

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461485

研究課題名(和文) アレルギー性気道炎症における蛋白シトルリン化の病的意義の解明

研究課題名(英文) The role of protein citrullination in antigen-induced airway inflammation

研究代表者

前澤 裕子 (MAEZAWA, Yuko)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00724923

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)：近年、各種の自己免疫性・非自己免疫性炎症性疾患においてpeptidylarginine deiminase (PAD)及びシトルリン化タンパクの病的発現が病態形成に関与することが示されたが、気管支喘息を代表とするアレルギー疾患におけるそれらの役割の詳細は不明であった。本研究ではアレルギー性気道炎症の病態形成においてシトルリン化蛋白が関与しているか否かを喘息モデルマウスを用いて解析し、PAD阻害剤により抗原誘発性気道炎症が抑制されることを明らかとした。さらに、肥満症モデルマウスでも病態指標が改善することから、多岐にわたる炎症性疾患においてシトルリン化蛋白が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Protein citrullination is one of post-translational protein modifications mediated by peptidylarginine deiminase (PAD). PAD over-expression and resulting abnormal protein citrullination have been reported to be involved in various autoimmune inflammatory diseases and non-autoimmune inflammatory diseases. However, the roles of PAD and protein citrullination in the pathogenesis of allergic airway inflammation has not been fully elucidated. We analyzed the effect of PAD inhibitor on antigen-induced murine airway inflammation and clarified its suppressive effect on the disease phenotypes via regulating T cell functions. PAD inhibitor also improved the phenotypes of obesity model mouse, suggesting the involvement of citrullinated proteins in various inflammation-mediated diseases.

研究分野：アレルギー

キーワード：アレルギー性気道炎症

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は可逆性気道閉塞および慢性気道炎症を特徴とする慢性呼吸器疾患である。その有病率は国内国外ともに増加傾向にあり、日本国内における小児、成人を合わせた喘息人口は約 800 万人と推計され、その後も増加傾向である (厚生労働省資料)。近年の治療の進歩に伴い死亡例は減少傾向にあるものの、吸入ステロイドをはじめとする非特異的な対症療法が治療の中心であり、詳細な病態の解明に基づく新たな治療法の開発が求められている。気管支喘息は幾つかの病型に分類されるが、その中で最も有病率の高いアレルギー性喘息では特異抗原刺激に対するアレルギー性気道炎症が特徴的であり、その成立には T 細胞、B 細胞、好酸球、肥満細胞、好中球、自然リンパ球などの血球系細胞の他、気道上皮細胞、神経ペプチドといった多くの因子が関与し、中でも CD4 陽性 T 細胞 Th2 細胞が IL-4、IL-5、IL-13 などの炎症生サイトカイン分泌を介して抗体産生や好酸球活性化をもたらすことで炎症誘導に中心的役割を果たしていると考えられてきた。

一方、近年 peptidylarginine deiminase (PAD) 及びその高発現の結果生じるシトルリン化タンパクの病的発現が全身性エリテマトーデスや多発性硬化症を始めとする多数の自己免疫疾患、および非自己免疫性炎症性疾患において炎症性病態に関与することが示された (Moscarello MA et al, *Neurochem Res* 2007, Knight JS et al, *J Clin Invest* 2013 他)。PAD はタンパクの翻訳後調節を司る酵素の一つとして同定され、タンパク分子中のアルギニン残基のシトルリン残基への変換により電荷および疎水性の変化に基づく構造変化を惹起する。自己免疫疾患においては抗原蛋白のシトルリン化による新たな免疫原性の獲得が推測される一方、炎症細胞に関しては好中球に neutrophil extracellular trap (NET) 形成における PAD4 の関与や、ケモカインタンパク

