

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08248

研究課題名(和文) アレルギー性気管支喘息時の過敏性気管支平滑筋細胞におけるエピゲノム変化とその遺伝

研究課題名(英文) Possible involvement of epigenomic alterations in the development of bronchial smooth muscle hyperresponsiveness in allergic asthma

研究代表者

千葉 義彦 (Chiba, Yoshihiko)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00287848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アレルギー性喘息時の気道過敏性発現に關与するエピゲノム変化の同定を試みた。喘息モデルマウスでは、RhoAタンパク質過剰発現を伴う気管支平滑筋過敏性が獲得されていた。このRhoA過剰発現は、親世代と比較してF3世代で増強される傾向が認められた。喘息群の気管支平滑筋において、93遺伝子のCpG islandsメチル化レベルの変動が認められたが、RhoA遺伝子のCpGメチル化には変化は認められなかった。一方、14種のmiRNAsおよび131種のlncRNAsに発現変動が認められ、これらエピゲノム変化が気道過敏性発現に關与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The current study was performed to identify epigenetic changes associated with the pathogenesis of airway hyperresponsiveness (AHR) in asthma. In bronchial smooth muscles (BSMs) of mice with asthma, a BSM hyperresponsiveness with an up-regulation of RhoA protein was observed. The RhoA up-regulation induced by antigen tended to be augmented in BSMs of the F3 generation compared to those of the parents. A MeDIP-Seq analysis revealed 93 differentially methylated regions of CpG islands between the diseased and control BSMs. However, no change in the CpG methylation of RhoA gene was observed. Microarray analyses revealed 14 and 131 differentially expressed miRNAs and lncRNAs, respectively, in BSMs of the diseased mice. Some of the ncRNAs that might be associated with RhoA translation are also differentially expressed. These findings suggest that wide variety of epigenetic changes, including changes in functional ncRNA expression, in the BSMs are involved in the development of AHR in asthma.

研究分野：生理学、病態生理学、薬理学。特にアレルギー疾患時の平滑筋等の過敏性発症機序。

キーワード：アレルギー性喘息 気道過敏性 気管支平滑筋 RhoA microRNA (miRNA) long non-coding RNA lncRNA

1. 研究開始当初の背景

近年のアレルギー研究は、おもに免疫細胞を中心とした発症機序解明に力が注がれ、成果をあげている。しかしながら、実際の患者は「今ある症状」に苛まれており、この症状を急速かつ永続的に緩解させるような薬物・治療法の確立が望まれている。多くのアレルギー疾患で問題となるのが標的臓器・組織の過敏性であり、例えば気管支喘息の根底には気道過敏性が存在し、わずかな刺激でも気道が過剰に収縮し、喘息死の原因となる。アレルギー性鼻炎やアトピー性皮膚炎においても鼻粘膜や皮膚の過敏性が根底に存在しており、わずかな刺激でも激しい症状が惹起され、患者の QOL を著しく低下させてしまう。一方、喘息発作に短時間作用型 β_2 作動薬が著効を示すことから、発作時の気道狭窄には気管支平滑筋の過剰収縮が深く関与していることがうかがえる。研究代表者はこれまでに、この点に着目して種々の検討を行い、アレルギー反応時に気管支平滑筋自体に質的変化が惹起され、収縮反応性の亢進すなわち気道過敏性が獲得されることを証明した。すなわち、喘息時の気管支平滑筋細胞において RhoA タンパク質発現が増加している。RhoA は平滑筋収縮、特に Ca^{2+} に対する感受性を亢進させる Ca^{2+} sensitization に関与する中心的なタンパク質で、この RhoA の発現増加により軽微な刺激でも過剰な収縮反応を惹起し、これが気道過敏性の一因である可能性を示唆した。しかしながら、病態時に RhoA 発現が変動するメカニズムについてはまだ完全には解明されていない。

