

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08786

研究課題名(和文)慢性アレルギー性気道炎症における2型免疫細胞の活性化制御方法の研究

研究課題名(英文)Regulation of type-2 immune cells in chronic allergic airway inflammation.

研究代表者

松下 一史(Matsushita, Kazufumi)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：20581549

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)：アレルギーの長期曝露により起こる慢性アレルギー性気道炎症はアレルギー曝露がなくなっても炎症症状が持続する。本研究ではRNaseとして免疫調節作用をもつRegnase-1の分解抑制を介して、慢性アレルギー性気道炎症をコントロールできないか検討した。その結果、Regnase-1 AAマウスは野生型マウスと比べて好酸球浸潤やIgE産生といったアレルギー性炎症が軽微であり、またアレルギー曝露終了後、特に盃細胞の過形成が顕著に早期に消失していった。さらに、アレルギー曝露終了後、肺のIL-5/IL-13産生性ILC2/Th2細胞の割合が上昇したが、AAマウスでは野生型マウスに比べてこれらも軽微であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

気道へのアレルギーの長期曝露により、内因性の炎症性サイトカインの産生 2型免疫細胞の活性化による負のスパイラルが形成され、炎症の悪化、症状の持続へとつながるものと考えられる。IKK依存的なRegnase-1の分解を抑制することにより、IL-33誘導性の2型自然リンパ球(ILC2)やTh2細胞の活性化が抑制されることにより、これらの負のスパイラルを停止し、炎症の抑制、回復の促進へとつながるものと考えられる。本研究により、Regnase-1の分解を抑制することで慢性アレルギー性気道炎症の発症を抑制、または発症後の回復を促進しうる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Allergic airway inflammation caused by chronic exposure to allergens persists long after ceasing the allergen exposure. Here, we examined if regulating the degradation of Regnase-1, an immune-regulatory RNase, could ameliorate symptoms of chronic allergic airway inflammation. Compared with wild-type mice, Regnase-1 AA mice, a mouse strain expressing S435A/S439A mutant Regnase-1 resistant to IKK-mediated degradation, showed reduced airway eosinophilia and systemic IgE/IgG1 production in response to chronic exposure to multiple allergens. In addition, after ceasing the allergen exposure, goblet cells disappeared more quickly in the lungs in Regnase-1 AA mice compared with wild-type controls. Furthermore, although lung IL-5/IL-13-producing ILC2 and Th2 cells increased after ceasing allergen exposure, Regnase-1 AA mice showed a milder phenotype. These results suggest that regulating Regnase-1 degradation could facilitate recovery from chronic allergic airway inflammation.

研究分野：免疫学・アレルギー学

キーワード：慢性アレルギー 気道炎症 Th2 ILC2 IgE

## 1. 研究開始当初の背景

アレルギー性喘息をはじめとした気道アレルギーはこれまでの研究にも関わらず、未だにその根本的な発症機序の解明と治療法の確立には至っていない。特に長期間抗原に曝露されることによって起こる慢性アレルギー性気道炎症では、自然免疫と獲得免疫の活性化が複雑に関与することで非常に治療が困難な病態を作り上げている。慢性アレルギー性気道炎症の治療が困難な要因としては、自然免疫と獲得免疫の活性化が複雑に関与していることが挙げられる<sup>(1)</sup>。

免疫調節分子 Regnase-1 は mRNA の安定性を制御することにより、自然免疫・獲得免疫系の様々な細胞種においてその活性化の制御に関わる分子である<sup>(2,3)</sup>。Regnase-1 は細胞内において IKK などの活性化シグナルにより分解されるが<sup>(4)</sup>、我々はこれまでに IL-25 ならびに IL-33 を介した 2 型自然リンパ球の活性化には Regnase-1 の分解が必須であることを見出している<sup>(5)</sup>。Regnase-1 は 2 型自然リンパ球以外にも様々な細胞種に発現しており、異なる活性化シグナルの下流においてその分解が制御されていることから、我々はこの Regnase-1 の分解制御に着目することにより、慢性アレルギー疾患に関わる様々な細胞種 (2 型自然リンパ球、Th2 細胞、肥満細胞) の活性化を一度に制御できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

