

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08909

研究課題名(和文) Rabによるオートファジーを介したアレルギー性気道炎症の慢性化機序の解明

研究課題名(英文) Rab controls allergic diseases via regulating autophagy

研究代表者

鈴木 淳平 (Suzuki, Junpei)

愛媛大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20734239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究によって、Rab分子は、アレルギー性疾患の発症に関わるTh2細胞やIL-33受容体陽性Th2 (IL-33R-Th2)細胞分化に対して抑制的に働く可能性を明らかにした。さらにRab分子による制御が報告されているオートファジーは、Th2細胞やIL-33R-Th2細胞分化を促進させる作用を持つ可能性を示した。これら結果から、Rabがオートファジーの調節を介してTh2細胞やIL-33R-Th2細胞分化を制御することが示唆され、本研究によって新たなアレルギー性疾患治療のための標的候補分子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Th2細胞やIL-33R-Th2細胞分化におけるRabの役割やオートファジーの役割は十分に理解されていない。本研究により、Rab分子群の中からTh2細胞分化やIL-33R-Th2細胞分化の制御に関わるRab分子を3つ同定した。さらに、Rabを介したオートファジーの調節がTh2細胞分化やIL-33R-Th2細胞分化を制御する可能性を新たに見出した。

研究成果の概要(英文)：Th2 cells and IL-33R-Th2 cells induces allergic diseases by producing Th2 cytokines. This study shows that Rabs inhibited the induction of differentiation of Th2 cells and IL-33R-Th2 cells. It has been reported that autophagy is regulated by Rabs. The differentiation of Th2 cells and IL-33R-Th2 cells was suppressed by inhibition of autophagy. These results suggested that Rab regulated the induction of Th2 and IL-33R-Th2 cell differentiation via controlling autophagic flux. The regulation of Rabs and autophagy might be a novel therapeutic target molecules for allergic diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：Rab オートファジー アレルギー性疾患

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国において喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎や食物アレルギーといったアレルギー性疾患の罹患率は急速に増加しており、全人口の約2人に1人が何らかのアレルギー性疾患に罹患している。アレルギー性疾患の原因のひとつとなる2型慢性アレルギー性炎症は、対症療法やステロイドで十分に制御可能であるとされているため、アレルギー性疾患の根治につながる分子標的治療薬の開発研究は立ち後れている。近年、ステロイドでコントロール不能な難治性の喘息に対する治療薬としてIL-5を標的としたヒト化モノクローナル抗体が、本邦において認可された。これは、IL-5を標的とする治療が重症の2型慢性アレルギー性炎症の治療に有用であることを示している。一方で、抗体医薬は高価であり、投与経路も限定される点が問題となっている。また、前述したように、現在のアレルギー性疾患の治療は対症療法であるため、長期に渡る継続投与が必要となり、患者の生活の質的低下や社会的・経済的な影響が大きい。そのため、2型慢性アレルギー性炎症の発症と病態形成機構を解明し、その制御法を見出すための研究は、アレルギー重症化の予防や根治を含む新規治療法の開発に大きく貢献できる可能性がある。アレルギー性疾患の発症や病態には、CD4陽性ヘルパーT(Th)細胞のサブセットであるTh2細胞の過剰な活性化が深く関わっている。近年、Th2細胞の亜集団でIL-33受容体を発現するTh2(IL-33R-Th2)細胞が、抗原非依存的にIL-5やIL-13を大量に産生し、2型慢性アレルギー性炎症の発症や病態形成の大きな要因となることが分かってきた。しかし、IL-33R-Th2細胞の分化や抗原非依存的な機能発現機構には、未だ不明な点が多い。私たちはこれまでに、低分子化合物SH-2251が、IL-5産生Th2細胞の分化とIL-5産生を強く抑制し、アレルギー性気道炎症マウスモデルの病態を改善することを報告してきた(Suzuki et al. *PLoS One* 2013)。さらに、SH-2251がIL-33R-Th2細胞分化を低下させ、抗原非依存的なIL-5/IL-13産生を低下させることを見出している。そのメカニズムを解明するため、SH-2251の結合分子を探索し、SH-2251誘導体の結合分子として低分子Gタンパク質に属するRab分子群を同定した。そこで、本研究は、Th2細胞およびIL-33R-Th2細胞分化・機能におけるRab分子の役割の解明を目的とした。

