

令和元年5月24日現在

機関番号：20101
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2016～2018
課題番号：16K21249
研究課題名(和文) 気管支喘息における Np63関連エピムノームによる ILC2細胞の活性化機構

研究課題名(英文) Mechanism of the ILC2 activation in bronchial asthma regulated by deltaNp63-related epimmunome

研究代表者
久保 輝文 (KUBO, Terufumi)
札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：90580019
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：気管支喘息によって死亡した症例の病理解剖組織を検討すると気管支上皮が高度に脱落している一方で、deltaNp63陽性を示す基底細胞に相当する細胞が残存していた。BEAS2B非腫瘍性気管支上皮細胞株におけるdeltaNp63遺伝子発現をRNA干渉法によってノックダウンした検討にてdeltaNp63はTLR3リガンドによって引き起こされるアポトーシス感受性を制御することを示した。また、気管支上皮のdeltaNp63の発現はある種のプロテアーゼによって制御されることが分かった。一方でdeltaNp63は内因性プロテアーゼ阻害因子や炎症性サイトカインの産生を制御していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
我々の検討によって気管支上皮細胞が発現するdeltaNp63はウイルス感染に対する気管支上皮細胞の反応を制御していることが示された。また、deltaNp63の発現を制御するプロテアーゼはハウスダストに含まれるダニに含まれている。つまり、気管支上皮細胞の振る舞いを制御するdeltaNp63は、気管支喘息の増悪の主たる原因となるウイルス感染とハウスダスト曝露を結びつける因子となっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： Np63-positive basal epithelial cells were covered with differentiated Np63-negative cells in healthy bronchial tissue; however, Np63-positive cells were directly exposed to the bronchial lumen due to severe epithelial shedding in the asthmatic airway. Np63 regulated bronchial apoptosis in response to Toll-like receptor 3 stimulation. Expression of Np63 was modulated by stimulation with the certain type of protease signal. On the other hand, Np63 controlled the transcriptional expression and protein release of some epithelium-derived proinflammatory cytokines and endogenous protease inhibitors.

研究分野：機能病理学

キーワード：気管支喘息 気管支上皮細胞 deltaNp63 プロテアーゼ サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息の発症と慢性化機構には未だ不明な点が多く、既存の治療法は対症的なものに限られている。また、約 10% の喘息患者は高容量の副腎皮質ステロイド吸入によっても制御が困難であり、気管支喘息治療の大きな課題となっている。気管支喘息は病理組織学的に気管支の慢性炎症およびリモデリングを呈する。従来、この炎症は抗原と IgE を介する適応免疫によって引き起こされると理解されてきた。しかし近年、IgE が介在しない自然免疫によるアレルギー性炎症が存在し、ステロイド抵抗性の重症気管支喘息を引き起こしている可能性が示唆されており、その病態メカニズムの解明が気管支喘息の根治に必須な課題となっている。

気管支上皮は吸入された物質が最初に接触する外界とのインターフェイスとして生体防御機構の最前線に位置する。近年の研究によって上皮細胞は自然免疫受容体によって外来抗原あるいは障害された自己由来分子を感知し、炎症性サイトカインの産生を通して自然免疫および適応免疫の発動を制御していることが明らかとなってきた。興味深いことに IgE 依存性 (適応免疫性) と IgE 非依存性 (自然免疫性) のいずれの気管支喘息の病態形成において中心的役割を果たすと注目される 2 型自然リンパ球 (Type 2 innate lymphoid cell; ILC2) は侵襲を受けた上皮から産生されるサイトカインによって活性化される。従って、気管支上皮の免疫応答ダイナミクスは気管支喘息の発症と慢性化機構において根源的な役割を果たしている可能性が高い。

2. 研究の目的

申請者のこれまでの検討より $\Delta Np63$ は様々な上皮細胞の免疫学的性質を制御していることから、 $\Delta Np63$ 陽性の気道上皮は遷延する自然免疫シグナルあるいはサイトカイン刺激に対して、 $\Delta Np63$ 陰性を示す健常の上皮とは異なる反応を示すことが予想された。そこで $\Delta Np63$ 陽性の気道上皮が気管支喘息における気道炎症の発症と慢性化に果たす役割を解明するため、本研究では (1) $\Delta Np63$ が制御する気管支エピムノーム機構 (インプット系とアウトプット系) を解明し、(2) $\Delta Np63$ の発現を制御する外的因子 (ウイルス、細菌など) および内的因子 (自己由来タンパク、サイトカインなど) を同定することを目的とした。さらに (3) 気管支上皮の $\Delta Np63$ の発現の多寡によって調節される局所炎症環境が炎症の下流に位置する ILC2 をはじめとする各種免疫細胞の振る舞いに与える影響を明らかとすることを旨とした。

