

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09629

研究課題名(和文) アレルギー疾患における気道粘膜IgAの役割

研究課題名(英文) Role of airway mucosal IgA in allergic diseases

研究代表者

鈴川 真穂 (Suzukawa, Maho)

帝京大学・医学部・助手

研究者番号：20453699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、アレルギー疾患における気道粘膜IgAの役割を明らかにすることとした。secretory IgA (sIgA)は、レセプターCD71を介して正常ヒト肺線維芽細胞(NHLF)からの炎症性サイトカインの産生および増殖能を有意に増強した。また、特発性肺線維症(IPF)患者の肺切片において、気腔内にsIgAが強く発現していた。本研究から、IgAは肺線維芽細胞を活性化することにより、肺における炎症を増強する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

気道粘膜を含め生体内において大量に存在する免疫グロブリンであり、抗原曝露の第一線に存在するIgAは、元来生体防御因子として重要視されてきたが、本研究から、肺の炎症を増強することで病原性役割があることが示唆された。本研究の結果を踏まえて、IgAが肺線維芽細胞を活性化する機構を明らかにできれば、IgAの役割の一部を標的とした予防あるいは治療戦略の確立につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The precise effects of IgA on lung fibroblasts remain unclear. This study aimed to elucidate how IgA activates human lung fibroblasts. Secretory IgA (sIgA) induced interleukin (IL)-6, IL-8, monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) production by normal human lung fibroblasts (NHLFs). sIgA also promoted proliferation of NHLFs. Among known IgA receptors, NHLFs significantly expressed CD71. Immunohistochemistry revealed that sIgA is abundant in lung sections from patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). Our findings suggest that sIgA may promote human lung inflammation by activating human lung fibroblasts.

研究分野：呼吸器内科、免疫、アレルギー

キーワード：IgA 肺線維芽細胞 特発性肺線維症 サイトカイン CD71

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

IgA は生体内において1日当たり最も大量に産生される免疫グロブリンであり、粘膜で重要な生体防御機構を形成していると考えられている。アレルギー疾患においては、抗原チャレンジ後、粘膜局所に抗原特異的IgAが増加することが報告されていることから、アレルギー疾患におけるIgAの重要な役割が推測されるが、これまでアレルギー疾患における粘膜IgAの作用を系統的に研究した報告は見当たらない。

2. 研究の目的

アレルギー疾患における気道粘膜IgAの役割を明らかにすることを本研究の目的とした。近年、腸管上皮におけるIgAの新たな役割が明らかになる等、IgAが再び注目されており、本研究の成果はIgAの予防医学的または治療的臨床応用につながる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) 細胞

ヒト肺線維芽細胞であるNormal Human Lung Fibroblasts(NHLF)を用いた。また、気道上皮細胞株、A549細胞を用いた。

(2) サイトカイン濃度の測定

購入したヒト分泌型IgAおよび単量体IgAで細胞を刺激して得られた上清中のサイトカイン濃度をCytometric Bead Assay; CBAおよびELISA法で測定した。

(3) Real time PCR

細胞を刺激した後、細胞からtotal RNAを抽出した。その後mRNAからcDNAに逆転写を行い、Thermo Fisher Scientific社作成のprimerおよびTaqman probeを用いて、レファレンス遺伝子を β -actinとしてCt法で相対定量した。

(4) 細胞増殖測定

細胞を刺激する試薬をプロモデオキシウリジン(Bromodeoxyuridine: BrdU)と共に添加して培養し、細胞増殖についてCell Proliferation ELISA kit, BrdU (Roche Applied Science)を用いて測定した。

(5) フローサイトメトリーによる解析

細胞表面発現については、各種特異抗体で標識後、FACSVerse(BD Biosciences)で測定した。IgA結合については、まずIgAと共に細胞を培養し、その後細胞をAPC-conjugated mouse anti-human IgA antibodyで標識してFACSVerse(BD Biosciences)で測定した。

(6) Western blot analysis

刺激後の細胞をlysis buffer (RIPA buffer)で溶解し、SDS化、還元熱処理し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった。ウェット式でpolyvinylidene difluoride (PVDF)メンブレンに転写し、抗体で標識後化学発光し、Amersham Imager 600(GE Healthcare Japan)で撮影した。

(7) siRNAを用いたノックダウン

siRNAをHiPerFect Transfection Reagent(Qiagen)に懸濁し、ノックダウンの評価についてはFACSおよびPCRで解析し、確認を行った。

