

平成 30 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：2014～2017

課題番号：26461484

研究課題名(和文) アレルギー反応におけるRab27及びそのエフェクター分子の新奇の役割の解明

研究課題名(英文) Novel roles of Rab27 and its effectors in allergic immune responses

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、調節性分泌機構で作用するRab27及びそのエフェクター分子に焦点を当てて、アレルギー反応におけるそれらの機能を明らかにすることを目的に、各種検討を行った。その結果、Rab27関連分子が多種の免疫細胞に発現しており、それらの欠損によりアレルギー応答が修飾されること、すなわち、Rab27関連分子が、アレルギー応答において重要な役割を果たしていることを示唆する結果を得た。そして、いくつかの分子に関して、それらが作用する細胞を同定し、更に、部分的ではあるが、その作用機序を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We sought to clarify the roles of Rab27 and its effectors in allergic immune responses. We confirmed that deficiency of some Rab27 effectors altered antigen-induced Th2 responses, suggesting that they play important roles in allergic immune responses. We also identified cells in which those effectors function to regulate allergic immune responses, and partially clarified the mechanisms of their actions in those immune cells.

研究分野：アレルギー・免疫

キーワード：アレルギー Th2 Rab27 調節性分泌

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息などのアレルギー免疫疾患の患者数は、年々増加傾向にあるが、その治療法の主体は、ステロイドを中心とした非特異的な抗炎症・免疫抑制療法である。疾患特異的で、治癒に結びつくような新規治療法の開発の為に、アレルギー・免疫疾患の更なる病態解明が必要不可欠である。

アレルギーの本質は、抗原特異的な過剰な Th2 応答であり、様々な細胞間の相互作用を経て形成される。その病態形成上、Th2 サイトカインを始めとする各種生理活性物質が重要な役割を果たすことは、周知の事実である。一方、生理活性物質がその生理作用を発揮する為には、細胞外へ分泌され、標的細胞の受容体に結合する必要があるが、これら生理活性物質の分泌や受容体発現の制御機構の詳細は、未だ不明な点が多い。

生理活性物質の分泌機構は、構成性分泌（外的刺激に応じて合成された生理活性物質を、合成に応じて順次細胞外に分泌する）と調節性分泌（合成された生理活性物質を、予め細胞内の小胞に貯蓄しておき、外的刺激に応じて分泌する）に大別される。特に調節性分泌機構は、合成過程ではなく分泌過程を律速段階としているため、外的刺激に速やかに反応でき、高等生物における細胞間の機能調節やシグナル伝達機構として高度に発達・分化している。そして、一部のサイトカインや、受容体等の細胞表面発現分子が、prefomed の形で免疫細胞内の分泌小胞に存在することが報告されており、実態はまだ不明な点が多いものの、それらの細胞内輸送が調節性分泌機構により制御されていることが示唆される。

本研究では、アレルギー反応において調節性分泌機構が重要な役割を果たすという仮説を立て、それを明らかにする為、調節性分泌機構で作用する Rab27 関連分子に焦点を当てながら、各種検討を行った。

2. 研究の目的

調節性分泌機構において中心的な役割を果たす蛋白として、低分子量 GTP 結合蛋白である 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、いずれも、分泌小胞膜上に局在している。そして、エフェクターと呼ばれる、活性型 Rab27 と結合する 11 種類もの分子と協調して、分泌小胞膜の輸送を精巧にコントロールしている。免疫応答では、Rab27a は、細胞傷害性 T 細胞などからの細胞傷害性顆粒の開口放出に必須の分子で、その遺伝子変異は、原発性血球貪食症候群の一つ Griscelli 症候群を引き起こす。一方、Rab27 は、細胞傷害性 T 細胞以外にも、ヘルパー T (helper T, Th) 細胞、樹状細胞、マクロファージ、好酸球、肥満細胞、好中球など、多種の免疫細胞に発現することが知られているが、各免疫細胞におけるその役割は、ほとんど解明されていない。特にアレルギー

