

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790810

研究課題名(和文)呼吸器免疫系におけるホスホリパーゼC の役割

研究課題名(英文)Role of phospholipase Cepsilon in the respiratory immune system

研究代表者

永野 達也(Nagano, Tatsuya)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：80624684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：ホスホリパーゼCepsilon(PLCepsilon)は低分子量GTP蛋白質Ras/Rapの標的タンパク質で、非免疫細胞に高発現している。本研究の目的は、PLCepsilonの遺伝子改変マウスと喘息モデルを用いて、呼吸器免疫におけるPLCepsilonの役割を明らかにすることである。PLCepsilon欠損マウスでは、気道過敏性の亢進や気管支血管周囲の炎症細胞の浸潤が著明に抑制され、ヘルパーT細胞2型のサイトカインや、気道上皮細胞からのサイトカインの産生が抑制されることが明らかとなった。PLCepsilonは少なくともTh2を介する呼吸器免疫に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Phospholipase Cepsilon(PLCepsilon) is an effector of Ras and Rap small GTPases and is highly expressed in non-immune cells such as epithelial cells. PLCepsilon has been shown to play a role in inflammation in the skin. This study aimed to elucidate its role in the respiratory immune system by employing an allergic asthma model using the mutant mice where PLCepsilon is enzymatically inactive. In the elicitation stage of the asthma, PLCepsilon deficient mice exhibited substantially attenuated airway hyper-responsiveness accompanied by reduced airway inflammation with a decrease in the Th2 cytokine levels. This attenuated airway inflammation seems to be caused by inhibition of cytokine production from the bronchial epithelial cells as demonstrated by immunohistochemical studies of the allergen-sensitized PLCepsilon deficient mice upon allergen challenge. These results demonstrate an important role of PLCepsilon in the respiratory immune system, at least that mediated by Th2 cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：ホスホリパーゼCイプシロン 喘息 Th2細胞 マウス 卵白アルブミン

### 1. 研究開始当初の背景

ホスホリパーゼC イプシロン (PLC $\epsilon$ ) は低分子量 GTP 蛋白質 Ras/Rap の標的タンパク質 (エフェクター) で、免疫細胞には発現が見られず、上皮細胞などの非免疫細胞に発現している。G 蛋白質共役受容体やレセプターチロシンキナーゼの両方の活性化により活性化を受け、基質であるホスファチジルイノシトール 2 リン酸を加水分解することにより、セカンドメッセンジャーであるジアシルグリセオールとイノシトール 3 リン酸を産生する。

PLC $\epsilon$  のリパーゼ活性を欠損させたノックアウトマウスや培養細胞を使用した研究から、PLC $\epsilon$  は炎症性サイトカインの産生を介して炎症において重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた。ホルボールエステルや紫外線 B 波 (UVB) 誘導性の皮膚炎、さらにはハプテンが誘導するヘルパー T 細胞 (Th) 1 型アレルギー性接触皮膚炎が PLC $\epsilon$  の欠損により抑制されることが明らかにされ、PLC $\epsilon$  が Th1 型アレルギー炎症に重要な役割を果たしていることが分かってきた。一方、表皮の PLC $\epsilon$  を過剰発現させたトランスジェニックマウスではインターロイキン (IL) -23 の産生が亢進し、好中球や IL-22 産生 CD4 陽性細胞などの炎症細胞が集簇する乾癬様の皮膚炎が誘導されることも明らかとなった。培養細胞では PLC $\epsilon$  のノックアウトにより、腫瘍壊死因子 (TNF) - $\alpha$  や IL-17、UVB の刺激により炎症性サイトカインの産生が抑制されることが明らかとなった。

しかしながら、Th2 を介するアレルギー性気道炎症における PLC $\epsilon$  の役割については不明であり、詳細な解析によりこれを明らかにする必要があった。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、Th2 型気道アレルギー性疾患である気管支喘息における PLC $\epsilon$  の役割について明らかにすることを目的に、(1) PLC $\epsilon$  の遺伝子型の喘息の表現型へ与える影響、(2) Th2 サイトカインの関与とその産生機構、(3) 呼吸器領域における PLC $\epsilon$  の局在とアレルギー性気道炎症における作用点について解明を目指すこととした。

### 3. 研究の方法

(1) PLC $\epsilon$  の遺伝子型の喘息の表現型へ与える影響：

6 週齢の PLC $\epsilon$  の野生型 (WT) マウスとノックアウト (KO) マウスに卵白アルブミン (OVA) を実験 0 日目、7 日目、14 日目の 3 回にわたり腹腔注射して OVA に対する感作を成立させ、21 日目から 23 日目まで 3 日間連続で OVA をエアロゾル化して吸引させ、喘息を発症させた。コントロール群には OVA を含まない PBS のみをエアロゾル化して吸引させた。24 日目にメタコリンの段階希釈液を投与し気道過敏性を解析した。また、同じく 24 日目にマ

