

平成23年 5月31日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2009 ～ 2010
 課題番号：21790083
 研究課題名 (和文) CFTR 機能不全によるアレルギー・気道炎症の分子病態の
 解析とその治療応用
 研究課題名 (英文) Analysis of Molecular Pathogenesis of Allergy and Pulmonary
 Inflammation by CFTR Deficiency and its Therapeutic Application
 研究代表者
 首藤 剛 (SHUTO TSUYOSHI)
 熊本大学・大学院生命科学研究部・講師
 研究者番号：80333524

研究成果の概要 (和文)：CFTR の破綻により発症することで知られるアレルギーや気道炎症との関連性を明らかにすることを目的とした。その結果、変異型 CFTR は、セリンプロテアーゼ依存的に 25 kDa の断片を産生するが、この断片は、炎症関連遺伝子 TLR2 の発現制御には関与しないことが示された。また、CFTR の破綻は、ダニ寄生依存的な皮膚ケラチノサイトからの NGF の発現上昇・末梢感覚神経の伸長を惹起し、掻痒症状を強めることが示された。

研究成果の概要 (英文)：We sought to understand the mechanisms responsible for the phenotype of allergy and pulmonary inflammation by CFTR deficiency. Although we found the serine protease-dependent production of 25kDa fragment derived from mutated CFTR, the fragment did not seem to be involved in the regulation of TLR2 gene expression. We further concluded that CFTR in keratinocytes plays a critical role for the regulation of peripheral nerve function and pruritus sensation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：薬理学, 分子生物学

1. 研究開始当初の背景

cAMP 依存性の Cl⁻イオンチャネル cystic fibrosis transmembrane conductance

regulator (CFTR) の変異 (ΔF-508-CFTR) は、白色人種間で最も頻度が高い致死性の遺伝性疾患、嚢胞性線維症 (CF) の発症を惹起

する。CF 患者は、通常、その平均寿命は約 30 歳と短命である。その主な原因は、進行性の呼吸器の閉塞と慢性的な細菌感染とそれに伴う持続的炎症であるとされるが、これは、気道上皮組織において CFTR の機能低下または変異 CFTR の存在が、細胞内外の環境を著しく変化させることに起因するものである。しかしながら、CFTR の機能低下または変異 CFTR の気道上皮細胞における存在が、どのように細胞内環境に影響を与え細菌感染への感受性増大とそれに伴う炎症病態の誘発を引き起こすのかについては長年不明であった。このような背景の中、本申請者は、CF 患者由来の気道上皮細胞における遺伝子発現制御機構の破綻メカニズムの解明を試みた。その結果、CF 気道上皮細胞において toll-like receptor-2 (TLR2) の発現量および応答性が上昇していることを見出した。また、そのメカニズムに TLR2 プロモーター領域の DNA メチル化異常が関与していることを明らかにした (Shuto. T., et. al. *FASEB J*, 2006)。しかしながら、CF 細胞において TLR2 の DNA メチル化制御機構が破綻するメカニズムに関しては不明である。

一方、CFTR の機能低下または変異 CFTR の存在は、上記 TLR2 以外にも多くの遺伝子の変化を誘発し、様々な症状を惹起する。興味深いことに、近年 $\Delta F508$ -CFTR 発現マウスは、Th2 応答が亢進していることが報告された (Allard JB. et al., *J. Immunol.* 2006)。 $\Delta F508$ -CFTR を有する CF 患者は、アトピー性皮膚炎や喘息の罹患率が高いという疫学調査とあわせて考えると $\Delta F508$ -CFTR はアレルギー様症状の誘発に寄与する可能性が高い。しかしながら、CFTR の機能低下または変異 CFTR が、どのようにアレルギー様病態を引き起こすのかについての分子基盤については全く不明である。

2. 研究の目的

本研究では、難治性遺伝性疾患である CF の原因遺伝子である CFTR に着目し、CFTR の破綻により発症することで知られる種々の

病態 (アレルギー、気道炎症) との関連性を明らかにすることを目的とする。具体的には、CFTR の制御破綻がどのように細胞内環境を変化させ、病態発症に寄与するかについてのコンセンサスを得るため、第 1 に、変異型 CFTR ($\Delta F508$ -CFTR) による炎症関連遺伝子 TLR2 の発現制御機構の詳細について、 $\Delta F508$ -CFTR 発現上皮細胞に存在する 25 kDa-CFTR 断片の観点から明らかにする。また、第 2 に、 $\Delta F508$ -CFTR 発現マウスにおけるダニ寄生依存的な掻痒病態について、アレルギー誘発遺伝子 nerve growth factor (NGF) 発現誘導の観点から検討する。