反応における Rab27 およびそのエフェクター分子の役割は、全くと言っていい程わかっていない。

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、それらが抗原特異的な Th2 応答の成立において果たす役割を明らかにする為に、後述の、各種解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 各種免疫細胞における Rab27 及びそのエフェクター分子の発現プロファイルの確認：

まず、Rab27a, b 両アイソタイプ、及び 11 種類ある Rab27 エフェクター分子の各種免疫細胞における発現を確認する為に、次に挙げる細胞を、マウスの脾臓や腹腔から、または、適当なサイトカインを用いて骨髄細胞を各免疫細胞に分化誘導させた後、FACS 又は MACS ソーティングにより単離し、各分子の mRNA の発現を real time PCR で検討した：(単離した細胞) T 細胞(Th 細胞、メモリー Th 細胞、ナイーブ Th 細胞、Treg 細胞、Tc 細胞)、樹状細胞、マクロファージ、好塩基球、肥満細胞、好酸球、肺上皮細胞など。

(2) アレルギー疾患マウスモデルを用いた検討：

前述のように、アレルギー反応は、種々の細胞の相互作用の上で成立する。そのような複雑なアレルギー反応全体における各分子の役割を解明するためには、個体レベルでの検討が必要不可欠である。本研究では、アレルギー・免疫疾患モデルのうち、Th2 型優位の気管支喘息モデル(卵白アルブミン (ovalbumin, OVA) /alum で感作後、経気道的な OVA チャレンジで誘導する)と、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。

(3) 肥満マウスモデルを用いた検討：

最近、糖尿病やメタボリック症候群の発症要因として、肥満に伴う脂肪織の慢性炎症の重要性が明らかにされ、この慢性炎症促進因子として、白色脂肪織マクロファージ(adipose tissue macrophage; ATM)が注目されている。一方で、ATM の脂肪蓄積における役割は、これまで不明であった。そこで、脂肪蓄積における ATM の役割を明らかにし、更に、ATM における Rab27 関連分子の役割を明らかにすることを目的に、各種肥満マウスモデルを用いた検討を行った。

4. 研究成果

(1) 免疫細胞における Rab27 関連分子の発現プロファイルに関して：

前述の各種免疫細胞における Rab27 関連分

子の発現プロファイルを確認したところ、Rab27a は全ての細胞に発現しているのに対し、Rab27b は、主に好塩基球、肥満細胞に発現しているのを確認した。また、複数のエフェクター分子が免疫細胞において発現し、更に、一部重複があるものの、各分子が比較的異なった発現パターンを示すことを確認した。

(2) アレルギー疾患マウスモデルの表現型に関して：

アレルギー反応の主体は、外来抗原に対する抗原特異的な Th2 型反応であり、その成立には、Th 細胞や抗原提示細胞などの血球系免疫細胞が重要である事は、周知の事実である。そこで、前述の検討により血球系免疫細胞において発現を確認した Rab27 関連分子に関して、そのアレルギー反応に対する役割を明らかにする為に、アレルギー疾患の代表例である喘息のマウスモデルの表現型を、各分子の遺伝子欠損マウスと野生型とで比較検討した。その結果、血球系細胞に発現する Rab27 エフェクター分子のうち、2 分子に関しては、その分子の遺伝子欠損マウスでアレルギー性気道炎症が増悪する一方、1 分子に関しては、その欠損に伴いアレルギー性気道炎症が減弱することを確認した。更に、後者の分子においては、Th1 型接触性皮膚炎モデルにおいて、皮膚炎が増強することも確認した。