ウスから肺組織を取り出し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色で気管支血管周囲の炎症細胞の浸潤を、粘液に含まれる多糖を染色する過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色で粘液産生細胞の増加を評価した。

(2) Th2 サイトカインの関与とその産生機構：

(1) と同様の方法で喘息を発症させたマウスに 24 日目に気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の炎症細胞のプロファイリングをディフ・クイック染色により行い、Th 由来サイトカインを酵素免疫測定法 (ELISA) により定量した。

(1) と同様の方法で喘息を発症させたマウスに 24 日目に目視できる領域リンパ節を全て廓清し、白血球の細胞表面マーカーを染色してフローサイトメトリーで解析した。

(3) 呼吸器領域における PLC $\epsilon$  の局在とアレルギー性気道炎症における作用点：

PLC $\epsilon$  の感作に対する影響を調べるために、OVA で感作を成立させたマウス (コントロールには PBS を使用) から 21 日目血清を取り出し、OVA 特異的イムノグロブリン (Ig) G1、IgG2、IgE を ELISA により定量した。

PLC $\epsilon$  の脱顆粒への影響を調べるために、PLC $\epsilon$  WT マウスと KO マウスの腓骨と大腿骨から骨髓細胞を取り出し、IL-3 の存在下で肥満細胞へ分化させて、肥満細胞における PLC $\epsilon$  の発現を逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法 (RT-PCR) で解析した。さらにこの骨髓由来肥満細胞をジニトロフェニル (DNP) 抗体と一晚反応させ、DNP 結合ヒト血清アルブミン (HSA) と反応させて脱顆粒を起こさせ、遊離されてくる  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼを定量した。

PLC $\epsilon$  の樹状細胞の遊走能への影響を調べるために、OVA で感作を成立させたマウスに蛍光標識 OVA (コントロールには PBS を使用) を経気道的に投与し、24 時間後に領域リンパ節を取り出し、リンパ節に移動してくる OVA を貪食した CD11c 陽性樹状細胞を蛍光免疫染色で解析した。

PLC $\epsilon$  WT マウスから肺組織を取り出し、ABC 法により免疫染色を行い PLC $\epsilon$  の呼吸器領域における局在を調べた。

(1) の で作成した喘息マウスモデルから 24 日目に肺組織を取り出し、定量 RT-PCR (qRT-PCR) により炎症性サイトカインの発現に PLC $\epsilon$  の遺伝子型による違いがみられるかを解析した。また、PLC $\epsilon$  と炎症性サイトカインの抗体で免疫染色を行い、肺組織の PLC $\epsilon$  の発現細胞と、炎症性サイトカインの産生との関係性を評価した。

PLC $\epsilon$  WT マウスと KO マウスの肺組織から気道上皮細胞と線維芽細胞を単離、培養し、PLC $\epsilon$  の発現を RT-PCR で解析した。さらに TNF- $\alpha$  で刺激して発現してくる炎症性サイトカインを qRT-PCR で解析した。

### 4. 研究成果

PLCεの遺伝子型の喘息の表現型へ与える影響：

これまでの報告からノザンプロット解析で PLCεの mRNA が肺に発現していることが確認されていたため、PLCεが喘息の発症にどのような影響を与えるかを確認するために PLCεWT マウスと KO マウスを使用して、OVA を抗原とする気管支喘息マウスモデルを作成した。その結果、WT マウスで見られる気道過敏性の亢進が、KO マウスでは PBS を吸入させたコントロール群と同程度まで抑制されていることが明らかとなった（図 1）。

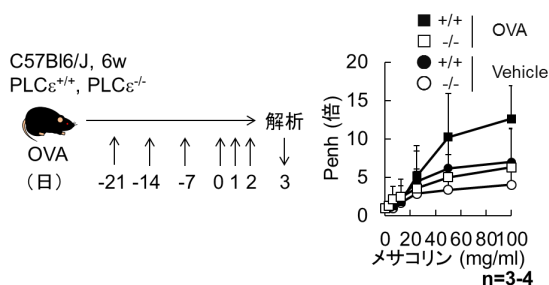


図 1. 気管支喘息モデルと気道過敏性試験

また、OVA の最終吸入から 24 時間後に肺組織を取り出し、HE 染色を行ったところ、WT マウスで見られる気管支血管周囲の炎症は KO マウスではコントロール群と同程度まで抑制されており、同じ組織切片を使用して PAS 染色を行ったところ、WT マウスで見られる PAS 陽性細胞の増加が KO マウスでは抑制されていることが明らかとなった。以上の事から、PLCεが欠損すると喘息症状は弱まり、PLCεが喘息の発症に重要な役割を果たしていることが示唆された。

