

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：34504

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16508

研究課題名(和文) 嚢胞性線維症の非感染炎症応答における新規CFTR相互作用受容体の生理的意義の解明

研究課題名(英文) Physiological role of CFTR interaction receptor under sterile inflammatory response in cystic fibrosis

研究代表者

福田 亮介 (Fukuda, Ryosuke)

関西学院大学・理工学部・助教

研究者番号：90825308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：嚢胞性線維症(Cystic fibrosis:CF)における気道非感染性炎症の発症にCFTRの新規相互作用タンパク質として同定されたEPHA2受容体のCFTRの発現異常に伴うシグナル変化が関与することが示された。機能的なCFTRはEPHA2とリガンドとの結合を促進することでEPHA2のリガンド非依存的経路を抑制し、炎症を抑制することが示された。EPHA2リガンド非依存的経路及び下流のERKシグナル経路の阻害はCF患者由来初代培養気道上皮細胞においても感染非依存的な炎症を抑制する効果を示した。本結果からCFにおける慢性炎症の治療標的としてEPHA2経路の有用性を新たに見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

呼吸器慢性炎症はCF病態増悪の根本的な原因であり、EPHA2は病態進行を遅延させる治療法の有用な治療標的になり得る。またCFTR機能異常はCFのみならず感染性呼吸器疾患やCOPDにおいても報告されており、種々の呼吸器炎症病態に本課題で見出された機構が関与している可能性がある。今後、EPHA2を標的とした炎症抑制薬の評価を行なうことで、様々な呼吸器炎症における有効性を明らかにできると考える。また、本課題中に開発したEPH-EFN結合性評価法を応用することで網羅的な生細胞での結合試験法の確立にも至り、幅広い疾患におけるEPH受容体の重要性を議論するための基盤構築も成し得た。

研究成果の概要(英文)：This research has been shown that activation of EPHA2 ligand-independent signaling associated with CFTR expression abnormalities are involved in the development of sterile airway inflammation in cystic fibrosis (CF). Constitutive expression of functional CFTR facilitates binding of EPHA2 and its ligand EFNA1 and attenuates EPHA2 ligand-independent pathways dependent inflammation during air-liquid interface culturing in CFBE cells. EPHA2 ligand-independent pathways and downstream ERK signaling pathways inhibition showed the effect of suppressing sterile inflammation in primary cultured airway epithelial cells derived from CF patients. These results suggest that usefulness of the EPHA2 pathway as a therapeutic target for chronic inflammation in the early stage of CF and also in the CFTR-deficiency associated disease such as COPD.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：呼吸器炎症 上皮細胞炎症応答 嚢胞性線維症 CFTR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

嚢胞性線維症(Cystic fibrosis:CF)の患者において、生後まもなく生じる感染非依存的な呼吸器炎症応答機構は明らかにされていなかった。CFは形質膜上Cl-チャネルであるCFTRの遺伝子変異に伴う生合成・トラフィッキング異常を原因とすることから、CFTRの形質膜への局在化が生じないことでCFTRの形質膜インタラクトームに影響を与え、炎症シグナルが活性化されるのではないかと仮説を立てた。BioID法によるCFTRインタラクトーム解析の結果、CFTRは受容体型チロシンリン酸化キナーゼであるEPHファミリーに属するEPHA2と形質膜、およびエンドソームで相互作用することが示された。EPHA2はリガンド依存的シグナリングとリガンド非依存的シグナリングの異なる経路を司っており、呼吸器炎症における機能も議論が分かれている。CF患者由来気道上皮細胞株であるCFBEを用いた検討の結果、EPHA2のノックダウン及び低分子化合物を用いたEPHA2シグナルの抑制はCFTR非発現によるIL-8産生を顕著に抑制した。そこで本課題ではEPHA2をCF初期における非感染性炎症病態の重要な因子であると仮説を立て、検討を行った。

