

令和元年6月17日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08951

研究課題名(和文)好酸球性気道炎症の治療ターゲットとしてのステロイド受容体の局在と機能の解析

研究課題名(英文) Analysis of localization and function of glucocorticoid receptor as a therapeutic target for eosinophilic airway inflammation

研究代表者

小林 良樹 (KOBAYASHI, Yoshiki)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：10375298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：好酸球性気道炎症の局所においては、炎症部位粘膜では同一患者の正常粘膜と比較しても機能的ステロイド受容体(GR)およびGRの核内移行能に関するホスファターゼの発現が低下していることがわかった。炎症局所におけるGR機能低下(ステロイド感受性の低下)による炎症性メディエーター(自然免疫誘導型サイトカインや好酸球ケモカイン)の過剰産生が、好酸球性炎症の遷延化に寄与している可能性が示唆された。一方で、炎症局所におけるホスファターゼPP2Aの活性化や発現増強が、ステロイド感受性低下に対する治療戦略のひとつになりうることを期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性好酸球性気道炎症の代表格である喘息合併好酸球性副鼻腔炎におけるステロイド感受性の低下のメカニズムを解明することは、難病に指定されている本疾患の病勢コントロールをする上で非常に重要である。同一患者においてステロイド受容体機能の低下に関与する分子の発現異常が正常粘膜部位と比較して炎症局所で顕著に見られたことから、治療ターゲットがより明確になり、新しい治療法(治療薬およびその炎症局所への送達方法)の開発につながることで多いに期待できる。

研究成果の概要(英文)：We found that the expressions of functional glucocorticoid receptor (GR) and phosphatases associated with the ability of GR nuclear translocation were significantly reduced in mucosa from inflammatory site compared with normal mucosa from the same patients with eosinophilic airway inflammation. Excessive production of inflammatory mediators such as innate immune response inducible cytokines and eosinophil chemokines caused by impairment of GR function, or reduction of corticosteroid sensitivity, in the inflammatory site may prolong eosinophilic inflammation. On the other hand, activation and overexpression of protein phosphatase PP2A in the inflammatory site could be a therapeutic strategy for corticosteroid insensitivity.

研究分野：好酸球性気道炎症

キーワード：ステロイド受容体 好酸球 好酸球性副鼻腔炎 喘息 ホスファターゼ ステロイド感受性

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

近年、増加傾向にある気道アレルギー疾患（気管支喘息やアレルギー性鼻副鼻腔炎など）の特徴として、上・下気道の炎症を合併していることが多く、“one airway, one disease”という概念が提唱されている。本疾患においては、気管支喘息（特にアスピリン喘息）と篩骨洞優位型の好酸球性副鼻腔炎が高率に合併すること、喘息の重症度に比例して副鼻腔炎の重症度も悪化することが報告されていて(Bresciani et al., *J Allergy Clin Immunol* 2001, Ishitoya et al., *Allergol Int* 2010, Lin et al., *Am J Rhinol Allergy* 2011)、我々はこの上・下気道で起こっている難治性の好酸球性気道炎症の病態解明と病勢コントロールに着目してきた。好酸球性副鼻腔炎では、ステロイドにある程度の反応を示すものの、特に重症例においては感受性が低い。ステロイド抵抗性のメカニズムとして、グルココルチコイド受容体(GR)-Ser226 残基のリン酸化亢進およびリン酸化を制御するホスファターゼ機能の低下が知られている(Kobayashi et al., *PLoS ONE* 2011, Kobayashi et al., *Respir Res* 2016, Kobayashi et al., *Mol Pharmacol* 2017)。炎症局所への薬剤送達により、副鼻腔近傍（ポリープなど）の上皮細胞に局在するホスファターゼが活性化し GR の機能が回復することで、ステロイド抵抗性の改善がもたらされることが推測される。

