

令和元年9月20日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15462

研究課題名(和文) マルチオミクス解析を用いた好酸球性炎症における好酸球のフェノタイプの同定

研究課題名(英文) Identification of phenotypes of eosinophils in eosinophilic inflammation using multi-omics analysis

研究代表者

馬場 里英 (Baba, Rie)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：50772456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：好酸球性副鼻腔炎の鼻茸より好酸球を単離し、リポドミクス、プロテオミクス、トランスクリプトミクスを統合した網羅的解析を施行した。脂肪酸代謝物では、プロスタグランジンと15-リポキシゲナーゼの代謝物が減少し、ロイコトリエンD4が選択的に上昇していた。脂肪酸代謝酵素の発現量が変化しており、ロイコトリエンC4をロイコトリエンD4に変換するGGT5の発現が上昇していた。パスウェイ解析で2型炎症応答と微生物応答の経路が活性化していることが示唆された。細胞実験により脂肪酸代謝異常をIL-5・GM-CSFもしくはTLR2・NOD2のリガンドによってex vivoで誘導可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症喘息・好酸球性副鼻腔炎では炎症部位に浸潤した好酸球が病態に関与する。これまでの研究では細胞機能や表面抗原等の単一の評価項目に注目した実験が多く、包括的な評価が為されていなかったため、全体像を捉えることは困難であった。マルチオミクス解析を利用することで、同定された代謝異常と関連する分子の挙動を把握し、上流因子を特定する事が可能となった。好酸球性副鼻腔炎患者の鼻茸に存在する好酸球では特異的な脂肪酸代謝異常が存在することが証明され、特定された上流因子は炎症制御を目的とした治療の標的となりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We established a method for isolating eosinophils from nasal polyps of patients with eosinophilic rhinosinusitis (NP-EOS). Multi-omics analysis including lipidomics, proteomics, and transcriptomics was performed to analyze NP-EOS. Lipidomic analysis revealed impaired synthesis of prostaglandins and 15-lipoxygenase (15-LOX)-derived mediators, and selective upregulation of leukotriene D4 production. Furthermore, proteomics and transcriptomics revealed changes in the expression of the enzymes including GGT5 responsible for dysregulated lipid metabolism. Ingenuity pathway analysis indicated the importance of type 2 cytokines and pattern recognition receptor pathways. Stimulation of PB-EOS with eosinophil activators IL-5, GM-CSF, and agonists of TLR2 and NOD2 mimicked the observed changes in lipid metabolism.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：好酸球 好酸球性副鼻腔炎 システイニルロイコトリエン 脂肪酸代謝

1. 研究開始当初の背景

好酸球はアレルギー疾患・寄生虫感染において重要な役割を果たしている炎症細胞である。重症喘息・アスピリン喘息・アレルギー性気管支肺アスペルギルス症・慢性好酸球性肺炎などステロイド治療抵抗性の難治性好酸球性炎症が遷延する疾患が未だ存在しているが、その機序は十分に解明されていない。

気管支喘息に代表される好酸球性気道炎症を伴う疾患では、末梢血や喀痰中の好酸球数が病勢の評価に用いられており、炎症細胞としての重要性が示されている。好酸球はIL-4・TGF- β といったサイトカインやシステイニルロイコトリエン・トロンボキサン等の炎症性脂質メディエーターを産生することで炎症反応を増幅しているとされるが、一方で、リポキシン・プロテクチンに代表される抗炎症性脂質メディエーターの産生能を有しており、多彩な生理応答に関与する可能性が示唆されている。我々は重症喘息患者の末梢血由来の好酸球において、抗炎症性脂質メディエーター産生を誘導する15-リポキシゲナーゼ活性が低下していることを示しており(Miyata J et al. J Allergy Clin Immunol 2012)、好酸球の質的な違いが細胞機能を決定していると考えられる。

好酸球の細胞機能は遊走・接着・脱顆粒・活性酸素産生等で評価されているが、その制御機構は様々な液性因子・シグナル伝達に依存しており、単一の細胞機能で全体像を捉えることは困難である。我々は包括的な理解を深める目的でマルチオミクス解析に着目した。マルチオミクス解析を利用することで、一つの代謝異常を同定した場合に、関連する分子の挙動を把握することで、上流にある因子の同定や他の代謝や細胞応答に及ぼす影響を推察することが可能であり、病態の解明及び新たな創薬標的を見出すことができるようになっている。

好酸球性炎症性疾患においては、臨床検体の解析によりIL-5・eotaxin・システイニルロイコトリエン等の炎症性メディエーターの産生が炎症局所で亢進していることが既に知られている。浸潤した好酸球においては、CD69・CD44等の表面分子の発現が上昇することやシステイニルロイコトリエンの産生能が亢進することが報告されている。本研究では様々な好酸球の関与し得る疾患での好酸球の特徴を比較検討することで、病態との関連性をより詳細に理解できると考えられる。

