

令和元年6月17日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15718

研究課題名(和文) RNA結合タンパク質Mex-3Bによるステロイド耐性気管支喘息制御機構の解明

研究課題名(英文) The role of RNA-binding protein Mex-3B in the development of steroid-resistant asthma

研究代表者

山角 祐介 (Yamazumi, Yusuke)

東京大学・定量生命科学研究所・特任助教

研究者番号：40773768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、RNA結合タンパク質Mex-3Bが、好中球の遊走に関わるCXCL2タンパク質の発現量を転写後調節機構によって制御することによって、ステロイド耐性の気管支喘息の発症を制御していることが明らかになった。また、CXCL2抗体の投与やMex-3Bに対するアンチセンス核酸の吸入により、ステロイド耐性気管支喘息のモデルマウスで観察される肺への好中球の蓄積が顕著に抑制されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症喘息とは、既存薬が効きにくい重篤な喘息のことである。重症喘息の患者数は喘息患者全体の10%程度にも関わらず、喘息で亡くなる患者の30-50%をも占める。重症喘息の病態は人によって大きく異なっているため、その発症メカニズムには未だ不明な点が多い。本研究により、CXCL2やMex-3Bの阻害によって、重症喘息の症状が緩和されることが明らかになった。本研究結果により、重症喘息に対する創薬研究の新たな展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：It has recently been shown that in a subgroup of severe asthma cases, neutrophils that infiltrate into the airways play an important role in inflammation. However, the mechanisms underlying this increased neutrophil infiltration are not well understood. Here, using a mouse model of steroid-resistant neutrophilic inflammation, we show that mice deficient for the RNA-binding protein Mex-3B have significantly less neutrophil infiltration in the airways than wild-type mice. We further demonstrate that Mex-3B post-transcriptionally upregulates CXCL2, a chemokine that induces neutrophil chemotaxis and migration. Moreover, we show that treatment with either anti-CXCL2 antibody or anti-Mex-3B antisense oligonucleotide suppresses neutrophilic allergic airway inflammation. These results suggest that Mex-3B-mediated induction of CXCL2 is crucial for steroid-resistant neutrophilic allergic airway inflammation.

研究分野：分子生物学

キーワード：喘息

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息とは、アレルゲンや感染、大気汚染物質など、さまざまな要因により気道に慢性的な炎症が起こり、時に発作的な咳や呼吸困難をきたす病気のこと、全世界で3億人以上もの人々が苦しんでいる。気管支喘息の治療は、発作の原因となる気道炎症を抑えることが主流で、吸入ステロイドの投与によりほとんどの気管支喘息はコントロールできるようになった。一方で、重篤な喘息の中にはステロイドに対する抵抗性を示し、従来の治療法が効かないケースが多く認められる。こうした現状にもかかわらず、ステロイド耐性の分子機構はほとんど明らかになっていないため、有効な治療法は確立されていない。

Mex-3BはRNA結合ドメインを持つタンパク質で、先行研究により、Mex-3Bは特定のRNAに結合することが明らかになっている。しかしながら、Mex-3BがRNAに結合することでどのような機能を発揮しているのか、その生理的な役割に関してはほとんど明らかになっていなかった。我々は、気管支喘息マウスモデルを用い、Mex-3Bが肺胞上皮細胞におけるIL-33の発現を促進することによって気道炎症を促進していることを明らかにした。また、その制御機構を詳細に解析したところ、Mex-3BはIL-33 mRNAに直接結合し、miRNAの機能を阻害することによりIL-33のタンパク質量を増やしていることが明らかになった。さらに、Mex-3Bに対するアンチセンス核酸の噴霧・吸入により気道におけるMex-3Bの発現を抑制することで、気道炎症を抑制できることも明らかにした (Yamazumi et al., 2016 Cell Reports)。

以上の結果と、Mex-3B遺伝子を欠損したマウスが正常に発達し、成体でも異常が認められないことを考慮すると、Mex-3Bを標的とした薬剤は副作用の少ない新機序の気管支喘息治療薬となりうることが期待される。しかしながら、前述のように気管支喘息の大部分はステロイドの投与によりコントロール可能であり、軽度の喘息のみを標的とした治療薬の開発には慎重にならざるを得ない。そこで我々は、Mex-3Bを標的とした創薬の有用性を明らかにするため、IL-33が重症喘息におけるステロイド耐性に寄与しているという報告 (Sejal et al., 2013 J. Allergy Clin. Immunol., Susana et al., 2015 J. Allergy Clin. Immunol.) に着目し、重症喘息の発症におけるMex-3Bの重要性をステロイド耐性気管支喘息モデル (Pieter et al., 2011 Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.) を用いて検証した。その結果、Mex-3B欠損マウスでは重症喘息の指標のひとつである好中球の浸潤が顕著に抑制されており、Mex-3Bがステロイド耐性気管支喘息の病態を制御していることが明らかになった。また予想に反して、炎症時のIL-33の発現量は野生型マウスとMex-3B欠損マウス間で差が認められなかった。これらの結果から、Mex-3Bは気管支喘息モデルとは異なる分子機構でステロイド耐性気管支喘息の発症を制御していると考えられる。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、気管支喘息マウスモデルを用い、RNA結合タンパク質Mex-3BがIL-33の発現を直接促進することによって気道炎症を促進していることを見出している。加えて、Mex-3Bに対するアンチセンス核酸の噴霧・吸入により気道におけるMex-3Bの発現を抑制することで、気道炎症を抑制できることも明らかにした (Yamazumi et al., 2016 Cell Reports) 。さらに最近我々は、Mex-3B欠損マウスにおいてステロイド耐性気管支喘息の発症も抑制されることを見出した。本研究では、Mex-3Bがステロイド耐性気管支喘息を制御する分子機構を明らかにすると共に、重症喘息の治療薬としての抗Mex-3Bアンチセンス核酸の可能性を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、Mex-3Bによるステロイド耐性気管支喘息の制御機構の解明(課題1)と、抗Mex-3Bアンチセンス核酸の治療効果の検証(課題2)を目的とする。課題1に関しては、喘息を誘導した野生型およびMex-3B欠損マウスの肺からRNAを回収し、次世代シーケンサーを用いたRNA sequenceにより発現量に差がある遺伝子群を同定する。また、培養細胞を用いてCLIP-Seq、Ribosomal profilingによる網羅的解析を行い、Mex-3B結合RNAを同定する。これらの遺伝子群のステロイド耐性気管支喘息における生理的役割を明らかにする。課題2に関しては、アンチセンス核酸を噴霧・吸入させたマウスにステロイド耐性気管支喘息モデルを適用し、治療効果を検証する。また、別の重症喘息の実験系を確立し、同様に治療効果を検証する。

