

アレルギーおよび肥満を制御する新奇分子基盤の解明

群馬大学生体調節研究所 代謝システム制御分野
奥西 勝秀

1. 研究背景・目的

現在の日本では、アレルギー患者および肥満者が著増しており、アレルギーと肥満は「国民病」と呼ぶべき状況にある。一方、アレルギー疾患では依然として、ステロイド局所投与による非特異的抗炎症・対症療法が標準治療であり、肥満に関しても、食事・運動療法以外の有効な治療法は確立していない。疾患特異的で治癒に繋がる新奇治療法を開発する為にも、各病態発症の分子基盤をより詳細に解明する必要がある。

喘息を含むアレルギー反応において、IL-5/IL-13は炎症増悪因子として特に重要である。これまでは、メモリーTh2と呼ばれる1細胞集団から、IL-4を含む全てのTh2型サイトカインが一律に産生されると考えられていたが、申請者は最近、CD44^{hi}メモリーTh2細胞の中でも、CD62L^{lo}CXCR3^{lo}の発現パターンで、かつIL-33受容体陽性のごくわずかしかな存在しない細胞集団（マウス脾臓Th細胞の1%以下）が、IL-33非存在下でも、抗原刺激時に選択的にIL-5/IL-13を高産生することを報告した (*J. Clin. Invest.* 2020) (1)。また、白色脂肪細胞に特異的に高発現するI型TGF- β 受容体ALK7は、脂肪分解を抑制し、脂肪蓄積を亢進させるが、生体でのそのリガンドは不明であった。申請者は、ALK7リガンドとしてGDF3を、その主要な産生細胞としてCD11c⁺脂肪織マクロファージ(adipose tissue macrophages, ATM)を同定した (*Diabetes* 2018) (2)。他方、これらアレルギーや肥満を促進させる病原性免疫細胞の分化誘導機構や細胞特性は、ほとんど分かっていない。加えて、喘息と肥満は、疫学上正の相関を示すことが知られていたが、最近のGWAS解析で、両疾患共通のリスク遺伝子の存在が明らかにされた。その一つがRab27エフェクターMunc13-4をコードする*UNC13D*遺伝子のSNPであるが、Munc13-4の喘息・肥満における生理作用は不明である。

本研究では、各種マウス（intactなIL-5が産生されるIL-5-EGFPレポーターマウス含む各種遺伝子変異マウスや、喘息および肥満・糖尿病モデル）や各種薬剤を用いて、各病原性免疫細胞の分化誘導機構およびその細胞特性や、Munc13-4の新奇生理作用の解明を試みた。

2. 方法・結果

①IL-5高産生性アレルギー促進性Th2細胞の細胞特性

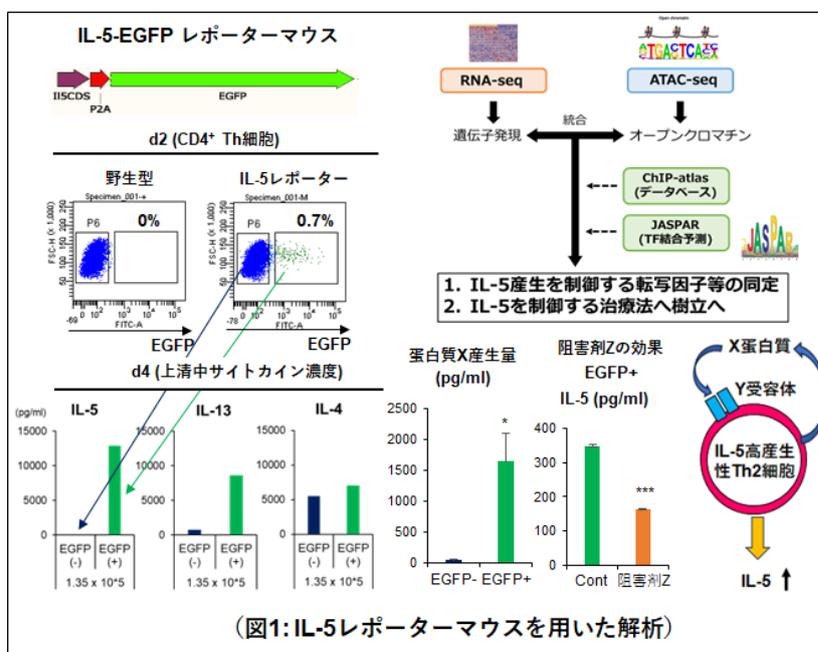
まず、IL-33受容体陽性IL-5高産生性Th2細胞の分化誘導にIL-33が必要か、IL-33遺伝子欠損マウスを用いた検討を行った。その結果、IL-33欠損マウス由来脾臓Th細胞において、野生型マウスと同程度の割合でIL-33受容体陽性CD44^{hi}CD62L^{lo}CXCR3^{lo}細胞が存在し、更にこの細胞群が、抗CD3 ϵ 抗体刺激に応じてIL-5/IL-13を高産生することを見出した。すなわち、IL-33受容体陽性IL-5高産生性Th2細胞の分化誘導に、IL-33は必須でないと考えられた。