2. 研究の目的

本研究は、炎症制御のターゲットである気道上皮に発現するステロイド受容体の気道局所分布やその機能を解析し、治療効果発現のメカニズムおよびステロイド抵抗性メカニズムを明らかにすることで、治療効果の向上や新たな治療戦略の開拓につなげることを目的とする。

- (1) 気道局所における気道上皮 GR（好酸球性気道炎症制御に深く関与する GR）の局在・分布領域の探索（気道内のどのエリアに機能的な GR が存在するのか）
- (2) ターゲット領域における GR 機能（ホスファターゼとの関わりも含む）の解析
- (3) 実臨床において炎症局所の GR 機能を把握する簡易な方法の開発

3. 研究の方法

(1) 気道局所からのサンプリングおよびステロイド感受性の検討

ポリープ採取後、実体顕微鏡を用いて上皮成分を剥離して、上皮細胞と線維芽細胞成分を分けて培養した。培養後にステロイドによる FKBP51 mRNA 誘導および炎症性サイトカイン抑制能を検証した。また、ステロイド受容体の核内移行機能に関与するホスファターゼ (PP2A と PTP-RR) の発現も確認した。さらに、①コントロール（アレルギー性鼻炎）における鉤状突起由来上皮細胞、②好酸球性副鼻腔炎 (E CRS) 症例における鉤状突起由来上皮細胞、③E CRS 症例における鼻ポリープ由来上皮細胞、④E CRS 症例における鼻ポリープ由来線維芽細胞の 4 グループに分けて、ステロイド受容体 (GR) および GR 機能に関与するホスファターゼの発現を確認した。

(2) ターゲット領域における GR 機能（ホスファターゼとの関わりも含む）の解析

同一患者における部位別での評価を行った。前頭洞、前篩骨洞、後篩骨洞のポリープ上皮と鉤状突起粘膜上皮におけるステロイド受容体 (GR) および GR 機能に関与するホスファターゼの発現を比較した。さらに、自然免疫誘導サイトカインおよび好酸球ケモカインの発現レベルも検討した。一方で、ターゲット領域の再現モデルとして、気道上皮細胞 (BEAS-2B) と好酸球の共培養させた系を確立させ、同様にステロイド感受性、ホスファターゼ、サイトカイン、ケモカインなどの発現レベルを検討した。

また、気道局所におけるホスファターゼ PP2A の発現低下とステロイド感受性低下の関与を確認するために、siRNA を用いて気道上皮細胞株 BEAS-2B で PP2A をノックダウンした系を確立した。さらに、プラスミド DNA を用いた PP2A のノックインモデルも作成した。

(3) 実臨床における炎症局所の GR 機能を把握する簡易な方法

鼻腔粘膜上皮由来の初代培養細胞において、FITC-conjugate dexamethasone を用いた簡易的な GR 核内移行能の測定方法を検証した。

4. 研究成果

(1) 線維芽細胞成分と比較して上皮細胞成分におけるステロイドの反応性が優れていることがわかった。この結果を裏付けるようにホスファターゼ (PP2A と PTP-RR) は上皮細胞成分でより多く発現していた。このことから、ポリープを含む気道炎症局所においては、上皮細胞成分がステロイド感受性に主に関与することが示唆された。機能的 GR (GR α)、PP2A、PTP-RR とともに上述①>②=③>④の順にそれらの発現が低下しており (図 1)、実際のステロイド感受性と相関していた (図 2)。