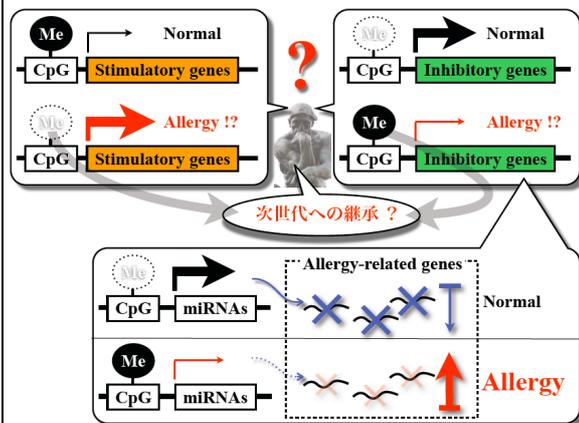
近年、エピジェネティクスと呼ばれるゲノム DNA 塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現を高次元に制御する機構が明らかとなった。このエピジェネティクス機構の一つに DNA メチル化があり、プロモータ領域 CpG が高度にメチル化されると、その遺伝子発現は抑制される。アレルギー・免疫領域においても、例えば T 細胞の Th1、Th2 への分化に IL-13 や IL-4 の CpG メチル化レベルが関与するなど、いわゆる免疫細胞を中心とした解析が進んでいる。しかしながら、多くのアレルギー疾患で問題となる標的臓器・組織の過敏性、すなわち喘息時の気管支平滑筋細胞などアレルギー病変部位の非免疫細胞に関する情報は皆無である。さらに、DNA メチル化変動が複数世代にわたり遺伝する可能性も報告されて (*Science* 2005; **308**: 1466-9, *Nature* 2010;**467**:963-6, *Cell* 2011; **145**: 1049-61)、我が国のスギ花粉症を例に挙げた場合、スギを植林した時代の親世代、子世代そして孫世代を含めた現在まで長年にわたりスギ花粉に曝露され、これに起因する DNA メチル化の変化が遺伝・継承され患者数の爆発的増加につながったとも考えられる。

以上の研究代表者のこれまでの研究成果と他の研究者による学術的背景を発展的に融合させる形で、「例えば気管支喘息におけ

る RhoA 遺伝子のようなアレルギー症状関連遺伝子、あるいは miRNA 等その発現制御因子のレベル低下によりその遺伝子発現が増加して症状が発現するのではないかと、「この miRNA レベル低下に、プロモーター領域の CpG メチル化あるいは host gene のイントロンの CpG メチル化が関与しているのではないかと？」さらに「この DNA メチル化レベルの変化が次世代に継承されるのではないかと？」と考え、本研究計画の着想に至った。

2. 研究の目的

近年、気管支喘息やアレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患罹患率が全世界的にも飛躍的に増大しており、我が国ではスギ花粉症が今や「国民病」とまで言われるほど患者が増えている。その原因を解明すべく、下図のような仮説を立てた。すなわち、一般に DNA メチル化レベルが高いとその遺伝子の発現は抑制されるが、アレルギー促進遺伝子の発現増加あるいは抑制遺伝子の発現減少に DNA メチル化レベルの変化が関与しているのではないかと。さらに、この DNA メチル化レベルの変化が次世代に継承されるのではないかと。本研究計画では、このようなエピジェネティクスの観点からアレルギー症状が発現するメカニズムを解明するとともに、アレルギー体質すなわちアレルギー症状の発現しやすさが遺伝する可能性を証明する。



3. 研究の方法

雌雄 BALB/c マウス (7 週齢) にアレルギーとして OA、アジュバントとして alum を腹腔内投与して感作を施し、5 日後に同様の方法で追加感作を施した。初回感作の 12、16 および 20 日後に、OA 溶液のエアゾールを 30 分間吸入させることによりチャレンジを行い、喘息様症状を惹起させた。これら動物を Parent 群として交配させ、各世代ごとに同様に喘息症状を惹起させた F1~F3 世代を準備した。Parent 群と F3 群について、最終抗原チャレンジ 24 時間後に実験に供し、気管支肺胞洗浄液 (BALF) の採取、摘出左主気管支リング標本を用いた tension study、主気管支