次に、IL-5-EGFPレポーターマウス（以下、レポーターマウス）を用いた解析を行った。まず、レポーターマウスの脾臓から単離したCD4⁺Th細胞を抗CD3 ϵ 抗体（ \pm 抗CD28抗体）で刺激後にEGFP^{-/+}でFACSソーティングを行い、単離した細胞を抗CD3 ϵ 抗体（ \pm 抗CD28抗体）で再刺激した際の培養上清中のサイトカイン濃度を測定した。その結果、EGFP⁻群と比べて、EGFP⁺群のみがIL-5を産生し、更にIL-13の産生もEGFP⁺群で著増していることを見出した（図1）。すなわち、このレポーターマウスが、IL-5レポーターマウスとして作用することを確認した。以後、このレポーターマウスを用いて、各種臓器におけるIL-5産生Th2細胞の割合を検証し、IL-5の産生誘導因子の同定や、IL-5産生Th2細胞の細胞特性の同定を試みた。

まず、各種臓器に関しては、脾臓と比べ、肺や内臓脂肪などの末梢組織において、Th細胞からのIL-5産生が亢進し、Th細胞中のEGFP⁺細胞の割合も増加していることを見出した（特に白色脂肪でこの傾向が顕著）。また、各種サイトカイン・生理活性物質の中では、今のところ、IL-7のみがIL-5産生亢進作用を示した。

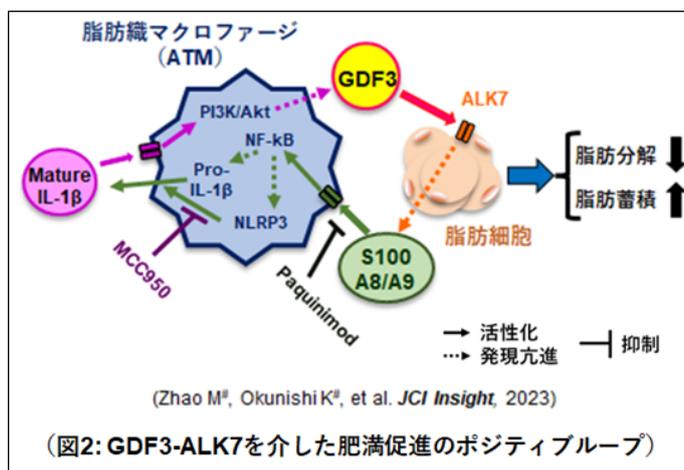
そして、IL-5産生性Th2細胞の細胞特性を明らかにするために、脾臓および肺のTh細胞を刺激後、FACSソーティングでEGFP⁻、EGFP⁺の細胞群を単離し、単離した細胞を用いてバルクのRNAseqおよびATACseqを行った。そして、RNAseqの結果、EGFP⁻群と比べEGFP⁺群で2倍以上の発現を脾臓由来・肺由来いずれの細胞においても認める遺伝子を、IL-5とIL-13を含め64個同定することが出来た。その中の一つ転写因子Aについては、ATACseq上、IL-5のイントロン領域のその結合予測部位が、EGFP⁺群においてのみオープンクロマチンとなっており、EGFP⁺群におけるIL-5産生が転写因子Aにより制御されている可能性が示唆された。実際、脾臓Th

細胞と比較してIL-5を高産生する脂肪織Th細胞で、転写因子Aの発現が顕著に亢進していることや、転写因子Aの阻害剤が、EGFP+細胞や脂肪織Th細胞のIL-5産生を強く抑制することを、確認している。また、EGFP+群で発現亢進する64個の中の一つの遺伝子でコードされる分泌性蛋白質Xに関しては、EGFP+群でその産生が著増していることや、EGFP+細胞においてのみその受容体Yの発現が増加することを突き止めた。更に、その阻害剤Zが、EGFP+ Th細胞、野生型脾臓由来Th細胞、および、抗原で感作したマウスから取り出された後に抗原で再刺激された全脾細胞、いずれの細胞群においても、IL-5産生を強力に抑制することも見出している。すなわち、IL-5高産生性Th2細胞は、分泌性蛋白質Xを介して、オートクライン的に自身を活性化している可能性を示唆する結果を得た (図1)。



