

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：32653

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2019

課題番号：15KK0321

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（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）The mechanisms of asthma exacerbation induced by viral infection and the development of strategy for controlling the pathogenesis(Fostering Joint International Research)

研究代表者

芦野 滋 (Ashino, Shigeru)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：10507221

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 7,576,000円

渡航期間：14ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、ウイルス感染による気管支喘息の重症化メカニズムを、モデルマウスを使用して解析するとともに、有効な治療標的の探索のための研究基盤を構築した。その結果、ウイルス核酸成分(1本鎖RNA (single stranded RNA, ssRNA)、および2本鎖RNA (double stranded RNA, dsRNA))のうち、dsRNA成分を認識するtoll-like receptor 3(TLR3)による認識機構が喘息重症化に関わっていることが示唆された。今後、ウイルス感染による重症喘息の治療標的を評価していく上で、このTLR3シグナル経路に関する分子群が重要になると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

風邪症候群を引き起こすウイルスに感染した喘息患者の病態が、著しく増悪する症例は全体の約70%であることが知られており、重症患者群の一部では難治化することが報告されている。現在、ウイルス感染による喘息悪化のメカニズムは完全に解明されておらず、治療法の確立も十分でないために、本研究で得られた新規知見は有効な制御法を開発していく上で重要な成果になると考えている。特に、ウイルス成分に着目して治療ターゲットを絞り込むことで、より効果的な治療戦略を創出でき、本研究によってその研究基盤を構築できていると考えている。

研究成果の概要（英文）：Viral infection is a risk factor for asthma exacerbation, but the underlying mechanisms are not fully determined. In particular it is not clear how viral components are involved in asthma exacerbation. Therefore, we investigated the mechanisms and pathogenesis using our mouse models.

In this study, the viral infection-asthma models were established by allergen sensitization and challenge followed by viral components (single-stranded RNA (ssRNA) and double-stranded RNA (dsRNA)) or respiratory syncytial virus (RSV) administration, which can mimic human severe asthma. It was found that allergen-induced asthma was more severely exacerbated in mice administered dsRNA than ssRNA, which stimulated toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR7 respectively. In addition, RSV induced asthma exacerbation, but the pathogenesis was attenuated in knock-out mice of TLR3 but not TLR7. Targeting TLR3 may be a potential therapeutic target to control asthma exacerbation by an infection of virus such as RSV.

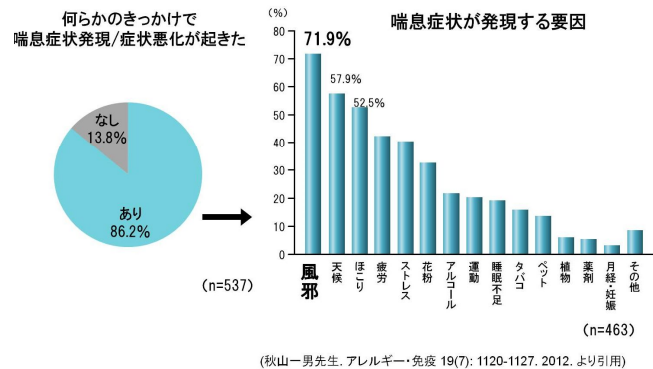
研究分野：呼吸器内科学

キーワード：気管支喘息 ウイルス感染 重症気管支喘息

1. 研究開始当初の背景

近年、風邪症候群を引き起こすウイルスに感染した喘息患者の病態が、著しく増悪する症例がしばしば見受けられる。臨床研究においても、喘息症状が悪化する要因として、図1に示すように、風邪を引き起こすウイルスに感染した場合が最も多く(71.9%)、その患者群のほとんどが薬剤コントロールされているにもかかわらず、ウイルス感染後3日以内に喘息の病態が増悪することが報告されている(秋山一男, アレルギー・免疫 19: 1120-1127, 2012)。また、喘息症状が重篤化するほど、肺や喀痰中の免疫系の種々のサイトカインレベルが上昇し、約40%以上の患者群がステロイド薬に抵抗性を示して難治性喘息に陥る傾向が知られている(Gelfand EW. *et al. Immunol Rev.* 278: 63-86, 2017.)。

