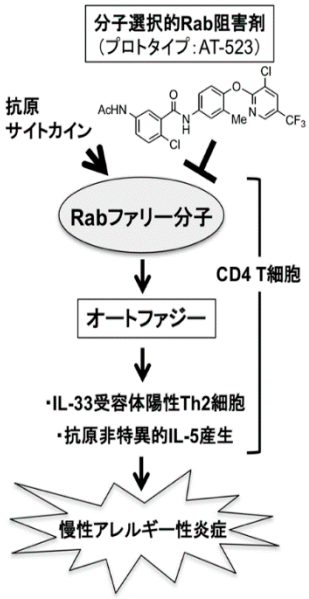
57　2型慢性アレルギー性炎症におけるRabの役割解明と制御	山下　政克

【目的】Rab ファミリー分子による 2 型慢性アレルギー性炎症病態制御機構を、特に CD4 T 細胞におけるオートファジーに着目して解明する。さらに、我々が新規に合成した Rab 結合化合物 SH-2251/AT-523 をプロトタイプとしてサブタイプ選択的な Rab 結合低分子化合物を創製することで、Rab 機能の調節を介した慢性アレルギー性炎症根治療のための新たな治療戦略と新規創薬シーズの提示を目指す。

【方法】AT-523 誘導体をアフィニティー樹脂に固定したカラムを用いて、結合タンパク質を分離し、質量分析でタンパク質を同定した。質量分析によって同定された、Rab ファミリー分子と AT-523 誘導体の結合を Biacore により確認した。*In vitro* 培養系で、SH-2251/AT-523 の結合が確認された Rab1A、Rab1B、Rab5C、Rab8A、Rab10、Rab11B および Rab35 をレトロウイルスベクターで活性化 CD4 T 細胞に導入し、IL-4、IL-5、IL-13 産生細胞分化を指標に Th2 細胞分化における Rab ファミリー分子の役割を検討した。また、Th2 細胞分化におけるオートファジーの役割を解析するため、クラス PI3 キナーゼの抑制を介してオートファジーを阻害する 3-methyladenine（3-MA）を添加し、*in vitro* Th2 細胞分化に与える影響を検討した。加えて、病原性 Th2 細胞のマーカーである IL-33 受容体α鎖（IL-33Rα）の IL-7/IL-33 依存的な発現誘導に対する、3-MA の作用についても *in vitro* で解析した。さらに、3-MA が Th1、Th17 細胞分化、Foxp3 陽性 iTreg 細胞分化に及ぼす影響についても、*in vitro* 分化系を用いて解析した。

【結果】検討した Rab ファミリー分子の中で、Rab8A および Rab35 の導入により、IL-5 産生 Th2 細胞、IL-13 産生 Th2 細胞分化の低下が認められた。一方、IL-4 産生 Th2 細胞への分化は、Rab8A および Rab35 の導入では影響を受けなかった。また、3-MA の添加によっても IL-5 産生 Th2 細胞、IL-13 産生 Th2 細胞への分化が顕著に低下したが、IL-4 産生 Th2 細胞分化への影響はほとんど認められなかった。さらに、IL-7/IL-33 依存的な IL-33Rα の誘導も 3-MA によって低下した。IL-7/IL-33 依存的 IL-33Rα発現の低下は、別のオートファジー阻害薬である Bafilomycin A1 によっても認められた。3-MA は、Th17 細胞分化も抑制したが、Th1 細胞分化、Foxp3 陽性 iTreg 細胞分化は抑制しなかった。Rab8A および Rab35 は、オートファジーの制御に関わっていることが報告されている分子であるが、活性化 T 細胞のオートファジーにおける役割は不明である。今後は、Rab8A および Rab35 の CD4 T 細胞オートファジーにおける役割を明らかにしたいと考えている。