分子のシトルリン化による性質変化についての報告がなされ、生体内での PAD の多彩な役割が示唆されていた (Li P et al, *J Exp Med.* 2010, Proost P et al, *J Exp Med.* 2008 他)。報告者らは自験データとしてマウス喘息モデルにおける気道炎症が低分子不可逆的 pan-PAD 阻害剤 2-Chloroacetamide (2CA) の投与により抑制を受けることを見いだしていた。しかし、アレルギー性炎症における PAD 及び蛋白シトルリン化の意義、および 2CA の作用機序に関しては依然不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、アレルギー性気道炎症において PAD 及び蛋白シトルリン化がどのように病態形成に関与しているか否か、PAD 阻害剤 (2CA) が喘息モデルマウスに与える作用を解析し明らかにすることを目的とした。また、近年微小血管および内臓脂肪炎症が病態形成に関与すると示唆されている肥満症についてもモデルマウスを用いて PAD 阻害剤の影響を検討し、蛋白シトルリン化の病態への関与の可能性について探索した。

3. 研究の方法

(1) 抗原誘発性アレルギー性気道炎症に対する PAD 阻害剤の役割の検討

①野生型マウス (Balb/c) を用いて卵白アルブミン (OVA) を抗原とする喘息モデルを定法にて確立し、PAD 阻害剤 (2CA) が気道炎症に与える影響について検討した。具体的には OVA-水酸化アルミニウムの腹腔内投与にてマウスを抗原感作後、第 20 日に 2CA (5 μ g/g 体重) またはコントロールとして PBS を腹腔内投与し、第 21・第 23 日に OVA-生理食塩水の吸入にて気道炎症を誘発後、その 48 時間後に気管支肺胞洗浄液・肺組織等の検体を採取し、炎症細胞数及び炎症細胞分画・炎症性サイトカイン・病理組織像等について解析した。

②マウス気道炎症におけるシトルリン化

タンパクの検討

①で得られたマウス肺組織について抗シトルリンタンパク抗体 (F95) を用いたウェスタンブロット法にて解析し、非炎症肺組織との比較により特異的バンドを探索した。

③マウス T リンパ球に対する PAD 阻害剤の役割の *in vitro* での検討

OVA 抗原特異的 T 細胞レセプター (TCR) を発現するトランスジェニックマウス (DO11.10 マウス)より脾臓由来リンパ球を採取後、対応抗原である OVA ペプチド (OVA₃₂₃₋₃₃₉) 及び 2CA 添加の有無にて 3 日間培養し、細胞生存・増殖に対する 2CA の影響について検討した。また、2CA によるアポトーシス誘導の有無について細胞染色法 (Apopercentage dye) 及び propidium iodine・Annexin V を用いたフローサイトメトリーにて其々 6 時間及び 12 時間の時点で解析した。

④マウス T リンパ球の細胞内シグナル伝達に対する PAD 阻害剤の役割の検討

DO11.10 マウスの脾臓リンパ球を②と同様に 24 時間培養後、TCR シグナル下流分子 p53, p21 の発現についてそれぞれの特異抗体を用いた Western blot 法にて解析した。

(2) マウス肥満症モデルに対する PAD 阻害剤の影響の検討

野生型 C57BL/6 マウスを離乳後より高脂肪食 (脂肪率 35%) で 14 週間飼育し肥満症モデルマウス (diet-induced obesity model) を確立した後、高脂肪食を継続しながら 5µg/g 体重の 2CA もしくは PBS を連日腹腔内投与し、体重変化および 3 週間後の耐糖能・インスリン抵抗性について検討した。

4. 研究成果

(1) 抗原誘発性アレルギー性気道炎症に対する PAD 阻害剤の役割の検討

① OVA 抗原誘発性気道炎症マウスに 2CA

を腹腔内投与したところ、コントロール群と比較して気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞数が減少した。(図 1)。

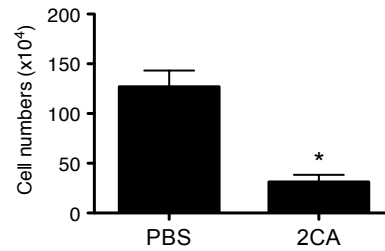


図 1 OVA 抗原誘発性気道炎症に対する PAD 阻害剤の抑制効果 (* $p<0.05$)