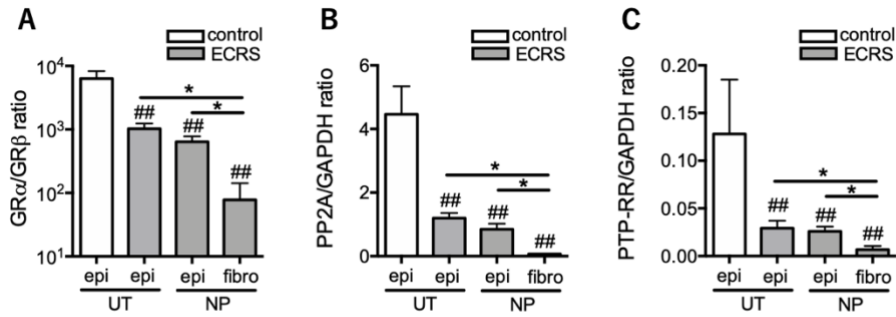


図1. 好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) の鼻ポリープにおけるステロイド受容体とホスファターゼ発現
 A, 機能的ステロイド受容体(GR α)、B, セリン・スレオニンホスファターゼPP2A、C, チロシンホスファターゼPTP-RR. epi; 上皮細胞成分、fibro; 線維芽細胞成分, UT; 鈎状突起粘膜、NP; 鼻ポリープ粘膜.

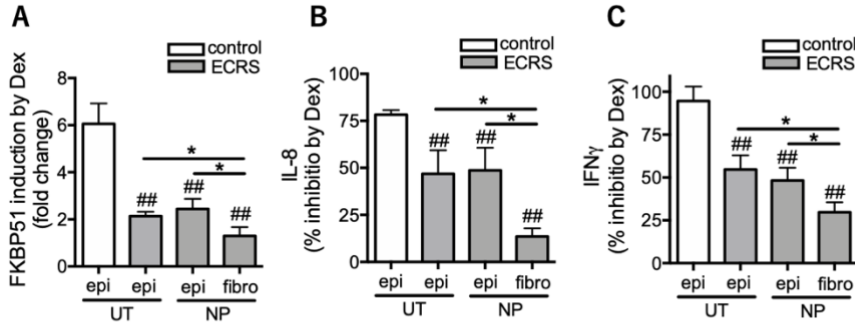


図2. 好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) の鼻ポリープにおけるステロイド感受性
 A, DexamethasoneによるFKBP51誘導、B, DexamethasoneによるTNF α 誘導IL-8発現の抑制、C, DexamethasoneによるTNF α 誘導interferon γ (IFN γ) 発現の抑制. epi; 上皮細胞成分、fibro; 線維芽細胞成分, UT; 鈎状突起粘膜、NP; 鼻ポリープ粘膜.

(2) 機能的 GR (GR α)、ホスファターゼ PP2A は、鈎状突起粘膜と比較して、ポリープ上皮では有意にそれらの発現が低下していた。部位別ポリープ間における差は明らかではなかったが、前篩骨洞ポリープで低い傾向にあった (図 3A, 3B)。同一患者間での鈎状突起粘膜上皮と前篩骨洞ポリープ上皮における自然免疫誘導サイトカイン (TSLP、IL-25、IL-33) の発現レベルは、明らかに前篩骨洞ポリープ上皮において増加していた。さらに、好酸球ケモカインである CCL4、CCL5、CCL11、CCL26 の発現レベルも同様に前篩骨洞ポリープ上皮において増加していた (図 3C, 3D)。これらの結果から同一患者内でも炎症局所ではさらにステロイド感受性が低下して炎症性メディエーターの過剰産生の原因となっていることが示唆された。また、気道上皮細胞 (BEAS-2B) と好酸球を共培養させた系 (炎症局所再現モデル) においても、ホスファターゼ PP2A の発現低下とともにステロイド感受性の低下、好酸球ケモカイン (前述) の増加を認めた。特に、CCL4 の発現上昇が顕著であり、炎症局所における好酸球炎症のポジティブフィードバックに関与していることが示唆された。

