

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460601

研究課題名(和文) セリンプロテアーゼインヒビターによるアレルギー反応の制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the regulatory role of SLPI in the activation of basophils and eosinophils.

研究代表者

中村 晃 (NAKAMURA, Akira)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：20344723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、アレルギー反応のエフェクター細胞である好塩基球および好酸球において、セリンプロテアーゼインヒビターであるsecretory leukoprotease inhibitor (SLPI)の役割を明らかにすることを目的とした。SLPI欠損マウスの好塩基球および好酸球は、IgEやLPS刺激によるサイトカイン産生が有意に亢進していた。SLPI欠損好塩基球を移入したマウスでは、皮膚受身アナフィラキシー反応が亢進していた。Slpi欠損マウスは喘息モデルにおいて、好酸球数が著明に増加していた。これらの結果より、SLPIが、好塩基球および好酸球によるアレルギー性炎症を抑制していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Mast cells, basophils and eosinophils secrete abundant serine proteases as well as chemical mediators and cytokines. However, it remains unclear about expression profiles and functions of serine protease inhibitors in allergic effector cells. In this study, we have found that a major serine protease inhibitor, secretory leukoprotease inhibitor (SLPI) is expressed on basophils and eosinophils. Both basophils and eosinophils from SLPI-deficient (Slpi^{-/-}) mice showed more cytokine secretions than those from wild-type (WT) mice upon stimulation. Mice transferred with Slpi^{-/-} basophils showed an enhanced IgE-mediated cutaneous anaphylaxis when compared with WT mice. We also investigated HDM induced asthma model. Slpi^{-/-} mice showed significantly higher percentages of eosinophils in bronchoalveolar lavage fluids than WT mice. These results suggested that SLPI is essential for the regulation of basophil and eosinophil activation.

研究分野：免疫学

キーワード：アレルギー

1. 研究開始当初の背景

アレルギー反応の主なエフェクター細胞は、マスト細胞、好塩基球、好酸球である。これらの細胞は抗原の刺激により、ヒスタミンやロイコトリエンなどの化学伝達物質や様々なサイトカインを産生するが、この他にもキマーゼやカテプシンGさらにはグランザイムなどのセリンプロテアーゼを産生する。セリンプロテアーゼは、本来細菌感染に対する防御機構として働くが、過剰な分泌は炎症反応を助長し、組織破壊を引き起こす。一方、生体には炎症性プロテアーゼを特異的に抑制するインヒビターが存在している。研究代表者らは代表的なセリンプロテアーゼインヒビターである SLPI (secretory leuko-protease inhibitor) の遺伝子欠損マウスを作製し、SLPI が敗血症の抑制因子であることを世界に先駆けて明らかにしている (Nakamura A, et al. J. Exp. Med. 197, 2003)。また、SLPI を含めセリンプロテアーゼインヒビターについては国内外の研究者らにより、抗炎症作用が多数報告されている。近年では、敗血症の治療薬としても商品化されているが、アレルギー疾患における生理機能については不明なままである。これまで研究代表者らは、抑制型受容体 PIR-B 欠損マウスにおいてアレルギー反応が亢進していることを明らかにしているが (Masuda A, Nakamura A, et al. J. Exp. Med. 204, 2007) このマウスでは、セリンプロテアーゼインヒビターの mRNA 発現が大きく変動していた。しかしながら、セリンプロテアーゼインヒビターは、マスト細胞で一部の発現が確認されているのみで、好塩基球や好酸球においては発現すら報告されていなかった。ごく最近になり、研究代表者らは、タンパク質レベルでの SLPI の発現を検討したところ、好塩基球において好中球の約 22 倍と極めて高発現していることを見いだした。さらに SLPI を欠損した細胞は IgE 刺激や LPS 刺激に対するサイトカイン産生が野生型と比較していずれも亢進しており、SLPI がアレルギー反応の新規制御分子である可能性を見いだした。一方、マスト細胞や好酸球では SLPI の発現が低いことから、他のセリンプロテアーゼインヒビターの存在も強く示唆する所見と考えられた。

そこで、これまでまったく知られていない、アレルギーのエフェクター細胞における SLPI を含めたセリンプロテアーゼインヒビターの発現と機能を明らかにすることは、学術的および臨床的に極めて重要な課題と考え本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

セリンプロテアーゼインヒビターによるアレルギー反応の制御機構の解明

本研究では新たなアレルギー疾患の制御分子としてのセリンプロテアーゼインヒビターの役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 好塩基球および好酸球における SLPI のシグナル伝達に与える影響の検討