2. 研究の目的

好酸球はアレルギー疾患・寄生虫感染において重要な役割を果たしている炎症細胞で

ある。重症喘息・アレルギー性気管支肺アスペルギルス症・慢性好酸球性肺炎などステロイド治療抵抗性の難治性好酸球性炎症が遷延する疾患が未だ存在しているが、その機序は十分に解明されていない。今回申請者は、健常者と患者由来の末梢血及び炎症部位由来の臨床検体から単離した好酸球に対して、マルチオミクス解析(トランスクリプトミクス・プロテオミクス・リポドミクス)を行い、質的な違いを検討することで、疾患の病態解明を目指す。

気管支喘息等の好酸球性炎症が病態に関わる疾患では、末梢血の好酸球が増加する場合もあれば、炎症部位でのみ好酸球が浸潤する場合も認められる。この事実は、疾患において好酸球が関与する分子機構が異なることを示唆している。多様な病態における好酸球の状態を比較検討することにより、全身性の変化や炎症局所における応答による好酸球の活性化を部位別、もしくは重症度・病態に対応付けて評価することが可能であり、病態の原因となっている分子、炎症を増幅する分子等を個別に見出すことが出来る可能性がある。

3. 研究の方法

(1) 末梢血・組織検体からの好酸球の単離

気管支喘息等の好酸球性炎症が病態に関わる疾患では、末梢血の好酸球が増加する場合もあれば、炎症部位でのみ好酸球が浸潤する場合も認められる。この事実は、疾患において好酸球が関与する分子機構が異なることを示唆している。今回我々は、アスピリン喘息の合併が多い好酸球性副鼻腔炎の患者より、手術検体として採取した鼻茸より、セルソーターを用いて組織好酸球を単離した。セルソーターを用いたネガティブセレクション法により、高純度で生存率の高い好酸球が単離可能である。

(2) 同一検体からのトランスクリプトーム・プロテオミクス解析

上記のように単離した好酸球は、Trizol試薬を用いて溶解し、RNA・蛋白とともに酵素による分解を可能な限り軽減した状態で抽出を行った。この方法により同一検体で遺伝子発現と蛋白存在量を対応させて評価することが可能となった。

(3) 同一検体からのリポドミクス解析

好酸球はカルシウム流入を誘導する刺激を加えることにより、システイニルロイコトリエンに代表される多彩な脂質メディエーターを産生することが知られているが、我々はオメガ3脂肪酸であるDHAを添加すること

で、プロテクチン D1 等の新規抗炎症性脂質メデイエーター含めた脂肪酸代謝物の産生能も有することを報告している。本研究でも異なる疾患を有する患者由来の好酸球の脂質プロファイルを同定するため、単離した好酸球をカルシウムイオノフォアで刺激し、その細胞上清を高圧UPLC システムと3 連4 重極型の質量分析計を組み合わせた LC-MS/MS 法によって一斉定量解析を行い、同時に約 250 種類の脂肪酸代謝物を同定した。

これらの脂肪酸代謝物は、オメガ 6 脂肪酸のアラキドン酸に加え、オメガ 3 脂肪酸の DHA・EPA・DPA を含めた脂肪酸由来の代謝物であり、酵素活性や量的な比較が可能となっている。

(4) 表面抗原の発現強度の検討

トランスクリプトーム・プロテオーム解析による細胞全体の分子の量的な相違だけでは評価できない機能的蛋白として表面抗原分子が挙げられる。表面抗原の発現量を測定することにより、細胞の活性化状態や疾患への寄与度を評価し得るマーカーとなる因子を探索する。

(5) 倫理委員会における承認

健常人、喘息患者より採血・気管支鏡検査で得た検体・喀痰や、血液検査・呼吸機能検査・アンケート調査の結果を研究目的に使用することに関して、慶應義塾医学部倫理委員会から既に承認を得ており、その承認を受けた形式に従い、健常人、喘息患者から文書にて承諾を得た上で研究を遂行した。現在、臨床研究に登録された全ての患者から口頭による説明後、文書による承諾を得ている。(承認番号：20090009)

4. 研究成果

本実験計画に基づき、アスピリン喘息の合併が多い好酸球性副鼻腔炎の患者より、手術検体として採取した鼻茸より、セルソーターを用いて組織好酸球を単離した。単離した好酸球の溶解液もしくは刺激上清を用いて、網羅的解析(プロテオミクス・トランスクリプトミクス・リポドミクス)を施行した。