炎症細胞分画の解析では 2CA 投与群で全分画が有意に減少し、特に好酸球、リンパ球数が 2CA 投与の影響により著明に減少することが判明した (図 2)。

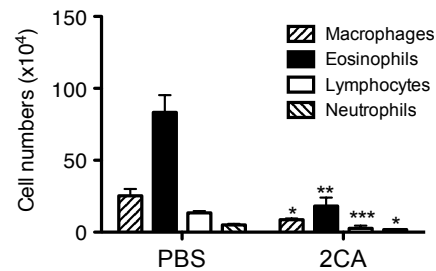


図 2 OVA 抗原誘発性気道炎症における炎症細胞分画への PAD 阻害剤の影響 (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$)

病理組織像においても 2CA 投与群ではコントロール群と比較して気管支周囲の細胞浸潤が抑制されており、気管支肺胞洗浄液の解析結果に矛盾しなかった (図 3)。

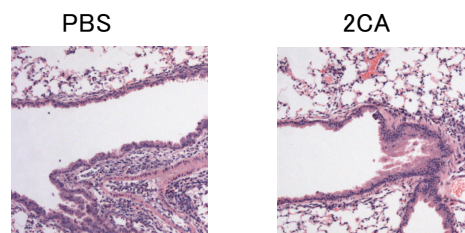


図 3 OVA 抗原誘発性気道炎症における気道炎症細胞浸潤への PAD 阻害剤の影響

2CA 投与群(OVA/2CA)では気管支肺胞洗浄

液中の IL-5 を始めとする Th2 サイトカイン濃度がコントロール群(OVA/PBS)と比較して抑制されたほか、OVA 特異的 IgE の血中濃度がコントロール群と比較して抑制された (図 4、5)。

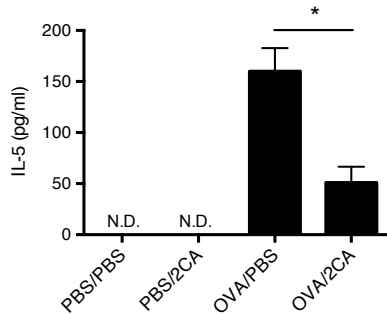


図 4 気管支肺胞洗浄液中 IL-5 濃度 (* $p < 0.05$) (吸入投与薬/腹腔内投与薬を表示)

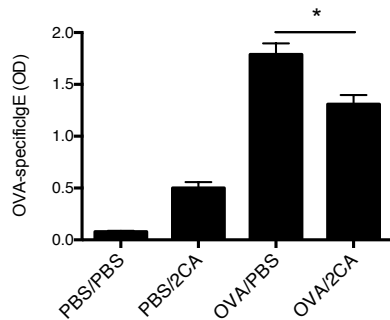


図 5 血中 OVA 特異的 IgE 濃度 (縦軸は OVA 特異的 IgE 濃度を吸光度の絶対値として表示。* $p < 0.05$)

気管支肺胞洗浄液中のリンパ球分画の検討では CD4 陽性 T 細胞が特に減少した (図 6)。これらの結果から、PAD 活性の阻害が抗原誘発性気道炎症に抑制的な役割を持つこと、及び CD4 陽性 T 細胞の抑制を介して Th2 型炎症を抑制する可能性が示唆された。

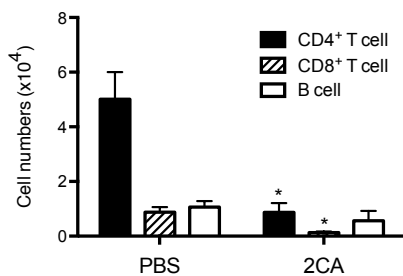


図 6 気管支肺胞洗浄液中リンパ球分画 (* $p < 0.05$)

②マウス気道炎症におけるシトルリン化タンパクの検討

次に OVA 誘発性マウス喘息モデルの肺組織を採取し、細胞溶解液を用いて抗シトルリン蛋白抗体を用いた Western blot 法にて解析したところ、非炎症組織では見られない複数のバンドを認めた (図 7)。このことから、抗原誘発性気道炎症の局所において複数のシトルリン化蛋白が発現しており炎症の発現制御に関与している可能性が示唆された。