SLPI 欠損細胞が IgE 刺激に高反応性なことから、SLPI による IgE 受容体の下流のシグナル伝達制御機構について検討した。特に IgE 受容体下流の主要な経路であるアラキドン酸活性化経路、サイトカイン産生につながる NF- κ B 活性化経路、Ca 応答経路について SLPI が高発現している好塩基球において検討した。

(2) アレルギー疾患の新規治療薬としての SLPI の作用の検討

現在、プロテアーゼインヒビターは敗血症の治療薬として認可されている。しかしながら、アレルギー疾患には治療薬としての可能性はまったく追求されていない。そこで実験 2 では、リコンビナント SLPI を作製し、アレルギーの新規治療薬としての可能性を探求した。

(3) SLPI 以外のセリンプロテアーゼインヒビターの作用の検討

実験 3 では、SLPI 以外のセリンプロテアーゼインヒビターの発現をマイクロアレイ、定量的 PCR 法を用いて比較検討した。また高発現しているセリンプロテアーゼインヒビターが同定できれば、siRNA を用いてノックダウンすることにより、その作用を検討した。

4. 研究成果

(1) SLPI は好塩基球の作用を細胞および個体レベルで制御する

好塩基球において IgE 刺激後のサイトカイン産生を検討したところ、SLPI 欠損好塩基球では、IL-4 産生が野生型と比較して亢進していた (図 1)。

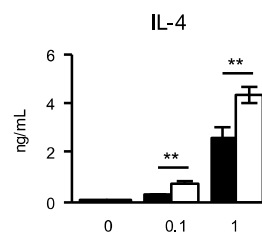


図 1 : 好塩基球の IgE 刺激後の IL-4 産生

さらに個体レベルでの解析を目的として、IgE 受容体を欠損する Fc γ R 欠損マウスに、好塩基球と TNP-IgE 抗体を移入後に、耳介に TNP を塗布し、受け身型皮膚アナフィラキシー反応を誘導した。その結果、SLPI 欠損好塩基球を移入したマウスにおいて、皮膚アナフィラキシー反応が亢進していた (図 2)。一方、代表的な IgE 受容体下流のシグナル伝達に関しては SLPI 欠損と野生型マウスに関しては明らかな差がないことから、現在 DNA マイクロアレイにより見出した分子について

検討中である。

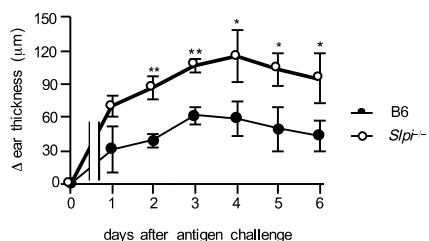


図2 受け身皮膚アナフィラキシー反応

(2) SLPI は好酸球によるアレルギー反応を制御する

好酸球においてLPS刺激後のサイトカイン産生を検討した。その結果、SLPI欠損好酸球においてIL-6産生が亢進していた(図3)。さらに、LPSとeotaxin刺激による走化性を検討したところ、SLPI欠損好酸球で亢進しており、MMP-9の発現が著名に上昇していることが判明した。そこでシグナル伝達を解析したところEIk-1の発現が亢進していることを見出した。また、ハウスダストの経鼻投与による気管支喘息モデルでは、SLPI欠損マウスにおいて著大な好酸球の増加を認めた(図4)。これらの結果から、SLPIは好塩基球と好酸球の活性化を制御していることが判明した。一方、リコンビナントSLPIの作製に成功したが、収量が不十分のため大量培養系の構築中で、今後の治療実験に用いる予定である。