3. 研究の方法

(1) $\Delta Np63$ 制御性の気管支エピムノームの解明

上皮細胞の免疫学的振る舞いを詳細に解析するため本研究計画は主に BEAS2B 正常ヒト培養気道上皮細胞株を用いて進行した。気道上皮には種々の自然免疫受容体、サイトカイン受容体が発現している。これまでの報告からその発現パターンは分化段階によって特徴的に異なっており、上皮の分化を司る $\Delta Np63$ はこれらのリガンドに対する反応性を調節すると予想される (インプット系)。さらに $\Delta Np63$ は直接的あるいはインプット系の変容に基づく反応性の変化により間接的に上皮細胞のサイトカイン産生等のアウトプット系を制御すると予想されたことから、 $\Delta Np63$ の発現を強制発現系と RNA 干渉法による発現ノックダウンにより調節し、DNA マイクロアレイ法で $\Delta Np63$ が発現を制御する分子を網羅的に検索した。

(2) $\Delta Np63$ の発現を制御する外的および内的因子の検索

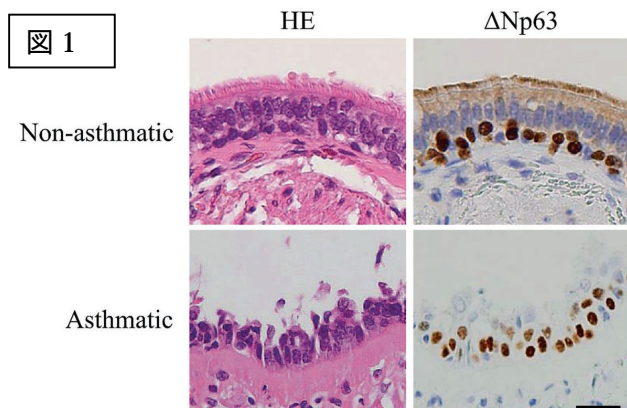
汚染大気などの化学的ストレス、感染や傷害された自己由来分子、サイトカインを含む生物学的ストレスが $\Delta Np63$ の発現に与える影響を検討し、 $\Delta Np63$ の発現調節によって気管支喘息の病態に対して保護的に働く、あるいは増悪、慢性化を促進する外的および内的因子を検討した。このような因子の候補としては衛生仮説あるいはウイルス感染、ハウスダストおよびダニ抗原をはじめとする疫学的知見から考えられる因子や現在治療に用いられている薬物などが考えられ、これらの物質で気管支上皮を刺激して $\Delta Np63$ の発現変化を遺伝子発現レベル、タンパク質レベルで検討した。

(3) $\Delta Np63$ の発現状態によって調節される上皮細胞の機能解析

網羅的解析によって遺伝子発現レベルで発現変化の得られた分子についてタンパク質レベルでの機能解析を行った。さらに上皮細胞の各種のリガンドへの反応性の変化によってもたらされる新規の炎症性サイトカインの産生経路について ELISA 法を用いて検索した。同時に、上皮細胞のアポトーシス抵抗性はカスパーゼ分子のウェスタンブロット解析さらに WST8 アッセイを組み合わせて検討を加えた。

4. 研究成果

(1) $\Delta Np63$ は気管支上皮細胞の TLR3 リガンド刺激に対する生存を規定した。



気管支喘息によって死亡した患者の病理解剖組織を検討すると、気管支上皮の剥離が高度に観察された。このとき Δ Np63 を発現する基底細胞に相当する上皮細胞が残存し、外界と接していた (図 1; Kubo T et al Lab Invest. 2019 より引用)。そこで、BEAS2B 細胞に対し RNA 干渉法を用いて Δ Np63 の発現をノックダウンし、 Δ Np63 の発現の低下した上皮細胞のモデルを作成した。種々のウイルスがもつ自然免疫受容体 (TLR3、TLR7、TLR9) リガンド (それぞれ poly I:C、R837、CpG-ODN) による刺激を行うと Δ Np63 ノックアウト群では細胞の生存が有意に低下した。また、この結果は TLR3 をノックダウンすることでキャンセルされたことから、TLR3 が関与していることが示された。また、Caspase-8 と cleaved PARP をウェスタンブロット法で検出すると Δ Np63 ノックダウン群では polyI:C 刺激によって、これらの分子がコントロールと比較して多く発現した。したがって、 Δ Np63 は TLR3 刺激によって誘導される気管支上皮細胞のアポトーシス感受性を制御することが示された。

(2) 気管支上皮細胞が発現する Δ Np63 の量はトリプシン刺激によって低下した。

次に気管支上皮に発現する Δ Np63 量を規定する因子を検索した。代表的 Th1 サイトカインである IFN γ や Th2 サイトカインである IL-13、あるいは TLR3、TLR7、TLR9 リガンド (それぞれ poly I:C、R837、CpG-ODN) では Δ Np63 の発現量に変化は見られなかった、しかし、トリプシンの刺激によって容量依存性に Δ Np63 の発現が低下した。このとき、トリプシンの受容体となる PAR2 のモデルリガンド SLIGKV も同様に Δ Np63 の発現を低下させた。