3. 研究の方法

- (1) 25 kDa-CFTR 断片の CFBE41o⁻ 細胞特異性を検討する。
- (2) 25kDa-CFTR 断片の 2 次元電気泳動により解析する。
- (3) 25kDa-CFTR 断片の産生機構を検討する。
- (4) TLR2 発現に対する 25kDa-CFTR 断片の影響を検討する。
- (5) 掻破行動・皮膚の組織学的変化に対する CFTR 変異の影響を調べる。
- (6) CFTR 変異マウスの掻痒感誘発に対する NGF の関与を調べる。
- (7) 野生型 C57BL マウスの掻痒感誘発に対する CFTR チャネル阻害剤の影響を検討する。
- (8) HaCaT cell における CFTR の機能抑制時の NGF 産生への影響を調べる。

4. 研究成果

- (1) 25 kDa-CFTR 断片の CFBE41o⁻ 細胞特異的な発現上昇

まず、内因的に野生型 CFTR を発現する気管支上皮細胞である 16HBE14o⁻ 細胞、及び内因的に $\Delta F508$ -CFTR を発現する気管支上皮細胞である CFBE41o⁻ 細胞より Whole cell lysate を抽出し、抗 CFTR-RD 抗体および抗 CFTR-C 末端抗体を用いた Western blot 法により CFTR 断片の検出を行った。また、negative control として内因性 CFTR の発現が mRNA のレベルから検出できない A549

細胞を用いた。その結果、抗 CFTR C 末端抗体で認識されるバンド（約 25kDa）の発現が CFBE41o⁻ 細胞において高かった。一方、抗 CFTR-RD 抗体ではこのような特異的バンドは検出されなかった。次に、抗 CFTR C 末端抗体で検出されるバンドが CFTR 由来の断片であるか否か検討するために、CF 気道上皮細胞に WT-CFTR あるいは ΔF508-CFTR を安定高発現した細胞（CFBE-WT、CFBE-ΔF）を用いた。その結果、CFBE41o⁻ に比べて CFBE-WT で発現がわずかに増加しており、CFBE-ΔF ではさらにその断片の発現が増加していた。以上の結果より、CFBE41o⁻ においてこの断片の発現量は ΔF508-CFTR の発現量に比例することが示され、抗 CFTR C 末端抗体で検出されるバンドが CFTR 由来の断片であることが示唆された。以下、このバンドを 25 kDa-CFTR 断片と記載する。さらに、CFBE41o⁻ 以外の CF 細胞における 25 kDa-CFTR 断片の発現を検討するために、内因的に ΔF508-CFTR を発現する気管支上皮細胞である IB3 細胞および IB3 細胞に WT-CFTR を安定高発現した細胞、内因的に ΔF508-CFTR を発現する気管上皮細胞である CFTE29o⁻ 細胞、内因的に ΔF508-CFTR を発現する膵臓腺ガン細胞である CFPAC-1 細胞を用いた。その結果、これらの細胞において 25 kDa-CFTR 断片の発現量は CFBE41o⁻ と比べて低かった。以上の結果より、25 kDa-CFTR 断片は CFBE41o⁻ 細胞特異的に発現上昇することが示された。

(2) 25kDa-CFTR 断片の配列同定

これまでの検討により、抗 CFTR C 末端抗体で認識される約 25 kDa のバンドは CFTR 由来の断片であることが示唆された。しかし、このバンドが CFTR 由来の断片であるという直接的な証拠は得られていない。そこで、25 kDa-CFTR 断片の配列を同定するために種々の検討を行った。まず、25kDa-CFTR 断片を濃縮して配列を同定するために、抗 CFTR C 末端抗体を用いた免疫沈降法を行った。その結果、全長の CFTR が免疫沈降できる条件で、

25kDa-CFTR 断片は免疫沈降できなかった。次に、25 kDa-CFTR 断片を多く含む細胞内画分を同定するために、細胞分画法を用いた。CFBE41o⁻ 細胞および CFBE-ΔF 細胞に細胞質画分、膜画分、核画分に分画し、25 kDa-CFTR 断片の発現を Western blot 法により解析した。その結果、25 kDa-CFTR 断片は両方の細胞とも膜画分において発現が高かった。CFBE-ΔF 細胞においては核画分でも膜画分と同程度に発現が認められた。そこで、25 kDa-CFTR 断片のスポットを同定するために、16HBE14o⁻ 細胞および CFBE41o⁻ 細胞、CFBE-ΔF 細胞の膜画分を二次元電気泳動法により展開した後、抗 CFTR-C 末端抗体を用いて Western blot 法を行った。その結果、分子量が約 25 kDa で、等電点が約 9 のスポットの発現が CFBE41o⁻ 細胞で見られ、CFBE-ΔF 細胞でさらに発現が高かった。さらに、このスポットの配列を同定するために、16HBE14o⁻ 細胞および CFBE-ΔF 細胞の膜画分を二次元電気泳動法により展開した後、銀染色法を行った。その結果、25 kDa-CFTR 断片と思われる特異的なスポットは検出できなかった。

