

# 細胞内小胞輸送を標的とする新規アレルギー制御法開発

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科フロンティア口腔科学分野

門脇 知子

【研究目的】近年、環境条件の悪化や生活様式の変化に伴うストレスによりアレルギー疾患に悩む人は増加の一途をたどっている。アレルギー疾患の治療法としては対症療法的が主流を占め、根治的な治療法の確立が期待されている。

真核生物の細胞には多様な細胞小器官があり、これらの間を物質が行き交うことで細胞機能が発揮される。この小胞輸送を制御する主要な因子として Rab タンパク質が知られている。我々が世界に先駆けて報告した新規 Rab タンパク質” Rab44” は、Rab ドメイン以外に N 末端に大きなドメインを持つ点で他の Rab とは構造的に一線を画する。Rab44 ノックアウト (KO) マウスは、OVA に対する受動および能動どちらのアレルギー反応とも減弱していた。このとき血中ヒスタミン濃度も有意に減少し、*in vitro* のマスト細胞実験では IgE 依存性の脱顆粒が低下していた。IgE を介する即時型アレルギーである I 型アレルギー反応以外にも、金属アレルギー反応 (IV 型・遅延型アレルギー) モデルにおいて、Rab44 KO マウスでは免疫応答が抑えられる傾向にあった。すなわち、Rab44 は様々なアレルギー反応に関与していると考えられる。本研究では、この Rab44 による炎症応答制御メカニズムを解明し、これまでにないアレルギー性疾患の新規制御法確立へと展開することを目的とした。

## 【研究結果】

### (1) 金属アレルギーモデルマウスの確立と Rab44 の関与の解析

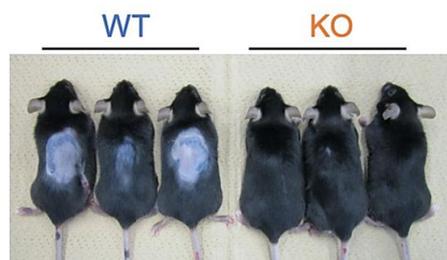
歯科用金属やアクセサリなどの金属に長期間曝されることにより、金属から溶出したイオンが生体タンパク質と結合し、アレルゲンとなることがある。金属アレルギーなどの IV 型アレルギーは、遅延型アレルギー反応と呼ばれ、I 型アレルギーが抗体を介するのと異なり、細胞性エフェクターによって発症すると考えられている。病態形成にはリンパ球や多様な骨髄系細胞が関与する。

我々は、マウスに低濃度の Ni 水溶液と LPS の混和物を腹腔内投与して感作した後、Ni 希薄水溶液 (0.2 mM) を飲用として与える金属アレルギーモデルマウスを確立した。Ni 水投与開始後、2 か月目には野生型マウス (WT) は、背部・腹部・頭部に脱毛を示したが、Rab44 ノックアウトマウス (KO) では脱毛はほとんどみられなかった (図 1)。さらに耳介根元に NiCl<sub>2</sub> を皮下注射すると、Rab44-KO マウスでは WT に比べて有意に耳介の腫脹が抑制されていた (図 2)。このとき、末梢血における顆粒球の割合が Rab44-KO マウスでは WT と比較して有意に少なく、Ni 投与しない場合と同等であった (図 3)。耳介部においても、Gr-1 陽性の顆粒球系細胞の耳介組織への遊走が Rab44-KO マウスでは有意に抑制されていた (図 4)。このように、Rab44-KO マウスでは、IV 型アレルギー反応時の顆粒球系の免疫細胞の分化・増殖・遊走が減弱していることが示された。

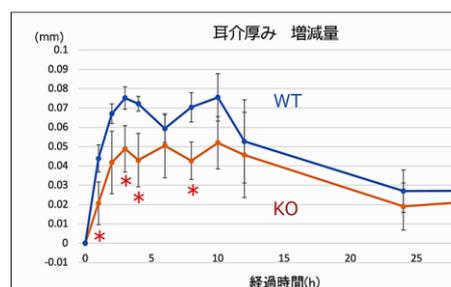
### (2) 慢性関節リウマチモデルにおける

#### Rab44 の関与

関節リウマチは滑膜の炎症を特徴とする慢性疾患であり、進行すると炎症を起こした滑膜が軟骨を侵食し、骨びらん性変化へと進展する。自己免疫応答が原因と考えられている頻度の多い炎症性関節疾患である。我々は、抗コラーゲン抗体を投与することによって誘導される関節炎モデル (CAIA) を用いて、Rab44 の関節炎病態形成における関与を調べた。