脂肪酸代謝物では、選択的に代謝物の産生量が増減する特徴的な変化が認められた。

蛋白の発現量では、好酸球に特異的な顆粒の含有量には大きな変化が認められなかった。脂肪酸代謝酵素の発現量が変化しており、リポドミクスの結果を説明しうる変化であった。

トランスクリプトーム解析データを用いてパスウェイ解析を施行した。いくつかの免疫応答機構が活性化していることが示唆され、細胞実験により上記の脂肪酸代謝異常を

ex vivo で再現することが可能であった。

以上の結果より、炎症細胞特異的な脂肪酸代謝異常が好酸球性副鼻腔炎患者の鼻茸に存在することが証明された。脂肪酸代謝異常を是正することが炎症を制御することに寄与する可能性が示唆され、今回同定された誘導因子も治療標的として有用であると考えられた。

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3件)

(1) Cysteinyl leukotriene metabolism of human eosinophils in allergic disease.

Miyata J, Fukunaga K, Kawashima Y, Ohara O, Arita M.
Allergol Int. 2019.
DOI: 10.1016/j.alit.2019.06.002

(2) Dysregulated fatty acid metabolism in nasal polyp-derived eosinophils from patients with chronic rhinosinusitis.

Miyata J, Fukunaga K, et al.
Allergy. 2019 Jun;74(6):1113-1124.
DOI: 10.1111/all.13726.

(3) ヒト好酸球のマルチオミクス解析で紐解く、好酸球性副鼻腔炎・重症喘息の分子機序

宮田 純, 川島 祐介, 小原 収, 別役 智子, 福永 興壺, 有田 誠
アレルギー 2019 年 68 巻 2 号 p. 86-91
DOI: <https://doi-org.kras1.lib.keio.ac.jp/10.15036/arerugi.68.86>

[学会発表](計6件)

(1) ヒト好酸球における自然免疫応答を介したシステイニルロイコトリエン(CysLTs)産生への影響

奥隅 真一, 福永 興壺, 宮田 純, 持丸 貴生, 渡辺 理沙, 松坂 雅子, 田野崎 貴絵, 鎌谷 高志, 馬場 里英, 桑江 美聡, 上田 壮一郎, 有田 誠, 別役 智子
(日本呼吸器学会学術講演会 2018 年)

(2) 好酸球性炎症性疾患におけるヒト好酸球のマルチオミクス解析

宮田 純, 川島 祐介, 小原 収, 福永 興壺, 有田 誠
(日本呼吸器学会学術講演会 2018 年)

(3) 好酸球性副鼻腔炎患者の鼻茸由来の好酸球の網羅的解析

宮田 純、福永 興壹、川島 祐介、渡辺 貴志、小原 収、別役 智子、有田 誠
(日本呼吸器学会学術講演会 2018年)

(4) ヒト好酸球のLTD4合成におけるステロイド抵抗性の検討

持丸 貴生、宮田 純、奥隅 真一、松坂 雅子、田野崎 貴絵、桑江 美聡、渡辺 理沙、西浦 美穂、上田 壮一郎、有田 誠、別役 智子、福永 興壹
(日本呼吸器学会学術講演会 2019年)

(5) 気管支喘息 病態生理 重症喘息患者の末梢血由来の好酸球の網羅的解析

宮田 純、持丸 貴生、奥隅 真一、川島 祐介、渡辺 貴志、小原 収、有田 誠、福永 興壹
(日本呼吸器学会学術講演会 2019年)

(6) 免疫担当細胞 重症喘息患者の末梢血由来好酸球の炎症フェノタイプの特徴

宮田 純、持丸 貴生、奥隅 真一、川島 祐介、渡辺 貴志、小原 収、有田 誠、福永 興壹
(日本アレルギー学会学術講演会 2019年)

〔図書〕(計2件)

(1) 【呼吸器病学 TOPICS 2018-19】細胞・分子生物学 ヒト好酸球のマルチオミクス解析

宮田 純、福永 興壹
分子呼吸器病 5ページ(2019.03)
先端医学社

(2) 【脂質クオリティ研究の基礎と臨床】脂肪酸クオリティと疾患制御 アレルギー疾患における好酸球の脂肪酸代謝異常

宮田 純、福永 興壹、有田 誠
医学のあゆみ 7ページ(2019.06)
医歯薬出版株式会社

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 里英 (BABA, Rie)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・助教
研究者番号: 50772456

(2) 研究分担者

福永 興壹 (FUKUNAGA, Koichi)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・准教授
研究者番号: 60327517

(3) 連携研究者

宮田 純 (MIYATA, Jun)
国立研究開発法人理化学研究所・メタボローム研究チーム・客員教員 (研究員)
研究者番号: 80464866