(8) 肺組織の免疫染色

一次抗体として、Anti-IgA antibodyおよびAnti-secretory component antibodyを使用した。VECTASTAIN ABC kit(VECTOR)を用いて染色した上で光学顕微鏡BZ-X710(Keyence)で観察、撮影した。

(9) 統計解析

連続変数の二群間比較はMann-Whitney's U検定で、多群間比較はKruskal-Wallis検定で評価し、統計学的有意差は $P < 0.05$ とした。

4. 研究成果

(1) IgAによるNHLFのサイトカイン・ケモカイン産生亢進作用

線維芽細胞が産生する様々な炎症性メディエーターに対するIgAの作用を明らかにするために、monomeric IgA(mIgA)およびsecretory IgA(sIgA)でNHLFを刺激し、CBAおよびPCRを用いて解析した。Fig.1に示す通り、mIgA 100 $\mu\text{g/ml}$ ではNHLFのサイトカイン産生に変化がなかったのに対して、sIgA 100 $\mu\text{g/ml}$ ではNHLFによるIL-6、IL-8、CCL2/MCP-1およびGM-CSFの産生が有意に上昇した(Fig.1)。sIgA刺激によるIL-6、IL-8、CCL2/MCP-1およびGM-CSFのmRNA発現レベルもsIgA 100 $\mu\text{g/ml}$ 刺激群で有意に増強した。同様に、sIgAによる刺激で、A549細胞からのVEGF-A、TGF- β 1、IL-8の産生が有意に増強した。

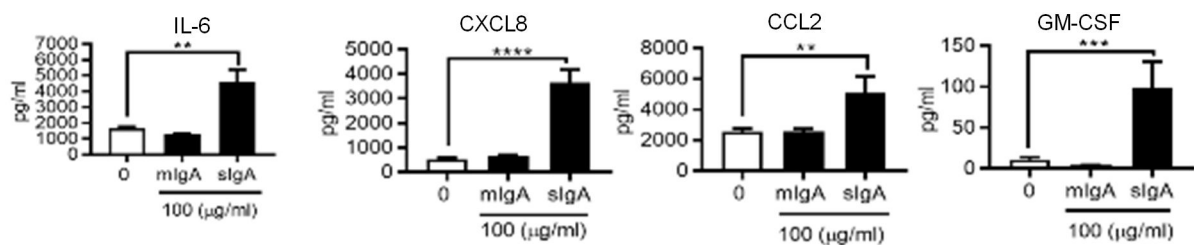


Fig. 1 IgAによるサイトカイン・ケモカインの産生

n=3 ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

(2) sIgA刺激によるNHLFの増殖とコラーゲンゲル収縮の促進

sIgA 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ により、線維芽細胞の増殖を増強する因子として知られているTGF- β 1の刺激と同程度にNHLF増殖能が促進された(Fig.2)。またNHLFによるコラーゲン基質収縮能は、sIgA刺激でTGF- β 1と同程度に促進された。