組織からの total RNA 抽出およびタンパク質サンプルの調製を行った。

4. 研究成果

4-1. 喘息モデルマウスにおける気管支平滑筋過敏性の確認

喘息群(Chal)の摘出左主気管支平滑筋のアセチルコリンに対する収縮反応性を測定したところ、コントロール群(NC)と比較してその濃度-反応曲線は左上方にシフトし、気管支平滑筋過敏性が獲得されていることを再確認できた(Fig. 1)。

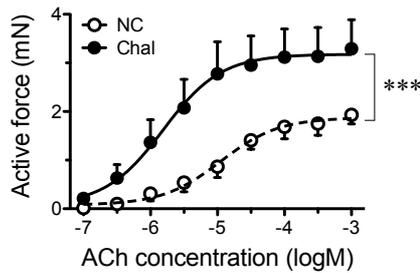


Fig. 1

4-2. 喘息マウスの過敏性気管支平滑筋における RhoA up-regulation および F3 世代におけるその変化

Fig. 2 に示すように、喘息群の主気管支組織において RhoA up-regulation が確認でき、F3 群でわずかに増強される傾向が認められた。一方、F3 群では各種サイトカインレベルが有意に低く(Fig. 3)、すなわち F3 群ではより少ないサイトカインレベルで RhoA up-regulation が惹起され、複数世代にわたる抗原暴露によりわずかな抗原刺激でも気管支平滑筋過敏性が形成されやすくなる可能性が示唆された。

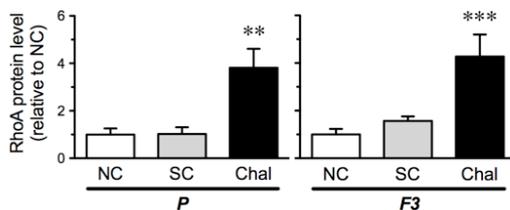


Fig. 2

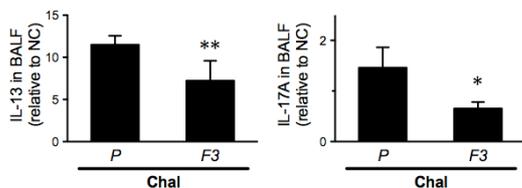


Fig. 3

4-3. 喘息マウスの過敏性気管支平滑筋における CpG メチル化レベルの変化

MeDIP-Seq を用いて喘息時の気管支平滑筋における DNA メチル化レベルの変化について検討を行ったところ、喘息群では 62 の CpG

メチル化が増加しており、31 の CpG メチル化が減少していた(Fig. 4)。しかしながら、RhoA 遺伝子の CpG メチル化には変化は認められなかった(Fig. 5)。

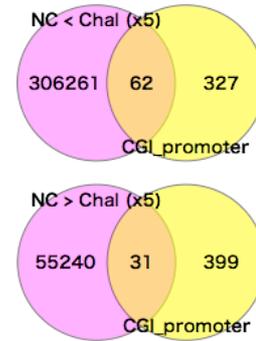


Fig. 4



Fig. 5

4-4. 喘息マウスの過敏性気管支平滑筋における各種 miRNA レベルの変化

マイクロアレイ法を用いて網羅的解析を行ったところ 14 種の miRNAs に発現変動が認められ(Table 1)、RT-qPCR 法を用いて検討を行ったところ、RhoA 翻訳を抑制的に制御することが知られている miR-133a-3p 発現が有意に低下していた(Fig. 6)。

Table 1. Differentially expressed miRNAs in bronchial smooth muscles of murine experimental asthma.