近年、喘息様アレルギー性気道炎症の誘導において、血球系免疫細胞以外に肺構成細胞も重要な役割を果たすことが明らかになっている。肺構成細胞の中でも特に、サイトカインなどの生理活性物質を分泌することが明らかにされた肺上皮細胞のアレルギー反応における重要性が、最近注目されている。そこで、マウス肺の単細胞懸濁液を作成後、CD45⁺CD326⁺肺上皮細胞を FACS sorting により単離し、前述の 3 分子の発現を調べた結果、その欠損によりアレルギー性気道炎症の増悪を認めた 2 分子とも肺上皮細胞に発現していることを確認した。一方、その欠損によりアレルギー性気道炎症が減弱する分子に関しては、肺上皮細胞における発現は確認できなかった。次に、各分子の遺伝子欠損マウスにおけるアレルギー性気道炎症の増悪が、血球系細胞におけるその分子の欠損によるものか、それとも、非血球系細胞におけるその分子の欠損によるものかを明らかにする為に、各分子遺伝子欠損マウスと野生型マウスとで骨髓キメラマウスを作製し、喘息モデルの表現型を比較検討した。その結果、血球系細胞、肺上皮細胞、いずれにおいても発現する 2 分子に関して、血球系細胞におけるその欠損により喘息様気道炎症が増悪することを確認した。以上から、この 2 分子に関しては、血球系免疫細胞において、アレルギー反応を抑制する方向に作用していることが示唆された。

(3) 血球系免疫細胞における Rab27 エフェクター分子の機能解析：

次に、血球系細胞におけるその欠損により喘息様気道炎症が増悪することを確認した上記 2 分子に注目して、それらの作用機構の詳細を明らかにすることを試みた。

まず、対象 2 分子のうち、血球系細胞の中では主に Th 細胞に発現を認めた Rab27 エフェクター分子に関して、Th 細胞移入の系を用いた検討を行い、遺伝子欠損マウス由来 Th 細胞を移入されたマウスで喘息所見の増悪を確認した。この結果から、Th 細胞における当該 Rab27 エフェクター分子の欠損が喘息所見の増悪に重要な役割を果たしていると考えられた。

他方の分子に関しては、当該分子欠損マウス由来の樹状細胞では Th1 応答誘導能が低下しており、この樹状細胞による Th1 応答誘導の低下に伴い、相対的に Th2 応答が亢進していることを示唆する結果を得た。更に、樹状細胞におけるその欠損は、IL-12p70 の産生には影響を与えないが、IL-12p70 の分泌を有意に低下させるという結果を得た。すなわち、この分子が、樹状細胞からの IL-12p70 の分泌を制御しており、その欠損に伴い樹状細胞からの IL-12p70 の分泌が低下する結果、樹状細胞の Th1 応答誘導能が低下することが示唆された。この分子自体は、アレルギー応答の誘導に重要な役割を果たしている Th 細胞や好塩基球にも発現することを確認済みであるが、Th1 や Th2 への分化誘導条件に対する Th 細胞の反応性や、好塩基球の IL-4 分泌に関しては、野生型マウス由来の細胞と、当該分子欠損マウス由来の細胞とで明らかな差異を認めなかった。以上から、この分子の欠損により、樹状細胞からの IL-12p70 の分泌が低下し、その結果、Th1 応答の減弱及び Th2 応答の亢進が誘導される、という機序が示唆された。

樹状細胞では、この分子の他に、前述の、その欠損によりアレルギー性気道炎症が減弱する分子も高発現していた。そこで、この分子に関しても、その作用機序を解明すべく、各種検討を行った。そして、この分子の欠損により、樹状細胞機能には変化は認めないが、IL-3 存在下で骨髓細胞から分化誘導される好塩基球の数や、好塩基球からの IL-4 分泌が低下することを確認した。すなわち、この分子は好塩基球の数や機能を制御しており、その欠損は、好塩基球数や機能の低下につながり、その結果、Th2 応答が減弱するという機序が推測された。

以上、本申請研究により、様々な Rab27 関連分子が、アレルギー応答の成立に必須な各種免疫細胞の多種多様な細胞機能の制御に関与し、その結果、アレルギー反応全体の制御において極めて重要な役割を果たしていることを示唆する結果を得ることが出来た。各分子の生理作用の分子基盤の詳細を解明するための検討は、今後も継続していく予定

である。

(4) 肥満マウスを用いた検討：

申請者の所属研究室は、これまでに、I 型 TGF- 受容体である ALK7 が主に成熟白色脂肪細胞に発現し、その活性化は、脂肪分解酵素の発現を低下させ、その結果、脂肪蓄積を増大させることを報告している。今回、脂肪蓄積におけるマクロファージの役割を明らかにするために、クロドロネート投与により、肥満マウスからマクロファージを除去したところ、ALK7 を発現するマウスにおいてのみ脂肪重量が減少することを確認した。そして、その機序として、ALK7 リガンドである GDF3 が、CD11c⁺ ATM により産生・分泌されることを明らかにした。更に、この CD11c⁺ ATM は、Th2 応答により誘導される M2 マクロファージ様であり、GDF3 を細胞内に貯留していることも確認した (Bu Y, *et al.* Diabetes 2018)。