上述のように慢性アレルギー性気道炎症の治療が困難である理由の一つは、様々な細胞種、活性化因子が関与しており、その全てを一度に制御することが困難な点である。Regnase-1 は様々な細胞種で活性化シグナルにより分解が誘導されることが分かっており、本研究では 2 型免疫細胞の活性化ならびに慢性アレルギー性気道炎症における Regnase-1 の役割、ならびに Regnase-1 分子の分解制御の役割を明らかにすることで、慢性アレルギー性気道炎症の治療に向けた新規アプローチの可能性を探索した。

## 3. 研究の方法

Regnase-1 は MyD88 を介したシグナル伝達の下流において IKK 依存的にリン酸化を受け分解される。本研究ではこの Regnase-1 のリン酸化モチーフに変異が導入され、すなわち MyD88 シグナルの下流において Regnase-1 が分解できないマウス (Regnase-1 AA マウス) を用いて研究を行った<sup>(6)</sup>。野生型マウスと Regnase-1 AA マウスを用いて、以下の 3 つのモデルについて検討した。

卵白アルブミンの腹腔内投与→気道曝露することで誘導される急性アレルギー性気道炎症モデル。

ブタクサ花粉/ハウスダスト抗原/アスペルギルス混合溶液を毎週 2 回、6 週間気道曝露することで誘導される慢性アレルギー性気道炎症モデル。

慢性アレルギー性気道炎症モデルの抗原曝露終了後、マウスを 1、2、6 ヶ月後まで放置し、回復期の状態を解析。

いずれのモデルにおいても肺への炎症細胞の浸潤ならびに血清中抗体価 (IgE ならびに IgG1) 等をはじめとした 2 型炎症についての強度を解析した。

## 4. 研究成果

Regnase-1 AA マウスは IKK 依存的な Regnase-1 の分解ができないマウスであり、したがっ

て IL-33 や IL-25 刺激による Regnase-1 の分解ができない<sup>(5)</sup>。一方で T 細胞受容体 (TCR) の下流では異なるシグナルによって Regnase-1 が分解されることが知られている<sup>(3)</sup>。そこで、まず IL-33 や TLR の関与の少ない卵白アルブミンの腹腔内投与→気道曝露による急性アレルギー性気道炎症モデルを検討した。本モデルでは肺への強い好酸球浸潤が認められ、血清中 IgE ならびに IgG1 が誘導されたが、その程度は Regnase-1 AA マウスでも野生型マウスと同等であった (図 1)。次に、より臨床のアレルギー性気道炎症に近いモデルであり、その病態に IL-33 や TLR が関与すると考えられている慢性アレルギー性気道炎症モデル (ブタクサ花粉/ハウスダスト抗原/アスペルギルスの混合溶液を毎週 2 回、6 週間気道曝露) を検討した。本マウスモデルでは肺への強い炎症細胞の浸潤ならびに盃細胞の過形成が認められ、好酸球をはじめとした炎症性細胞の浸潤が認められたが、Regnase-1 AA マウスでは細胞浸潤の程度が減弱していた (図 2、A、B)。同様に血清中 IgE ならびに IgG1 が誘導されたが、その程度は Regnase-1 AA マウスでは野生型マウスと比較して著明に減弱していた (図 2、C)。慢性アレルギー性気道炎症モデルは抗原曝露を終了しても内因性の IL-33 産生や、それによ

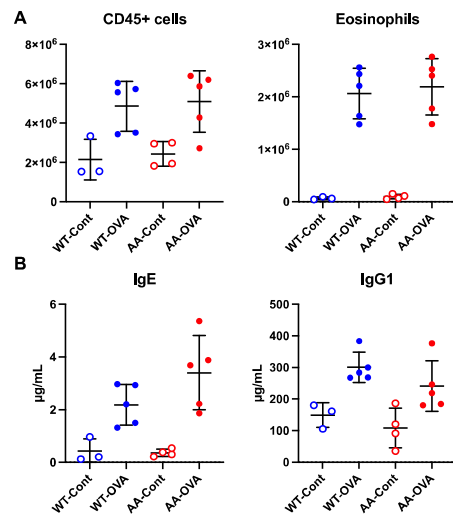


図1、Regnase-1 AA マウスではOVA誘導性の急性アレルギー性気道炎症が誘導される  
野生型マウスとRegnase-1 AAマウスをOVA/Alumで免疫した後、気道にOVAを曝露し気道炎症を誘導した。(A)マウスの左肺あたりの炎症細胞の浸潤をFACSにて解析した。(B)血清中抗体濃度をELISAにて測定した。