| miRNA (mmu-) | Accession | Mature sequence | Human expression | AHR/Cont |
|--------------|--------------|------------------------------|------------------|----------|
| miR-140-3p | MIMAT0000152 | 5'-UACCACAGGGUAGAACCACGG-3' | Yes | 0.448 |
| miR-140-5p | MIMAT0000151 | 5'-CAGUGGUUUUACCCUUGGUAG-3' | Yes | 0.449 |
| miR-133a-3p | MIMAT0000145 | 5'-UUUGGUCCUUCAACCAGCUG-3' | Yes | 0.465 |
| miR-1971 | MIMAT0009446 | 5'-GUAAGGCGGGCUGAGA-3' | No | 2.004 |
| miR-142-3p | MIMAT0000155 | 5'-UGUAGUGUUCCUACUUUUGGA-3' | Yes | 2.101 |
| miR-669e-5p | MIMAT0003479 | 5'-AUAGUUGUGUGUGUGUGUGU-3' | No | 2.123 |
| miR-1897-5p | MIMAT0007864 | 5'-CUUUGGAGGAGAAGAGGGGG-3' | No | 2.257 |
| miR-300-5p | MIMAT0004578 | 5'-UUGAAGAGAGGUUAUCCUUUGU-3' | Yes | 2.262 |
| miR-1196-5p | MIMAT0005857 | 5'-AAUUCUACCCGCUCCU-3' | No | 2.488 |
| miR-302a-3p | MIMAT0000380 | 5'-UAAGUGCUUCCUUGUUUGGUGA-3' | Yes | 2.525 |
| miR-133b-3p | MIMAT0000769 | 5'-UUUGGUCCUUCAACCAGCUA-3' | Yes | 3.134 |
| miR-1947-3p | MIMAT0017343 | 5'-GCACUGAGCUAGCUCUCCUCC-3' | No | 6.173 |
| miR-3100-3p | MIMAT0014920 | 5'-CUGUGACACCCCGUCCAG-3' | No | 6.410 |
| miR-3474 | MIMAT0015646 | 5'-CCUUGGGAGGAGCGUGGAUUC-3' | No | 12.195 |

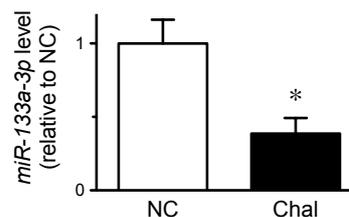


Fig. 6

4-5. 喘息マウスの過敏性気管支平滑筋における各種 lncRNA レベルの変化

マイクロアレイ法を用いて網羅的解析を行ったところ 104 種の lncRNAs に発現増加が認められ (Table 2)、27 種の lncRNAs に発現低下が認められた (Table 3)。RT-qPCR 法を用いて検討を行ったところ、miR-133a-3p に対する sponge 効果を有することが知られている *Malat1* 発現が有意に増加していた (Fig. 7)。

Table 2. Up-regulated lncRNAs in bronchial smooth muscles of murine experimental asthma.