Rab ファミリー分子によるオートファジーを介した慢性アレルギー性炎症の制御（仮説）



57. 2 型慢性アレルギー性炎症における Rab の役割解明と制御

山下　政克

愛媛大学 大学院医学系研究科 免疫学講座

Key words：2 型慢性アレルギー性炎症，Th2 細胞，Rab，オートファジー，IL-33 受容体

緒　言

現在、我が国の全人口の約 2 人に 1 人が何らかのアレルギーに罹患しており、近年その数は急速に増加している。アレルギーの病態の原因となる 2 型慢性アレルギー性炎症は、対症療法やステロイドにより十分に制御可能であるとされ、患者の満足度が低いにもかかわらずアレルギー疾患の根治につながる低分子化合物の開発研究は立ち後れている。また、近年、舌下免疫療法をはじめとした抗原特異的な減感作療法が開発され一定の治療効果をあげているが、感作抗原が明らかとなっていない慢性アレルギーに対しては適用が期待できない。この様な現状の中、2015 年に IL-5 を標的としたヒト化モノクローナルが、ステロイドでコントロール不能な難治性の喘息（2 型慢性アレルギー性炎症）に対する治療薬として本邦において認可された。さらに、抗 IL-5 抗体は、喘息−慢性閉塞性肺疾患オーバーラップシンドロームにも有効であることも報告された。これらの事実は、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が、抗体医薬は高価であり、投与経路も限局される。

我々は、低分子化合物 SH-2251 が、IL-33 受容体を発現し IL-5 を大量に産生する Th2 細胞（IL-33 受容体陽性 Th2 細胞）の分化と IL-5 の産生を強力に抑制し、2 型慢性アレルギー性炎症のマウス病態モデルの病態を著しく改善することを報告している［1]。IL-33 依存的な 2 型免疫応答はアレルギー性炎症慢性化の大きな要因であるが、解析の結果、SH-2251 投与により IL-33 受容体の発現が低下し、2 型慢性アレルギー性炎症の病態が改善されることが分かってきた（論文投稿中)。これらの結果は、SH-2251 結合分子が 2 型慢性アレルギー性炎症の病態形成に深く関与しており、結合分子の機能を解析し、その分子を標的とした化合物を開発することが 2 型慢性アレルギー性炎症の新規治療戦略の確立につながることを示唆している。しかし、SH-2251 は、IL-33 受容体陽性 Th2 細胞分化や 2 型自然リンパ球（ILC2）機能発現に重要な転写調節因子、Gfi1 の発現を低下させることで作用を発揮している可能性が示されているものの、直接の標的分子は未だ同定されていない。そこで我々は、樹脂に固定可能な SH-2251 誘導体 AT-523 を新規合成し、結合タンパク質のカラム精製と質量分析を行うことで、SH-2251/AT-523 標的分子として低分子量 G タンパク質に属する Rab ファミリー分子群を同定した。Rab ファミリーは、約 60 の分子から構成されているが、これまでに Rab1a、Rab1b、Rab5c、Rab8、Rab10、Rab11b、Rab12、Rab35 が AT-523 と結合することが確認できている。しかしながら、SH-2251/AT-523 と結合するどの Rab 分子がアレルギー炎症の制御に重要なのかは未だ明らかとなっていない。また、Rab ファミリー分子は、オートファジーの調節因子であると報告されている。そこで本研究では、2 型慢性アレルギー性炎症の発症と病態形成機構には、Rab による CD4 T 細胞オートファジー制御が重要な役割を担っているという仮説を立て、研究を行なった。

方法および結果

1.　SH-2251/AT-523 結合 Rab 分子の Th2 細胞分化における役割解析

脾臓から分離したナイーブ CD4 T 細胞を、Th2 細胞分化条件下（抗 TCRβ 抗体、抗 CD28 抗体、IL-2、IL-4 刺激、抗 IFN-γ 中和抗体) で 48 時間活性化した後、SH-2251/AT-523 の結合が確認された *Rab1A*、*Rab1B*、*Rab5C*、*Rab8A*、*Rab10*、*Rab11B* および *Rab35* 遺伝子をレトロウイルスベクターにより導入した。遺伝子導入 3 日後に、細胞を再刺激し、IL-4、IL-5、IL-13 の細胞内サイトカイン染色を行い、Th2 細胞分化における Rab ファミリー分子の役割を

検討した。その結果、コントロール（Mock）に比べ、*Rab8A* および *Rab35* 遺伝子の導入群では、IL-5 産生 Th2 細胞、IL-13 産生 Th2 細胞分化の低下が認められた（図 1）。一方、IL-4 産生 Th2 細胞への分化は、*Rab8A* および *Rab35* の導入では影響を受けなかった。この結果から、SH-2251/AT-523 結合 Rab 分子の中で、*Rab8A* および *Rab35* は、IL-5/IL-13 を産生する 2 型慢性炎症を誘導する Th2 細胞の分化に対して抑制的に働くことが示された。