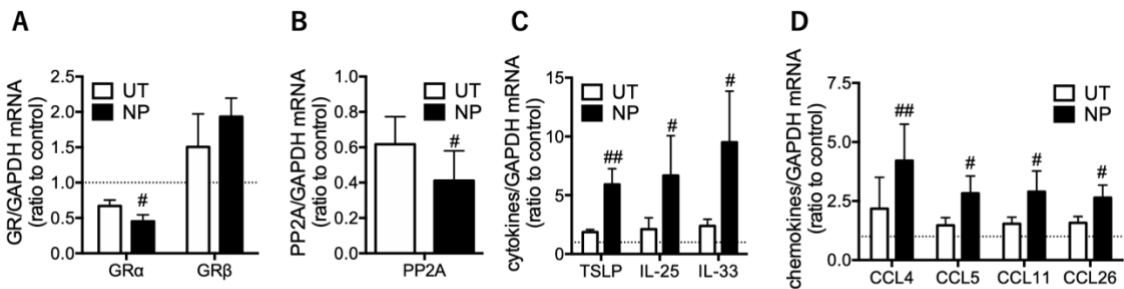


図3. 好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) の鼻ポリープにおけるステロイド受容体、ホスファターゼ、サイトカイン、ケモカイン発現レベルの同一患者における比較
 A, 機能的ステロイド受容体(GR α)、B, セリン・スレオニンホスファターゼPP2A、C, 自然免疫誘導型サイトカイン (TSLP、IL-25、IL-33)、D, 好酸球性ケモカイン (CCL4、CCL5、CCL11、CCL26). UT; 鈎状突起粘膜、NP; 鼻ポリープ粘膜.

PP2A をノックダウンさせると GR の核内移行が低下することが確認できた。一方で、PP2A に対する活性効果を有する長時間作用型気管支拡張剤 (LABA) を用いて、ECRS 症例から得られた鼻ポリープ由来上皮細胞を治療すると GR の核内移行が改善した。さらに、プラスミド DNA を用いた PP2A のノックインモデルでは、GR の核内移行能が上昇することから、PP2A を含むホスファターゼの活性化が、気道炎症局所のステロイド抵抗性における治療ターゲットになる可能性がある。

(3)気道上皮細胞 (BEAS-2B) を用いて測定方法を確立化させ、鼻腔粘膜上皮由来の初代培養細胞で実践応用した。サンプル採取後からアッセイに必要な細胞数に増やすまで2-3週間要することが実用化に不向きである。以前の検討で、鼻腔粘膜上皮由来の初代培養細胞におけるステロイド感受性は、同一患者の末梢血単核球における感受性と相関することが明らかにされていることから、現在、末梢血単核球を用いたアッセイでデータを収集している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2件)

- ① Kobayashi Y, Konno Y, Kanda A, Yamada Y, Yasuba H, Sakata Y, Fukuchi M, Tomoda K, Iwai H, Ueki S. Critical role of CCL4 in eosinophil recruitment into the airway. Clin Exp Allergy. 2019 Jun;49:853-860. 査読有, doi: 10.1111/cea.13382.
- ② Kobayashi Y, Yasuba H, Asako M, Yamamoto T, Takano H, Tomoda K, Kanda A, Iwai H. HFA-BDP metered-dose inhaler exhaled through the nose improves eosinophilic chronic rhinosinusitis with bronchial asthma: a blinded, placebo-controlled study. Front Immunol. 2018 Sep 25;9:2192. 査読有, doi: 10.3389/fimmu.2018.02192. eCollection 2018.

〔学会発表〕 (計 3件)

- ① 小林良樹, Airway Medicine の必要性和その実践、第68回日本アレルギー学会学術大会, 2019年6月14日、東京
- ② 小林良樹, コントロール不良 ECRS に対する HFA-BDP 経鼻呼出療法の追加治療効果の検証、第67回日本アレルギー学会学術大会, 2018年6月24日、千葉
- ③ Yoshiki Kobayashi, A fine particle inhaled corticosteroid exhalation though the nose is a therapeutic option for eosinophilic chronic rhinosinusitis with bronchial asthma, The 22nd Asian Pacific Society of Respiriology Congress, 2017年11月25日, Sydney, Australia

〔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〕

特記事項なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：神田 晃

ローマ字氏名：(KANDA, Akira)

所属研究機関名：関西医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号 (8桁)：70375244

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。