生体内における ALK リガンドが GDF3 であり、その産生細胞が CD11c⁺ ATM であることは、今回初めて明らかにされた知見であり、CD11c⁺ ATM からの GDF3 分泌機構は未知であるが、上記の知見から、Rab27 関連分子の関与が疑われる。そこで、この ATM における Rab27 関連分子の発現を検討したところ、Rab27 エフェクターの 1 分子が比較的高発現していることを確認した。更に、この分子の欠損により、高齢時や高脂肪食負荷時に体重が減少する傾向 (すなわち、GDF3 分泌低下により誘導される表現型) を認めた。この ATM における Rab27 関連分子の機能の詳細に関しても、解析を継続していく予定である。

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 3 件)

(全論文査読有)

Bu Y, Okunishi K*, Yogosawa S, Mizuno K, Irudayam MJ, Brown CW, and Izumi T. Insulin regulates lipolysis and fat mass by upregulating growth/differentiation factor 3 in adipose tissue macrophages. Diabetes 2018. (in press) (*, corresponding author)

Fan F, Matsunaga K, Wang H, Ishizaki R, Kobayashi E, Kiyonari H, Mukumoto Y, Okunishi K, and Izumi T. Exophilin-8 assembles secretory granules for exocytosis in the actin cortex via interaction with RIM-BP2 and myosin-VIIa. Elife 6: e26174. 2017.

Wettlaufer SH, Penke LR, Okunishi K, and Peters-Golden M. Distinct PKA regulatory subunits mediate PGE2 inhibition of TGF- β 1-stimulated collagen

I translation and myofibroblast differentiation. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 313:L722-L731. 2017.

[学会発表](計 10 件)

奥西 勝秀、歩 云、泉 哲郎

「インスリンの ALK7 依存的な脂肪蓄積作用の解明」

日本糖尿病・肥満動物学会、2018 年

奥西 勝秀

「Rab27 effector exophilin5 regulates IL-33 signaling in allergic immune responses」

日本免疫学会、2017 年

奥西 勝秀、歩 云、與五沢 里美、泉 哲郎

「インスリンは GDF3-ALK7 経路を介して脂肪蓄積を亢進させる」

日本肥満学会、2017 年

星野 圭司、奥西 勝秀、泉 哲郎

「Rab27 エフェクター Munc13-4 のアレルギー反応における役割の解明」

北関東医学会、2017 年

歩 云、奥西 勝秀、泉 哲郎

「インスリンによる新奇脂肪蓄積機構の解明」

北関東医学会、2017 年

歩 云、奥西 勝秀、與五沢 里美、泉 哲郎

「脂肪組織における ALK7 シグナルの生理的役割の解明」

日本糖尿病・肥満動物学会、2017 年

奥西 勝秀、與五沢 里美、泉 哲郎

「I 型 TGF- 受容体 ALK7 に対するリガンドの発現細胞ならびにその発現誘導因子の探索」

日本肥満学会、2016 年

歩 云、與五沢 里美、奥西 勝秀、泉 哲郎

「脂肪組織における ALK7 リガンド産生細胞及びその誘導因子の同定」

北関東医学会、2016 年

奥西 勝秀、與五沢 里美、泉 哲郎

「白色脂肪組織における ALK7 リガンドの探索」

日本肥満学会、2015 年

奥西 勝秀

「PGE₂ は T 細胞上 EP2 受容体を介してアレルギー性気道炎症を抑制する」

日本アレルギー学会、2014 年

〔その他〕

ホームページ等

群馬大学生体調節研究所 遺伝生化学分野
泉研究室

[URL] <http://molend.showa.gunma-u.ac.jp/>

6．研究組織

(1)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