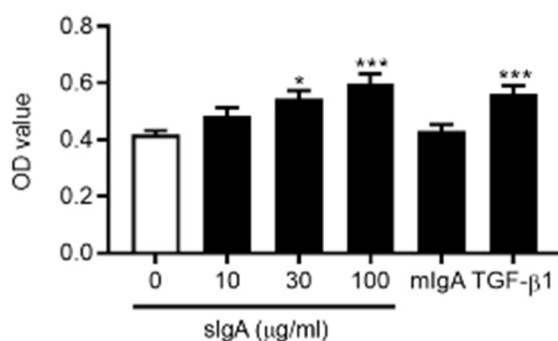


Fig. 2 sIgA刺激によるNHLFの増殖

n=3 * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

(3) sIgAによるNHLF細胞のSMAおよびコラーゲンI(Col I)産生促進

Fig.3に示す通り、sIgAと共培養したNHLFにおいては、mRNAおよびタンパクレベルでSMAお

よび Col I の発現増強を認めた。

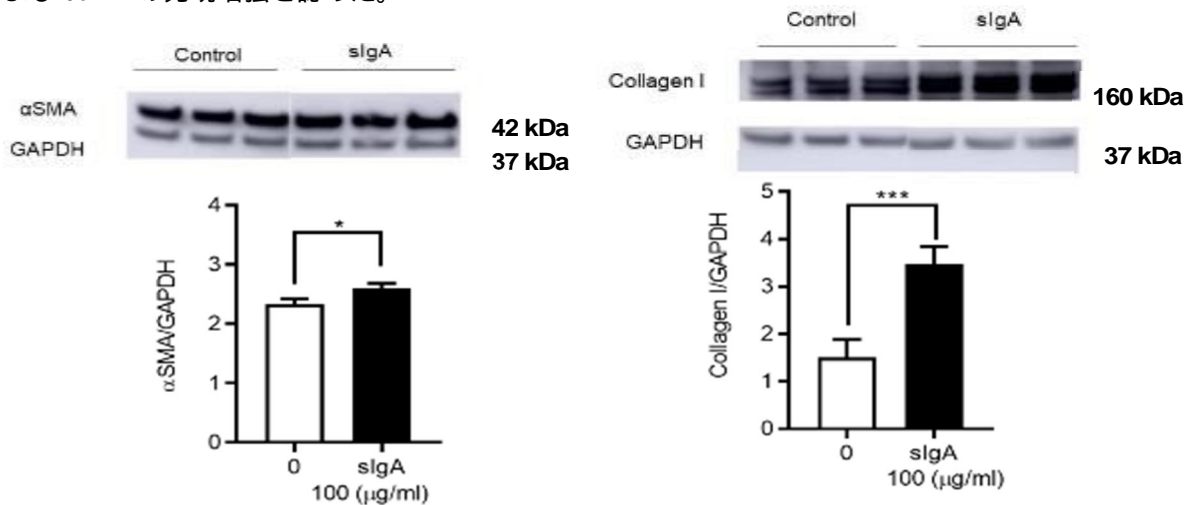


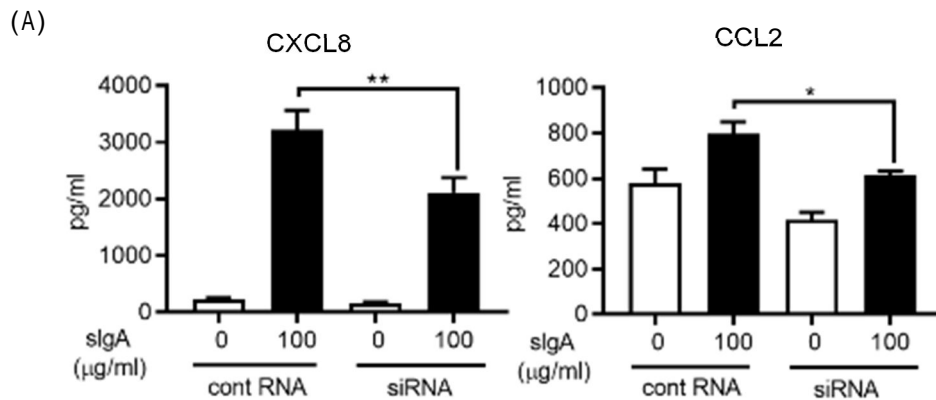
Fig. 3 sIgAによるNHLF細胞の α SMAおよびコラーゲンI (Col I) 産生
n=3 *p<0.05, ***p<0.001

(4) IgAのNHLFへの結合とNHLFのIgA受容体発現

sIgAがNHLFに結合するか明らかにするために、IgAと共にNHLFを培養し、その後APC-conjugated mouse anti-human IgA antibodyで標識してFACSVerseで測定した。濃度依存的にsIgAの結合量が増えた。既知のIgA受容体の中ではCD71の発現がNHLF上で最も高く、抗CD71抗体を用いた免疫染色においても、明らかな発現が確認された。同様にA549上でもCD71が高発現していた。

(5) IgAのCD71を介したNHLFに対する作用

CD71に対するsiRNAを用いてCD71をノックダウン後、sIgAのNHLFへの結合およびsIgAによるNHLFのサイトカイン産生を解析した。CD71 siRNAによりNHLFに対するsIgA結合は低下傾向を示し、CD71ノックダウン後sIgA刺激を加えると、NHLFによるIL-8およびCCL2/MCP-1の産生は完全ではないものの、有意に低下した(Fig.4A)。同様に、CD71ノックダウン後sIgA刺激を加えると、A549細胞によるVEGF、TGF- β 1、IL-8の産生は、有意に低下した(Fig.4B)。



(B)