②GDF3産生肥満促進性ATMの分化誘導機構

申請者は以前、マクロファージからのGDF3産生に関して、臓器特異性を認める (各種臓器由来マクロファージの中でATMが選択的にGDF3を高産生する) ことや、インスリンがATMからのGDF3産生を亢進することを報告したが (*Diabetes* 2018) (2)、その他のGDF3発現調節機構は、ほとんど分かっていなかった。申請者はまた、ALK7遺伝子変異の導入やALK7阻害抗体によるALK7経路の阻害が、ATMからのGDF3産生を著減させることも見出していた。ALK7は主に成熟白色脂肪細胞に発現し、ATMにはほとんど発現していないことから、ALK7が活性化することで脂肪細胞から分泌される因子が、ATMのGDF3産生を亢進させる可能性が考えられ、そのような因子の探索を行った。各種検討の結果、最終的に、「ALK7活性化→脂肪細胞からのS100A8/A9の産生亢進→脂肪織マクロファージのIL-1β産生亢進→脂肪織マクロファージのGDF3産生亢進→脂肪細胞上ALK7の更なる活性化」という、ポジティブループの存在を明らかにし (図2)、2023年に *JCI insight* 誌で報告した (3)。更に、S100A8/A9阻害剤paquinimodが、抗ALK7中和抗体と同様、GDF3産生の低下を伴って、肥満マウスの蓄積脂肪量を減少させる事も見出した。



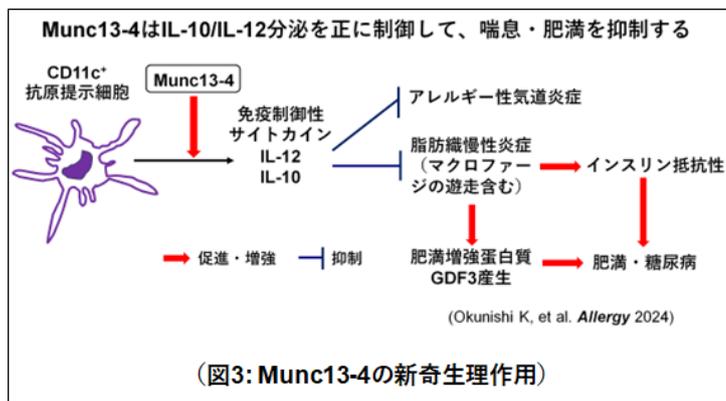
③喘息および肥満におけるMunc13-4の新奇生理作用

Rab27は、小胞輸送を制御する低分子量GTP結合蛋白の一つで、エフェクターと呼ばれるRab27結合蛋白質と協調して、小胞輸送を精巧にコントロールしている。Munc13-4はRab27エフェクター蛋白質の一つであり、免疫細胞から細胞傷害性顆粒の放出を正に制御することが良く知られる一方で、喘息や肥満におけるその役割は、全く不明であり、本研究でその解明を試みた。

申請者はまず、データベース (GTEx およびImmuNexUT) を用いて、Munc13-4をコードする *UNC13D* 遺伝子の喘息および肥満のリスクアレルのeQTL効果を検索した。そして、当該リスクアレルが、末梢血やヒト免疫細胞におけるMunc13-4の発現を減少させるeQTL効果を有することを突き止めた。

そこで、*Unc13d* 遺伝子変異を有し、Munc13-4蛋白質が欠失した *jinx* マウスを用いた解析を行った。その結果、野生型マウスと比べ、*jinx* マウスで、喘息様アレルギー性気道炎症や肥満・糖尿病が悪化すること、後者に関しては、白色脂肪織炎症の増悪、および、肥満促進性サイトカインGDF3産生の亢進を伴うことを見出した。そして、骨髄キメラマウスを用いた検討で、血球系のMunc13-4の欠損が、これらの表現型表出に重要であることを明らかにした。次に、野生型および *jinx* マウス由来の各種免疫細胞の機能評価を行い、検討した範囲内では、CD11c⁺ 抗原提示細胞 (antigen presenting cells, APC) においてのみ、機能の差異を認められた。すなわち、野生型マウス由来の細胞と比べ、*jinx* マウス由来のCD11c⁺ APCでは、免疫制御性サイトカイン

ンであるIL-10およびIL-12の分泌が有意に低下し、その移入は、アレルギー性気道炎症や肥満に伴う脂肪織炎症を増悪させること、後者はインスリン抵抗性の増悪につながることを明らかにした。以上から、Munc13-4は、CD11c⁺ APCからのIL-10/IL-12分泌を正に制御することで喘息や肥満・糖尿病の発症・進展を抑制することが示唆された(図3)。これらの結果を、2024年に *Allergy*誌で報告した(4)。



