

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461565

研究課題名(和文) 気管支喘息に対する分子病態に基づいた新規ペプチド療法の開発

研究課題名(英文) Development of a peptide as a novel therapy for bronchial asthma

研究代表者

安戸 裕貴 (YASUDO, HIROKI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70422285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、分子レベルでの蛋白導入技術を用いて、気管支喘息に対する新たな治療薬の開発を目的とした。この研究で、炎症を抑える働きを有する蛋白Src homology region 2 (SH2) domain-containing phosphatase 1 (SHP-1)を、蛋白の運び屋の役目を果たすベクターを用いて細胞レベルに導入することにより、喘息モデルマウスの肺胞洗浄液内における総細胞数、好酸球数が低下することを示した。このことは、気道炎症を抑制するを示唆しており、喘息の新しい治療薬となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We aim to develop a molecular based drug as a novel therapy for bronchial asthma.

In this study, we have shown that the introduction of Src homology region 2 (SH2) domain-containing phosphatase 1 (SHP-1) with TAT vector (protein carrier) have brought a decrease in the total cell counts and eosinophil counts in bronchoalveolar lavage fluid of asthmatic mice. This result shows this therapy could suppress inflammation in respiratory tracts and could be a novel therapy for the disease.

研究分野：アレルギー

キーワード：気管支喘息 治療 ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年アレルギー性疾患の罹患率は年々増加傾向にあり、特に、小児における罹患率は増加の一途をたどっている。気管支喘息は、ステロイド吸入治療の積極的導入により、QOL は劇的に改善するようになった。しかし、ステロイド治療に反応性が乏しい症例も多数報告されており、患者の遺伝子背景も含めた明確な分子病態に裏付けられたサブタイプ(エンドタイプ)に基づく治療の必要性が提唱されるようになってきている。

(2) ホスホリパーゼ C(PLC)-3 はホスファチジル-4,5-ニリン酸を加水分解し、イノシトール 1,4,5-三リン酸(IP3)とジアシルグリセロールを生成する酵素で、IP3 はカルシウムの細胞内濃度を上昇させ、ジアシルグリセロールはプロテインキナーゼ C 等の活性化を誘導する機能を持つ。

(3) 研究代表者らの研究室では、PLC-3 がその酵素活性とは別に、肥満細胞においては、PLC-3 は SHP-1 および Lyn と結合し、複合体(SHP-1- PLC-3- Stat5-Lyn 複合体、以下 SPSL 複合体)を形成することにより Lyn の活性を抑制する結果、Th2 サイトカイン(IL-4, -5, -13) や炎症性サイトカイン(IL-6, TNF- $\alpha$ )の産生が増加し、気管支喘息の重症化に結びつくことを解明した(Xiao W, Yasudo H, et al. Immunity, 2011)。

(4) 膜透過性ペプチドを用いた細胞内蛋白導入法が開発され、治療に応用されるようになってきている。例えば、HIV の転写調節に関わる TAT 蛋白における TAT 配列 GRKKRRQRRPP は、塩基性アミノ酸に富んでおり、陽性荷電を呈するため、細胞膜に容易に導入される(S Wadia et al. Nat. Med 2004)。この TAT 配列をベクターとして用いることにより、p53 蛋白の導入による癌抑制や、Bcl-xL の導入による虚血性脳損傷における神経細胞死の軽減など様々な細胞機能が制御、調節されることが報告されており、新たな治療法として注目されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、重症気管支喘息に Lyn の活性が抑制されているエンドタイプが存在するという仮説をたて、SPSL 複合体の形成に関わる PLC-3 領域内の結合部位をもとにした新しい治療法の開発および臨床応用に展開するための基盤的な検討を行うことを目的とする。

(1) SPSL 複合体形成に関わる PLC-3 C 末端領域内の結合部位を同定し、結合部位ペプチド配列の機能的評価を行う。

(2) (1)で決定したペプチド配列に TAT 配列を加えた TAT-結合部位ペプチドを作成・精

製し、細胞導入による機能評価を行う。

(3) 気管支喘息モデルマウスを用いて TAT-結合部位ペプチドの投与による治療効果の解析・判定を行う。

(4) 気管支喘息患者の好塩基球における Lyn の発現・活性を評価し、発現・活性が低下しているエンドタイプが存在するか明らかにし、Lyn 発現・活性が低下したエンドタイプに対して、TAT-結合部位ペプチドの投与による治療効果を判定する。

## 3. 研究の方法

(1) GST プルダウンアッセイ法を用いて、PLC-3 C 末端領域内における SPSL 複合体形成に必要と思われる Lyn との結合部位のマッピングを検討した。方法としては、PLC-3 C 末端領域内の様々な領域を有する GST 融合蛋白を作成し、Lyn との結合性を Western Blotting 法により評価した。

(2) 同定した結合部位に相当するペプチドの細胞内機能評価のため、膜透過性ペプチド TAT ペプチドを使用した。予備実験として TAT 配列を付加した SHP-1 およびその kinase 不活性型 SHP-1(SHP-1-C453S; 以下 SHP-1 CS mutant, SHP-1-D419A; 以下 SHP-1 DA mutant)の結合蛋白を作製した。これらを BaF-3 細胞(マウス pro-B 細胞株) MEC-1 細胞, MEC-2 細胞(B リンパ球慢性リンパ球性白血病由来)に導入して細胞の増殖を評価した。

(3) 同様に、同定した結合部位に相当するペプチドの喘息モデルマウスにおける治療効果を評価するため、TAT ペプチドを使用した。喘息モデルマウスは C57BL/6 マウスにオポアルブミンを第 0 日、7 日、14 日、21 日、28 日、35 日に感作経腹腔投与し感作させ、第 40 日、43 日、46 日に経鼻的にオポアルブミンを投与して刺激した。TAT ペプチドは第 39 日、42 日、45 日に投与した。気管支肺胞洗浄液は、最後の刺激後 24 時間後に回収した。予備実験として TAT 配列を付加した SHP-1 およびその kinase 不活性型 SHP-1(SHP-1-C453S; 以下 SHP-1 CS mutant, SHP-1-D419A; 以下 SHP-1 DA mutant)を用いた。

## 4. 研究成果

(1) 最初に以前報告した PLC-3 C 末端領域内の様々な領域を含んだ GST 融合蛋白のコンストラクトを用いて、Lyn との結合性を評価した。

当初 BaF3 細胞を用いて、GST-PLC-3 809-982, GST-PLC-3 983-1234 GST-PLC-3 C 末全長(809-1234)を用いて western blotting を施行したが、Lyn との結合を確認できなかった。また、THP-1 細胞を用いて同様の実験を施行したが、Lyn との結合は確認できなかった。細胞と GST 融合蛋白

との結合比、結合時間、抗 GST 抗体などとの反応時間など、実験における諸条件を変えてみたが結果は同様であった。

以前の報告(Xiao W, Yasudo H, Kawakami T et al. Immunity 2011)では、PLC-3 欠損細胞内で GST-PLC-3 C 末全長(809-1234)を強制発現させた条件下で lyn の結合を Western blotting で示していることから、今回の結果として、PLC-3 が発現している細胞内では、lyn と生理的な PLC-3 との結合による影響で、PLC-3 C 末領域内の領域を含んだ GST 融合蛋白と lyn との結合が十分に評価できなかった可能性が考えられた。このため、PLC-3 欠損細胞株を入手も検討したが、入手することができず、さらなる評価が困難となった。

(2)(1)において GST pull down assay による PLC-3 と Lyn との結合部位の同定を確認できなかったため、TAT ペプチドによる予備実験を対象として行った。最初に BaF-3 細胞に PBS TAT-GFP His-SHP-1WT(TAT 領域を含まず) TAT-SHP-1WT TAT-SHP-1CS mutant TAT-SHP-1DA mutant を添加したところ、添加後第 6 日目には、TAT-SHP-1WT TAT-SHP-1CS mutant TAT-SHP-1DA mutant を添加した BaF-3 細胞では、PBS TAT-GFP His-SHP-1WT を添加した BaF-3 細胞と比較して細胞増殖が抑制された。また、添加後第 9 日目の時点でも、この傾向は変わらず、いずれも有意に細胞増殖が抑制されたのが認められた。更に、TAT-SHP-1WT TAT-SHP-1CS mutant を添加した BaF-3 細胞は、TAT-SHP-1DA mutant を添加した BaF-3 細胞と比較しても有意に増殖が抑制されていることが認められた。また、MEC-1 細胞、MEC-2 細胞に導入した場合も同様な結果が得られた。このことから、TAT-SHP-1WT、TAT-SHP-1CS mutant および TAT-SHP-1DA mutant ペプチドが細胞内に導入されることにより細胞増殖が抑制されることがわかり、特に TAT-SHP-1WT、TAT-SHP-1CS mutant の導入では細胞抑制が著明であった。