図1 気管支喘息増悪に関する原因調査



ウイルス感染によって症状が重篤化した喘息患者群にはステロイド治療が主流であるが、前述したように 難治化した病態に対してはステロイドを含めた既存の薬物療法が無効であると考えられている。そのうえ、ウイルス感染による喘息重症化メカニズムは明らかになっておらず、未だ十分な治療法は確立されていない。その原因の一つには、ウイルス自体が生体内でどのような原理で増幅し 喘息増悪を引き起こしたのかが不明で、感染の初期段階での生体反応(とりわけ喘息を悪化させる免疫反応)について未解明な点が多く、治療ターゲットの同定が困難になっていることが挙げられる。

そこで本研究では、ウイルスがどのようにして喘息悪化を引き起こすか解明を行うため、重症喘息モデルマウスの作製および病態解析を行い、さらに治療ターゲットの探索を行うための研究基盤の構築を行った。

2. 研究の目的

本研究課題では、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した。ウイルス感染状態を疑似的に再現できる人工試薬(3. 研究の方法で後述)を気管支喘息マウスに投与を行うこと、また、風邪症候群を引き起こすウイルスの一つとして知られている respiratory syncytial virus (RSV)を投与して気管支喘息の病態を悪化させるとともに、ヒト重症喘息と酷似したモデルを用いることで、治療標的となり得るターゲットの探索を行うことを目的とした。

RSVは小児領域で注意すべきウイルスと考えられてきたが、近年の疫学調査で小児・成人どちらの喘息患者の症状も悪化させることが明らかになってきたため(Westerly BD *et al. Immunol Allergy Clin North Am.* 30:523-539, 2010.)、本研究でも喘息増悪を引き起こすウイルスとして用いた。

また、本研究ではウイルス核酸構成成分である RNA が生体内では2種類の形で存在することに着目し、肺組織の免疫細胞がどのように活性化し 喘息重症化に関与するかを明らかにした。また、喘息重症化の責任分子群に対する阻害剤候補を見出すため、その効果を立証する研究基盤の構築(特に重症化モデルマウス作製)を目的とした。

RSVなどの風邪症候群を引き起こす多くのウイルスは、本来 ゲノム構造の分類では1本鎖RNA(single-stranded RNA, ssRNA)ウイルスであるが、生体内ではウイルス増幅のために、RNA依存性RNAポリメラーゼにより一時的に2本鎖RNA(double-stranded RNA, dsRNA)を形成する。その後、形成された dsRNAを鋳型にして ssRNAが合成され RSVが増幅されていく。一方、感染局所では ssRNAと dsRNAは Toll-like receptor (TLR) 7または TLR3という受容体によってそれぞれ認識されて、炎症反応が誘導されることが知られている。この点に注目して、ウイルスが引き起こす喘息重症化は、ssRNAと dsRNAのどちらに依存し、どのような免疫細胞が関与するのかを独自のモデルマウスを用いて解析を行った。

3. 研究の方法

本研究では、気管支喘息モデルに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 とともに免疫 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 日間吸入させて気管支喘息を惹起させた。その喘息モデルマウスに、ウイルス感染を想定して、ウイルス成分として知られている ssRNA の人工試薬 R848 や dsRNA の人工試薬 poly I:C を喘息マウスの気管内に投与、あるいは実際のウイルス RSV を投与して重症喘息モデルマウスを作製した。