(2) Th2 サイトカインの関与とその産生機構：

PLCεがどのように喘息の表現型に影響を与えているのかを明らかにしていくため、喘息によりどのような炎症細胞が誘導されているのかについて解析を行った。まず、解析方法として、OVA の最終吸入から 24 時間後に BAL を行い、炎症細胞の種類を病理学的に分類した。その結果、総細胞数と好酸球数の増加が WT マウスに比較して KO マウスで有意に抑制されていることが明らかとなった（図 2、それぞれ  $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$ ）。

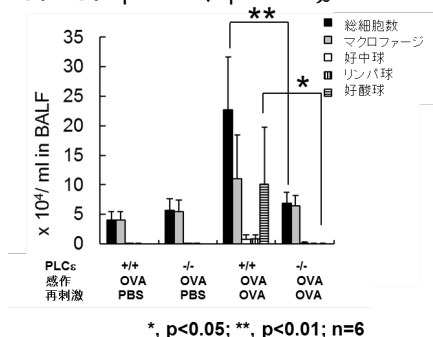


図 2. BALF 中の炎症細胞数

同様の傾向はリンパ球、好中球、マクロファージでも見られたが有意差には至らなかった ( $p > 0.05$ )。この結果より、PLCεは好酸球性の気道炎症と関係していることが示唆された。

次に、BALF 中の Th サイトカインを ELISA により定量したところ、Th1 サイトカインであるインターフェロンガンマ ( $IFN\gamma$ ) は OVA による気管支喘息では軽微な増加にとどまったものの、Th2 サイトカインである IL-4、5、13 は WT マウスでは著明に増加が見られたのに対し、KO マウスではコントロールと同程度まで有意に増加が抑制されていることがわかった（全て  $p < 0.001$ ）。

我々はさらに、OVA の最終吸入から 24 時間後に領域リンパ節を摘出し、総細胞数を WT マウスと KO マウスで比較したところ、WT マウスでは OVA の吸入によりコントロール群に比較して総細胞数の増加が見られたが、KO マウスではコントロール群と同程度まで有意に増加が抑制されていることが明らかとなった ( $p < 0.001$ )。またリンパ節の細胞を細胞表面マーカーで染色してフローサイトメトリーで解析したところ、表面抗原分類 (CD) 45R 陽性 B リンパ球と、CD3ε陽性 T リンパ球は WT マウスに比較して KO マウスでは増加が抑制されていることが明らかとなったが、CD4 陽性リンパ球と CD11c 陽性主要組織適合抗原 (MHC) II 陽性樹状細胞では有意差には至らなかった（それぞれ  $p = 0.051$ 、 $p = 0.12$ ）。以上の結果より、PLCεは Th2 型の気道炎症と関係していることが示唆された。

(3) 呼吸器領域における PLCεの局在とアレルギー性気道炎症における作用点：

PLCεの抗原感作に与える影響を調べるために、感作成立後のマウスから血清を取り出し、OVA 特異的 IgG1、IgG2a、IgE を ELISA により定量したところ、これらのコントロール群と比較した増加は、すべて PLCεWT マウスと KO マウスの間で有意な違いは見られなかった。以上のことから、PLCεは感作の成立には影響しないことが示唆された。

次に、炎症性メディエーターなどを放出し、喘息の発症に重要な役割を持つ脱顆粒への PLCεの影響を調べた。PLCεWT マウスから骨髄由来肥満細胞を調整し、RT-PCR で解析したところ、肥満細胞のマーカーである c-Kit や  $Fc\epsilon R1\alpha$  の発現は見られたが PLCεの発現は見られないことが明らかとなった。また、β-ヘキソサミニダーゼ遊離試験を行ったが、PLCεの遺伝子型による影響は見られず、PLCεは脱顆粒には影響しないことが示唆された（図 3）。