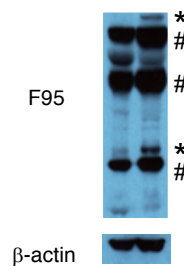


図 7 マウス肺組織におけるシトルリン化タンパクの検討 左: コントロール 右: 炎症性肺組織 *シトルリン化蛋白 # Western blot で用いた免疫グロブリン

③マウス T リンパ球に対する PAD 阻害剤の役割の in vitro での検討

DO11.10 マウス由来脾臓細胞を OVA-peptide 及び 2CA 存在下で培養し、T 細胞生存・増殖に対する 2CA の影響を検討したところ、2CA の濃度依存性に細胞数が抑制された (図 8)。このことから、PAD 阻害剤が細胞生存・増殖に抑制作用を有する可能性が示唆された。

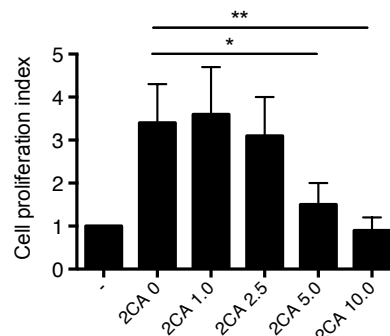


図8 T細胞生存・増殖に対する PAD 阻害剤の影響 (Cell proliferation index=無刺激時の細胞数を1とした場合の相対値。2CA 濃度単位 = $\mu\text{g/ml}$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$)

次に、2CA によるアポトーシス誘導効果の有無について、①と同様に OVA-peptide 及び 2CA 存在下で培養した DO11.10 マウス脾臓細胞を用いて検討した所、コントロール群ではアポトーシス細胞の比率が減少するのに対し 2CA 添加群では逆に増加が認められた (図 9)。

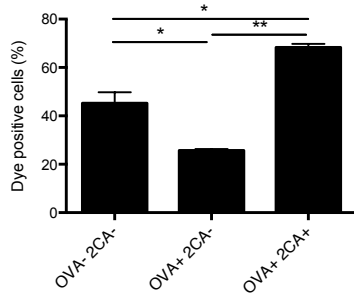


図9 DO11.10 マウス脾臓細胞に対する PAD 阻害剤のアポトーシス誘導効果 (縦軸はアポトーシス細胞の比率。* $p<0.05$, ** $p<0.01$)

表面マーカー解析においてもアポトーシス細胞の比率の増加が確認された (図 10)。これらの結果から、2CA は T 細胞に対して増殖抑制及びアポトーシス誘導を介して抗原誘発性炎症の場でのエフェクター機能を抑制する可能性が示唆された。

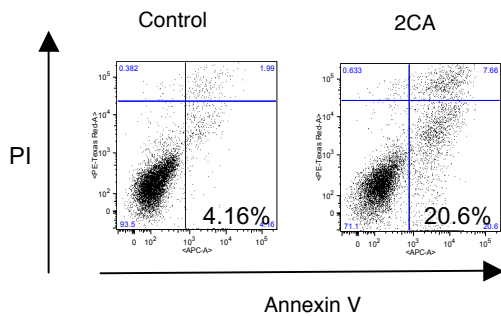


図10 DO11.10 マウス脾臓細胞に対する PAD 阻害剤のアポトーシス誘導効果 (PI=propidium iodine)

④マウス T リンパ球の細胞内シグナル伝達に対する PAD 阻害剤の役割の検討

DO11.10 マウス脾臓 T 細胞における TCR シグナル下流分子 p53, p21 の発現に対する 2CA の影響について Western blot 法にて検討したところ、OVA ペプチド及び 2CA 存在下では p53, p21 いずれの発現も増強される傾向が見られた (図 11)。このことから、2CA が TCR シグナル伝達経路に作用し細胞機能に影響を及ぼす可能性が示唆された。