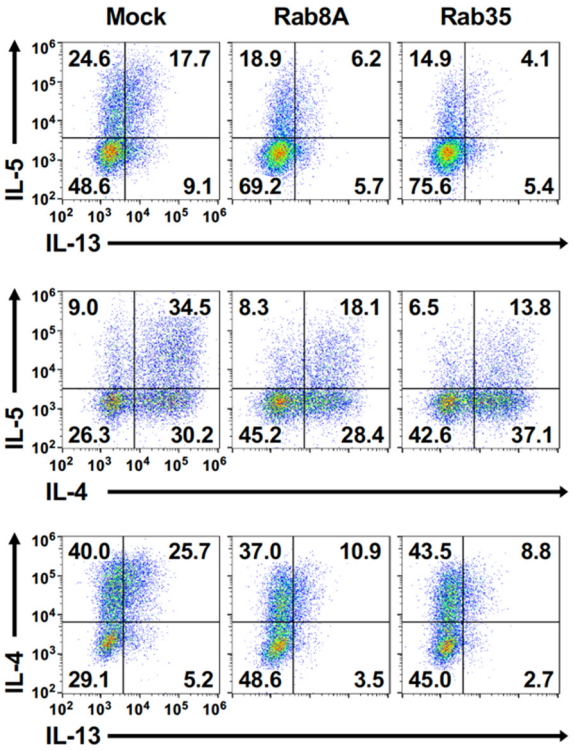


図 1. Rab8A、Rab35 発現により IL-5/IL-13 産生 Th2 細胞分化は抑制される

コントロール（Mock）、*Rab8A*、*Rab35* 遺伝子導入エフェクターCD4 T 細胞における、IL-5/IL-13（上段）、IL-4/IL-5（中段）、IL-4/IL-13（下段）の細胞内サイトカイン染色パターンを FACS で検出した。

2. オートファジー阻害薬 3-methyladenine (3-MA)の Th2 細胞分化に対する作用解析

脾臓から単離したナイーブ CD4 T 細胞を、Th2 細胞分化条件下にて、3-MA 存在下、非存在下で 2 日間培養後、さらに IL-2/IL-4 で細胞を 3 日間増殖させた後、抗 TCR β 抗体で細胞を再刺激し、IL-4、IL-5、IL-13、IFN-γ の細胞内サイトカイン染色を行なった。IL-5 産生 Th2 細胞、IL-13 産生 Th2 細胞への分化は 3-MA により強く抑制された一方で、IL-4 産生 Th2 細胞分化はほとんど抑制されなかった（図 2）。

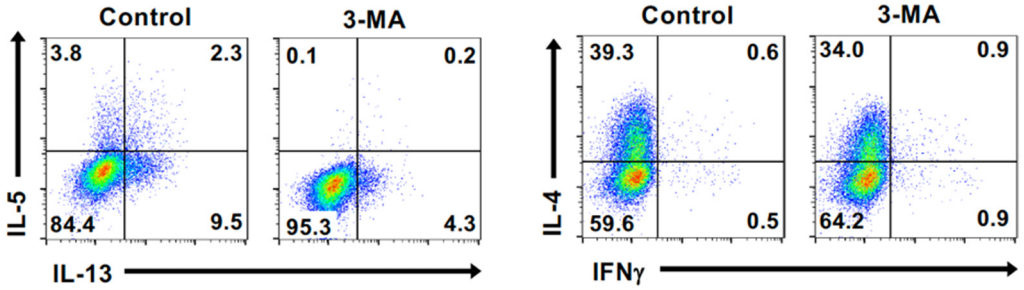


図 2. オートファジー阻害剤 3-MA により IL-5/IL-13 産生 Th2 細胞分化は抑制される

3-MA 処理（3-MA）、非処理（Control）Th2 細胞における、IL-5/IL-13（左）、IL-4/ IFN-γ（右）の細胞内サイトカイン染色パターンを FACS で検出した。