(3) 25kDa-CFTR 断片の産生機構の検討

25 kDa-CFTR 断片の産生に関するプロテアーゼを同定するために、各種プロテアーゼの阻害剤を用いて CFBE41o⁻ 細胞における 25 kDa-CFTR 断片の発現変化を Western blot 法により解析した。まず、CFTR の発現制御への関与が報告されているプロテアソームとカルパインについて検討した。その結果、プロテアソーム阻害剤である MG132 の用量依存的に 25 kDa-CFTR 断片の発現が抑制された。一方、カルパイン阻害剤である ALLN の処理では 25 kDa-CFTR 断片の発現変化は認められなかった。次に、プロテアソームの主要な触媒活性であるトリプシン様プロテアーゼとキモトリプシン様プロテアーゼの関与を検討した。その結果、キモトリプシン様プロテアーゼの阻害剤である TPCK の用量依存的に 25 kDa-CFTR 断片の発現が抑制された。また、トリプシン様プロテアーゼの阻

害剤である TLCK の処理では 25 kDa-CFTR 断片の発現がわずかに抑制された。以上の結果より、25 kDa-CFTR 断片の産生にはプロテアソームの特にキモトリプシン様プロテアーゼが関与することが示唆された。

(4) TLR2 発現に対する 25kDa-CFTR 断片の影響の検討

25 kDa-CFTR 断片は抗 CFTR C 末端抗体により認識されることから、CFTR の C 末端領域を含むことが予想される。そこで、CFTR C 末端領域をクローニングし、25 kDa-CFTR 断片の類似体を作成することで、25 kDa-CFTR 断片の TLR2 発現に対する影響を検討した。まず、クローニングした CFTR C 末端領域のコンストラクト (NBD2 construct) と 25 kDa-CFTR 断片との発現パターンを比較するために、16HBE140⁻ 細胞に NBD2 construct を過剰発現し、CFBE-ΔF 細胞に発現する 25 kDa-CFTR 断片との比較を Western blot 法により検討した。その結果、NBD2 construct の分子量は 25 kDa-CFTR 断片よりも大きく、約 32 kDa であった。この条件下で NBD2 construct 過剰発現による TLR2 発現変化を検討した。その結果、NBD2 construct を過剰発現しても TLR2 mRNA 発現は変化しなかった。25kDa-CFTR 断片の産生機構の検討から、CFBE410⁻ 細胞における TPCK の処理により 25 kDa-CFTR 断片の発現は減少することが示されている。そこで次に、TPCK 処理による TLR2 発現変化を検討した。その結果、TPCK を処理しても TLR2 mRNA 発現は変化しなかった。以上の結果より、25kDa-CFTR 断片は CFBE410⁻ 細胞における TLR2 発現上昇に関与しないことが示唆された。

(5) 搔破行動に対するCFTR変異の影響

まず、皮膚アレルギー症状として、最も顕著な搔痒感について検討を行った。本研究では、ダニ感作により CFTR ホモ変異マウス (ΔF508/ΔF508) において後肢による搔破行動が誘発されるか否か検討した。その結果、ダニ感作 3 週目から、NC/Nga マウスと同様に、

経時的に CFTR ホモ変異マウス (ΔF508/ΔF508) の搔破行動数が野生型マウス (+/+) と比較して有意に増加した。

(6) 皮膚の組織学的変化に対するCFTR変異の影響

H. E. 染色により、ダニ感作 8 週後の吻側背部の病理組織学的観察を行うと、NC/Nga マウスでは、慢性的な搔破行動に起因すると思われる表皮の肥厚ならびに真皮層の線維化 (線維芽細胞と膠原繊維の増生) が顕著に認められた。CFTR ホモ変異マウス (ΔF508/ΔF508) においても、NC/Nga マウスより軽度であるが、野生型マウス (+/+) と比較して表皮肥厚ならびに真皮層の線維化が認められた。また、真皮層が線維化した領域の、皮膚サンプル全体の長さに対する割合を定量化したところ、NC/Nga マウスおよび CFTR ホモ変異マウス (ΔF508/ΔF508) において、野生型マウス (+/+) に対し有意に高い割合で真皮層の線維化が生じていた。