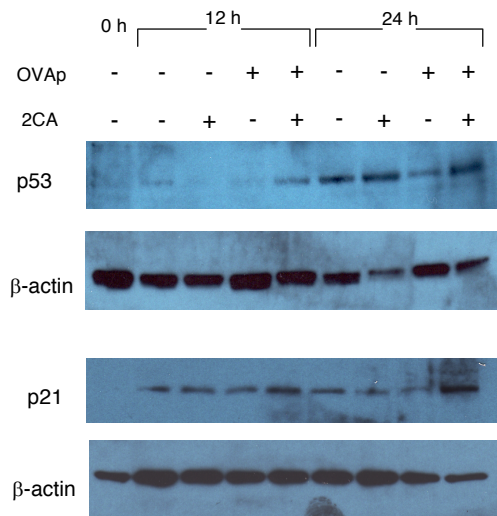


図11 活性化 DO11.10 マウス脾臓 T 細胞における p53, p21 の発現に対する PAD 阻害剤の影響

(2) マウス肥満症モデルに対する PAD 阻害剤の影響の検討

肥満モデルマウスに対し、2CA の連日投与を行ったところ、PBS 群と比較して体重増加の抑制傾向が見られた (図 12)。

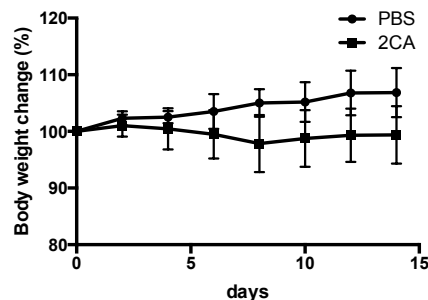


図1 2 マウス食餌誘発性肥満モデルに対する PAD 阻害剤の体重増加抑制効果 (2CA/PBS 投与開始時を 100%とする)

さらに、肥満モデルマウスに対し、PBS または 2CA の連日投与を 3 週間施行し、その前後で耐糖能 (IP-GTT) を比較したところ、2CA 投与群では耐糖能の改善を認めた (図1 3)。これらから、肥満モデルにおいて肥満進行及び耐糖能障害の悪化に PAD が関与している可能性が示唆された。

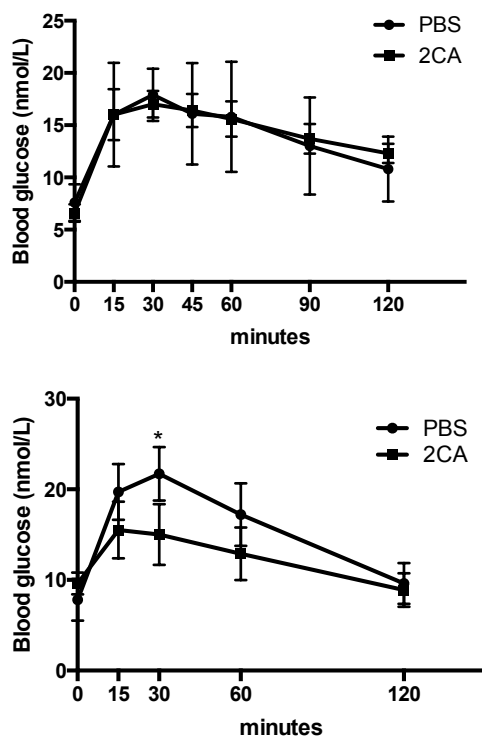


図1 4 2CA/PBS 投与前 (上) 及び投与後 (下) の IP-GTT (* $p < 0.01$)

総括：アレルギー性気道炎症において PAD 及びシトルリン化蛋白の T 細胞機能を介した病態への関与が明らかとなった。このことから、気道炎症局所における PAD 及びシトルリン化蛋白の発現制御が気管支喘息の治療開発に結びつく可能性が示唆された。さらに、肥満モデルにおいても PAD 阻害剤により病態指標が抑制される傾向を認めたことから、PAD 及びシトルリン化蛋白の発現制御が多岐にわたる炎症性疾患の治療開発に結び

つく可能性が示唆された。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前澤 裕子 (MAEZAWA, Yuko)
千葉大学・医学部付属病院・医員
研究者番号：00724923

(2) 研究分担者

中島 裕史
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：00322024

高取 宏昌
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30568225

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし