

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 2 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19431

研究課題名(和文) ウイルス感染が誘導するステロイド抵抗性気管支喘息のメカニズム解明とその制御法開発

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms for developing new strategies on a viral infection-induced steroid-resistant asthma

研究代表者

芦野 滋 (Ashino, Shigeru)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：10507221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ウイルス感染を想定しpoly I:Cを用いて重症喘息モデルマウスを作製することに成功した。通常の喘息に比べて重症喘息マウスでは気道過敏性が顕著に亢進し、一部ステロイド抵抗性の好中球性気道炎症を伴ってTh1/Th17免疫反応に関わるサイトカイン上昇も見られた。また重症喘息マウス肺組織内のTh細胞では自然免疫に関わるサイトカインが誘導するシグナル分子の活性化が確認された。現在これらサイトカイン・シグナル分子を標的にした制御法の有効性を検討している。一方でステロイド抵抗性関連遺伝子は重症喘息のTh細胞で発現増大しなかったため、その他の樹状細胞や気道上皮細胞を対象を広げて解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we first established an asthma exacerbation model mouse with a viral component poly I:C, which can mimic virus infection. It has been demonstrated that the airway hyperresponsiveness was higher in the poly I:C-induced asthma exacerbation model compared to regular asthma model. In addition, steroid-resistant neutrophilic airway inflammation with pulmonary Th1/Th17 cytokine productions was observed in the asthma exacerbation model. It has also found that innate immunity cytokines-associated signal molecules were activated in the helper T (Th) cells from the lung of exacerbated asthma model. We plan to demonstrate that targeting the molecules would be effective in improving the asthma exacerbation. On the other hand, since steroid resistance-related genes were not increased in the Th cells, we are investigating whether dendritic cells and airway epithelial cells have those molecules that could be targets for treatment of the steroid-resistant airway inflammation.

研究分野：呼吸器疾患

キーワード：気管支喘息

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息患者が、風邪症候群を引き起こすRSウイルスやライノウイルスに感染した際に、症状が重篤化する症例がしばしば見受けられる。臨床研究において、重症喘息患者ではそれらウイルス応答に関連したサイトカインレベルが上昇しているという報告があり、病態の悪化に関係があると言われている。これまで、申請者がモデルマウスを用いて行ってきた研究では、ウイルス感染応答に関係するinterferon- γ (IFN- γ) やinterleukin-17 (IL-17) のようなサイトカインが関係する気道炎症は、劇症型でありステロイド薬が無効な難治性であることを確認している。いずれのサイトカインも、ウイルス感染の際にTh細胞から産生される、あるいはTh細胞の機能を増強するものであり、これらのサイトカインが喘息の重症化に関わると考えられているため、サイトカイン中和抗体やサイトカインシグナルの阻害剤が治療に有用と言われている。

しかし、一方で、これらのサイトカインは、微生物感染の際の生体防御機構に重要であることから、サイトカインに対する抗体療法や阻害剤治療では、宿主の肺が易感染性となり日和見感染などの副作用を招く恐れがある。

現時点では、ウイルス感染状態にある喘息の重篤化がどのような機序で誘導されているかほとんど解明されていないうえに、安全性のある新規治療法も提唱されていない。

2. 研究の目的

本研究では、以上の背景を念頭に置き、ウイルス感染状態を設定したモデルマウスを独自に開発して、詳細な重症気管支喘息の病態を解析することを目的とした。

一般の気管支喘息は、免疫細胞の一種ヘルパーT (Th) 細胞のサブタイプ、Th2細胞が引き起こす病態であるが、ウイルス応答性免疫反応がこのTh2型の病態をいかに変遷させるかを、本研究における最初の解析項目とした。

また、ウイルス感染状況下において引き起こされる、生体防御機構に関わるサイトカイン産生が気管支喘息をどのように重篤化するか検討した。さらに、重症気管支喘息マウスの肺組織においてヘルパーT (Th) 細胞の機能がどのように変遷したか解析するとともに、ステロイド薬が有効ではない難治性の病態を誘導する因子がTh細胞に発現するかどうか精査することも研究目的の一項目とした。