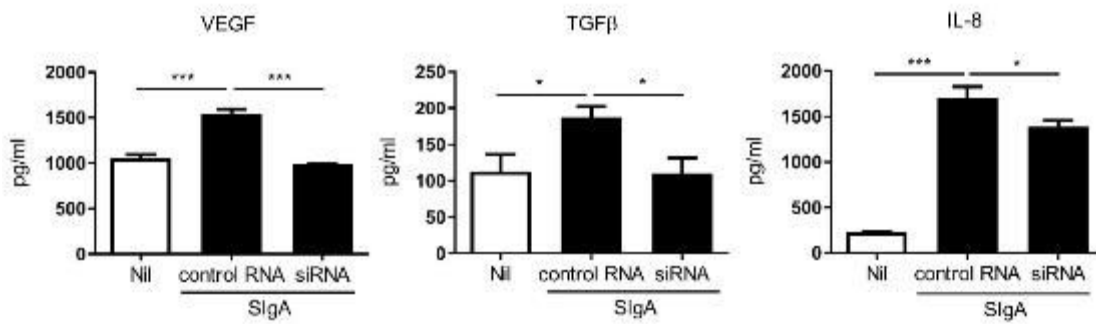


Fig.4 CD71 siRNA 導入による sIgA のサイトカイン産生

(A) NHLF, n=3 *p<0.05, **p < 0.01, n.s., not significant

(B) A549 細胞, n=4-12 *p < 0.05, ***p < 0.001

(6) IPF 患者肺における sIgA の発現

切除肺の標本を用いて、sIgA に対する免疫染色を行なった。Fig.5 に示す通り、IPF 患者において気腔内に粘液貯留を認める箇所的一致して IgA および secretory component (SC) が強陽性に染色された。

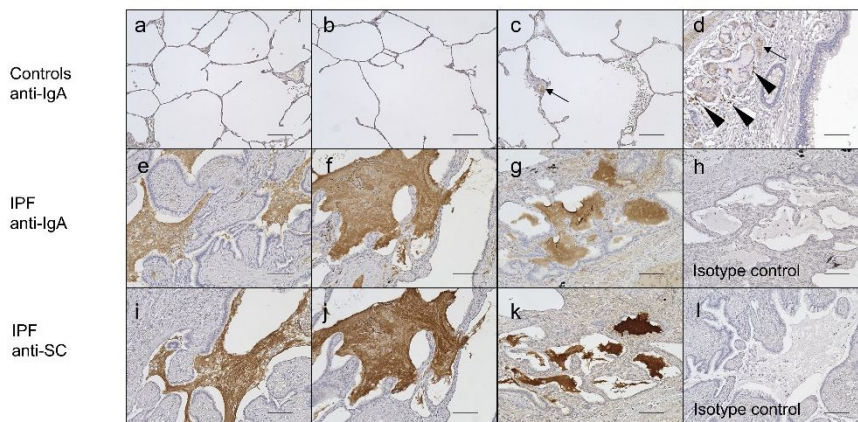


Fig.5 肺組織の IgA および SC 発現

健常肺 (最上段) IPF 患者肺 (中段、最下段)