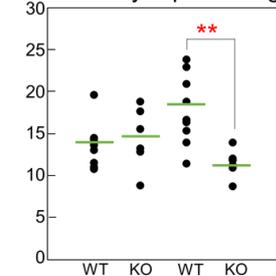


(図 1) Ni 水投与後の WT と Rab44-KO マウス



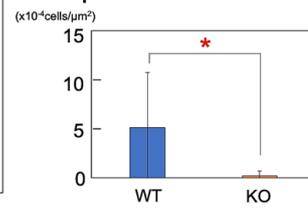
(図 2) WT と Rab44-KO マウスの耳介腫脹

#### (%) Granulocyte percentage



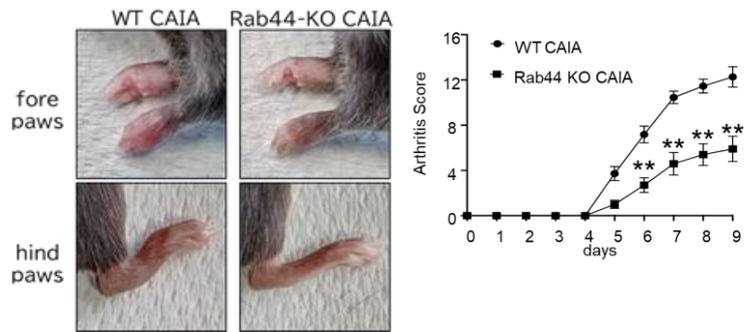
(図 3) 末梢血における顆粒球の割合

#### Gr-1 positive cell / ear area

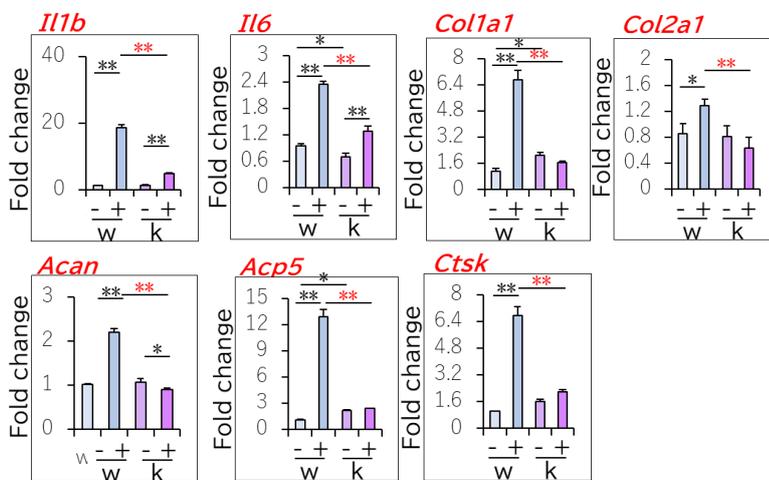


(図 4) 耳介における Gr-1 陽性細胞の浸潤

WTマウスは前後肢関節に明らかな腫脹と発赤を認め、高い関節リウマチスコアを示すが、Rab44-KOマウスでは関節炎がかなり減弱し、関節リウマチスコアも有意に低下していた(図5)。橈骨手根の組織像からもWTマウスでは滑膜および軟骨への炎症性細胞浸潤が顕著に認められるのに対し、Rab44-KOマウスではそれが顕著に抑制されていた(図6)。この時の関節における遺伝子発現を調べたものを(図7)に示す。炎症性サイトカインであるIL-1



(図5) WT と Rab44-KO マウスにおける CAIA の比較  
 $\beta$ 、IL-6が関節炎誘導時のWTよりRab44-KOで有意に低下していた。軟骨のターンオーバーを表すコラーゲン群(Coll1a1, Col2a1)や軟骨プロテオグリカンであるアグリカン(Acan)もWTよりRab44-KOマウスで有意に低下していた。そして、