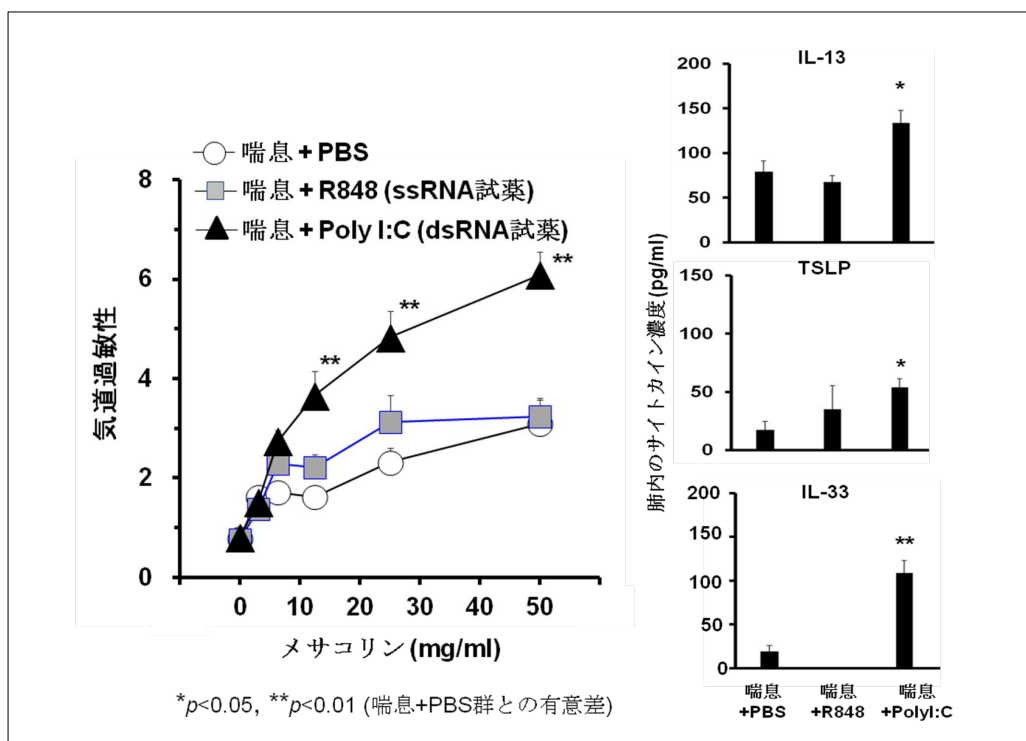
本研究では、以下の 2 つの項目を中心に研究を遂行した。

- (1) 初めに、重症喘息の誘導には、どのようなウイルス成分が重要であるかを R848 や poly I:C を気管内投与して解析した。各ウイルス成分投与後、呼吸機能の指標である気道過敏性 (airway hyperresponsiveness: AHR) の解析や気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid: BALF) を行い、重症喘息を効率的に誘導するウイルス成分を評価した。
- (2) また、実際のウイルス感染(本研究では RSV 感染)時でも、それらのウイルス成分が病態増悪にどのように関わっているかを knock out (KO) マウスを用いて更なる解析を行った。加えて、通常の喘息から重症喘息へ病態が悪化した際の免疫細胞の機能変遷や肺組織の病態変化の情報も捕捉した。

4. 研究成果

(1) 気管支喘息を悪化させるウイルス成分について

上述したように、一般の気管支喘息モデルマウスに対してアレルゲン OVA 吸入後の喘息成立後に、ssRNA 成分である R848 あるいは dsRNA 成分である poly I:C を気管内投与し、気道過敏性 (AHR) を測定した。また、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の免疫系のサイトカインレベルを測定した。その結果、以下の図に示すように、poly I:C を投与された喘息マウス群で著しい AHR 上昇が認められ呼吸機能が悪化することが明らかとなった。また、ヒト重症喘息でも報告されているように、免疫系のサイトカインである、IL-13 や TSLP、IL-33 などの BALF 内濃度が上昇していた。一方、R848 を投与された喘息マウスの AHR や BALF 中のサイトカイン濃度には大きな変化はなかった。これらのことから、気管支喘息を悪化させるウイルス成分は、ssRNA ではなく、dsRNA であることが示唆された。