一部の Th2 細胞は、IL-7 刺激により IL-33Rα発現し、IL-33 に反応して IL-5 や IL-13 を産生して、アレルギー性炎症の慢性化を引き起こすことが知られている（図 3）。そこで、次に *in vitro* で分化誘導した Th2 細胞を 3-MA 存在下、非存在下で 24 時間 IL-7 刺激し、IL-33Rα の発現誘導における 3-MA の作用について検討した。図 3 に示すように、IL-7 による Th2 細胞における IL-33Rα の発現誘導は、3-MA 処理によって部分的にではあるが抑制された。これらの結果は、2 型慢性アレルギー性炎症の誘導に関わる IL-33Rα陽性・IL-5/IL-13 産生 Th2 細胞分化に対しオートファジーが促進に作用している可能性を示している。

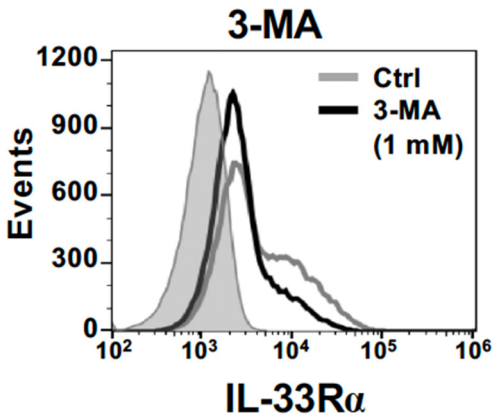


図 3. オートファジー阻害剤 3-MA は IL-7 依存的 IL-33Rα の発現誘導を部分的に抑制する
3-MA 処理（3-MA）、非処理（Ctrl）Th2 細胞における、IL-33Rα の発現を FACS で検出した。

3. 3-methyladenine (3-MA)の Th1、Th17 細胞分化に対する作用解析

脾臓から単離したナイーブ CD4 T 細胞を、Th1 細胞分化条件下（抗 TCRβ抗体、抗 CD28 抗体、IL-2、IL-12 刺激、抗 IL4 中和抗体）、Th17 細胞分化条件下（抗 TCRβ抗体、抗 CD28 抗体、IL-6、TGFβ刺激、抗 IFN-γ中和　抗体、抗 IL4 中和抗体）にて、3-MA 存在下、非存在下で 2 日間培養後、Th1 細胞はさらに 3 日間増殖させた後、Th17 細胞は 1 日サイトカインのみで増殖させた後、細胞内サイトカイン（Th1：IL-2/IFN-γ、Th17：IL-17A/IL-17F）を行なった。Th17 細胞の分化は、3-MA 首里により強く抑制された（図 4 左）。一方、Th1 細胞分化条件下において、IFN-γ産生 Th1 細胞分化は、ほとんど影響を受けず、IL–2 産生 Th1 細胞の分化は 3-MA によって逆に　増強された（図 4 右）。さらに、Foxp3 の発現を指標とした iTreg 細胞の分化は、3-MA 処理により影響を受けなかった。これらの結果から、オートファジーは、ヘルパーT 細胞サブセット毎に異なった役割を担っている可能性が示された。

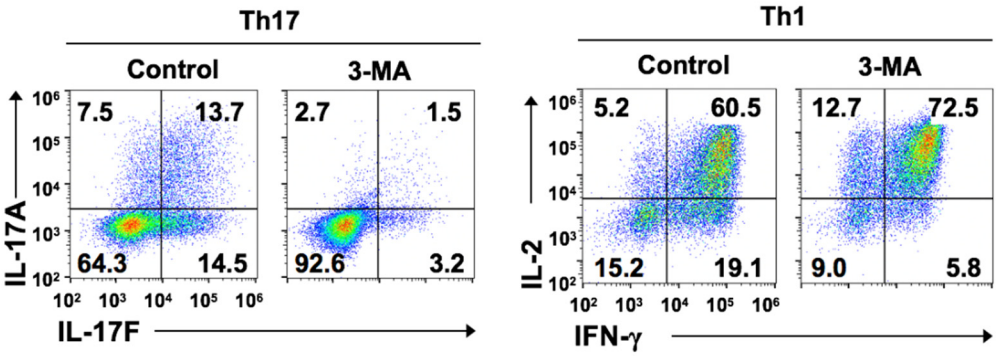


図 4. オートファジー阻害剤 3-MA の Th17、Th1 細胞分化に対する作用
3-MA 処理（3-MA）、非処理（Control）Th17 細胞における IL-17A/IL-17F（左）、
Th1 細胞における IL-2/ IFN-γ（右）の細胞内サイトカイン染色パターンを FACS で検出した。