2. 研究の目的

本課題では(1)CFTRが相互作用を介してEPHA2を制御する機構の解明、(2)EPHA2がCFTR欠失に伴う非感染性炎症誘導の抗炎症治療の標的としての妥当性評価、の2点を達成することを目的とする。究極的には、CF病態初期での慢性炎症を抑制し、病態発症の遅延させることのできるEPHA2を標的とした抗炎症薬の創出や慢性閉塞性肺疾患や感染性呼吸器疾患、ガンなどのCFTR機能低下が関連する疾患(CFTR-related non-CF disease)への応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) CFTRの欠失に伴い活性化されるEPHA2の経路を調べるため、CF患者気道上皮細胞株であるCFBE細胞を用いて、リガンド依存的経路の指標であるY772リン酸化及びリガンド非依存的経路の指標であるS897リン酸化状態をWestern Blot法により調べた。

(1) CFTR欠失による炎症応答に寄与するEPHA2シグナリング経路をEPHA2リン酸化部位変異体を用いて調べた。また、EPHA2下流シグナルの阻害剤による非感染性炎症抑制効果について調べた。

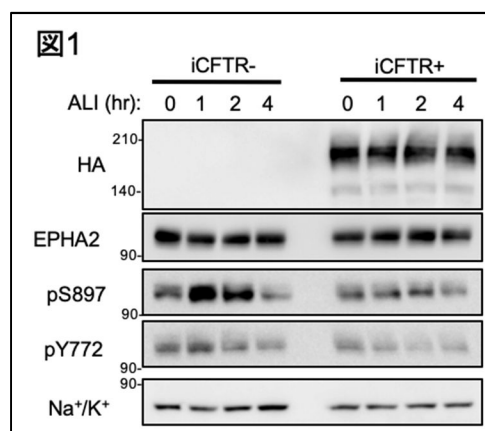
(1) CFTRによるEPHA2の形質膜発現制御機構についてEPHA2の細胞外領域を認識する抗体を用いたCell-surface ELISA法によって調べた。

(1) EPHA2とそのリガンドの結合状態に対するCFTRの影響をNanoBiTシステムを用いた相互作用解析法を用いて調べた。

(2) CF患者由来初代培養気道上皮細胞を用い、CF病態において亢進しているIL-8産生を指標としてEPHA2シグナリング阻害の抗炎症効果について調べた。

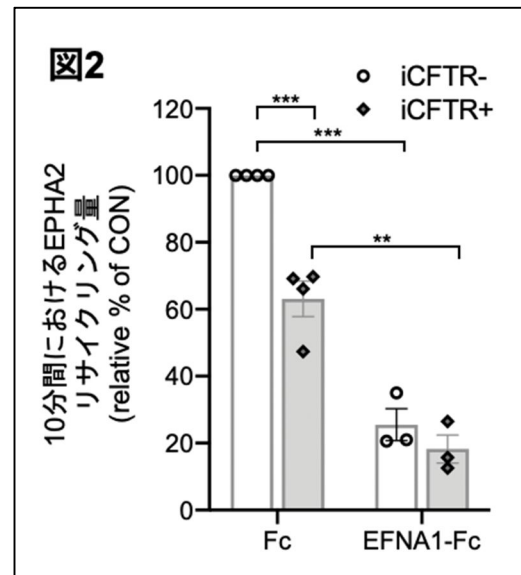
4. 研究成果

(1) HA-tagを付加したCFTRを誘導性に発現可能なCFBE細胞において炎症が誘発される気液界面(Airliquid interface: ALI)培養開始0-4時間においてEPHA2のリン酸化状態変化をWestern Blot法により確認した。その結果、CFTR非存在下においてのみ、ALI後1-2時間においてEPHA2のS897リン酸化が亢進されることが示された(図1)。正常型のEPHA2及び、S897リン酸化部位変異体(S897A-EPHA2)を作成し、CFBE細胞