る ILC2 / Th2 細胞の活性化を介して一定期間肺の炎症が持続することが知られているが、この回復期における Regnase-1 の役割を検討する目的で慢性アレルギー性気道炎症を誘導した野生型ならびに Regnase-1 AA マウスを 1、2、6 ヶ月後に解析、その炎症症状の持続について検討した。野生型マウス、Regnase-1 AA マウス共に時間経過にしたがって、肺の炎症像は回復していったが、Regnase-1 AA マウスでは特に盃細胞の過形成が顕著に消失していた (図 3、A-C)。一方で抗原曝露終了 2 ヶ月後まで肺での *Illa* ならびに *I133* mRNA 発現レベルは上昇し、これに伴い IL-5/IL-13 産生性の ILC2 ならびに Th2 細胞の割合は抗原曝露終了 6 ヶ月後まで上昇し続けた。Regnase-1 AA マウスでは野生型マウスに比べて *Illa* ならびに *I133* mRNA 発現レベルの上昇が緩やかであり、また IL-5/IL-13 産生性の ILC2 ならびに Th2 細胞の割合も変化が少なかった (図 3、D-E)。興味深いことに野生型マウスでは抗原曝露終了後 2 ヶ月までは肺の炎症細胞の浸潤が減少していたが、6 ヶ月後では iBALT 様の細胞塊の出現を認め、炎症が悪化していた。これは Regnase-1 AA マウスでも同様であったが野生型マウスと比較して小規模であった (図 3、C)。

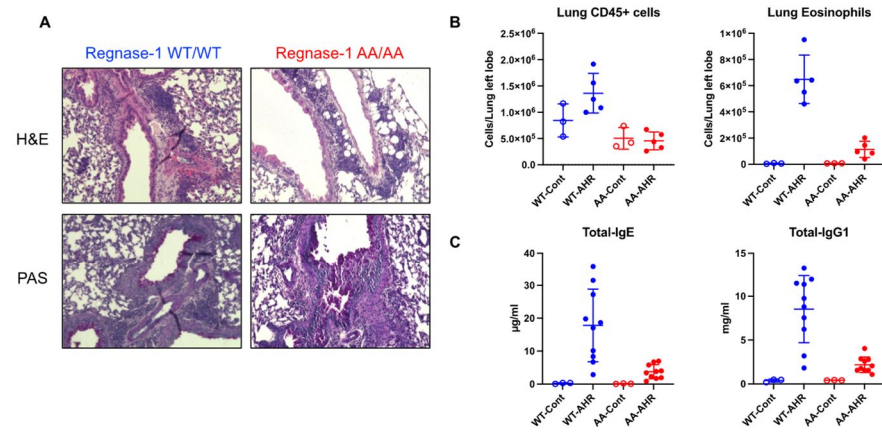


図2、Regnase-1 AAマウスでは複数抗原の長期曝露による慢性アレルギー性気道炎症が減弱している  
野生型マウスとRegnase-1 AAマウスにHDM/Aspergillus/Ragweedの三種類のアレルギーの混合溶液を毎週2回、6週間気道曝露し、慢性アレルギー性気道炎症を誘導した。(A)マウス肺をH&E (上パネル) およびPAS (下パネル) 染色した (x20)。(B)マウスの左肺あたりの炎症細胞の浸潤をFACSにて解析した。(C)血清中抗体濃度をELISAにて測定した。

る ILC2 / Th2 細胞の活性化を介して一定期間肺の炎症が持続することが知られているが、この回復期における Regnase-1 の役割を検討する目的で慢性アレルギー性気道炎症を誘導した野生

型ならびに Regnase-1 AA マウスを 1、2、6 ヶ月後に解析、その炎症症状の持続について検討した。野生型マウス、Regnase-1 AA マウス共に時間経過にしたがって、肺の炎症像は回復していったが、Regnase-1 AA マウスでは特に盃細胞の過形成が顕著に消失していた (図 3、A-C)。一方で抗原曝露終了 2 ヶ月後まで肺での *Illa* ならびに *I133* mRNA 発現レベルは上昇し、これに伴い IL-5/IL-13 産生性の ILC2 ならびに Th2 細胞の割合は抗原曝露終了 6 ヶ月後まで上昇し続けた。Regnase-1 AA マウスでは野生型マウスに比べて *Illa* ならびに *I133* mRNA 発現レベルの上昇が緩やかであり、また IL-5/IL-13 産生性の ILC2 ならびに Th2 細胞の割合も変化が少なかった (図 3、D-E)。興味深いことに野生型マウスでは抗原曝露終了後 2 ヶ月までは肺の炎症細胞の浸潤が減少していたが、6 ヶ月後では iBALT 様の細胞塊の出現を認め、炎症が悪化していた。これは Regnase-1 AA マウスでも同様であったが野生型マウスと比較して小規模であった (図 3、C)。