2. 研究の目的

SH-2251誘導体の結合分子として同定したRabは、Rasスーパーファミリーに属する低分子量Gタンパク質である。Rabファミリーは約60の分子群から構成されており、これまでに8種のRab分子群、Rab1a、Rab1b、Rab5c、Rab8a、Rab10、Rab11b、Rab12、Rab35がSH-2251誘導体と結合することを確認している。Rabはオートファジーや小胞輸送など幅広く細胞機能の調節に関わることが報告されているが、T細胞におけるRabの機能解析は進んでいない。そこで本研究は、Th2細胞、IL-33R-Th2細胞分化・機能制御におけるRabの役割を解明することで、アレルギー性疾患治療の新たな開発戦略の提示を目指す。

3. 研究の方法

*In vitro*解析は、マウス由来のCD4陽性T細胞をIL-2、IL-4、抗IFN- γ 抗体存在下で固相化抗TCR β 抗体と抗CD28抗体で2日間刺激後、IL-2で増殖させた細胞を用いて行った。Rab分子のTh2細胞、IL-33R-Th2細胞分化・機能における役割は、レトロウイルスベクターを用いた過剰発現系とCRISPR-Cas9を用いたノックアウト系により評価した。過剰発現系では、CD4T細胞をIL-2、IL-4、抗IFN- γ 抗体存在下で抗TCR β 抗体と抗CD28抗体で2日間刺激後、レトロウイルスを介してRab分子の遺伝子を導入した。CRISPR-Cas9システムを用いたノックアウト系では、T細胞特異的Cas9発現マウス由来のCD4T細胞をIL-2、IL-4、抗IFN- γ 抗体存在下でTCR β 抗体と抗CD28抗体で1日間刺激後、Rab gRNAを導入した。細胞はアッセイ日までIL-2/IL-4存在下で培養した。

4. 研究成果

Th2細胞・IL-33R-Th2細胞分化・機能に関与するRab分子の同定

Rabファミリーは約60種の分子から構成されている。私たちはこれまでに、Rab1a、Rab1b、Rab5c、Rab8a、Rab10、Rab11b、Rab12、Rab35がSH-2251誘導体と結合することを確認している。はじめに、Th2細胞分化に影響を与えるRab分子同定のため、レトロウイルスベクターを用いた過剰発現系を用いて解析した。各Rab分子を過剰発現した結果、IL-5産生細胞の割合がコントロールTh2細胞のくらべ、Rab1b、Rab8a、Rab35導入Th2細胞で中程度に低下した。また、IL-4、IL-13産生細胞は、コントロールTh2細胞にくらべ、Rab1b導入細胞で中程度に抑制されたが、Rab8a、Rab35導入細胞では大きな差は見られなかった。これらのことから、Rab1bは、Th2細胞分化に対し抑制的に働くことに対し、Rab8a、Rab35はIL-5を産生するTh2細胞を選択的に抑制する可能性が考えられた。次にCRISPR-Cas9システムを用いたノックアウトシステムを用いて解析を行った。当初計画していたCRISPR-Cas9システムではCas9タンパク質とgRNAを同時に細胞に導入したため、ノックアウト効率が悪く、解析が困難であった。そこで、Cas9 Tgマウスを購入し、T細胞特異的Cas9 Tgマウスを作製し、gRNAのみを導入することでノックアウト

ト効率を上昇させた。Cas9 Tg CD4 T細胞を用いて標的 Rab gRNA を導入した結果、コントロール Th2 細胞にくらべ Rab1b ノックアウト Th2 細胞で、IL-5 産生細胞がわずかに増加した。一方で、Rab8a, Rab35 をノックアウトしても IL-4/IL-5/IL-13 産生 Th2 細胞の割合はコントロールと比較して大きな差は認められなかった。これら結果から、Th2 細胞分化において Rab は、分子群間で冗長性を持ち、1 つの Rab 分子が機能不全をおこしても別の Rab 分子が代替りの機能を担うため、ノックアウトの作用が得られない可能性が考えられた。