さらに、本研究期間終了後も継続中であるが、気管支喘息の重篤化に関わる分子群を同定して、それらに対する中和抗体あるいは阻害剤がウイルス感染状態における重症喘息を改善する制御法であることを証明することも研究目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、気管支喘息モデルとして一般に広く使われている、アレルゲンとしてovalbumin (OVA) を感作・吸入させたマウスを用いた。具体的には、OVAと共にTh2アジュバントであるAlum (Al(OH)₃) を腹腔内投与してOVA感作を行った後に、OVAを3日間吸入させてTh2型の気管支喘息を惹起させた。

また、ウイルス感染を想定して、ウイルス成分の一つとして知られているdouble stranded RNAの人工試薬poly I:CをTh2型気管支喘息マウスの気管内に投与して、重症気管支喘息モデルマウスを作製した。

本研究では、以下の三つの項目を中心に研究を遂行した。

(1) 重症気管支喘息モデルマウスを確立するために、はじめに、ウイルス成分poly I:Cの投与タイミングを検討した。OVA/Alum感作後成立後、OVAを3日間吸入中(気管支喘息の惹起段階)にpoly I:Cを投与する場合と、OVAを吸入した後(気管支喘息が成立したあと)にpoly I:Cを投与する場合で、気道炎症がどのように変化するか検討した。これにより、重症喘息を効率的に誘導するウイルス感染時期の意義付けを試みた。

(2) 無処置の健常マウス、通常のTh2型気管支喘息マウス、poly I:C単独投与マウス、poly I:C投与された気管支喘息マウス(重症気管支喘息マウス)の肺組織から、それぞれセルソーターを用いてTh細胞を単離して、トランスクリプトーム解析を行い、Th細胞の性状変化を解析した。これにより、通常の気管支喘息から重症気管支喘息へ病態が悪化した際のTh細胞の機能変遷の情報を捕捉した。

(3) 重症気管支喘息モデルがステロイド抵抗性(難治性)であるかどうかを検討した。ステロイドは一般に広く使用されているデキサメサゾンを使用し、気管内投与(局所投与)、腹腔内投与(全身投与)を行い、その改善効果を検討した。これにより、気道炎症の難治化機構を解析できるモデルマウスが確立でき、(2)の研究項目と合わせて、Th細胞の機能変遷と難治性気道炎症の関連性を推察した。

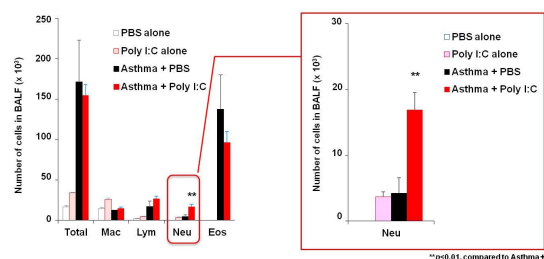
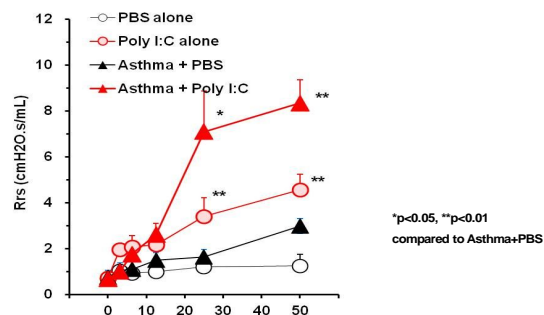
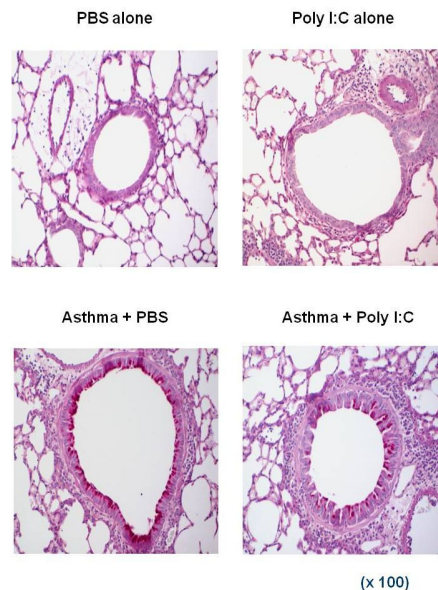
4. 研究成果

