

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08796

研究課題名（和文）Rab27によるアレルギー反応制御の分子基盤の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular basis for regulation of allergic immune responses by Rab27

研究代表者

奥西 勝秀（Okunishi, Katsuhide）

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：50401112

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、分泌制御蛋白質Rab27のアレルギー反応における新奇生理作用を解明しようとするものである。本研究ではまず、Rab27エフェクター蛋白質エキソフィリン-5が、上皮性サイトカインIL-33を介した過剰なTh2反応を抑制することを、論文で発表した（J. Clin. Invest. 2020）。更に、他のRab27エフェクターMunc13-4が、CD11c+抗原提示細胞からの免疫制御性サイトカインIL-10/IL-12の分泌を正に制御することで、喘息および肥満・糖尿病共通の制御因子として作用していることを明らかにし、こちらも論文として発表した（Allergy 2024）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、これまでほとんど分かっていなかった、分泌制御蛋白質Rab27を介した新奇のアレルギー反応制御機構の存在、および、その分子基盤の一端が、明らかとなった。本研究により、Rab27を介したサイトカインの分泌制御機構という新たな観点から、免疫アレルギー疾患の病態理解を深めることができたと考えている。更に、近年著増している喘息と肥満・糖尿病の両病態において、Rab27が共通の制御因子として作用している可能性を示すことが出来た。将来的に、喘息や肥満・糖尿病を始めとする各種アレルギー・免疫関連疾患において、Rab27関連分子を標的とした新たな治療開発につながることを期待する。

研究成果の概要（英文）：In the current study, we sought to clarify the novel physiological roles of Rab27 and its effectors in allergic immune responses. First, we reported that the Rab27 effector exophilin-5 prevents IL-33-mediated exacerbation of Th2 responses by controlling both IL-33 release from lung epithelial cells and IL-33 receptor expression on IL-5/IL-13-producing pathogenic Th2 cells (J. Clin. Invest. 2020). Then, we clarified that another Rab27 effector Munc13-4 prevents the development of asthma and obesity in mice by positively regulating secretion of immunoregulatory cytokines IL-10 and IL-12 from CD11c+ antigen-presenting cells. Our paper describing these results has recently been published (Allergy 2024). In summary, through the current study, we succeeded in uncovering the novel regulatory roles of Rab27-related proteins in allergic immune responses.

研究分野：アレルギー・免疫学

キーワード：アレルギー Rab27 サイトカイン 調節性分泌 肥満

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息などのアレルギー疾患の患者数は、年々増加傾向にあるが、その治療法の主体は、ステロイドを中心とした非特異的抗炎症療法である。疾患特異的で、治療に結びつく新規治療法の開発の為に、アレルギーの更なる病態解明が必要不可欠である。

アレルギーの本質は、抗原特異的な過剰な 2 型ヘルパー T (T helper type 2: Th2) 応答であり、その病態形成上、IL-5 や IL-13 を始めとした Th2 サイトカインが重要な役割を果たすことは、周知の事実である。一方、サイトカインがその生理作用を発揮する為には、まず細胞外へ分泌され、その後標的細胞の受容体に結合する必要があるが、これらの制御機構の詳細は未だ不明な点が多い。生理活性物質の細胞内輸送及びその細胞外への分泌の制御において重要な役割を果たす蛋白として、Rab27 が知られている。Rab27 は、小胞輸送を制御する Rab superfamily に属する低分子量 GTP 結合蛋白の一つで、a, b, 2 つのアイソタイプがあり、エフェクターと呼ばれる Rab27 結合蛋白質 (12 種類) と協調して、メラノソームやインスリン含有顆粒などの輸送を精巧にコントロールしている。免疫応答では、Rab27a は、細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞等からの細胞傷害性顆粒の開口放出に必須の分子で、その遺伝子変異は原発性血球貪食症候群の一つ Griscelli 症候群を引き起こす。更に、Rab27 は、Th 細胞や樹状細胞を始め多種の免疫細胞にも発現することが知られている。一方で、ヒト *RAB27A* の遺伝子多型と喘息の関連を示唆する報告が近年なされたものの、アレルギー反応における Rab27 の役割はほとんどわかっていなかった。そこで、アレルギー反応における Rab27 の役割を明らかにすることを目的に、本研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では、分泌制御蛋白質である低分子量 GTPase Rab27 と、それに結合して多様な作用を発揮するエフェクター分子群に着目し、それらがアレルギー反応において果たす役割を、遺伝子欠損マウスを用いた個体レベル、細胞レベル、両レベルの解析により、明らかにする。本研究の成果が、アレルギー疾患の新たな病態理解や治療標的の同定につながることを期待する。