4. 研究成果

(課題1)

本研究ではまず、炎症を誘導させたMex-3B欠損マウスで、野生型マウスと比較して発現量に差がある遺伝子の同定を試みた。その結果、Mex-3B欠損マウスでは炎症時のCXCL2、TNF- α 、IL-1 β などの炎症性サイトカインの発現量が減少していることが明らかになった。これら遺伝子群の中で特にCXCL2に関しては、培養細胞を用いた実験によりその発現制御機構を詳細に解析した。Mex-3B抗体を用いたRNP-IP実験、in vitroで合成したCXCL2 mRNA 3' UTR(以下CXCL2 3' UTR)を用いたPull-down実験により、Mex-3BはCXCL2 3' UTRに結合していることが明らか

かになった。さらに、CXCL2 3' UTR をレポーターとした Luciferase assay を行った結果、Mex-3B の過剰発現によってレポーターの活性が上昇したことから、Mex-3B は CXCL2 の発現量を転写後制御機構によって制御していることが明らかになった。

CXCL2 に関しては、好中球の浸潤に関与していることは報告されているものの、ステロイド耐性気管支喘息との関連を示唆する報告はなかったため、CXCL2 に対する中和抗体を用いた実験を行った。その結果 CXCL2 抗体の投与によって、ステロイド耐性気管支喘息モデルにおける好中球の顕著な抑制が認められた。この結果は、Mex-3B が主に CXCL2 の発現量を制御することによってステロイド耐性気管支喘息の病態を制御している可能性を示唆している。

さらに、気道過敏性に対する Mex-3B の明らかにするため、メサコリンを用いた気道過敏性試験を行った。その結果、Mex-3B 欠損マウスでは、好中球の浸潤だけでなく、炎症に伴う気道過敏症が抑制されることが明らかになった。

(課題2)

ステロイド耐性気管支喘息を誘導したマウスに対し、Mex-3B に対するアンチセンス核酸を吸入させ、炎症の軽減が認められるかどうか検討した。その結果、コントロール核酸吸入群と比較して、肺への好中球の蓄積が顕著に抑制されることが明らかになった。また、アンチセンス核酸の吸入により、CXCL2 に加え、IL-1、IL-17、TNF- α などの炎症性サイトカインの mRNA 量が減少することが明らかになった。

本研究で得られた知見のうち、Mex-3B に対するアンチセンス核酸に関しては、治療薬としての特許を取得することができた。また、難治性喘息に対する治療薬としての CXCL2 に対する抗体に関する特許は現在出願中である。

本研究成果は、未だ治療薬のない好中球優勢の重症喘息の治療につながる画期的な成果であり、現在論文投稿中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Oda T, Yamazumi Y, Hiroko T, Kamiya A, Kiriya S, Suyama S, Shiozaki-Sato Y, Akiyama T. Mex-3B induces apoptosis by inhibiting miR-92a access to the Bim-3'UTR. *Oncogene*. 査読有、2018 Sep;37(38):5233-5247. doi: 10.1038/s41388-018-0336-7

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称：難治性喘息の予防又は治療剤をスクリーニングする方法、及び難治性喘息の予防又は治療剤

発明者：秋山徹、山角祐介、佐々木欧、原田広顕

権利者：同上

種類：特許

番号：AT1-2286

出願年：2018

国内外の別：国内

取得状況(計1件)

名称：インターロイキン6、インターロイキン13、TNF、G-CSF、CXCL1、CXCL2、又はCXCL5に起因する疾病の予防又は治療剤をスクリーニングする方法、及びインターロイキン6、インターロイキン13、TNF、G-CSF、CXCL1、CXCL2、又はCXCL5に起因する疾病の予防又は治療剤

発明者：秋山徹、山角祐介、小田健昭、佐々木欧、原田広顕、河府和義

権利者：同上

種類：特許

番号：W02018/008750

取得年：2018

国内外の別：国内

6. 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：佐々木 欧

ローマ字氏名：Sasaki Oh

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。