

平成30年6月6日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09222

研究課題名(和文) 閉塞性肺疾患の増悪に関わるB7H1に対し既存薬再開発を含めた創薬をめざす基盤研究

研究課題名(英文) Innovation of drug seeds against B7-H1 involved in exacerbation of obstructive lung diseases

研究代表者

松元 幸一郎 (MATSUMOTO, KOICHIRO)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：60325462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：閉塞性肺疾患の増悪誘因としてウイルス感染は重要である。ウイルス関連分子である2本鎖RNA刺激による培養気道上皮実験系を用いてB7-H1/PD-L1発現を抑制できるPI3-kinase-delta阻害薬を見出した。その臨床的応用へ向けての段階として、疾患モデルマウスを用いた検証をおこなった。マウスに合成2本鎖RNAを気管内投与することで、一般的なウイルス感染気道炎症モデルを作成した。このモデルにおけるB7-H1/PD-L1の発現動態および気道炎症を解析した。PI3-kinase-delta阻害薬は本モデルにおけるB7-H1/PD-L1の発現および気道炎症を抑制することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Airway viral infections cause the exacerbations of obstructive lung diseases. B7-H1/PD-L1 is an immune-checkpoint molecule that plays a role in an escape mechanism of viruses from the host immune systems. This escape may be associated with the persistence of viral infection and the exacerbation of the underlying diseases. In a study in vitro, we have shown that a PI3-kinase-delta inhibitor attenuated the upregulation of B7-H1/PD-L1 on airway epithelial cells stimulated with an analog of viral double-stranded(ds) RNA. In this study, we investigated the effect of PI3-kinase inhibitor on the expression of B7-H1/PD-L1 in dsRNA-induced inflammation in mice. Administration of dsRNA upregulated the expression of B7-H1/PD-L1 and induced neutrophilic inflammation, which were suppressed by pretreatment with the PI3-kinase inhibitor. These results suggest PI3-kinase-delta inhibitor as a candidate of clinical use for preventing the virus-induced exacerbations of obstructive lung diseases.

研究分野：呼吸器病学

キーワード：B7-H1 PD-L1 気管支喘息 COPD ウイルス感染 複合病態

### 1. 研究開始当初の背景

COPD や喘息など閉塞性肺疾患の増悪誘因としてウイルス感染は重要である。抗ウイルス免疫の代表はインターフェロン応答であるが、COPD・喘息患者の気道上皮ではこの応答が健常者と比べて減弱している。一方、RS ウイルスやライノウィルスは IL-4, IL-13, IL-33 などの Th2 反応を誘導することで喘息の増悪を誘導しやすい。すなわち、増悪機序の解明には、COPD・喘息と感染の複合病態の特殊性を認識する必要がある。肺疾患とウイルス感染の複合病態において、気道上皮に発現誘導される B7-H1/PD-L1 は抗ウイルス免疫を強く抑制する。すなわち感染の遷延により閉塞性肺疾患の増悪に繋がる。我々は、培養ヒト気道上皮をウイルス関連分子 2 本鎖 RNA で刺激すると、B7-H1/PD-L1 発現が増強し、その発現はステロイド抵抗性であることを報告した (Tsuda et al. 2005, *BBRC*)。そこで、B7-H1/PD-L1 の発現機序を解明する研究を進め、その発現が転写因子 NF- $\kappa$ B 依存性であり、ステロイドと長時間作用型  $\beta$ 2 刺激薬 (LABA) の併用によって抑制できることを見出した (Kan-o et al. 2013, *Int Arch Allergy Immunol*)。ステロイドと LABA の配合薬は閉塞性肺疾患の増悪の予防にも有効であること知られている。我々の研究は、配合薬による増悪予防効果の一部が B7-H1/PD-L1 発現抑制によるウイルス感染の遷延化抑止を介している可能性を示したものと見える。一方、COPD で吸入ステロイドが肺炎を増加させる懸念や喘息に LABA を長期使用することへの懸念も指摘されており、別の作用に基づく創薬が求められる。なお、B7-H1/PD-L1 は多くの癌細胞でも発現しており癌免疫の妨げとなっている。抗 B7-H1/PD-L1 抗体が生物製剤として開発が進められているが、これら高分子の抗体薬は高コストであり感染による