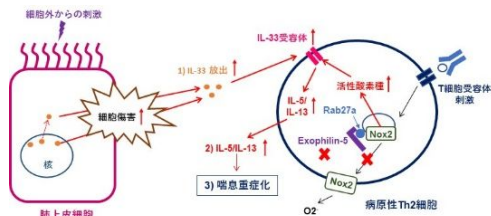
3. 研究の方法

本研究では、アレルギー疾患マウスモデルのうち、卵白アルブミン (ovalbumin, OVA) 誘発性気管支喘息モデル (OVA/alum を腹腔投与する事でマウスを感作後、経気道的な OVA チャレンジでアレルギー性気道炎症を誘導する系) を用いて、野生型マウスと各 Rab27 関連分子欠損マウス間で、表現型の違いを比較検討した。また、Munc13-4 に関しては、高脂肪食負荷誘導性肥満・糖尿病マウスモデルの解析も行った。その際、骨髄キメラマウスや細胞移入の系を適宜利用した。また、各マウスから各種免疫担当細胞を単離し、その機能解析を行った。これらの検討を通して、下記の研究成果を得ることが出来た。

4. 研究成果

1) エキソフィリン-5 (Exophilin-5)

本研究ではまず、Rab27 エフェクター蛋白質の一つエキソフィリン-5 (Exophilin-5, Exo5) が、内因性の喘息増悪抑制因子として作用していることを、論文で発表した。すなわち、Exo5 が、血球系細胞の中では IL-5/IL-13 高産生性病原性 Th2 細胞に高発現しており、この細胞において、T 細胞受容体刺激時における NADPH Oxidase NOX2 の細胞膜への輸送を正に制御することで、T 細胞受容体刺激時の IL-33 受容体の発現増強を抑制していることや、肺上皮細胞にも高発現しており、この細胞の integrity を維持することで、刺激に応じた過剰な IL-33 分泌を抑制していること、そして、Exo5 の欠損では逆に、肺上皮細胞からの IL-33 分泌が亢進し、IL-33 の標的細胞である IL-5/IL-13 高産生性病原性 Th2 細胞における IL-33 受容体の発現も増強する結果、IL-33 依存的な IL-5/IL-13 産生が増強することを、国際的一流誌である *J. Clin. Invest.* 誌に報告した (引用文献 1. 図 1)。なお、この論文は、アレルギー反応の新奇の制御機構を明らかにした論文として高く評価され、Commentary が付されると共に、別冊の *JCI this month* においても紹介された。その他、朝日新聞や上毛新聞でも、研究内容が報道された。



Okunishi K*, et al. *J. Clin. Invest.* 130:3919-3935, 2020.

(図1) エキソフィリン5欠損に伴う喘息重症化の分子機構

2) Munc13-4

a) マウス喘息モデルにおける Munc13-4 の役割

Exo5 以外の Rab27 エフェクター分子に関しては、まずは Munc13-4 に焦点を当てて解析した。Munc13-4 は、広く血球系細胞に発現しており、前述の細胞傷害性顆粒の分泌を正に制御することはよく知られている。血球系細胞以外にも、血管内皮細胞や肺上皮細胞にも発現することが、

報告されている。一方で、アレルギー反応における役割は、ほとんど解明されていない。そこで、Munc13-4 をコードする *Unc13d* 遺伝子に変異を有し、Munc13-4 蛋白質を欠損した *Jinx* マウスを用いて、OVA 誘発性喘息モデルの表現型を検証した。

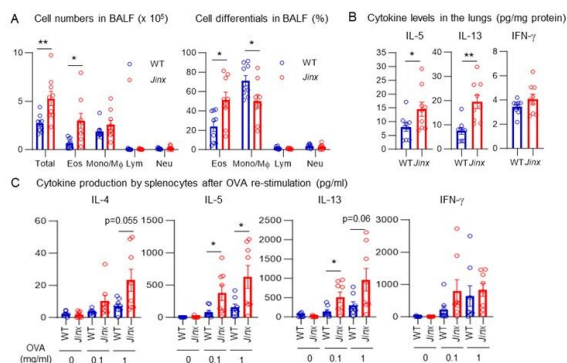
まず、Munc13-4 がアレルギー反応においてなんらかの生理作用を發揮するか、發揮するなどの phase で主に作用しているか(すなわち、抗原感作期か、それとも、気道炎症期か)を明らかにするために、OVA 喘息モデルにおけるアレルギー性気道炎症の程度、および、OVA/alum 感作後で OVA 吸入前のマウスから単離した全脾細胞を OVA 抗原で再刺激した際のサイトカイン産生能(感作で誘導された OVA 特異的 Th2 応答の程度の指標)を、まず評価した。そして、野生型マウスと比較して、*Jinx* マウスでは、肺での浸潤好酸球数や Th2 サイトカイン産生量が有意に亢進しており、喘息用アレルギー性気道炎症の増悪を認めた。更に *Jinx* マウスでは、OVA に反応して脾細胞から産生される Th2 サイトカイン量も著増しており、Munc13-4 の欠損が、OVA 特異的 Th2 細胞の分化誘導を亢進させていることが示唆された(図2)。次に、骨髓キメラマウスを用いて同様の検討を行い、*Jinx* マウスで認められた表現型が骨髓細胞の Munc13-4 の欠損で再現されること、すなわち、*Jinx* マウスの表現型表出の責任細胞が血球系細胞であることを突き止めた。