(図7) 関節における mRNA レベル

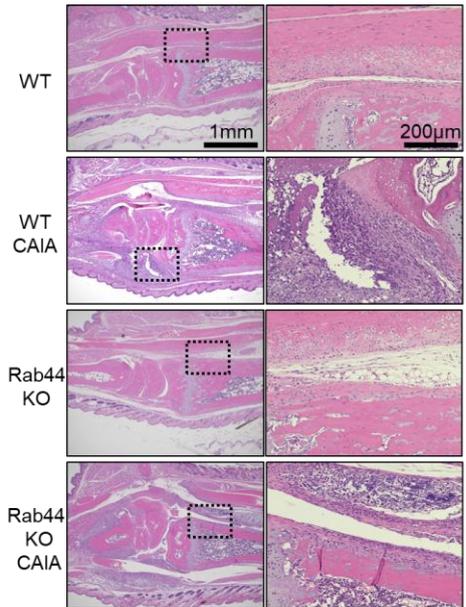
骨吸収マーカーである酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(Acp5)、カテプシンK(Ctsk)もWTでは有意に上昇し、骨吸収が起きていることを示していたが、Rab44-KOマウスでは関節炎誘導前と同程度であり、骨吸収が起きていることが示された。このようにRab44-KOマウスでは、組織学的にも生化学的にも慢性関節リウマチの病態形成が遅延・減弱することが明らかとなった。

### (3) Rab44の構造解析

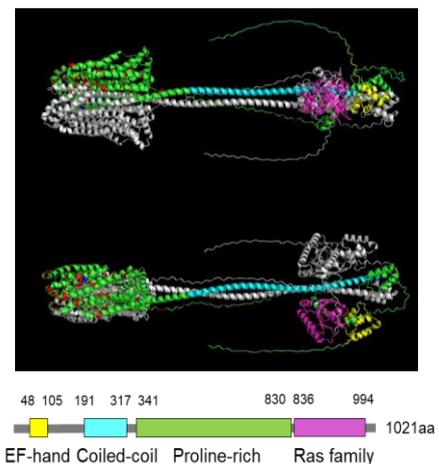
ヒトRab44は1021アミノ酸から成る比較的大きなタンパク質である。今回、Hisタグ付加タンパク質として全長リコンビナントタンパク質を大腸菌に発現し精製を試みたが、十分量の精製タンパク質として得ることができなかった。AlphaFold2によって予測される構造を図9に示す。

### (5) Rab44相互作用タンパク質の同定

本研究では、骨髄細胞ならびに分化させた骨髄マスト細胞を用いて、抗Rab44抗体を用いた免疫共沈によって、Rab44と相互作用する候補タンパク質をいくつか見つけることができています。それらは①アクチン制御タンパク質、②Ca依存性リン脂質結合タンパク質、③細胞分化制御タンパク質として報告されている分子であり、現在、それらとRab44の相互作用について解析中である。



(図6) CAIA 誘導時の滑膜の組織像



(図9) Rab44 の構造予測

### 【結論および考察】

本研究により、Rab44はアレルギーを含む炎症応答全般を制御する分子であり、様々な炎症性疾患の病態

形成に関わることが示された。Rab44は好中球やマクロファージといった免疫のエフェクターへと分化する骨髄幹細胞に発現し、Rab44欠損によって顆粒球系の細胞分化が抑制されることが示唆された。Rab44が欠損した骨髄細胞から分化した細胞では、炎症応答誘導時に膜表面タンパク質やケモカインの発現の低下がみられ、機能低下が予測された。したがって、Rab44あるいはRab44関連因子を制御することによって、炎症の減弱を図ることは可能であると考えられる。さらにRab44の発現の個体差やSNPは個人の病態感受性や病態進行に大きく関与することが示唆され、病態の予後予測に有用であることも示唆されている。

#### 【謝辞】

本研究の遂行にあたり、公益財団法人・アステラス病態代謝研究会から研究助成金による多大なご支援を賜りました。厚く御礼申し上げます。

#### 【参考文献】

図 1~4; Rab44 Deficiency Induces Impaired Immune Responses to Nickel Allergy. Noguromi M, Yamaguchi Y, Sato K, Oyakawa S, Okamoto K, Murata H, Tsukuba T, Kadowaki T. International Journal of Molecular Sciences, 24, 994, 2023

図 5~7; Impaired Development of Collagen Antibody-Induced Arthritis in Rab44-Deficient Mice. Yamaguchi Y, Kadowaki T, Sakai E, Noguromi M, Oyakawa S, Tsukuba T. Biomedicines 12(11):2504, 2024