現在のところ、この iBALT 様の細胞塊についての意義等については分かっていない。

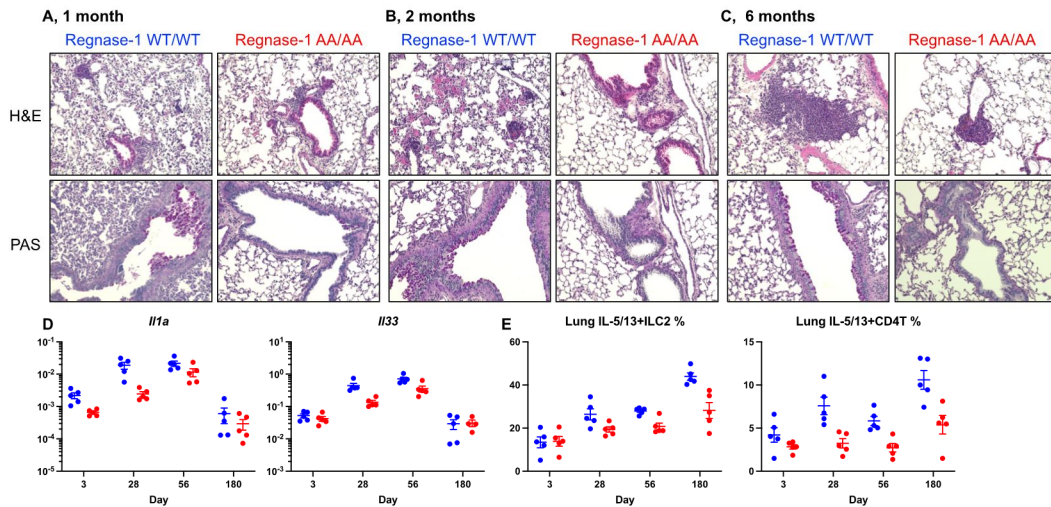


図3、Regnase-1 AAマウスは野生型マウスに比べ慢性アレルギー性気道炎症が早期に回復する  
野生型マウスとRegnase-1 AAマウスにHDM/Aspergillus/Ragweedの三種類のアレルゲンの混合溶液を毎週2回、6週間気道曝露し、慢性アレルギー性気道炎症を誘導した後、4週間、8週間または6ヶ月後に解析した。(A-C)マウス肺をH&E (上パネル) およびPAS (下パネル) 染色した (x20)。(D)マウスの肺での*Il1a*ならびに*Il33* mRNA発現をqPCRにて検討した。(E)マウス左肺あたりのIL-5/IL-13産生性ILC2ならびにTh2細胞の割合をFACSにて解析した。

Regnase-1 AA マウスでは卵白アルブミンの腹腔内投与→気道曝露により惹起した気道炎症は野生型マウスと同等に誘導されたのに対し、3種抗原の長期間曝露により惹起した慢性アレルギー性気道炎症は野生型マウスに比べて軽微であった。これは、IKKを介したRegnase-1の分解を抑制することにより、TCRではなくIL-33やTLRを介したシグナルが抑制されることにより、気道炎症が減弱していることを示している。また、Regnase-1 AA マウスでは抗原曝露終了後の肺での*Il1a*ならびに*Il33* mRNA発現の上昇ならびにIL-5/IL-13を産生するILC2ならびにTh2細胞の増加が緩やかであることから、内因性の炎症性サイトカインの産生→2型免疫細胞の活性化を介した気道炎症の持続ならびに回復の遅延が起こりにくいことが示された。本研究により、当初の仮説であるRegnase-1の分解を抑制することで慢性アレルギー性気道炎症の発症を抑制、または発症後の回復を促進しうる可能性が示された。