抗原特異的 Th2 細胞の分化誘導には、抗原提示細胞である樹状細胞、ナイーブ Th 細胞、および、IL-4 供給細胞である好塩基球が重要な役割を果たす。前述のように、Munc13-4 が欠損した *Jinx* マウスでは、アレルギー反応のごく初期である抗原特異的 Th2 細胞の分化誘導が亢進していたことから、Munc13-4 はこれら 3 種の免疫細胞で重要な生理作用を發揮していることが推測された。そこで、野生型および *Jinx* マウスから各免疫担当細胞を単離し、その機能の差異を検討した。まずナイーブ Th 細胞の Th1/Th2 細胞への分化能、および、好塩基球からの IL-4 分泌能を検討したが、いずれにおいても、両群マウス由来の細胞で差を認めなかった。次に、樹状細胞が主体の CD11c⁺ 抗原提示細胞(antigen-presenting cells, APC)に焦点を当てて解析を行った。まず、様々な免疫応答を抑制することが知られる IL-10 に着目し、各群マウス由来 CD11c⁺ APC の IL-10 産生能・分泌能を評価した。そして、両群マウス由来の CD11c⁺ APC で、IL-10 mRNA の誘導に差を認めなかったものの、細胞外へ分泌される IL-10 蛋白質の量は、*Jinx* マウス由来の CD11c⁺ APC で有意に低下していた。次に、Th2 細胞と拮抗する Th1 細胞の分化誘導に必須のサイトカイン IL-12 についても同様の検討を行った。そして、*Jinx* マウス由来の細胞において、刺激に反応して誘導される IL-12 mRNA の発現量、および、細胞外へ分泌される IL-12 蛋白質の量、いずれもが、*Jinx* マウス由来の細胞で有意に低下していた(図3)。更に、Th 細胞との共培養の系で、野生型由来の細胞と比べて、*Jinx* マウス由来の細胞で Th1 誘導能が有意に低下していることを確認した。以上から、Munc13-4 が、CD11c⁺ APC からの免疫制御性サイトカイン IL-10/IL-12 の分泌を正に制御しており、その欠損は、各サイトカイン分泌を低下させ、その結果、抗原特異的 Th2 応答やアレルギー性気道炎症が増強すると考えられた。そこで、

CD11c⁺ APC における Munc13-4 欠損の病原性を、細胞移入の系を用いて検証した。すなわち、OVA/alum で 1 回感作した野生型マウスに、OVA を取り込ませた各マウス由来の CD11c⁺ APC を腹腔内投与で移入し、その後ネプライザーを用いて経気道的に OVA を投与することで好酸球性気道炎症を惹起し、その程度を比較検討した。そして、*Jinx* マウス由来の CD11c⁺ APC を移入されたマウスで、野生型マウス由来 CD11c⁺ APC を移入されたマウスよりも、好酸球性気道炎症の有意な増悪を認めた。以上から、Munc13-4 欠損 *Jinx* マウスでは、抗原特異的 Th2 応答、および、その後のアレルギー性気道炎症が増悪し、その表現型の責任細胞の一つとして CD11c⁺ APC が同定された。更に、その分子基盤として、Munc13-4 欠損に伴う CD11c⁺ APC からの IL-10/IL-12 の分泌低下が考えられた。

