

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09994

研究課題名（和文）Rab27関連分子によるサイトカインシグナル制御機構の解明

研究課題名（英文）Novel roles of Rab27 in cytokine signalings

研究代表者

奥西 勝秀 (Okunishi, Katsuhide)

群馬大学・生体調節研究所・講師

研究者番号：50401112

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：近年著増しているアレルギー疾患の成立には、様々なTh2サイトカインが関与している。本研究は、Th2サイトカインの情報伝達経路における、分泌制御蛋白質Rab27の新奇の役割を解明することを目的に、行われた。そして、本研究の結果、Rab27が、様々なTh2サイトカインの情報伝達経路を制御していることが明らかとなり、アレルギー反応のマスターレギュレーターという、Rab27の新奇の役割が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、これまでアレルギー・免疫の分野ではあまり注目されてこなかった分泌制御蛋白質Rab27の、アレルギー反応における重要性が明らかになった。本研究により、サイトカインシグナルの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。将来的に、Rab27関連分子を標的としたアレルギー・免疫疾患の新たな治療開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：The number of patients with allergic diseases is now increasing. Th2 cytokines are known to play essential roles in the development of allergic immune responses. In the current study, we investigated the roles of the secretion-regulating protein Rab27 in Th2 cytokine signaling, and found that Rab27 regulates many pathways related to Th2 cytokine signal transduction. Our results imply that Rab27 functions as a master regulator 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 Th2サイトカイン Rab27 調節性分泌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アレルギー・免疫疾患の病態形成上、サイトカインを始めとした各種生理活性物質が重要な役割を果たすことは、周知の事実であり、実際、これまでアレルギー・免疫分野の研究の多くは、これら生理活性物質の役割・作用の解明に焦点を当てて進められてきた。一方で、生理活性物質が生体内で発揮する生理作用の総量は、細胞内で産生される量以外にも、実際に産生細胞から細胞外へ分泌される量や、その標的細胞上に発現する受容体の発現量によっても規定されるが、これら生理活性物質の分泌や受容体発現の調節機構の詳細は、まだ不明な部分が多い。

生理活性物質の分泌制御において中心的な役割を果たす蛋白として、Rab27 が知られている。Rab27 には a, b, 2 つのアイソタイプがあり、GTP と結合した活性型 Rab27 は、エフェクターと呼ばれる分子 (11 種類) と結合して、分泌小胞膜の輸送を精巧にコントロールしている。Rab27 により分泌が制御される分泌小胞として、ライソゾーム様オルガネラやエキソゾーム等が知られている。アレルギー反応における Rab27 の役割は、これまではほとんど不明であったが、最近、ヒトにおいて、RAB27A 遺伝子多型と、好酸球性気道炎症の指標の一つである呼気一酸化窒素濃度との関連が報告されており、Rab27 のアレルギー反応への関与が示唆される。

アレルギー反応が誘導される為には、まず、個体で抗原感作が成立する必要がある。樹状細胞から naïve Th 細胞に抗原提示される際に、好塩基球から IL-4 が供給されると抗原特異的 Th2 細胞が分化誘導される、すなわち、アレルゲン (=アレルギー反応を誘導する抗原) に対する個体の感作が成立する。そして、この個体がアレルゲンに再暴露されると、抗原特異的な Th2 応答が活性化し、アレルギー性炎症が誘導される。一方で、樹状細胞から IL-12 が供給されると抗原特異的 Th1 細胞が誘導され、この場合、この個体が抗原に再暴露されると、抗原特異的な Th1 応答が惹起され、アレルギー反応は抑制される。

抗原感作が成立した個体が抗原に再暴露されことで誘導されるアレルギー性炎症においては、Th2 サイトカインの中でも、特に IL-5/IL-13 が病像増悪因子として重要で、実際に、IL-5 や IL-13 受容体の中和抗体が、現在、重症喘息患者の治療で使用され、その有効性が実証済みである。近年、この IL-5/IL-13 の産生増強因子として、上皮性サイトカイン IL-33 が注目されている。IL-33 は、主に肺や腸管の上皮細胞に恒常的に発現しており、外的刺激に応じて速やかに分泌されるアラミンとして作用するサイトカインである。そして、抗原刺激時に選択的に IL-5 や IL-13 を産生する病原性 Th2 細胞に作用して、この細胞からの IL-5/IL-13 の産生を増強し、アレルギー性気道炎症を増悪させることが報告されている。すなわち、IL-33 は、アレルギー反応の病態形成上、エフェクターサイトカインである IL-5 や IL-13 と比べより上位中枢で作用しており、IL-33 のシグナル経路の制御機構を解明することは、アレルギー性炎症のより根本的な制御機構を理解することにつながると考えられる。