3. 考察・今後の展望

①IL-5高産生性アレルギー促進性Th2細胞

今後は、バルクのRNAseqやATACseqの結果の再現性を確認すると共に、シングルセルでのRNAseq・ATACseqやCUT&Tagなど、より詳細な解析を行うことで、IL-5高産生性Th2細胞の細胞特性の全貌を明らかにしていきたい。また、喘息や肥満・糖尿病などの各種疾患モデルにおいて、EGFP+陽性細胞の動態の詳細な解析を行う予定である。更に、各種疾患モデルにEGFP-/+の細胞を移入することでその生理作用を明らかにし、前述の各種阻害剤の個体レベルでの効果の検討も行う。これらの検討を通して、IL-5高産生性Th2細胞の制御を介した新規の疾患治療法の開発に繋がる結果を得ることを期待する。

②GDF3産生肥満促進性ATMの分化誘導機構

炎症性サイトカインの中でもTNF- α などは、脂肪分解を促進するという報告もある。一方で、NLRP3(成熟IL-1 β の産生に必須の因子。図2参照)の遺伝子欠損マウスでは、GDF3産生低下を伴って肥満が抑制されることが報告されており、申請者自身でも、S100A8/A9阻害剤であるpaquinimodが、肥満マウスの脂肪蓄積を減少させることを見出していることから、少なくともIL-1 β やS100A8/A9に関しては、全体として肥満を促進させる作用を有すると考えられる。

今後は、肥満マウスから単離したCD11c^{-/+}のATMや、IL-5と同様の方法で作製したGDF3-EGFPレポーターマウスから単離したEGFP^{-/+}細胞に対して、RNAseqやATACseqなどの網羅的遺伝子解析を行い、GDF3産生肥満促進性ATMの細胞特性や分化誘導機構の更なる詳細を明らかにして行きたい。これらの検討を通して、GDF3産生制御を介した新奇肥満症治療法の開発に繋がる結果を得ることを、期待する。

③喘息および肥満におけるRab27エフェクターの新奇生理作用

これまで各疾患との関連が示されたSNPは、IL-33、TSLP(喘息)やALK7(肥満)など、既に各疾患における病原性が先に明らかにされていた蛋白質の遺伝子が多かったが、Munc13-4に関しては逆に、GWASで先に喘息・肥満との関連が指摘され、本研究により、その病原性・生理作用の詳細が初めて明らかにされており、この点も、本研究の重要な意義と考えている。

Munc13-4以外のRab27エフェクターの喘息や肥満・糖尿病における役割はほとんど分かっておらず、申請者が保有するRab27エフェクター6分子の遺伝子欠損マウスを用いて、それを明らかにしていく。既に、ある分子の遺伝子欠損マウスで、Munc13-4欠損 *jinx*マウスと同様に、喘息および肥満・糖尿病の表現型が悪化することを見出している。今後の検討を通して、アレルギー・免疫応答や脂肪蓄積におけるRab27エフェクターの重要性が明らかにされ、将来的に、その制御を介した新奇治療法の開発に繋がることを期待する。

最後に、本研究に対する多大なる支援に、心から感謝申し上げます。

参考文献

(*、corresponding authors; #, equally contributed)

- 1) **Okunishi K**[#], Wang H[#], Suzukawa M, Ishizaki R, Kobayashi E, Kihara M, Abe T, Miyazaki J, Horie M, Saito A, Saito H, Nakae S, Izumi T*. Exophilin-5 regulates allergic airway inflammation by controlling IL-33-mediated Th2 responses. *J. Clin. Invest.* 130:3919-3935, 2020.
- 2) Bu Y, **Okunishi K**^{*}, Yogosawa S, Mizuno K, Irudayam MJ, Brown CW, Izumi T*. Insulin regulates lipolysis and fat mass by upregulating growth/differentiation factor 3 in adipose tissue macrophages. *Diabetes* 67:1761-1772, 2018.
- 3) Zhao M[#], **Okunishi K**[#], Bu Y[#], Kikuchi O, Wang H, Kitamura T, Izumi T. Targeting activin receptor-like kinase 7 ameliorates adiposity and associated metabolic disorders. *JCI insight* 8:e161229, 2023.
- 4) **Okunishi K**^{*}, Kochi Y, Zhao M, Wang H, Nakagome K, Izumi T*. Munc13-4 regulates asthma and obesity in mice by controlling functions of CD11c⁺ antigen-presenting cells. *Allergy* 79:1992-1995, 2024.