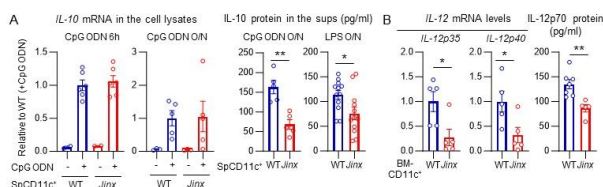
b) マウス肥満・糖尿病モデルにおける Munc13-4 の役割

近年、喘息、肥満とも増加傾向にある。両疾患は何らかの因果関係を有すると考えられており、例えば、肥満が気管支喘息新規発症の危険因子であり、気管支喘息の発症は body mass index と強い関連があることなどが報告されている。そしてごく最近、UK Biobank の GWAS 解析から、ヒトにおける喘息・肥満共通のリスク遺伝子が同定され、そのうちの 하나가、Munc13-4 をコードする *UNC13D* 遺伝子であった(*J. Allergy Clin. Immunol.* 2020)。そして、その疾患リスクアレルは、GTEx データベース上、末梢血中の Munc13-4 の発現を減少させる eQTL 効果を有することが示されていた。そこで、肥満・糖尿病における Munc13-4 の生理作用を明らかにするために、



Okunishi K^{*}, et al. *Allergy* 2024 (Online ahead of print).

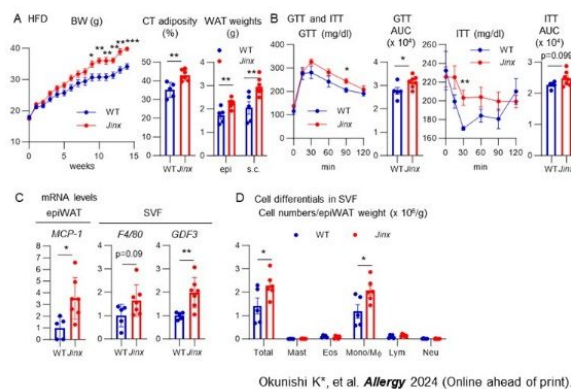
(図2) Munc13-4欠損によりアレルギー反応が亢進する



Okunishi K^{*}, et al. *Allergy* 2024 (Online ahead of print).

(図3) Munc13-4欠損によりCD11c⁺ APCからのIL-10/IL-12の分泌が低下する

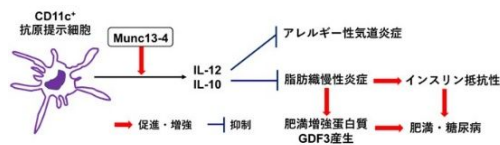
高脂肪食負荷により誘導される肥満・糖尿病マウスモデルにおける *Jinx* マウスの表現型を解析した。そして、野生型と比較して、*Jinx* マウスで、肥満・糖尿病が悪化することを見出した。ごく最近我々は、脂肪織炎症が、脂肪織マクロファージからの脂肪蓄積性サイトカイン GDF3 の産生を亢進させることで、肥満を悪化させることを報告している(引用文献2)。実際に、前述の喘息モデルと同様、高脂肪食誘導性肥満・糖尿病マウスモデルにおいても、*Jinx* マウスで白色脂肪織慢性炎症が増悪し、それに伴って、GDF3 産生が亢進していた(図4)。そして、骨髄キメラマウスを用いて同様の検討を行い、喘息モデルと同様、骨髄細胞における Munc13-4 の欠損が、肥満・糖尿病を悪化させることを確認した。更に、各マウス由来脾臓 CD11c⁺ APC を移入する系で、*Jinx* マウス由来の細胞を移入されたマウスで、野生型マウス由来の細胞を移入されたマウスよりも、インスリン抵抗性や脂肪織炎症が増悪することを突き止めた。以上から、肥満・糖尿病モデルにおいても、*Jinx* マウスで病像が悪化し、その責任細胞の一つが CD11c⁺ APC であることが明らかとなった。



(図4) Munc13-4欠損により肥満・糖尿病が増悪する

以上の検討を行い、喘息モデルと同様、骨髄細胞における Munc13-4 の欠損が、肥満・糖尿病を悪化させることを確認した。更に、各マウス由来脾臓 CD11c⁺ APC を移入する系で、*Jinx* マウス由来の細胞を移入されたマウスで、野生型マウス由来の細胞を移入されたマウスよりも、インスリン抵抗性や脂肪織炎症が増悪することを突き止めた。以上から、肥満・糖尿病モデルにおいても、*Jinx* マウスで病像が悪化し、その責任細胞の一つが CD11c⁺ APC であることが明らかとなった。

以上、本研究の結果、Munc13-4 の欠損で、CD11c⁺ APC からの IL-10/IL-12 分泌が有意に低下し、アレルギー性気道炎症や、高脂肪食負荷により誘導される肥満・糖尿病ならびに脂肪織慢性炎症が、有意に増悪することが明らかとなった、すなわち、Munc13-4 が、喘息、肥満・糖尿病、両疾患共通の抑制因子として作用しており、その分子基盤の一つとして、Munc13-4 による CD11c⁺ APC からの IL-10/IL-12 分泌の正の制御が考えられる(図5)。これらの結果をまとめて、2024 年に *Allergy* 誌に論文報告した(引用文献3)。