増悪への汎用化は困難である。

### 2. 研究の目的

我々は、ウイルスやウイルス関連分子である 2 本鎖 RNA 刺激による培養気道上皮実験系を用いて B7-H1/PD-L1 発現を抑制できる低分子化合物の探索を続け、PI3-kinase- $\delta$  阻害薬をはじめ幾つかの候補物質を見出した。これら候補物質の臨床的応用へ向けての次なる段階として、疾患モデルマウスを用いた *in vivo* での検証が必要となる。本研究では病態モデルを作製し、候補薬を絞り込み、アカデミア創薬を目指す。

### 3. 研究の方法

マウスに 2 本鎖 RNA を気管内投与する *in vivo* モデルおよび培養気道上皮細胞に 2 本鎖 RNA を添加刺激する *in vitro* モデルを併用して、B7-H1/PD-L1 の発現を誘導し、種々の処置によってその発現制御機構を検討する。

### 4. 研究成果

(1) 第一段階として、吸入麻酔した C57BL/6 野生型マウスに合成 2 本鎖 RNA を気管内投与することで、一般的なウイルス感染気道炎症モデルを作成した。このモデルにおける B7-H1/PD-L1 の発現動態および気道炎症を解析した。すなわち、切除肺からコラーゲナーゼ処理によって細胞浮遊液を作成し、keratin 陽性細胞を対象とした B7-H1/PD-L1 の発現を経時的に解析した。B7-H1/PD-L1 の発現は 2 本鎖 RNA 投与の 24 時間後から 72 時間後にかけて増強し、気管支肺胞洗浄液中の好中球数は 24 時間後でピークを示したことから、24 時間後を諸処置の評価ポイントに設定した。本モデルにおいて長時間作用型のステロイドであるシクレソニド、LABA であるインダカテロールそれぞれ単剤、あるいは併用を 2 本鎖 RNA 投与の 4 時間前に気管内投与し、

非投与群をコントロール群として比較検討した。シクレソニド単独投与、インダカテロール単独投与は 2 本鎖 RNA による B7-H1/PD-L1 の発現増強に影響しなかったが、シクレソニドとインダカテロールの併用投与は B7-H1/PD-L1 の発現増強を有意に抑制した。2 本鎖 RNA による好中球性炎症や気管支肺胞洗浄液中の IL-6, KC, MIP-1 $\beta$  増加はシクレソニドとインダカテロールの併用投与で抑制されなかったことから、両剤併用は炎症の抑制を介さずに keratin 陽性細胞における B7-H1/PD-L1 の発現増強を抑制すると考えられた。keratin 陽性細胞の多くは上皮細胞であることから、この実験結果は我々が *in vitro* の実験系で明らかにしたステロイドと LABA 併用による B7-H1/PD-L1 発現制御 (Kan-o et al. 2013, *Int Arch Allergy Immunol*) を *in vivo* のモデルで証明するものである。本研究成果は原著論文 Hamano et al. 2017, *J Inflamm* として掲載された。

(2) keratin 陽性細胞としては上皮系以外にも好中球などの炎症細胞も死細胞の貪食などによって一部陽性を示すことや、活性化した炎症細胞が自己発光を示し疑陽性反応が混在する可能性があった。そこで、発展型モデルとして、蛍光標識抗 EpCAM 抗体、抗 CD11b 抗体、抗 CD11c 抗体、抗 CD45 抗体を組み合わせて自己発光細胞を除去し、さらに FSC, SSC のパネル上の分布パターンと参考にゲーティングする工夫をおこなうことによって、上皮細胞系、好中球系、マクロファージ・単球系、リンパ球系に選別標識することに成功した。このモデルを用いて、各細胞系における B7-H1/PD-L1 の発現動態を解析し、かつて *in vitro* の実験系で明らかにした PI3-kinase- $\delta$  阻害薬の作用を検討した。2 本鎖 RNA をマウスに気管内投与すると上皮細胞系、好中球系、マクロ