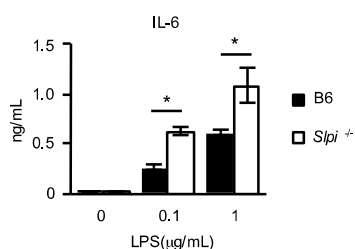


図3: 好酸球のLPS刺激のIL-6産生

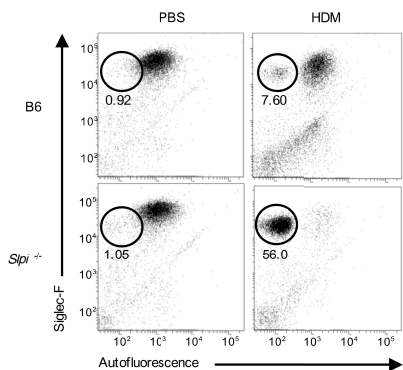


図4: HDM投与後のBALF中の好酸球(Siglec-F陽性細胞)の割合

(3) SLPI以外のセリンプロテアーゼインヒビターの作用の検討

マウスのみならずヒト好塩基球および好酸球細胞株においてDNAマイクロアレイを行った。その結果、SLPI以外にもSerpin b1, b2, b6の発現を認めた。そこで、ヒト好塩基球細胞株において、最も発現が高いSerpin b1のshRNAによる恒常的ノックダウン株を作製した。IgE刺激によるサイトカイン産生の差は認められなかったが、呼吸器感受性物質に対してIL-13産生の亢進を認め、今後の研究の展開が期待される結果を得ることができた。これらの結果を含めて現在投稿中である。

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4件)

Higashino-Kameda M, Yabe-Wada T, Matsuba S, Takeda K, Anzawa K, Mochizuki T, Makimura K, Saijo S, Iwakura Y, Toga H, Nakamura A. A critical role of Dectin-1 in hypersensitivity pneumonitis. *Inflammation Research*, 査読有, 65: 235-244, 2016, DOI:10.1007/s00011-015-0910-1

中村 晃, 呼吸器系の宿主免疫応答、呼吸、34巻、241-246、2015、<http://www.respiration.jp>

Kanari Y, Sugahara-Tobinai A, Takahashi H, Inui M, Nakamura A, Hirose S, Takai T. Dichotomy in FcRIIB deficiency and autoimmune-prone SLAM haplotype clarifies the roles of the Fc receptor in development of autoantibodies and glomerulonephritis. *BMC Immunology*, 査読有, 15: 47. 2014, DOI:10.1186/s12865-014-0047-y.

Jan Treda C, Fukuhara T, Suzuki T, Nakamura A, Zaini J, Kikuchi T, Ebina M, Nukiwa T. Secretory-leukocyte protease inhibitor modulates urethane-induced lung carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 査読有, 35:896-904, 2014, DOI:10.1093/carcin/bgt382.

[学会発表](計7件)

S. MATSUBA, K. TAKEDA, T. YABE-WADA, T. TAKAI, A. NAKAMURA, SLPI regulates eosinophil-mediated allergic inflammation, 第44回日本免疫学会学術集会、2015年11月20日、札幌コンベンションセンター、北海道札幌市白石区

Functional analysis of Sortilin in plasmacytoid dendritic cells, T. Yabe-Wada, S. Matsuba, K. Takeda, C. C. Philpott, A. Nakamura, 第44回日本免疫学会学術集会、2015年11月19日、札幌コンベンションセンター、北海道札幌市白石区

東野茉莉、及川卓、中川研、水野史朗、長内和弘、西城忍、榎村浩一、岩倉洋一郎、中村晃、梅博久、Trichosporon asahii による過敏性肺炎モデルにおける Dectin-1 の機能解析、第55回日本呼吸器学会学術講演会、2015年4月19日東京国際フォーラム、東京都千代田区

武田和也、姫田敏樹、大原義朗、中村晃 タイラマウス脳脊髄炎ウイルス感染における形質細胞様樹状細胞の役割、第19回日本神経感染症学会、2014年10月22日、金沢歌劇座、石川県金沢市

松葉慎太郎、和田俊樹、武田和也、佐藤哲也、須山 幹太、高井俊行、中村晃、好塩基球・好酸球における SLPI の制御機構の解明、第35回日本炎症・再生医学会、2014年7月2日、万国津梁館、沖縄県名護市

S. Matsuba, T. Yabe-Wada, K. Takeda, T. Takai, A. Nakamura, A regulatory role of secretory leukoprotease inhibitor (SLPI) in allergic effector cells, 第42回日本免疫学会学術集会、2013年12月12日、幕張メッセ、千葉県千葉市

松葉慎太郎、和田俊樹、武田和也、佐藤哲也、須山幹太、高井俊行、中村 晃：好塩基球・好酸球における SLPI の制御機構の解明、第63回日本アレルギー学会秋期学術大会、2013年11月30日、ホテルニューオータニ、東京都千代田区

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kanazawa-med.ac.jp/~serol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 晃 (NAKAMURA, Akira)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：20344723

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

松葉 慎太郎 (MATSUBA, Shintaro)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号：40367462

和田 俊樹 (WADA, Toshiki)
金沢医科大学・医学部・講師
研究者番号：10451634