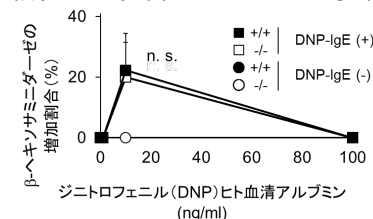


図 3. β-ヘキソサミニダーゼ遊離試験

続いて、CD11c 陽性樹状細胞について解析を行った。樹状細胞は抗原を貪食し、領域リンパ節に移動し、ナイーブT細胞に抗原提示を行い、ナイーブT細胞をTh2細胞に分化させる。まず、PLCεWTマウスとKOマウスから肺組織を取り出し、肺組織に存在するCD11c陽性細胞を免疫染色で病理学的に評価したところ、遺伝子型による明らかな影響は見られなかった。さらに、感作成立後のマウスに蛍光標識OVAを吸入させ、24時間後に肺と縦隔組織を取り出し、領域リンパ節に移動してくるCD11c陽性細胞を蛍光免疫染色で評価したところ、PLCεの遺伝子型による違いは認められなかった。よって、PLCεは樹状細胞の数や遊走能には影響しないことが示唆された。

Th1依存性のアレルギー性接触皮膚炎では、皮膚の角化細胞や線維芽細胞からの炎症性サイトカインの分泌を介して、PLCεがアレルギー性の炎症に重要な役割を果たしていることが報告されているため、呼吸器領域においても、非免疫細胞からの炎症性サイトカインの分泌を介して、PLCεがアレルギー性炎症を制御しているのではないかと仮説を立てた。そこで、非免疫細胞におけるPLCεの発現の有無を、PLCεWTマウスより肺組織を取り出し、免疫染色により解析した。その結果、PLCεは肺胞上皮細胞に高発現しており、気道の上皮細胞および平滑筋細胞、血管の平滑筋細胞にPLCεが発現していることが明らかとなった。この結果より、PLCεが上皮、間葉系細胞を介して呼吸器の炎症に作用している可能性が示唆された。

続いて、PLCεWTマウスとKOマウスにOVAで感作、再刺激を行って、24時間後に肺組織を取り出し、炎症性サイトカインのmRNAの発現に対するPLCεの影響をqRT-PCRで解析した。その結果、図のようにCcl2やCxcl2でPLCεのKOにより有意に炎症性サイトカインの発現がPLCεのWTに比較して抑制されていることが明らかとなった(それぞれp=0.001、p=0.022)。このことをPLCεとこれら炎症性サイトカインに対する抗体で免疫染色を行い、PLCεの発現細胞でPLCεのKOにより炎症性サイトカインの分泌がPLCεのWTに比べて抑制されていることを確認した。

ここまでの実験より、肺の構成細胞からの炎症性サイトカインの分泌にPLCεが重要な役割を果たしていることが示唆される。

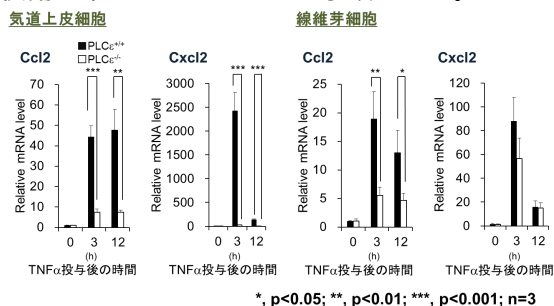


図4. 上皮・間葉系細胞の刺激実験

このことを確かめるために、PLCεWTマウスとKOマウスより肺組織を取り出し、気道の上皮細胞と線維芽細胞を単離、培養し、TNF-αで刺激を行った。その結果、Ccl2とCxcl2の発現が、PLCεのKOでWTに比較して抑制されていることが明らかとなった(図4)。

以上の結果より、PLCεがTh2免疫応答において、上皮間葉系細胞からの炎症性サイトカインの分泌を介して重要な役割を果たしていることを明らかにした。この研究成果により、上皮とPLCεを介する気管支喘息の新しい分子機構が明らかとなった。PLCεはKOマウスでの免疫抑制などの合併症が確認されていないことや、発現が気道上皮に見られ、経気道的なデリバリーシステムの良い対象となり得ることなどから、喘息治療の理想的な分子標的薬になり得ると考えられる。今後は、気道リモデリングや難治性喘息モデルにおけるPLCεの役割についても解析を行い、応用対象を拡大していく予定である。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Tatsuya Nagano、Hironori Edamatsu、Kazuyuki Kobayashi、Yoshihiro Nishimura、Tohru Kataoka、Crucial role of phospholipase Cε in T helper type 2 cell-mediated airway inflammation in mice、ATS2014、2014年5月20日、米国、サンディエゴ

永野達也、アレルギー性気道炎症におけるホスホリパーゼCεの役割、第4回IAA学術集会、2013年4月21日、東京、国際フォーラム

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

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 0 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  
なし

6．研究組織

(1)研究代表者

永野 達也 (NAGANO TATSUYA)  
神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員  
研究者番号：80624684