次に、表皮中知覚神経量を調べるため、マウスの皮膚組織 (ダニ感作 8 週後の吻側背部皮膚) を、知覚神経終末のマーカーである Protein Gene Product (PGP) 9.5 を用いて免疫組織化学染色を行った。その結果、NC/Nga マウスおよび CFTR ホモ変異マウス (ΔF508/ΔF508) の皮膚において、表皮中への知覚神経の伸長が数多く見られた。表皮内の知覚神経量を画像処理により定量化し、CFTR の遺伝子変異の有無について比較した結果、CFTR ホモ変異マウス (ΔF508/ΔF508) および NC/Nga マウスにおいて、野生型マウス (+/+) に対して表皮中の知覚神経量が有意に多かった。

(7) CFTR変異マウスの搔痒感誘発に対する NGFの関与

これまでの結果より、CFTR ホモ変異マウス (ΔF508/ΔF508) の顕著な搔破行動は、表皮内への知覚神経 C 線維の伸長により、痒みに対する感受性が増加している事が示唆された。そこで、次に、CFTR ホモ変異マウスでみられ

た顕著な搔破行動が、神経成長因子 (Nerve Growth Factor, NGF) 過剰産生に伴う知覚神経C線維の表皮内への伸長によるものかどうかを検討した。CFTRホモ変異マウス皮膚組織におけるNGF量を、免疫組織化学染色法により検討した。その結果、NC/Ngaマウスにおいて、過去の知見通り、表皮層において強いNGF陽性の染色が見られた。また、CFTRホモ変異マウスにおいても、野生型マウス (+/+), CFTRヘテロ変異マウス (+/ Δ F508) に比べ、表皮中のNGF陽性染色が顕著に認められた。以上の結果より、CFTRホモ変異マウスの顕著な搔破行動は、NGF過剰産生に伴う知覚神経C線維の表皮内への伸長により、痒みに対する感受性が増加していることに起因することが示唆された。

次に、過剰に産生されたNGFがCFTRホモ変異マウス (Δ F508/ Δ F508) の搔破行動誘発に関与しているか否かを明らかにするために、NGFの高親和性受容体である (tropomyosin-related kinase A, TrkA) の阻害剤K252aの頻回投与により、ダニ感作により誘発される搔破行動が抑制されるかを調べた。CFTRホモ変異マウスを、皮膚炎を発症したNC/Nga系雄性マウスとconventional環境での同居飼育 (ダニ感作) を行った。ダニ感作開始日から、各マウスの吻側背部 (頸背部) に、週に5回K252aを経皮投与して、搔破行動数を観察した。その結果、K252a投与により、搔破行動の増加が抑制される傾向が見られ、3週目において有意な搔破行動抑制効果が見られた。

(8) 野生型C57BLマウスの搔痒感誘発に対するCFTRチャンネル阻害剤の影響

次に、正常型CFTRを有する野生型C57BLマウスのCFTR機能阻害をした時に、CFTR変異マウスと同じ様な表現型を示すかを検討した。まず、皮膚炎を発症したNC/Nga系雄性マウスとconventional環境で同居飼育 (ダニ感作) した野生型C57BL/6に、CFTR機能を阻害する薬物であるGlibenclamide (GLB) を、ダニ感作の期間中10 mg/kg/dayで経口投与し、搔破行動数が誘発されるか否かを検討した。その結果、

ダニ感作5週目から、GLB投与群において、搔破行動数の増加傾向が見られ、感作6週目においてvehicle群と比較して有意に搔破行動数の増加が観察された。なお、SPF環境下で飼育した群においては、GLB投与群もvehicle群と同じく搔破行動は見られなかった。以上の結果から、CFTR機能低下が搔破行動誘発に関与する事、また、それには環境因子 (ダニの曝露) が必要であることが示唆された。

(9) HaCaT cellにおけるCFTRの機能抑制時のNGF産生への影響

ヒトケラチノサイトの細胞株HaCaT cellにおけるCFTRの機能低下時にNGF産生の亢進が見られるか否かを検討した。外来抗原としてダニの抽出物である Mite Extract-Df (*Dermatophagoides farinae*) をCFTR-inh172存在下、HaCaT cellに処理し、NGF mRNA発現量を定量的RT-PCR法により調べた。その結果、CFTR-inh172未処理群 (DMSO群) においては、各抗原による顕著なNGF mRNA発現誘導は見られなかった。しかしながら、興味深い事に、CFTR-inh172 処理群においては、Mite Extract-Dfに対し顕著なNGF mRNA発現誘導が見られた。