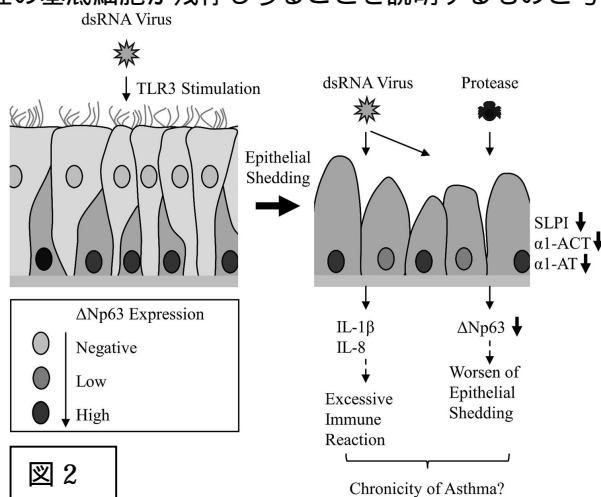
(3) 気管支上皮細胞において Δ Np63 によって発現が調節される因子を検索した。

続いて、 Δ Np63 によって発現の調節を受ける遺伝子を DNA マイクロアレイ法によって網羅的に検索した。その結果、400 以上の遺伝子に 2 倍以上の発現量の差がみられた。これらの中には炎症性サイトカインである IL1B や内因性プロテアーゼ阻害因子である SERPINA3 が含まれていた。さらに定量 PCR による検討で IL8、SLPI、SERPINA1 が Δ Np63 によって発現調節を受けていることが明らかとなった。さらに ELISA 法によって、これらは遺伝子のみならずこれらの遺伝子によってコードされるタンパク質レベルでも Δ Np63 によって産生量が調節されていることを示した。

(4) 気管支上皮が発現する Δ Np63 の量は poly I:C 刺激に対する IL-1 β と IL-8 の産生量に影響した。

Δ Np63 の発現量は poly I:C 刺激による気管支上皮からの IL1B と IL8 の遺伝子発現量において経時的にあるいは poly I:C の容量依存性に影響した。また、 Δ Np63 の発現量はこれらのサイトカインの産生量も影響することが分かった。

以上より Δ Np63 は TLR3 に作用するある種のウイルスに曝露された気管支上皮細胞の生存とアポトーシスを決定づける因子と考えられる。我々の結果は気管支上皮細胞がウイルスに曝露されたときにしばしば重症化する気管支喘息の局所組織では、 Δ Np63 の発現が低い表層の細胞がアポトーシスによって脱落し、 Δ Np63 陽性の基底細胞が残存しうることを説明するものと考えられる。また、 Δ Np63 はハウスダストに含まれるダニ抗原がもつプロテアーゼによって発現が低下する。ハウスダストへの曝露はウイルスに対する気管支上皮細胞の抵抗性あるいは反応性に影響しているものと考えられる。また、 Δ Np63 は種々の炎症性サイトカインや内因性プロテアーゼ阻害因子の産生量にも影響していた。このことは炎症の遷延化やプロテアーゼへの抵抗性の低下とも関連することが示唆された。つまり、我々の結果によって気管支上皮細胞の振る舞いを制御する Δ Np63 は、気管支喘息の増悪の主たる原因となるウイルス感染とハウスダスト曝露を結びつける因子となっている可能性が示唆された (図 2; Kubo T et al Lab Invest. 2019 より引用)。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Kubo T, Tsujiwaki M, Hirohashi Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Nakatsugawa M, Hasegawa T, Torigoe T. Differential bronchial epithelial response regulated by Δ Np63: a functional understanding of the epithelial shedding found in asthma. Lab Invest. 2019; 99:158-168. doi: 10.1038/s41374-018-0132-6.

〔学会発表〕(計3件)

久保輝文ら 転写因子 deltaNp63 が調節する気管支上皮の内因性プロテアーゼ阻害因子とサイトカインの産生 第51回北海道病理談話会、2018年10月13日、札幌市

Kubo T et al. Differential bronchial epithelial response regulated by deltaNp63: a potential mechanism explaining chronicity of asthma. 第46回日本免疫学会学術集会、2017年12月12日-14日、仙台市

Kubo T and Torigoe T. ΔNp63 regulate bronchial epithelial response: a potential mechanism of chronic airway inflammation. 第45回日本免疫学会学術集会、2016年12月5日-7日、沖縄県宜野湾市

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：辻脇 光洋

ローマ字氏名：TSUJIWAKI, Mitsuhiro

研究協力者氏名：廣橋 良彦

ローマ字氏名：HIROHASHI, Yoshihiko

研究協力者氏名：塚原 智英

ローマ字氏名：TSUKAHARA, Tomohide

研究協力者氏名：金関 貴幸

ローマ字氏名：KANASEKI, Takayuki

研究協力者氏名：中津川 宗秀

ローマ字氏名：NAKATSUGAWA, Munehide

研究協力者氏名：長谷川 匡

ローマ字氏名：HASEGAWA, Tadashi

研究協力者氏名：鳥越 俊彦

ローマ字氏名：TORIGOE, Toshihiko

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。