

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15049

研究課題名（和文）喘息発症におけるシグナル伝達p38-MK2経路の役割解明

研究課題名（英文）Role of p38-MK2 in the development of asthma

研究代表者

早川 裕子（Hiroko, Hayakawa）

自治医科大学・医学部・客員研究員

研究者番号：80626929

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）：喘息は気道炎症を伴うアレルギー疾患である。気道炎症を誘導するサイトカインIL-5とIL-13は、IL-33に反応した肺2型自然リンパ球(ILC2)から産生される。本研究は、IL-33シグナルのp38経路の下流にあるリン酸化酵素MK2、MK3について、遺伝子欠損マウスを用いて喘息モデルを作製し、喘息の病態形成への関与を検討した。野生型とMK3欠損マウスが典型的な気道炎症を呈したのに対して、MK2欠損マウスは肺ILC2が活性化されずIL-5とIL-13の産生が抑制され、気道炎症が軽度であった。これらの結果は、MK2が喘息の気道炎症の誘導に関与することを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

喘息の発症に関わるサイトカインIL-5とIL-13の産生は、肺ILC2におけるIL-33シグナルのp38経路により誘導される。本研究は、p38経路のリン酸化酵素MK2およびMK3の遺伝子欠損マウスを用いた喘息モデルにより、p38-MK3経路ではなく、p38-MK2経路がIL-5とIL-13の産生において不可欠な経路であることを明らかにした。本研究の成果は、MK2自身およびp38-MK2経路の下流シグナル分子が喘息治療の新たな標的になる可能性を示し、今後の治療法開発の分子基盤になるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Asthma is an allergic disease associated with airway inflammation. Activated type 2 innate lymphoid cells (ILC2) by interleukin (IL)-33 produce IL-5 and IL-13, which induce airway inflammation. The kinases MK2 and MK3, are downstream substrates of p38MAPK pathway involved in IL-33 signaling, play a key role of proinflammatory cytokine production including IL-5 and IL-13. In this study, we investigated the involvement of MK2 and MK3 in the pathogenesis of asthma using knockout mice. Wild-type and MK3-knockout mice showed typical airway inflammation. On the other hand, MK2-knockout mice showed mild airway inflammation due to lack of activation of lung ILC2 and suppression of IL-5 and IL-13 production. These results indicate that MK2 is involved in the development of airway inflammation in asthma.

研究分野：アレルギー

キーワード：喘息 モデルマウス IL-33

1. 研究開始当初の背景

IL-33 受容体は、ST2L と IL-1RAcP からなる。分泌型 ST2 は、ST2L の細胞外領域のみを持つタンパク質である。申請者の所属研究室は、分泌型 ST2 と ST2L をクローニングし、これらの分子が同一遺伝子から選択的スプライシングによって産生されることを明らかにした[1, 2]。2005 年に IL-33 が発見され、ST2L が IL-33 受容体として作用し、Th2 サイトカイン (IL-4、IL-5、IL-13) の産生を誘導することが示された[3]。また、IL-33 受容体を高発現する新規リンパ球として 2 型自然リンパ球 (ILC2) が報告された[4]。とくに、肺 ILC2 は気道炎症の誘導に関与することから、喘息治療の標的細胞として注目されている。

これまで申請者は、IL-33 シグナル伝達およびその疾患病態生理の解析を一貫して行ってきた。その過程で、分泌型 ST2 が細胞外で IL-33 と直接結合するデコイ受容体として働き、IL-33 シグナルに応答する MAPK 経路と NF- κ B 経路の活性化を抑制することを明らかにした[5]。また、以前の科研費研究では、肺 ILC2 において、IL-33 刺激前に分泌型 ST2 を添加することによって、IL-5 と IL-13 の産生を抑制できることを報告した[6]。その後、IL-33 シグナル伝達の解析から、p38MAPK 経路の下流にあるリン酸化酵素 MK2 が Th2 サイトカイン産生に関与することを見出した。

