2 倍程度)。このことは、DUSP16 がマスト細胞の増殖、分化に重要な働きをしている可能性を示唆している。

以上のことから、DUSP16 はアレルギー喘息の発症において重要な役割を果たしており、さらにマスト細胞においては増殖、分化、そして活性化に重要な働きをしている可能性が示唆され、アレルギー疾患における新規治療ターゲットとしての可能性が提示されたと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松口 徹也  (Matsuguchi Tetsuya)  (10303629)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授   (17701)	
研究分担者	大西 智和  (Ohnishi Tomokazu)  (30244247)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・准教授   (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関