以上を踏まえ、アレルギー反応が成立する上で重要な、抗原感作期や、IL-33 シグナルにおいて、Rab27 が果たす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、調節性分泌機構で作用する低分子量 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、それらがサイトカインシグナルにおいて果たす役割を、細胞、個体、両レベルの解析を行うことにより、明らかにする。本研究の成果が、免疫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・免疫疾患マウスモデルのうち、Th2 型優位の気管支喘息モデル (卵白アルブミン (ovalbumin, 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 (以下、OVA 喘息モデル) と、ダニ (house dust mite, HDM) 抽出液を複数回経鼻的に投与し、経鼻的に抗原感作と抗原チャレンジを行う系 (以下、HDM 喘息モデル))、ならびに、Th1 型優位の接触性皮膚炎モデル (ハプテンである DNFB で感作後、DNFB チャレンジを行って誘導する) を作成し、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、各マウスから各種免疫担当細胞を単離し、その機能評価を行った。その他、以下の研究成果で述べる各種検討を行った。

### 4. 研究成果

#### a. 抗原感作期における Rab27 エフェクター分子の役割

本研究では、まず、抗原感作の成立に必須の前述の 3 種類の細胞 (樹状細胞、Th 細胞、および好塩基球) における Rab27 エフェクター分子の発現を解析した。その結果、2 つのエフェクター分子がこれら 3 種類全ての細胞に発現していることを確認した。これらの分子は、抗原感作期に何らかの役割を果たしている可能性が考えられた為、次に、野生型マウス、および各分子の遺伝子欠損マウスから単離した細胞の機能比較を行い、各分子の各細胞における役割を評価した。そして、1 つの分子に関して、好塩基球からの IL-4 の分泌を正に制御しており、その欠損は、好塩基球からの IL-4 分泌を低下させ、また、OVA 喘息モデルにおけるアレルギー性気道炎症を減弱させることを確認した。他方の分子に関しては、この分子が樹状細胞からの IL-12 の分泌を正に制御しており、その欠損は、樹状細胞からの IL-12 産生低下や、OVA 喘息モデルにおけるア

アレルギー性気道炎症の増悪、および、接触性皮膚炎モデルにおける Th1 応答の減弱につながることを確認した。

今後、各分子の作用機構の詳細を明らかにすべく、研究を継続して行っていく予定である。

#### b) アレルギー反応におけるエキソフィリン 5 の役割

本申請研究では、Rab27 エフェクター蛋白質の中でも、その機能がほとんど解明されていないエキソフィリン 5 (Exophilin5, 以下 Exo5) に特に焦点を当て、解析を行った。

Exo5 は、ヒトの表皮細胞に発現しており、その欠損は、表皮細胞の脆弱性を誘発し、表皮水泡症の発症につながる事が報告されているが、表皮細胞における Exo5 の機能の詳細や、他の細胞におけるその役割は、ほとんど解明されていなかった。本研究では、主に Exo5 欠損マウスを用いた検討を行い、IL-33 経路の制御因子としての Exo5 の新奇の役割を明らかにすることが出来た。以下に、本研究で見出した知見を、列挙していく。

血球系免疫細胞の中では、メモリー T 細胞の中でも抗原刺激時に IL-5/IL-13 を選択的に産生する CD44<sup>high</sup>CXCR3<sup>low</sup>CD62L<sup>low</sup> の病原性 Th2 細胞 (pathogenic Th2, Tpath2) において Exo5 の発現レベルが高く、その中でも、L-33 受容体陽性 Tpath2 において特に Exo5 が高発現する：

Exo5 は、前述の様に、ヒトの表皮細胞に発現することが報告されていたが、その他の発現細胞の詳細は不明であった。そこで、マウスから各種細胞を単離し、Exo5 の発現レベルを検討したところ、血球系細胞では Tpath2 に、非血球細胞では肺上皮細胞に発現が高く、いずれの細胞でも (ヒトでの発現が報告されている) 表皮細胞と同レベルで発現を認めた。更に、Tpath2 の中でも、IL-33 受容体陰性群と比べて、IL-33 受容体陽性群に高発現していることを確認した。