(1) 重症気管支喘息を惹起するウイルス成分poly I:C投与のタイミングについて

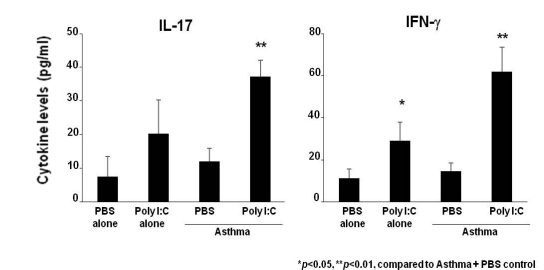
上述したように、一般のTh2型気管支喘息モデルマウスの、アレルゲンOVA吸入段階あるいはOVA吸入後の喘息成立後に、poly I:Cを気管内投与し、その24時間後に気道過敏性(airway hyperresponsiveness; AHR)を測定した。また、気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid; BALF)中の浸潤細胞を解析するとともに、BALF中の各種

サイトカインレベルを測定した。加えて、気道上皮組織における粘液産生を解析した。

その結果、polyI:C を OVA 吸入段階で気管内投与した場合は、Th2 型の気管支喘息の病態が減弱することがわかった。すなわち、肺への好酸球浸潤が抑制され、気道上皮組織における粘液産生も軽減した。OVA 吸入は3日間連続で行っていたため、polyI:C を OVA 吸入1日目、2日目、あるいは3日目に投与して検討したが、いずれも Th2 型の気道炎症は抑制された。一方で、OVA3 日間連続吸入後に(気管支喘息成立のあとに)、polyI:C を投与すると、AHR は、通常の Th2 型気管支喘息および polyI:C 単独処置群と比較して劇的に悪化することがわかった。さらに、Th2 型の気道炎症は保持されたまま、Th1/Th17 型の気道炎症が確認された。すなわち、激しい AHR 亢進とともに、肺内では好酸球浸潤が保持されながら好中球浸潤が伴っており、IFN- γ や IL-17 等のサイトカイン産生も増大していることがわかった。気道上皮組織における粘液産生は僅かに軽減していたが明らかな変化ではなかった (PolyI:C 投与で気管支喘息が重症化した結果を以下に示した)。



気管支喘息成立後に polyI:C を投与すると、好中球浸潤を伴った気道炎症に変化し、AHR は劇的に悪化した。



PolyI:C 投与により、IL-17 や IFN- γ といった生体防御系に関するサイトカイン産生が増大した。

Poly I:C を投与された気管支喘息マウスでは、気道上皮組織における粘液産生は増大せず、有意ではないが僅かに減弱していた。ただし、この場合、分泌亢進が盛んに行われた結果、分泌顆粒が枯渇したために、粘液産生細胞が減少しているように観察された可能性もあるため、現在 BALF 中の分泌液の濃度を検討しているところである。

気道粘液産生に関しては解析すべき点があるものの、少なくとも、poly I:C を用いて Th2 型気管支喘息の病態を悪化させるためには、気管支喘息の惹起と同時にではなく、気管支喘息が成立した後に投与することが必須であると考えられた。喘息惹起時に polyI:C を投与した際に気道炎症が軽減した理由については、polyI:C 刺激によって肺内で IFN- γ が産生され、Th2 反応が抑制され気管支喘息が惹起されなかったためと考えている。また、気管支喘息が成立した後で polyI:C 投与により IFN- γ 等が産生されたとしても、既に惹起された Th2 反応は保持されることがわかった。ヒトにおいて、すでに Th2 型気道炎症を有する気管支喘息患者がウイルス感染を罹患する状況は、後者の実験条件に近いと、本研究の重症気管支喘息モデルはヒトの病態を反映し得るものと考えている。

本研究では、この polyI:C 投与によって病態が増悪した気管支喘息マウス(重症気管支喘息マウス)を、以降の研究実施項目に使用した。

(2) 重症気管支喘息モデルマウスにおける T 細胞の性状について

本研究では、通常の気管支喘息から重症気管支喘息に変化する際の Th 細胞の機能変遷についても解析を行った。無処置の健常マウス、polyI:C 単独処置マウス、通常気管支喘息マウス、重症気管支喘息マウスの肺組織から、セルソーターを用いて Th 細胞を単離し、トランスクリプトーム解析を用いて Th 細胞