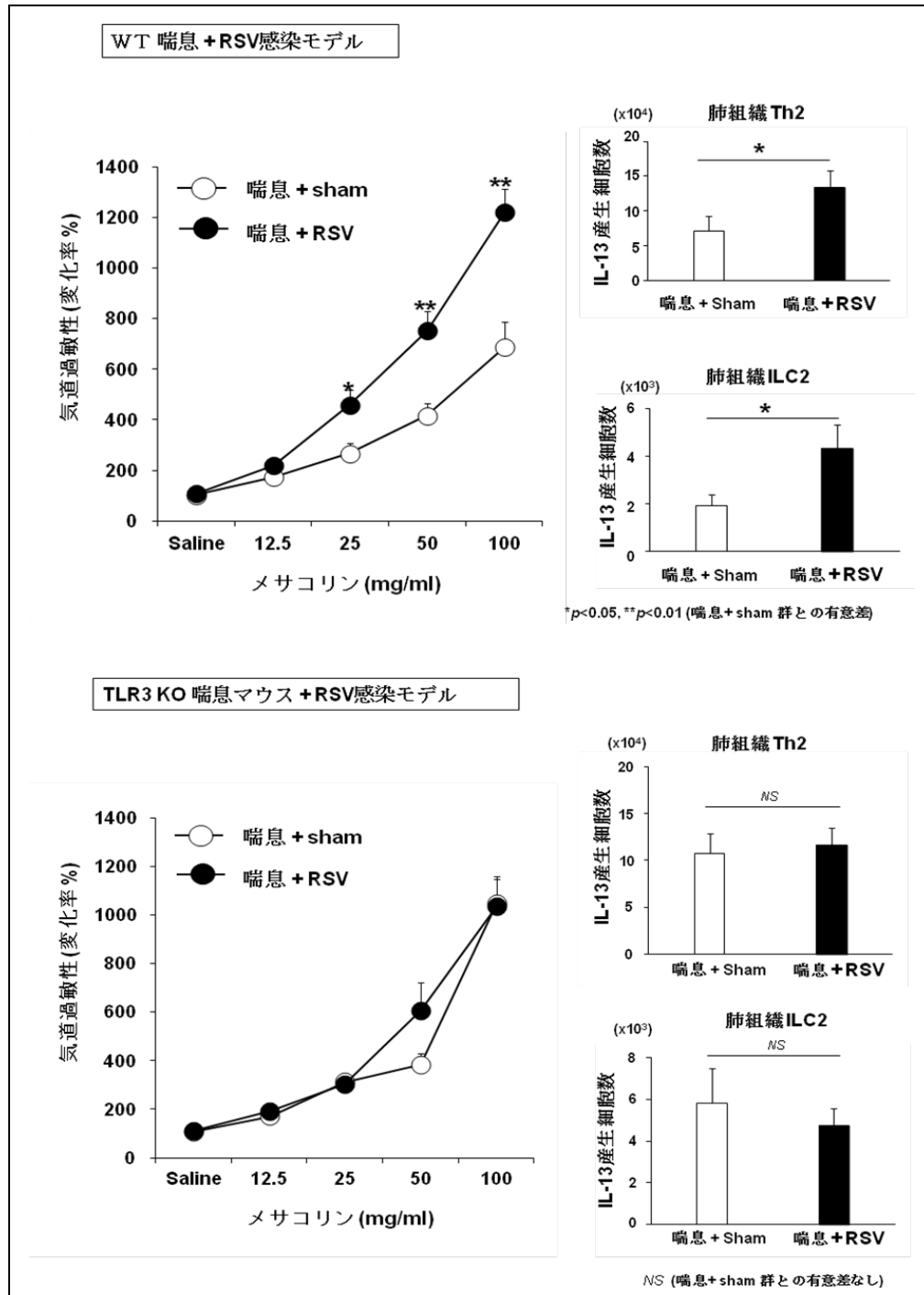
(2) 気管支喘息を増悪させるウイルス成分認識機構について

(1)の実験に引き続き、実際のウイルス感染 (本研究では RSV 感染) を喘息マウスに引き起こし、dsRNA 成分が喘息増悪に関与することを証明するために、toll-like receptor (TLR7) KO マウスおよび TLR3 KO マウスを用いた実験を行った。TLR7 は、生体内で ssRNA を認識する受容体であり、TLR3 は dsRNA を認識する受容体であるため、実際のウイルス感染でどちらのウイルス成分が病態増悪に重要であるかを再確認する実験として行った。