| Accession | FC (C/N) | Accession | FC (C/N) | Accession | FC (C/N) |
|--------------|-----------|--------------|----------|--------------|----------|
| XR_887134 | 490.36648 | NR_024198 | 3.198618 | XR_875471 | 2.329252 |
| XR_381951 | 20.631832 | NR_004439 | 3.177691 | NR_028576 | 2.328820 |
| NR_015531 | 10.265983 | NR_026561 | 3.139051 | XR_395611 | 2.312303 |
| NR_005279 | 9.639573 | XR_882345 | 3.128125 | NR_035305 | 2.312041 |
| XR_399068 | 7.890602 | NR_038009 | 3.087224 | NR_001460 | 2.274721 |
| XR_105855 | 7.780894 | NR_004415 | 3.016367 | XR_375928 | 2.265821 |
| NR_034051 | 7.326333 | XR_882345 | 2.979233 | NR_002847 | 2.254719 |
| NR_028284 | 6.910764 | XR_382381 | 2.939927 | NR_033450 | 2.253938 |
| XR_864896 | 6.524748 | NR_137278 | 2.932556 | NR_037956 | 2.242523 |
| NR_033626 | 6.405065 | XR_371596 | 2.925795 | XR_406738 | 2.225491 |
| XR_365119 | 5.974406 | NR_045076 | 2.924477 | NR_045893 | 2.210282 |
| XR_864896 | 5.929715 | NR_040311 | 2.888612 | XR_380624 | 2.209298 |
| XR_382815 | 5.824578 | NR_040588 | 2.868269 | XR_867757 | 2.199416 |
| NR_034048 | 5.527766 | NR_034049 | 2.863531 | XR_105056 | 2.195273 |
| XR_865012 | 5.383397 | XR_878949 | 2.860189 | NR_027885 | 2.192440 |
| NR_003185 | 5.279146 | NR_028589 | 2.848983 | XR_865063 | 2.190003 |
| XR_864479 | 5.220174 | NR_131023 | 2.811802 | XR_377341 | 2.170722 |
| NR_030762 | 5.196376 | XR_388547 | 2.777311 | XR_379940 | 2.168685 |
| NR_030687 | 4.986913 | NR_045886 | 2.727862 | NR_028261 | 2.143408 |
| NR_028512 | 4.892976 | NR_102366 | 2.702306 | NR_045845 | 2.138311 |
| NR_004411 | 4.767101 | NR_027810 | 2.673391 | XR_001782255 | 2.131614 |
| NR_004413 | 4.661074 | XR_387256 | 2.640272 | XR_001779409 | 2.111890 |
| NR_004412 | 4.571232 | NR_045780 | 2.629839 | XR_106151 | 2.086490 |
| NR_045477 | 4.338807 | NR_028589 | 2.616854 | NR_015349 | 2.074272 |
| XR_390643 | 3.994354 | NR_034043 | 2.609435 | NR_036696 | 2.069703 |
| NR_045009 | 3.830412 | XR_001784350 | 2.601112 | NR_045140 | 2.065786 |
| XR_385732 | 3.714739 | XR_384503 | 2.545353 | NR_001582 | 2.062997 |
| NR_003953 | 3.619611 | NR_040424 | 2.532320 | NR_045963 | 2.050842 |
| NR_052007 | 3.579268 | XR_380952 | 2.508366 | NR_040518 | 2.049233 |
| XR_876719 | 3.553004 | XR_403899 | 2.447817 | XR_878949 | 2.043708 |
| NR_045287 | 3.550120 | XR_384254 | 2.421779 | NR_004442 | 2.043294 |
| NR_001277 | 3.526804 | NR_015561 | 2.396323 | NR_040737 | 2.027162 |
| XR_001780315 | 3.293129 | XR_397206 | 2.387335 | NR_027818 | 2.020839 |
| XR_882345 | 3.235214 | NR_032499 | 2.377312 | XR_866036 | 2.017714 |
| NR_002142 | 3.209940 | NR_040454 | 2.340333 | | |

Table 3. Up-regulated lncRNAs in bronchial smooth muscles of murine experimental asthma.

| Accession | FC (C/N) |
|-----------|-----------|
| XR_882161 | -4.708270 |
| NR_033575 | -3.425506 |
| XR_868721 | -2.996539 |
| NR_033566 | -2.974643 |
| XR_877805 | -2.777458 |
| XR_375688 | -2.598335 |
| NR_033657 | -2.475537 |
| NR_027772 | -2.413115 |
| NR_045471 | -2.369027 |
| XR_389234 | -2.348590 |
| NR_040273 | -2.336968 |
| XR_877120 | -2.284302 |
| XR_388996 | -2.239406 |
| NR_002874 | -2.237117 |
| NR_027963 | -2.229504 |
| NR_015472 | -2.229152 |
| XR_875173 | -2.225878 |
| XR_868683 | -2.206767 |
| XR_386006 | -2.202024 |
| NR_027923 | -2.185073 |
| XR_037668 | -2.142068 |
| NR_033332 | -2.094782 |
| XR_383532 | -2.082004 |
| XR_403339 | -2.081235 |
| XR_168557 | -2.044845 |
| XR_379341 | -2.028231 |
| NR_003548 | -2.012217 |