の性状変化を解析した。その結果、様々な遺伝子変化が確認されたが、重症気管支喘息マウスの肺組織の Th 細胞においては、IL-13、IL-4/13 受容体、STAT1 および NF- κ B の発現が増強していることが特徴的であった。これは、IL-13 産生や IL-13 受容体シグナルが、通常喘息の Th 細胞に比べてより活性化していることを示すと同時に、IFN- α , β , γ のシグナル因子活性化および TNF- α や IL-17 のようなサイトカインシグナルが活性化していることが推察された。すなわち、Th2 型の気道炎症に加えて、抗ウイルス応答免疫反応に関わるサイトカインストームの環境に Th 細胞が曝されて機能変遷を起こしていることが考えられる。

これらの Th 細胞性状変化が気管支喘息重症化にどのような影響を及ぼすか、それぞれサイトカイン中和抗体やシグナル分子阻害剤を投与して Th 細胞の機能を追跡することが今後の検討課題である。現時点で、anti-IFN- γ mAb を重症気管支喘息モデルに投与した実験を行ったが、増悪した AHR が軽減することは認められていない。また anti-IL-17 mAb を投与したところ一部 AHR が改善したが完全な増悪抑制効果ではなかった。どちらの中和抗体でも好中球浸潤はほぼ抑制されたが、AHR はクリアに改善できなかったことから、AHR 増悪機構と気道炎症の変化には直接的な関連性がないことも推察された。現在、この乖離された現象を解明すべく他の因子(TNF- α , IFN- α , β , あるいは NF- κ B)の影響について更なる検討を行っている。

(3) 重症気管支喘息モデルマウスのステロイド抵抗性(難治性)について

本研究で確立した重症気管支喘息モデルがステロイド薬に対して感受性が抵抗性を調べるために、ステロイド薬の一種デキサメサゾン投与してその病態変化を評価した。

その結果、通常喘息の好酸球性気道炎症はステロイド感受性であるのに対し、重症喘息マウスの好中球性気道炎症はステロイド抵抗性であり難治性の病態に変化したことがわかった。このときの AHR はバラつきが大きく判定が困難であったが、少なくともステロイド薬を投与したときの AHR は重症気管支喘息群でより高い傾向にあった。この結果から、ウイルス感染状態にある気道炎症はステロイド抵抗性である可能性が非常に高いことがわかった。

このとき、重症気管支喘息マウスの肺組織由来 Th 細胞について行ったトランスクリプトーム解析では、ステロイド抵抗性に関わる遺伝子発現はほとんど見られなかった。特に本研究ではステロイド不活性化酵素が Th 細胞に発現することで、ステロイド抵抗性(難治性)の病態に変化するという作業仮説を立てていたが、今回の研究で Th

細胞ではなく、肺組織内の他の細胞群(樹状細胞や気道上皮細胞など)に発現している可能性が考えられたため、現在その代謝酵素発現細胞の同定を進めている。

以上の(1)~(3)から、ウイルス感染状態において気管支喘息が重症化すること、好中球性気道炎症に変化した病態はステロイド抵抗性を示すこと、Th 細胞の性状が変化したことが明らかとなった。今後は、重症気管支喘息の AHR や気道炎症を改善するために、上述したような重要分子群に対する中和抗体や阻害剤が有効であることを実証していく予定である(現在進行中)。また、Th 細胞の機能変化やそれをサポートする樹状細胞や気道上皮細胞を対象範囲を広げて難治性に関わる分子を同定し、更なる機能解析を進めている。

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)

[学会発表](計 3 件)

Shigeru Ashino, Keisuke Orimo, Kiyoshi Takeyama, Jun Tamaoki, and Junji Yagi. Crucial timing of a viral component exposure to exacerbate allergen-induced asthma. European Respiratory Society International Conference 2016. (Oral presentation, Session 358, OA1982), 2016/9/2-2016/9/7. (London, UK)

芦野滋. Th17 細胞の plastic conversion によって誘導される難治性気管支喘息の病態解明と制御法開発. 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会 シンポジウム「未来を見据えた難治性喘息克服への挑戦」, 2016 年 4 月 8 日 10 日, 国立京都国際会館(京都府京都市)

Shigeru Ashino, Kiyoshi Takeyama, Tomohiro Akaba, Jun Tamaoki, and Junji Yagi. The Effects of Double-Stranded RNA on allergen-Induced Eosinophilic Airway Inflammation in a Mouse Model. American Thoracic Society International Conference 2015, (Thematic poster session, Abstract 63693), 2015/5/14-2015/5/22. (Denver, Colorado, USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芦野 滋 (ASHINO, Shigeru)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号: 10507221