その結果、以下の図に示したように、対照群として用いた野生型 (wild-type, WT) マウスでは、

RSV 感染が喘息症状の AHR の上昇を引き起こしたが、TLR3 KO マウスでは、RSV 感染による喘息症状の悪化は観察されなかった。また、病態増悪に伴って、喘息病態の形成に深く関わる免疫細胞である、ヘルパーT(Th)2細胞や 2型自然リンパ球 (ILC2)が肺組織内で増加したが、TLR3 KO マウスではそれらの細胞群の大きな変化は認められなかった。さらに、ヒト重症喘息でも報告されている、喘息悪化を示すサイトカイン TSLP、IL-25、IL-33 等の肺内産生量も WT、マウスでは上昇し TLR3KO マウスでは変化がなかったことから (data not shown)、ウイルス核酸成分の dsRNA が TLR3 を介して気道炎症の増悪を誘導していることが示唆された。

これらの一連の喘息重症化は、TLR7 KO マウスでは認められなかったため、ウイルス感染時には TLR7 を介した ssRNA 成分の関与は大きくないことが推察された。



以上の(1)、(2)の研究結果が示すことは、気管支喘息が風邪症候群を引き起こす際に重要なウイルス成分は dsRNA であることであり、また TLR3 経路に依存して喘息重症化反応が誘導されていることである。

これらの新規知見は、各方面の学会や科学誌で発表されておらず、ウイルス感染を契機に発症する重症喘息に対して、今後 TLR3 を治療標的とした制御法を開発するための研究基盤構築に非常に有用であると考えられる。現在も dsRNA/TLR3 経路を介してどのような分子メカニズムが存在するか詳細な解析を行っており、各種阻害剤の有効性を評価している段階である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Shigeru Ashino, Hidemitsu Kitamura, Tomohiro Akaba, Kiyoshi Takeyama, Jun Tamaoki, and Junji Yagi.
2. 発表標題 The Crucial Roles of Neurokinin A and Neurokinin Receptor 2 Signaling in Asthma Exacerbation Induced by a Viral Component, Double-Stranded RNA.
3. 学会等名 第67回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shigeru Ashino, Hidemitsu Kitamura, Tomohiro Akaba, Kiyoshi Takeyama, Jun Tamaoki, and Junji Yagi.
2. 発表標題 The Effects of Viral Components, Single-Stranded RNA and Double-Stranded RNA, on Allergen-Induced Airway Hyperresponsiveness and Airway Inflammation.
3. 学会等名 American Thoracic Society International Conference 2018. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shigeru Ashino, Katsuyuki Takeda, Hidemitsu Kitamura, Atsushi Kurokawa, Tomohiro Akaba, Mitsuko Kondo, Kiyoshi Takeyama, Etsuko Tagaya, Naoko Yanagisawa, and Erwin W. Gelfand
2. 発表標題 Double But Not Single-Stranded RNA Exacerbates Allergen-Induced Airway Hyperresponsiveness and Airway Inflammation.
3. 学会等名 American Academy of Allergy Asthma and Immunology International Annual Meeting 2020 (新型コロナウイルス感染拡大 対応済み) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shigeru Ashino, Katsuyuki Takeda, Azzeddine Dakhama, Atsushi Kurokawa, Kondo Mitsuko, Kiyoshi Takeyama, Etsuko Tagaya, Naoko Yanagisawa, and Erwin W. Gelfand
2. 発表標題 Double but Not Single-Stranded RNA Derived from Respiratory Syncytial Virus Exacerbates Allergen-Induced Airway Inflammation
3. 学会等名 American Thoracic Society International Conference 2020 (新型コロナウイルス感染拡大 対応済み) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	Gelfand Erwin (Gelfand Erwin)	National Jewish Health · Department of Pediatrics · Division of Cell Biology	