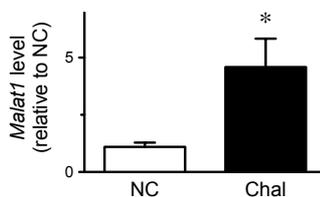


Fig. 7

以上の結果より、喘息時の気管支平滑筋細胞では *Malat1* 発現が増加しており、その sponge 効果で miR-133a-3p が低下して RhoA 翻訳抑制が解除され、これにより RhoA up-regulation がもたらされる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. **Chiba Y**, Danno S, Suto R, Suto W, Yamane Y, Hanazaki M, Katayama H and Sakai H. Intranasal administration of recombinant progranulin inhibits bronchial smooth muscle hyperresponsiveness in mouse allergic asthma. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **314**, L215-L223, 2018. (査読あり)
2. **Chiba Y**, Tanoue G, Suto R, Suto W, Hanazaki M, Katayama H and Sakai H. Interleukin-17A directly acts on bronchial smooth muscle cells and augments the contractility. *Pharmacol. Rep.* **69**, 377-385, 2017. (査読あり)

[学会発表] (計 41 件)

1. 安達幸佳, 藤井茂基, 須藤 航, 花崎元彦, 片山 浩, 酒井寛泰, 千葉義彦: マウスアレルギー性喘息時の過敏性気管支平滑筋における *Malat1* 発現の増加. 日本薬学会第 138 年会, 2018 年 3 月 25-28 日, 金沢.
2. 土山実紗規, 須藤 航, 竹澤菜穂美, 原田梨香, 藤原実来, 花崎元彦, 片山 浩, 岩崎雄介, 酒井寛泰, 千葉義彦: 喘息モデルマウスの気道局所における脂肪酸代謝変化の網羅的解析. 日本薬学会第 138 年会, 2018 年 3 月 25-28 日, 金沢.
3. 須藤 航, 佐藤 翼, 片山 浩, 花崎元彦, 酒井寛泰, 千葉義彦: 抗原誘発喘息マウスの気管支平滑筋過敏性発現における prostaglandin D₂ (PGD₂) の関与. 第 59 回日本平滑筋学会総会, 2017 年 8 月 23-25 日, 福岡
4. 須藤 航, 安達幸佳, 山根大和, 佐藤 翼, 岩崎雄介, 酒井寛泰, 亀井淳三, 千葉義彦: マウスアレルギー性喘息時の過敏性気管支平滑筋における発現変動遺伝子の網羅的解析. 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 24-27 日, 仙台.
5. 千葉義彦, 安達幸佳, 須藤 航, 山根大和, 花崎元彦, 片山 浩, 酒井寛泰: マウスアレルギー性喘息時の過敏性気管支平滑筋における long noncoding RNAs 発現の変化. 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 24-27 日, 仙台.
6. 山根大和, 須藤 航, 岩崎雄介, 酒井寛泰, 千葉義彦: マウス気管支平滑筋の low pH 誘発収縮抑制反応における PGE₂ の関与. 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 24-27 日, 仙台.
7. 甲斐友規, 千葉義彦, 里 史明, 湯本哲郎, 酒井寛泰: 気道過敏性時の気管支平滑筋収縮反応亢進における Rac1 signaling の関与. 日本薬学会第 137 年

会, 2017年3月24-27日, 仙台.

8. 千葉義彦, 太田康介, 多田沙織, 川田朋, 須藤航, 岩崎雄介, 酒井寛泰, 花崎元彦, 片山浩: 喘息マウスの気管支平滑筋における RhoA 発現に及ぼす複数世代抗原曝露の影響. 日本薬学会第 136 年会, 2016年3月26-29日, 横浜.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

星薬科大学ホームページ

<http://www.hoshi.ac.jp/site/index.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 義彦 (YOSHIHIKO Chiba)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 00287848

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

酒井 寛泰 (HIROYASU Sakai)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号: 00328923

(4) 研究協力者

なし