2. 研究の目的

本研究は、IL-33 シグナル伝達因子の遺伝子欠損マウスにおける喘息病態の解析により、肺 ILC2 の p38-MK2 経路の役割を明らかにするとともに、MK2 の下流分子から新たな治療標的分子を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子欠損マウスの作製

p38 は、MK2 と MK3 をリン酸化標的分子とする。そのため、MK2 欠損 (MK2 KO) マウスおよび MK3 欠損 (MK3 KO) マウスを、CRISPR/Cas9 法を用いたゲノム編集により作製した。MK2 遺伝子および MK3 遺伝子に対する guide RNA (gRNA) は、p38 でリン酸化されるアミノ酸を含む領域を欠損するようにエクソン上に設計した。エレクトロポレーション法により、MK2 gRNA または MK3 gRNA と Cas9 タンパク質を受精卵 (C57BL/6J 系統) に導入し、ファウンダー (F0) マウスを得た (本学動物実験施設に依頼)。DNA 変異は、マウス耳片から抽出したゲノム DNA を用いて Surveyor mutation detection kit により検出し、シーケンス解析により塩基配列を確認した。さらに、F0 マウスと野生型マウスの交配によりヘテロ (F1) を得た。その後、F1 マウス同士の交配によりホモ (F2) マウスを得た。

(2) 喘息モデルマウスの作製

喘息モデルの作製には、卵白アルブミン (OVA) を用いた。野生型 C57BL/6J (WT)、MK2 KO、および MK3 KO マウスに OVA を腹腔内投与して感作後、点鼻により OVA を曝露して作製した (喘息群)。また、生理食塩水を腹腔内投与後、OVA を点鼻した (対照群)。最終の OVA 点鼻投与から 24 時間後に、気管支肺胞洗浄液 (BALF)、血清、肺を採取し、炎症性細胞の細胞数 (Diff-Quick 染色法)、サイトカインの発現 (ELISA 法)、肺 ILC2 における細胞表面抗原の発現 (フローサイトメトリー法)、気道炎症 (PAS 染色法、HE 染色法) を解析した。

(3) 喘息モデルマウスにおける肺 ILC2 の遺伝子発現の変動解析

喘息モデルとした WT マウスの対照群および喘息群の肺 ILC2 をセルソーターで単離し、遺伝子発現の変動を SMART-seq により解析した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子欠損マウスの表現型

MK2 KO マウスは、gRNA 近傍に 7 塩基、または 2 塩基を欠損したホモ個体を得た。MK3 KO マウスは、gRNA 近傍に 5 塩基、または 17 塩基を欠損したホモ個体を得た。MK2 KO マウスおよび MK3 KO マウスはいずれも繁殖可能であり、通常飼育下において異常は見られなかった。

(2) 喘息モデルマウスにおける遺伝子欠損マウスの喘息病態の比較

WT、MK2 KO、および MK3 KO マウスを用いて作製した喘息モデルにおいて、対照群および喘息群における病態を比較した。

対照群では、WT、MK2 KO、および MK3 KO マウスのいずれにおいても、肺の状態、BALF 中のマクロファージ数、および IL-4、IL-5、IL-13 濃度は、通常飼育下と比べて大きな変化は認められ

なかった。

喘息群では、WT と MK3 KO マウスにおいて典型的な気道炎症が認められた。BALF 中の IL-4、IL-5、IL-13 濃度は、対照群に比べて有意に高値を示した (図 1)。気管支周囲に好酸球の浸潤が認められ、BALF 中の好酸球数も増加していた。また、気管支上皮における粘液も増産していた (図 2)。肺 ILC2 の細胞表面抗原の発現を調べたところ、対照群に比べて CD25、Sca-1、ST2L の発現増加が認められた。しかしながら、WT と MK3 KO マウスにおいて、BALF 中のサイトカイン濃度、炎症細胞数、気管支上皮の粘液産生、肺 ILC2 の細胞表面抗原発現に大きな違いは認められなかった (図 2)。