考　察

本研究で、IL-5 産生 Th2 細胞分化抑制能を有する SH-2251/AT-523 に結合する Rab ファミリー分子の中で、少なくとも Rab8A と Rab35 が IL-5 産生 Th2 細胞の分化を調節できることが示された。しかしながら、これらの分子がどのようにして IL-5 産生 Th2 細胞の分化を調節しているのかの分子機構については解明途中である。Rab は、GTPase 活性を持った分子であり、細胞内のタンパク質輸送やオートファジーに関与することが報告されている［2］。そこで、我々は、オートファジー阻害薬の 3-MA の IL-5 産生 Th2 細胞分化に対する役割について解析を行い、IL-5 産生 Th2 細胞分化が 3-MA で強く抑制されることを示した。さらに、3-MA は、IL-5 産生 Th2 細胞の細胞表面マーカーである IL-33Rα の発現も抑制した。これらのことから、Rab8A および Rab35 は、オートファジーの制御を介して IL-5 産生 Th2 細胞の分化を調節していることが予想される。実際、Th2 細胞の分化誘導因子である IL-4 が、B 細胞においてオートファジーを誘導し、喘息を増悪させているとの報告もある［3］。今後、SH-2251/AT-523、Rab8A および Rab35 の CD4 T 細胞オートファジーにおける役割を明らかにする研究を行うことで、この仮説を証明できると考えている。また、我々は、共同研究者とともに SH-2251/AT-523 誘導体を合成し IL-5 産生 Th2 細胞抑制活性を評価している。新規合成化合物の IL-5 産生 Th2 細胞分化抑制活性と Rab 結合活性の相関を検討することで、SH-2251/AT-523 の Rab 結合能の IL-5 産生 Th2 細胞抑制に対する重要性が示されると考えている。

我々は、Rab8A/Rab35 の過剰発現および 3-MA 処理により、IL-5 産生 Th2 細胞だけでなく IL-13 産生 Th2 細胞の分化も抑制されることを示した。しかし、SH-2251 は IL-13 産生 Th2 細胞の分化には影響がないことを我々は報告している［1］。また、SH-2251/AT-523 は、3-MA 異なり Th17 細胞分化は抑制しない。一方で、SH-2251/AT-523 は、3-MA と同様に IL-2 産生 Th1 細胞分化を促進する。今回、SH-2251/AT-523 結合能を持つ Rab の Th 細胞分化に対する作用は、Th2 細胞においてのみ検討している。今後、SH-2251/AT-523 結合 Rab 群が、Th2 細胞以外の Th 細胞サブセット分化に与える影響を検討することにより、Rab-オートファジー経路による Th 細胞分化制御の全容を明らかにし、Rab を標的とした新規慢性アレルギー性炎症治療薬の開発に繋げることができると考えている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、兵庫医療大学薬学部創薬科学研究室の田中明人、馬渕美雪である。

文　献

1） Suzuki J, Kuwahara M, Tofukuji S, Imamura M, Kato F, Nakayama T, Ohara O, Yamashita M. A novel small compound SH-2251 suppresses Th2 cell-dependent airway inflammation through selective modulation of chromatin status at the *Il5* gene locus. PLoS One. 2013 Apr16;8(4): e61785. PMID: 23613936 DOI: 10.1371/journal.pone. 0061785

2） Ao X, Zou L, Wu Y. Regulation of autophagy by the Rab GTPase network. Cell Death Differ. 2014 Mar 21(3): 348-58. PMID: 24440914 DOI: 10.1038/cdd.1013.187. Equb 2014 Jan 17.

3） Xia F, Deng C, Jiang Y, Qu Y, Deng J, Cai Z, Ding Y, Guo Z, Wang J. IL4 (interleukin 4) induces autophagy in B cells leading to exacerbated asthma. Autophagy. 2018 14(3): 450-464. PMID: 29297752 DOI: 10.1080/15548627.2017.1421884. Equb 2018 Feb 1.