Exo5 は、IL33 受容体の発現量を制御することで、IL-33 依存的な Tpath2 からの IL-5/IL-13 産生増加を抑制する：

Exo5 は、Tpath2 において、抗原刺激時の NADPH oxidase NOX2 の細胞内輸送を正に制御していることを確認した。そして、Exo5 が欠損すると、この Nox2 の細胞内輸送が阻害される結果、抗原刺激時に Tpath2 細胞内の ROS 産生が亢進し、PI3K/Akt/mTOR の経路がより活性化され、IL-33 受容体の発現が亢進し、IL-33 依存的な IL-5/IL-13 産生が亢進することを確認した。

Exo5 は、肺上皮細胞膜の恒常性を維持することで、刺激に応じた上皮細胞からの IL-33 分泌を制御している：

カビの一種アルテルナリアの抽出液は、セリン・プロテアーゼ活性を有しており、肺上皮を刺激・障害し、肺上皮細胞からの IL-33 の分泌を誘導することが知られている。このアルテルナリア抽出液を経気道的に投与した際、野生型マウスと比較して、Exo5 欠損マウスでは、細胞傷害の指標である LDH の増加を伴って、肺胞空内への IL-33 分泌が亢進した。すなわち、Exo5 の欠損により、肺上皮の脆弱性が増し、アルテルナリア投与に対して誘導される細胞傷害が亢進した結果、肺上皮細胞からの IL-33 分泌が亢進したことが示唆された。

Exo5 の欠損では、IL-33 依存的にアレルギー性気道炎症が増悪した：

Exo5 の欠損では、OVA 喘息モデル、HDM 喘息モデル、いずれの喘息モデルにおいても、アレルギー性気道炎症の増悪を認め、この増悪は、Exo5 と IL-33 の両方を欠損させたマウスでは消失した。すなわち、Exo5 の欠損は、IL-33 依存的にアレルギー性気道炎症を増悪させることが確認された。

更に、我々はこの Exo5 に関する検討の中で、前述の Tpath2 の中で IL-33 受容体を発現する、Exo5 が特に高発現しているごくわずかの細胞集団 (Tpath2 のわずか 2~4%程度) が、IL-33 非存在下でも、抗原刺激時に特異的に IL-5/IL-13 を高産生することも見出している。

以上の結果は、分泌制御因子である Rab27 のアレルギー反応における重要性を初めて明らかにし、かつ、抗原刺激時の IL-5/IL-13 の主要な産生 T 細胞を同定した点で、画期的な知見である。そして、これらの結果をまとめた論文は、国際的な一流誌である J. Clin. Invest. 誌に掲載される予定である (in press)<sup>1</sup>。また、本成果は、複数の新聞紙上でも報道された。

#### <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. 2020 Apr 2. pii: 127839. doi: 10.1172/JCI127839. [Epub ahead of print] (\*, corresponding authors)

以上、本研究の結果から、Rab27 が、抗原感作期、および、その後の炎症期、いずれにおいても、その制御において、重要な役割を果たしていること、すなわち、Rab27 は、アレルギー反応のマスターレギュレーターとして機能している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Katsuhide Okunishi, Hao Wang, Maho Suzukawa, Ray Ishizaki, Eri Kobayashi, Miho Kihara, Takaya Abe, Jun-ichi Miyazaki, Masafumi Horie, Akira Saito, Hirohisa Saito, Susumu Nakae, Tetsuro Izumi	4. 巻 -
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 -
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 -

〔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 Katsuhide Okunishi, Hao Wang, Maho Suzukawa, Susumu Nakae, Tetsuro Izumi
2. 発表標題 A novel regulatory role of the Rab27 effector exophilin5 in allergic airway inflammation
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥西 勝秀、王 昊、泉 哲郎
2. 発表標題 Rab27エフェクター-exophilin-5のアレルギー反応における役割
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥西 勝秀、王 昊、泉 哲郎
2. 発表標題 Rab27エフェクター-exophilin-5のアレルギー性気道炎症における新奇の役割の解明
3. 学会等名 第56回日本臨床分子医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星野 圭司、奥西 勝秀、泉 哲郎
2. 発表標題 Rab27エフェクターによる抗原特異的Th2応答の制御機構の解明
3. 学会等名 第65回北関東医学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Okunishi, Katsuhide
2. 発表標題 Rab27 effector exophilin5 regulates IL-33 signaling in allergic immune responses
3. 学会等名 第46回日本免疫学会総会
4. 発表年 2017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 遺伝生化学分野 泉研究室 <a href="http://molend.showa.gunma-u.ac.jp/">http://molend.showa.gunma-u.ac.jp/</a>
---

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