一方、MK2 KO マウスは、WT や MK3 KO マウスと比較して、気道炎症が軽度であった。BALF 中の IL-4、IL-5、IL-13 濃度はいずれも WT および MK3 KO マウスと比べて有意に低かった (図 1)。また、好酸球は、BALF 中や気管支周囲にほとんど認められず、気管支上皮における粘液産生もわずかであった (図 2)。さらに、肺 ILC2 の CD25、Sca-1、ST2L の発現増加の程度も小さかった。

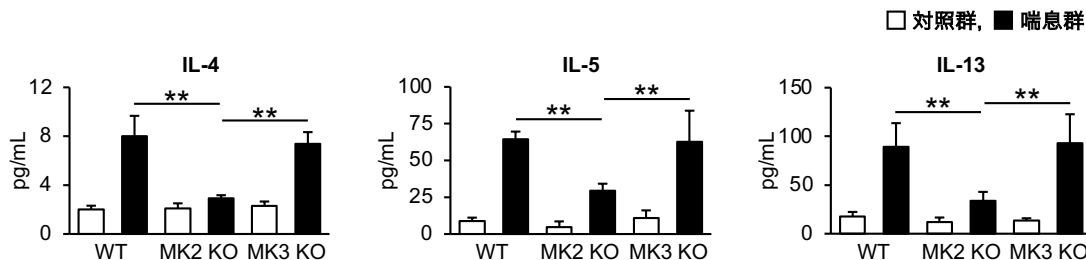


図 1. ELISA 法による肺胞洗浄液中の IL-4、IL-5、IL-13 の検出
MK2 KO マウスの喘息群では、IL-4、IL-5、IL-13 濃度が低下した (**, $p < 0.01$)

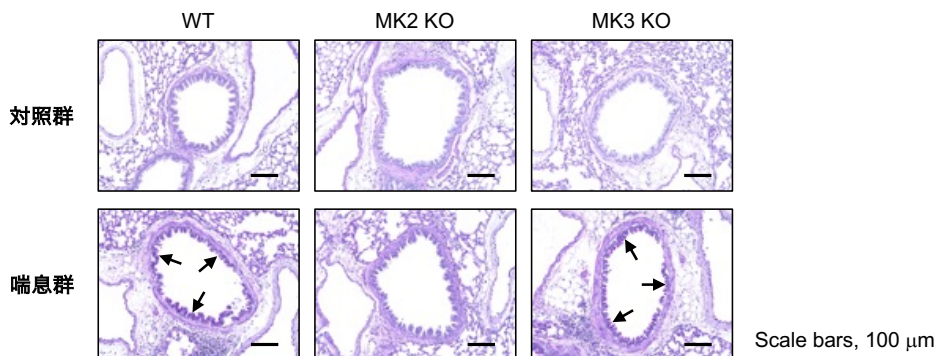


図 2. PAS 染色法による気管支の粘液産生の検出
矢印で示す濃紫色は気管支上皮からの粘液産生を示す。

(3) 喘息モデルマウスにおける肺 ILC2 の遺伝子発現の変動解析

喘息モデルとした WT マウスの対照群および喘息群の肺から単離した ILC2 より RNA を精製した。これらの RNA を用いて、網羅的な遺伝子発現解析を行うために、タカラバイオ (株) に SMART-seq 解析を依頼した。現在、対照群と喘息群における遺伝子発現差異を解析中である。

以上の結果から、MK2 KO マウスは喘息発症に対する抵抗性を示し、MK3 KO マウスは WT マウスと同様に喘息症状を示すことを明らかにした。これらの結果は、喘息の病態形成において、p38-MK2 の関与が大きく、一方で p38-MK3 の関与は小さいことを示唆している。本研究は、p38-MK2 経路の抑制による喘息の新たな治療戦略へと展開できる可能性を示した。

<引用文献>

1. Tominaga, S. A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor, *FEBS Lett.* **258** (1989) 301-304.
2. Yanagisawa, K., Takagi, T., Tsukamoto, T., et al. Presence of a novel primary response gene ST2L, encoding a product highly similar to the interleukin 1 receptor type 1, *FEBS Lett.* **318** (1993) 83-87.
3. Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine

that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines, *Immunity* **23** (2005) 479-490.