ファージ・単球系、リンパ球系で B7-H1/PD-L1 の発現が増強し、PI3-kinase- $\delta$  阻害薬の前投与は上皮細胞系と好中球系における B7-H1/PD-L1 の発現増強を有意に抑制されることを見出した。また、2 本鎖 RNA による好中球性炎症や気管支肺胞洗浄液中の IL-6, KC, MIP-1 $\beta$  増加も PI3-kinase- $\delta$  阻害薬の前投与によって有意に抑制され、PI3-kinase- $\delta$  阻害薬が免疫チェックポイント分子 B7-H1/PD-L1 の発現制御および抗炎症作用という多面的作用を有することを *in vivo* 実験系で示すことができた (論文投稿準備中)。現在、PI3-kinase- $\delta$  阻害薬シーズを有する製薬企業との産学連携をめざしている。

(3) PI3-kinase 系以外の B7-H1/PD-L1 発現制御系の探索を目的として、培養気道上皮細胞株 BEAS-2B を 2 本鎖 RNA で刺激して B7-H1/PD-L1 の発現を誘導する *in vitro* 実験系を使用して、STAT 系シグナル伝達の関与を検討した。IL-22 は炎症局所でリンパ球を主とする免疫細胞から分泌され、上皮修復作用や炎症調節作用を有し、その作用は主に STAT3 を介することが知られている。2 本鎖 RNA 刺激による B7-H1/PD-L1 の発現増強は IL-22 添加によって用量依存性に抑制された。2 本鎖 RNA 刺激は BEAS-2B 細胞において STAT1 および STAT3 のリン酸化を誘導し、IL-22 投与は STAT3 のリン酸化のみを誘導した。IL-22 による B7-H1/PD-L1 の発現抑制作用は STAT3 発現阻害作用を有する siRNA 処置によって消失した。2 本鎖 RNA 刺激による B7-H1/PD-L1 の発現増強は、IL-22 と同様に STAT3 リン酸化を誘導する IL-11 でも抑制された。さらに、C57BL/6 マウスに 2 本鎖 RNA を気管内投与する実験系でも IL-22 気管内投与は肺細胞上の B7-H1/PD-L1 の発現を抑制することを示した。すなわち、IL-22 は STAT3 を介して B7-H1/PD-L1 の発現を

負に制御することを明らかにし、原著論文  
Seki et al. 2017, *BBRC* として掲載された。

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2件)  
Hamano S, Matsumoto K, Tonai K, Fukuyama

S, Kan-o K, Seki N, Inoue H, Nakanishi Y.

Effects of corticosteroid plus long-acting  
beta2-agonist on the expression of PD-L1 in  
double-stranded RNA-induced lung  
inflammation in mice. *J Inflammation*. 14: 2,  
2017. doi: 10.1186/s12950-017-0149-4

Seki N, Kan-o K, Matsumoto K, Fukuyama S,  
Hamano S, Tonai K, Ota K, Inoue H, Nakanishi  
Y.

Interleukin-22 attenuates double-stranded  
RNA-induced upregulation of PD-L1 in airway  
epithelial cells via a STAT3-dependent  
mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*. 94:  
242-248, 2017. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.045

〔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:特になし。

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
松元 幸一郎 (MATSUMOTO, Koichiro)  
九州大学・医学(系)研究科・准教授  
研究者番号：60325462

(2)研究分担者  
福山 聡 (FUKUYAMA, Satoru)  
九州大学病院・呼吸器科・講師  
研究者番号：50380530