(3)(1)において GST pull down assay による PLC-3 と Lyn との結合部位の同定ができなかったため、TAT ペプチドによる予備実験を対象として行った。喘息マウスにおいては、TAT-SHP-1WT、TAT-SHP-1CS mutant ペプチドを喘息誘導時に投与して治療効果を評価した。コントロールとしては、PBS 投与群や His-SHP-1WT 投与群(TAT ペプチドを有さない)を用いた。TAT-SHP-1WT、TAT-SHP-1CS mutant ペプチドを投与したマウスの気管支肺胞洗浄液では、コントロール群と比較して総細胞数、好酸球が低下したことが判明した。

以上の結果より、当初の目的である PLC-3 C 末と Lyn の結合については十分な

評価ができなかった。

しかし、TAT ペプチドの予備実験として施行した kinase 不活性型 SHP-1 である TAT-SHP-1CS mutant では、細胞増殖の抑制効果や、喘息モデルマウスの気管支肺胞液内の総細胞数および好酸球の低下が認められ、気道炎症の抑制に効果を有する可能性が示唆された。引き続き、喘息モデルマウスを用いて、TAT-SHP-1WT、TAT-SHP-1CS mutant ペプチドの投与による気管支肺胞洗浄液中の IL-4, IL-5, IL-13, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 などの Th2 サイトカインや炎症性サイトカイン産生の変化、肺組織像による気道炎症の評価、気道過敏性の評価を行うことにより、TAT-SHP-1WT、TAT-SHP-1CS mutant ペプチドの喘息治療としての効果について評価する。

また、気管支喘息の患者の末梢血から採取した好塩基球および好酸球に TAT-SHP-1WT、TAT-SHP-1CS mutant ペプチドを導入して細胞増殖やサイトカインの産生(IL-4, -5, -13)への影響を評価する予定である。

## 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 10 件)

Isojima T, Hasegawa T, Yokoya S, et.al. The response to growth hormone treatment in prepubertal children with growth hormone deficiency in Japan: Comparing three consecutive years of treatment data of The Foundation for Growth Science in Japan between the 1990s and 2000s. *Endocr J.* (査読あり) 64:851-858,2017

Tamura M, Yasudo H, Kitanaka S, et.al. Novel *DHCR7* mutation in a case of Smith-Lemli-Opitz syndrome showing 46,XY disorder of sex development. *Hum Genome Var.* (査読あり) 4:17015.2017  
Yasudo H, Akashi M, Ohya Y, et.al. Randomized controlled trial of oral immunotherapy for egg allergy in Japanese patients. *Pediatr Int.* (査読あり) 59:534-539. 2017

Kato M, Seki M, Yoshida K, et.al. Genomic analysis of clonal origin of Langerhans cell histiocytosis following acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol.* (査読あり) 175:169-72, 2016

Hikita T, Kodama H, Mimaki M, et.al. Cyclic Vomiting Syndrome in Infants and Children: A clinical Follow-Up Study. *Pediatr Neurol.* (査読あり) 57:29-33, 2016.

Sato Y, Wakabayashi K, Mimaki M, et.al.

Low serum biotin in Japanese children fed with hydrolysate formula. *Pediatr Int.*(査読あり) 58:867-71, 2016

Hirano Y, Yasudo H, Kato M, et.al.

Systemic lupus erythematosus presenting with mixed-type fulminant autoimmune hemolytic anemia. *Pediatr Int.* (査読あり) 58:527-530,2016

Yasudo H., Ando T., Oka A, et.al.

“Suplatast tosilate for treating cutaneous mastocytosis.”, *Pediatr Dermatol.* (査読あり) 32:e118-9.2015

Yasudo H., Ando T., Oka A, et al.

Systemic lupus erythematosus complicated with liver cirrhosis in a patient with Papillon-Lefèvre syndrome. *Lupus.* (査読あり) 23:1523-7. 2014

Toriumi M, Nagasao T, Yasudo H, et.al.

3-D analysis of dislocation in zygoma fractures. *J Craniomaxillofac Surg.* (査読あり) 42:397-402. 2014.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

安戸 裕貴 (YASUDO,HIROKI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70422285

### (2)研究分担者

三牧 正和(MIMAKI, MASAKAZU)

帝京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：40392419

磯島 豪(ISOJIMA, TSUYOSHI)

帝京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00568230

加藤 元博(KATO, MOTOHIRO)

国立研究開発法人国立成育医療研究センタ

ー・小児血液・腫瘍研究部・医長

研究者番号：40708690

### (3)連携研究者

該当無し