4. Moro, K., Yamada, T., Tanabe, M., et al. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells, *Nature* **463** (2010) 540-544.
5. Hayakawa, H., Hayakawa, M., Kume, A., et al. Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation, *J. Biol. Chem.* **282** (2007) 26369-26380.
6. Hayakawa, H., Hayakawa, M., and Tominaga, S. Soluble ST2 suppresses the effect of interleukin-33 on lung type 2 innate lymphoid cells. *Biochem. Biophys. Rep.* **5** (2016) 401-407.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kawasaki Y, Sato K, Mashima K, Nakano H, Ikeda T, Umino K, Morita K, Izawa J, Takayama N, Hayakawa H, Tominaga K, Endo H, Kanda Y	4. 巻 27
2. 論文標題 Mesenchymal Stromal Cells Inhibit Aerobic Glycolysis in Activated T Cells by Negatively Regulating Hexokinase II Activity Through PD-1/PD-L1 Interaction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transplantation and Cellular Therapy	6. 最初と最後の頁 e1-e8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jtct.2020.11.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kikuchi Motoshi, Takase Kenkichi, Hayakawa Morisada, Hayakawa Hiroko, Tominaga Shin-ichi, Ohmori Tsukasa	4. 巻 13
2. 論文標題 Altered behavior in mice overexpressing soluble ST2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-020-00606-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kawasaki Y, Sato K, Nakano H, Hayakawa H, Izawa J, Takayama N, Mashima K, Oh I, Minakata D, Yamasaki R, Morita K, Ashizawa M, Yamamoto C, Hatano K, Fujiwara SI, Ohmine K, Muroi K, Ito R, Hayakawa M, Ohmori T, Kanda Y	4. 巻 103
2. 論文標題 Alloreactive T-cells display a distinct chemokine profile in response to conditioning in xenogeneic GVHD models	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transplantation	6. 最初と最後の頁 1834-1843
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/TP.0000000000002756	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sakai K, Nagashima S, Wakabayashi T, Bayasgalan T, Hayakawa H, Hayakawa M, Karasawa T, Ohashi K, Yamazaki H, Takei A, Takei S, Yamamuro D, Takahashi M, Yagyu H, Osuga J, Takahashi M, Tominaga S, Ishibashi S	4. 巻 38
2. 論文標題 Myeloid HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A) reductase determines atherosclerosis by modulating migration of macrophages	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology	6. 最初と最後の頁 2590-2600
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/atvbaha.118.311664	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kawasaki Y, Sato K, Hayakawa H, Takayama N, Nakano H, Ito R, Mashima K, Oh I, Minakata D, Yamasaki R, Morita K, Ashizawa M, Yamamoto C, Hatano K, Fujiwara SI, Ohmine K, Muroi K, and Kanda Y	4. 巻 24
2. 論文標題 Comprehensive Analysis of the Activation and Proliferation Kinetics and Effector Functions of Human Lymphocytes, and Antigen Presentation Capacity of Antigen-Presenting Cells in Xenogeneic Graft-Versus-Host Disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biology of Blood and Marrow Transplantation	6. 最初と最後の頁 1563-1574
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbmt.2018.04.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Hayakawa, H., Hayakawa, M., Tominaga S., Ohmori, T.
2. 発表標題 Testosterone suppresses allergy-induced airway inflammation in a murine model of asthma
3. 学会等名 34th Congress of the International Society for Advancement of Cytometry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayakawa, H., Hayakawa, M., Tominaga S., Ohmori, T.
2. 発表標題 喘息発症における性差と2型自然リンパ球の関係
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hayakawa, M., Hayakawa, H., Kamoshita, N., Ohmori, T.
2. 発表標題 Expression of coagulation factor VIII in liver sinusoidal endothelial cells
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

自治医科大学医学部 生化学講座病態生化学部門ホームページ
<http://www.jichi.ac.jp/biochem/byotai/index.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------