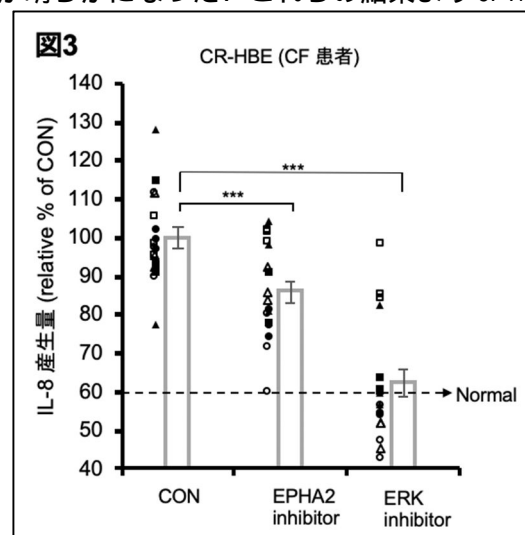
にレンチウイルスを用いて安定発現させた。その結果、WT-EPHA2 過剰発現によって IL-8 産生亢進が生じたが、S897A-EPHA2 過剰発現では IL-8 産生亢進は認められず、EPHA2-S897 リン酸化、つまりリガンド非依存的経路が CFTR 欠失に伴う炎症応答に参与していることが示された。また、EPHA2 リガンド非依存的経路の下流シグナルである ERK シグナリングも ALI 開始から 2-4 時間において CFTR 非発現細胞でのみ活性化がみられ、EPHA2-ERK 経路が重要であることも示唆された。

(1) Cell Surface ELISA 法を用いて CFTR 存在下、非存在下における EPHA2 の形質膜ターンオーバー効率の違いを調べた。まず形質膜 EPHA2 を抗体によりラベルし、20 分間のエンドサイトーシス量を調べたところ、CFTR 発現細胞において細胞内 EPHA2 取り込み量が増加していた。次に、エンドソームからのリサイクリング効率を調べた結果、CFTR 存在下によって EPHA2 リサイクリング量が減少していた (図 2)。また、形質膜 EPHA2 の細胞内取り込みの指標となるユビキチン化量を調べたところ、CFTR 発現によって EPHA2 のユビキチン化が増加することが示された。これら結果より CFTR は EPHA2 と相互作用することでユビキチン化に伴う形質膜ターンオーバーを亢進し、リガンド非依存的シグナリングを制御することで炎症抑制に寄与している可能性が示唆された。



(1) EPHA2 の形質膜からのターンオーバーはリガンドの結合により生じる。そこで CFTR が EPHA2 とリガンドの一つである EFNA1 との結合性に影響を与えるか否かを調べるため、EPHA2 と EFNA1 の細胞外領域に LgBiT または SmBiT を付加したコンストラクトを作製し、別々の細胞に発現させ、共培養させることで EPHA2-EFNA1 結合性を定量的に評価できる系を確立した。CFTR の存在化、非存在化で EPHA2-EFNA1 結合量を調べた結果、EPHA2-EFNA1 結合は CFTR 存在時においてより亢進されることが明らかになった。これらの結果より CFTR は EPHA2-EFNA1 の結合を亢進することで EPHA2 形質膜ターンオーバーを促進しうることが示された。

(2) EPHA2 シグナル阻害剤の CF 誘導性の炎症病態における効果をより臨床に近い環境で評価するため CF の前臨床試験でも用いられる CF 患者由来の初代培養気道上皮細胞 (primary Human Bronchial Epithelial cell: pHBE cell) を入手した。pHBE は増殖能が限られているため、conditional reprogramming (CR) により増殖能を獲得させ CR-HBE を作製し、ALI 培養によって分化誘導する際に放出される IL-8 サイトカイン量を健常人の CR-HBE と比較した。その結果、CR-HBE においても IL-8 産生量が健常人に比べ CF 患者において約 1.6 倍増加することが示された。EPHA2 シグナル阻害剤、ERK シグナル阻害剤の前処理はこの CF-CR-HBE における IL-8 産生誘導を約 20% または 40% 程度低下させた (図 3)。この結果より、CF 患者由来の気道上皮細胞においても EPHA2-ERK シグナル阻害剤の IL-8 産生に対する有効性が示された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福田 亮介
2. 発表標題 CFTR相互作用分子解析に基づく気道上皮非感染性炎症応答機構の解明
3. 学会等名 2019年度 生理研研究会
4. 発表年 2019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
---------	---------