#### < 引用文献 >

- (1) Christianson CA et al. Persistence of asthma requires multiple feedback circuits involving type 2 innate lymphoid cells and IL-33. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2015.
- (2) Matsushita K et al. Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune response by regulating mRNA decay. *Nature* 2009.
- (3) Uehata T et al. Malt1-Induced Cleavage of Regnase-1 in CD4<sup>+</sup> Helper T Cells Regulates Immune Activation. *Cell* 2013.
- (4) Iwasaki H et al. The IκB kinase complex regulates TLR-IL-1R induced cytokine mRNA stability by controlling Regnase-1 degradation. *Nat. Immunol.* 2011.
- (5) Matsushita K, et al. Regnase-1 degradation is crucial for IL-33- and IL-25-mediated ILC2 activation. *JCI insight.* 2020.
- (6) Tanaka H et al. Phosphorylation-dependent Regnase-1 release from endoplasmic reticulum is critical in IL-17 response. *J. Exp. Med.* 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Matsushita K, Li X, Nakamura Y, Dong D, Mukai K, Tsai M, Montgomery SB, Galli SJ.	4. 巻 6
2. 論文標題 The role of Sp140 revealed in IgE and mast cell responses in collaborative cross mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCI insight	6. 最初と最後の頁 e146572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.146572.	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 該当する
1. 著者名 Koida Y, Yasuda K, Adachi T, Matsushita K, Yasuda A, Hirano S, Kuroda E.	4. 巻 555
2. 論文標題 Thymic stromal lymphopoietin contributes to protection of mice from Strongyloides venezuelensis infection by CD4 + T cell-dependent and -independent pathways.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 168-174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.128.	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 Wang Y*, Matsushita K*, Jackson J, Numata T, Zhang Y, Zhou G, Tsai M, Galli SJ. (*equal contribution)	4. 巻 76
2. 論文標題 Transcriptome programming of IL-3-dependent bone marrow-derived cultured mast cells by stem cell factor (SCF).	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 2288-2291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.14808.	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 該当する
1. 著者名 Wang Y*, Yu M*, Matsushita K*, Liu C, Ishihara N, Nomura M, Tsai M, Galli SJ. (*equal contribution)	4. 巻 150
2. 論文標題 Dynamins Related Protein 1 differentially regulates Fc RI- and SP-induced mast cell activation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Allergy Clin. Immunol.	6. 最初と最後の頁 1228-1231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2022.04.028.	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 該当する

1. 著者名 松下一史、福岡あゆみ、黒田悦史	4. 巻 76
2. 論文標題 粘膜上皮細胞バリアーとアレルギー性鼻炎	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 656-662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松下一史	4. 巻 2
2. 論文標題 IL-33とアレルギー性鼻炎	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Allos ergon	6. 最初と最後の頁 373-380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Matsushita K, Li X, Nakamura Y, Dong D, Mukai K, Tsai M, Montgomery SB, Galli SJ.
2. 発表標題 The role of Sp140 revealed in IgE and mast cell responses in collaborative cross mice.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mukai A, Yasuda K, Egashira S, Adachi T, Matsushita K, Kuroda E.
2. 発表標題 Induction of antigen-specific immune responses by IL-33 as a mucosal adjuvant.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1 . 発表者名 Matsushita K, Li X, Tsai M, Montgomery SB, Galli SJ.
2 . 発表標題 The role of Sp140 revealed in IgE and mast cell responses in collaborative cross mice.
3 . 学会等名 第13回寄生虫感染免疫研究会
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Yasuda K, Koida A, Adachi T, Matsushita K, Kuroda E.
2 . 発表標題 Role of thymic stromal lymphopoietin in the protection against Strongyloides venezuelensis infection.
3 . 学会等名 第13回寄生虫感染免疫研究会
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Tezuka S, Matsushita K, Kuroda E.
2 . 発表標題 The role of local Th2 activation in the development of allergic rhinitis.
3 . 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Mukai A, Yasuda K, Egashira S, Adachi T, Matsushita K, Hoshino T, Kuroda E.
2 . 発表標題 Mode of action analysis of IL-33 as a mucosal adjuvant.
3 . 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4 . 発表年 2022年

1. 発表者名 手束祥彩、松下一史、黒田悦史。
2. 発表標題 アレルギー性鼻炎におけるTh2細胞の役割。
3. 学会等名 71回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2022年

〔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

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