変異体 CFTR が特定の遺伝子を制御するメカニズムを明らかにしようとする観点はこれまでにほとんど報告がなく独創的である。また、本研究の興味深い点は、CFTR およびTLR2 を新規アレルギー制御遺伝子として提案する可能性を秘めている点であり、従って、本研究は、CF疾患のみならず、種々のアレルギー疾患の治療薬開発の基礎的情報を提供できるものと思われる。特に、今では、多くのグループから CFTR 活性化薬が報告されるようになってきたことから、本研究が成功すれば、このような化合物の中から新規抗アレルギー薬のシーズが誕生する日が訪れるのもそう遠くはないと思われる。

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 15 件)

- ①Watanabe, K., T. Shuto, M. Sato, K. Onuki, S. Mizunoe, S. Suzuki, T. Sato, T. Koga, M. A. Suico, H. Kai, and T. Ikeda. 2011. Lucidenic acids-rich extract from antlered form of *Ganoderma lucidum* enhances TNF α induction in THP-1 monocytic cells possibly via its modulation of MAP kinases p38 and JNK. *Biochem Biophys Res Commun* 408:18-24. 査読有
- ②Sugiyama, T., T. Shuto, S. Suzuki, T. Sato, T. Koga, M. A. Suico, H. Kusuhara, Y. Sugiyama, D.M. Cyr, and H. Kai. 2011. Posttranslational negative regulation of glycosylated and non-glycosylated BCRP expression by Derlin-1. *Biochem Biophys Res Commun* 404:853-858. 査読有
- ③Hashimoto, Y., T. Shuto, S. Mizunoe, A. Tomita, T. Koga, T. Sato, M. Takeya, M. A. Suico, A. Niibori, T. Sugahara, S. Shimasaki, T. Sugiyama, B. Scholte, and H. Kai. 2011. CFTR-deficiency renders mice highly susceptible to cutaneous symptoms during mite infestation. *Lab Invest* 91:509-518. 査読有
- ④Shuto, T., T. Ono, Y. Ohira, S. Shimasaki, S. Mizunoe, K. Watanabe, M. A. Suico, T. Koga, T. Sato, S. Morino, K. Sato, and H. Kai. 2010. Curcumin decreases toll-like receptor-2 gene expression and function in human monocytes and neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 398:647-652. 査読有
- ⑤Shimasaki, S., T. Koga, T. Shuto, M. A. Suico, T. Sato, K. Watanabe, S. Morino-Koga, M. Taura, S. Okada, K. Mori, and H. Kai. 2010. Endoplasmic reticulum stress increases the expression and function of toll-like receptor-2 in epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 402:235-240. 査読有

〔学会発表〕 (計 37 件)

- ①○首藤 剛, 杉山 崇, 鈴木 伸悟, 佐藤 卓史, 古賀 友紹, Mary Ann SUICO, 楠原 洋之, 杉山 雄一, 甲斐 広文, 糖鎖型および脱糖鎖型 BCRP タンパク質の Derlin-1 による負の翻訳後発現調節, 第 131 回薬学会年会, 2011/3/28-31, 静岡 (静岡県立大学)
- ②首藤 剛, 粘液貯留を呈する新規の閉塞性肺疾患モデルマウス, 第 84 回薬理学会年会, 2011/3/22-24, 横浜 (パシフィコ横浜)
- ③○島崎省吾, 古賀友昭, 首藤 剛, Mary Ann Suico, 佐藤卓史, 渡邊健司, 森野沙緒里, 田浦 学, 岡田誠治, 森 和俊, 甲斐広文, 上皮細胞における小胞体ストレス誘導時の Toll 様受容体 2 発現制御機構の解明, 薬理学会西南部会, 2010. 11. 26, 鹿児島 (かごしま県民交流センター)
- ④○Shuto T., Sugahara T, Mizuno A, Ono T, Matsumoto C, Sakaguchi Y, Koga T, Sato T, Suico MA, Koga-Morino S, Kai H, Mucous obstruction and impaired pulmonary mechanics in airway-specific β -epithelial Na⁺ channel transgenic mice, 薬理学会西南部会, 2010. 11. 26, 鹿児島 (かごしま県民交流センター)
- ⑤首藤 剛, 疾患関連 ABC トランスポーターの発現・機能制御に基づく新たな創薬研究, 第 25 回薬物動態学会, 2010/10/7-9, 埼玉 (大宮ソニックシティ)

〔その他〕

ホームページ <http://www.molmed730.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

首藤 剛 (SHUTO TSUYOSHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号 : 80333524