次に IL-33R-Th2 細胞分化における Rab 分子の役割について抗原非依存的なサイトカイン (IL-4/IL-5/IL-13) 産生を指標に検討した。Rab を過剰発現させた Th2 細胞を IL-33R-Th2 細胞分化条件下で培養した結果、コントロール細胞に比べ Rab1b と Rab8a 導入細胞で抗原非依存的な IL-5 と IL-13 を産生する細胞の割合が減少した。一方で、Th2 細胞分化の抑制作用を持つ Rab35 を過剰発現させても抗原非依存的なサイトカイン産生に大きな影響は与えなかった。つぎに、CRISPR-Cas9 によるノックアウト系で同様の検討をおこなったが、Rab1b, Rab8a, Rab35 ノックアウトはコントロール細胞に比べ大きな差はみられなかった。これら結果も、Th2 細胞分化のノックアウト系と同様に Rab 分子の機能的代償作用のため、ノックアウトの作用が得られなかったと考えられる。以上の結果から、IL-33R-Th2 細胞分化において、Rab1b と Rab8a は抑制的に働くことが示唆された。

Rab による Th2 細胞・IL-33R-Th2 細胞分化・機能制御機構の解明

前述の通り Rab 分子は細胞内のオルガネラ膜に結合し、小胞輸送に関わることで細胞機能を制御することに加え、オートファジーを促進する分子であることも報告されている。そのため、Th2 細胞分化、IL-33R-Th2 細胞分化におけるオートファジーの役割について、オートファジー阻害剤を用いて検討した。その結果、オートファジー阻害剤で処理した Th2 細胞では、IL-5/IL-13 産生 Th2 細胞の割合がコントロール細胞に比べ著しく低下した。一方で、IL-4 産生細胞の割合に大きな影響を与えなかった。これらのことから、オートファジーは、Th2 細胞の中でも IL-5 と IL-13 を産生する Th2 細胞分化を促進する作用を持つと考えられた。さらに、オートファジー阻害剤を処理することで、Th2 細胞の IL-33 受容体の発現が低下した。この結果から、オートファジーは IL-33R-Th2 細胞分化を促進させる作用を持つと考えられた。次に、Rab 分子の Th2 細胞におけるオートファジーの役割解析を目指した。これまでに、T 細胞におけるオートファジー解析法が十分に確立できていなかったため、本研究では、その手法の確立を行った。CD4 T 細胞は、ヘルパー T 細胞サブセットが存在し、サブセットごとのオートファジー状態が異なることが予想されるため、本研究ではサブセットの影響が少ない CD8 T 細胞を用いて検討し、オートファジー関連分子である LC-3 の発現量を指標としたオートファジーフラックス解析法やオートファジーに関連するリソソームの pH や Ca²⁺ 状態を生細胞で検討するための手法を確立した。

以上の解析結果から、Rab1b, Rab8a, Rab35 が Th2 細胞分化に対して抑制的に働くことが考えられた。さらに、Rab1b と Rab8a は IL-33R-Th2 細胞分化に対しても抑制的に働く可能性がある。SH-2251 処理による Th2 細胞分化、IL-33R-Th2 細胞分化の抑制作用に比べ、Rab の過剰発現系・ノックアウト系で影響を受ける作用が弱いことから、SH-2251 は複数の Rab 分子または他の分子と同時に作用し、その機能を発揮する可能性が考えられる。そのため、Rab は単独でなく協調的に働くことで Th2 細胞分化及び IL-33R-Th2 細胞分化を制御する可能性が示唆された。Th2 細胞のオートファジーを阻害することで IL-5 産生 Th2 細胞分化が強く抑制されたことから Rab を介したオートファジーの調節による Th2 細胞分化の制御機構の存在が示唆された。Th2 細胞において、本研究で同定した Rab 分子のオートファジーに与える影響は不明である。そのため、本研究で確立したオートファジー解析法を用いて、その詳細について解析する予定である。また、ビオチン標識した SH-2251 を新たに作製し、免疫沈降法と質量分析を行うことで、Rab 分子以外の SH-2251 結合分子を複数同定した。今後、新規同定分子を含め、Rab の Th2 細胞分化、IL-33R-Th2 細胞分化における役割を明らかにし、Th2 細胞、IL-33R-Th2 細胞の制御を介した新規アレルギー治療法の開発につなげたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Junpei Suzuki, Amane Konishi, Toshihiro Yorozuya, Msakastu Yamashita
2. 発表標題 The tumor suppressor menin inhibits CD8 T cell senescence by regulating autophagy
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 鈴木淳平、川上良介、松田正司、松本哲、今村健志、山下政克
2. 発表標題 腫瘍抑制因子Meninはオートファジーとライソソーム機能の調節を介してT細胞老化を制御する
3. 学会等名 第21回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------