(図5) Munc13-4は喘息、肥満・糖尿病、共通の抑制因子として作用する

3) その他の Rab27 エフェクター

本研究では、Exo5 や Munc13-4 以外の Rab27 エフェクターについても解析を行った。そして、OVA 誘発性マウス喘息モデルにおいて、当該 Rab27 エフェクター蛋白質の遺伝子欠損マウスで、好酸球性気道炎症が顕著に増悪することを見出した。当該 Rab27 エフェクター蛋白質は、II 型肺胞上皮細胞に発現する一方で、血球系免疫細胞にはほとんど発現しないという予備的知見を得ており、当該 Rab7 エフェクター蛋白質は、主に気道炎症期に肺上皮細胞において作用することが示唆される。今後、喘息モデルでの表現型の再現性をまず確認し、再現性が確認された場合、アレルギー反応における当該 Rab27 エフェクター蛋白質の作用機序を解明すべく、各種検討を行っていく予定である。

以上、本研究を通して、Rab27 が、抗原感作期、および、その後の炎症期、いずれの phase においても重要な役割を果たすこと、すなわち、Rab27 が、「アレルギー反応のマスターレギュレーター」として機能することを示唆する結果を得た。さらに、Rab27 エフェクター Munc13-4 が、喘息と肥満・糖尿病に共通の疾患抑制因子として作用することを、初めて明らかにした。本研究で得られた結果が、今後、Rab27 を標的としたアレルギー・免疫疾患の新規治療法の開発に繋がることを、期待する。

<引用文献>

1. **Okunishi K***, Wang H, Suzukawa M, Ishizaki R, Kobayashi E, Kihara M, Abe T, Miyazaki JI, Horie M, Saito A, Saito H, Nakae S, Izumi T*. Exophilin-5 regulates allergic airway inflammation by controlling IL-33-mediated Th2 responses. *J. Clin. Invest.* 130:3919-3935, 2020. (*, corresponding authors)
2. Zhao M#, **Okunishi K#**, Bu Y#, Kikuchi O, Wang H, Kitamura T, Izumi T. Targeting activin receptor-like kinase 7 ameliorates adiposity and associated metabolic disorders. *JCI insight* 8(4):e161229, 2023. (#, co-first authors)
3. **Okunishi K***, Kochi Y, Zhao M, Wang H, Nakagome K, Izumi T*. Munc13-4 regulates asthma and obesity in mice by controlling functions of CD11c⁺ antigen-presenting cells. *Allergy* 2024 (Online ahead of print). (*, corresponding authors)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okunishi Katsuhide, Wang Hao, Suzukawa Maho, Ishizaki Ray, Kobayashi Eri, Kihara Miho, Abe Takaya, Miyazaki Jun-ichi, Horie Masafumi, Saito Akira, Saito Hirohisa, Nakae Susumu, Izumi Tetsuro	4. 巻 130
2. 論文標題 Exophilin-5 regulates allergic airway inflammation by controlling IL-33-mediated Th2 responses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 3919 ~ 3935
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI127839	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 Okunishi Katsuhide, Kochi Yuta, Zhao Min, Wang Hao, Nakagome Kazuyuki, Izumi Tetsuro	4. 巻 -
2. 論文標題 Munc13 4 regulates asthma and obesity in mice by controlling functions of CD11c+ antigen presenting cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.16087	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Okunishi Katsuhide, Wang Hao, Suzukawa Maho, Ishizaki Ray, Nakae Susumu, Izumi Tetsuro
2. 発表標題 Exophilin-5 regulates IL-33-mediated Th2 responses
3. 学会等名 第15 回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

群馬大学生体調節研究所
<https://www.imcr.gunma-u.ac.jp/>

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
研究協力者	泉 哲郎 (Izumi Tetsuro) (00212952)	群馬大学・生体調節研究所・教授 (12301)	
研究協力者	王 昊 (Wang Hao) (70775874)	群馬大学・生体調節研究所・助教 (12301)	
研究協力者	趙 敏 (Zhao Min)	群馬大学・生体調節研究所・大学院生 (12301)	
研究協力者	高地 雄太 (Kochi Yuta) (60415156)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授 (12602)	
研究協力者	中込 一之 (Nakagome Kazuyuki) (60401113)	埼玉医科大学・呼吸器内科・教授 (32409)	

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