以上、本研究から sIgA は、NHLF のサイトカインの産生、NHLF によるコラーゲン産生、細胞増殖能の亢進を誘導し、その機序の一部には CD71 が関与している可能性が示唆された。この反応に細胞内のシグナル伝達がどのように関与しているかについてもさらに検証を重ね、検証結果から今後気管支喘息のリモデリングや IPF を含む異常な線維化を来たす疾患における治療薬として臨床応用できるかどうかとも検討する価値があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Osumi Mika, Yamaguchi Masao, Sugimoto Naoya, Suzukawa Maho, Arai Hidenori, Akiyama Hiroshi, Nagase Hiroyuki, Ohta Ken	4. 巻 9
2. 論文標題 Allergy to carminic acid: in vitro evidence of involvement of protein-binding haptens	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Asia Pacific Allergy	6. 最初と最後の頁 e2 ~ e2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5415/apallergy.2019.9.e2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiraishi Yoshihisa, Yamaguchi Sachiko, Yoshizaki Takamichi, Nambu Aya, Shimura Eri, Takamori Ayako, Narushima Seiko, Nakanishi Wakako, Asada Yosuke, Numata Takafumi, Suzukawa Maho, et al.	4. 巻 8
2. 論文標題 IL-33, IL-25 and TSLP contribute to development of fungal-associated protease-induced innate-type airway inflammation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18052 ~ 18052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-36440-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugimoto Naoya, Suzukawa Maho, Nagase Hiroyuki, Koizumi Yuta, Ro Shoki, Kobayashi Konomi, Yoshihara Hisanao, Kojima Yasuhiro, Kamiyama-Hara Asae, Hebisawa Akira, Ohta Ken	4. 巻 60
2. 論文標題 IL-9 Blockade Suppresses Silica-induced Lung Inflammation and Fibrosis in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 232 ~ 243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.2017-02870C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arakawa Sayaka, Suzukawa Maho, Ohshima Nobuharu, Tashimo Hiroyuki, Asari Isao, Matsui Hiroto, Kobayashi Nobuyuki, Shoji Shunsuke, Nagase Takahide, Ohta Ken	4. 巻 67
2. 論文標題 Expression of Siglec-8 is regulated by interleukin-5, and serum levels of soluble Siglec-8 may predict responsiveness of severe eosinophilic asthma to mepolizumab	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 S41 ~ S44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2018.03.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arakawa S., Suzukawa M., Watanabe K., Kobayashi K., Matsui H., Nagai H., Nagase T., Ohta K.	4. 巻 195
2. 論文標題 Secretory immunoglobulin A induces human lung fibroblasts to produce inflammatory cytokines and undergo activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical & Experimental Immunology	6. 最初と最後の頁 287 ~ 301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cei.13253	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzukawa Maho, Matsumoto Hisako, Ohshima Nobuharu, Tashimo Hiroyuki, Asari Isao, Tajiri Tomoko, Niimi Akio, Nagase Hiroyuki, Matsui Hirotohi, Kobayashi Nobuyuki, Shoji Shunsuke, Ohta Ken	4. 巻 134
2. 論文標題 Baseline serum CXCL10 and IL-12 levels may predict severe asthmatics' responsiveness to omalizumab	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Respiratory Medicine	6. 最初と最後の頁 95 ~ 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.rmed.2017.12.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Horie Masafumi, Miyashita Naoya, Mikami Yu, Noguchi Satoshi, Yamauchi Yasuhiro, Suzukawa Maho, Fukami Takeshi, Ohta Ken, Asano Yoshihide, Sato Shinichi, Yamaguchi Yoko, Ohshima Mitsuhiro, Suzuki Hiroshi I., Saito Akira, Nagase Takahide	4. 巻 314
2. 論文標題 TBX4 is involved in the super-enhancer-driven transcriptional programs underlying features specific to lung fibroblasts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology	6. 最初と最後の頁 L177 ~ L191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajplung.00193.2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohta Ken, Nagase Hiroyuki, Suzukawa Maho, Ohta Shin	4. 巻 29
2. 論文標題 Antibody therapy for the management of severe asthma with eosinophilic inflammation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 337 ~ 343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxx045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鈴川 真穂
2. 発表標題 Pathogenic activity of secretory IgA in lung fibrosis
3. 学会等名 The 47th Japanese Society of Immunology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴川 真穂
2. 発表標題 結核感染におけるQFT Gold Plus, QFT Gold In Tubeの残血漿中サイトカイン値の検討
3. 学会等名 第67回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第65回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴川 真穂
2. 発表標題 Baseline serum cytokine levels may predict responders to omalizumab and mepolizumab
3. 学会等名 XXIV World Congress of Asthma (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴川 真穂
2. 発表標題 メボリズマブ投与喘息患者における血清サイトカイン値の検討
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 鈴川 真穂
2. 発表標題 間質性肺炎の肺病変におけるIL-9およびIL-9レセプターの発現解析
3. 学会等名 第58回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴川真穂
2. 発表標題 血中サイトカインを用いたオマリズマブの治療効果予測因子の検討
3. 学会等名 第66回 日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 鈴川 真穂	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医薬ジャーナル社	5. 総ページ数 5
3. 書名 医薬ジャーナル (0287-4741)54巻11号 【喘息治療における分子標的治療】 基礎総論 喘息における気道炎症の概説(解説/特集)	

1. 著者名 渡邊 直昭(国立病院機構東京病院 呼吸器センター), 大島 信治, 永井 英明, 加藤 貴史, 齋藤 美奈子, 五十嵐 彩夏, 鈴川 真穂, 川島 正裕, 浅里 功, 松井 弘稔	4. 発行年 2018年
2. 出版社 (一社)日本呼吸器学会	5. 総ページ数 7
3. 書名 日本呼吸器学会誌 (2186-5876)7巻4号 成人における4価インフルエンザ不活化スプリットワクチンの免疫原性と安全性の検討	

1. 著者名 鈴川 真穂	4. 発行年 2018年
2. 出版社 (株)北隆館	5. 総ページ数 4
3. 書名 アレルギーの臨床 (0285-6379)38巻2号 アレルギー療養に対する肥満の影響	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----