

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K16064

研究課題名(和文) 免疫系と神経系のクロストークに着目した気管支喘息重篤化機構の解明と制御法開発

研究課題名(英文) Development of a therapeutic method for asthma exacerbation with cross-talk of immune- and peripheral nervous-system

研究代表者

芦野 滋 (ASHINO, Shigeru)

京都大学・オープンイノベーション機構・特定講師

研究者番号：10507221

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)：本研究では、ウイルス核成分を用いた喘息増悪モデルマウスの作製およびその制御法開発のための研究基盤の構築を試みた。通常の喘息マウスと比較して喘息増悪マウスでは気道過敏性が著しく亢進し、好中球性気道炎症を伴いながらTh2サイトカイン以外にもTh1/Th17免疫反応に関わるサイトカインのレベルが上昇した。このとき、神経ペプチド受容体を発現する免疫細胞も出現し、その阻害剤投与によって喘息の増悪は回避された。これらのことから、ウイルス感染時に誘導される神経ペプチドと免疫細胞の相互作用が喘息増悪を軽減できる標的になり得ることが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ウイルス感染状態にある喘息増悪メカニズムの一端をマウスを使った実験で示し、その制御法開発の研究基盤の構築を進めた。その結果、ヒトでも確認される増悪メディエーターの肺内での上昇が認められ、その病態において神経ペプチドの一種の受容体を発現する免疫細胞(樹状細胞やマクロファージ)が標的になる可能性が示唆された。現在の重症喘息に適応されているサイトカイン中和抗体製剤が無効である場合に、この新規知見を応用することが可能かどうか検討を続けている。

研究成果の概要(英文)：In the present study, an asthma exacerbation model mouse using a viral component poly I:C, which mimics virus infection, was successfully established. It was revealed that the airway hyperresponsiveness was higher in the poly I:C-induced asthma exacerbation model compared to regular asthma model. In addition, neutrophilic airway inflammation with pulmonary Th1/Th17 cytokines were upregulated in the asthma exacerbation model. Moreover, a neuro-transmitter peptide receptor expressing dendritic cells and macrophages were involved in the asthma exacerbation phenotype. We found that an antagonist against the neuro peptide was capable of controlling the exacerbated pathogenesis. These results suggest that the cross-talk of immune cells and the neuro peptide could be therapeutic target to negatively regulate the exacerbation.

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

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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。また、病態が重症化するほど、肺や喀痰中の抗ウイルス応答に関係する免疫系のサイトカインレベルが上昇することも報告されている。これらのサイトカインは喘息重症化に関わることが知られているため、サイトカイン中和抗体やサイトカインシグナル阻害剤が治療に有用と考えられる。しかし、一方で、抗ウイルス応答にも必須であるため、それらの治療法では感染症の際にウイルス排除を遅延させる、あるいは日和見感染の危険性が懸念される。現時点では、どのような機序で喘息重症化が誘導されるか詳細に解明されていないうえに、安全性のある新規治療法も開発されていない。

申請者は、本研究において、抗ウイルス免疫応答に関するサイトカインレベルを低下させず、喘息増悪を回避できる新たな治療ターゲットに着目するため、以前より免疫系と神経系のクロストークがこの喘息増悪にどのように関わるかを精査し、またウイルス排除に関わる生体防御機構を抑制しないが病態を改善し得る新規阻害剤を探索してきたが、さらなる詳細なメカニズム解明とともに、安全性のある新たな制御法開発の研究基盤を構築することが必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、気管支喘息の病態がウイルス感染によって増悪するメカニズムを、各種の免疫細胞の性状解析とともに、その変化に関わる因子を特定し、病態増悪を軽減できるターゲットになりうるかを、免疫系および神経系の機能変化にフォーカスを当てて検証することを目的とした。

また、その過程で、病態増悪を促進する責任分子に対する新規阻害剤を見出した場合、喘息増悪は回避できるが、抗ウイルス応答に関わる反応 (例えば、サイトカイン産生) は抑制されていないかどうかをあわせて検証する。とくに、後述する肺組織内の免疫細胞に発現する神経伝達物質の受容体阻害剤が、どのような喘息増悪抑制効果を示すか、また免疫系サイトカインレベルに変化を生じさせるかどうかを詳細に検討する。

3. 研究の方法

ウイルスに感染した疑似状態を作成し、喘息増悪を誘導するモデルマウスを作製するため、ウイルス構成成分として知られる double stranded RNA を模倣する人工試薬 poly I:C によって、なぜ喘息増悪が引き起こされたかを免疫系と神経系のクロストークの観点から追究した。in vivo および in vitro 実験を中心に、大きく分けて以下の3項目を展開した。

(A) 気管支喘息増悪モデルの作製

一般的な喘息を有する患者がウイルス感染を起こす状況を想定して、気管支喘息モデル (アレルゲン ovalbumin (OVA) + Th2 アジュバント Alum (Al(OH)₃) で感作後に OVA を吸入させるモデル) に poly I:C を気管内投与して喘息増悪モデルを作製した。病態は、気道過敏性 (AHR) は、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の炎症細胞、種々の免疫系サイトカインレベルを測定しての評価した。

(B) 喘息増悪時の免疫系および神経系の変化に関する解析

ウイルス成分 poly I:C で惹起された喘息増悪モデルマウスの肺組織の免疫細胞の性状変化を、抗原提示能および様々な細胞表面分子群をフローサイトメトリーで精査した。とくに、poly I:C

刺激を受容する免疫細胞である樹状細胞 (DC) やマクロファージ (Mφ) がどのように変化したかを確認し、神経系との関連があるかどうかを種々の神経伝達物質の受容体の増減変化をもとに検討した。

(C) 免疫細胞と神経系のクロストーク依存的な喘息増悪メカニズムの証明と阻害剤の有効性の検討

ウイルス成分投与による喘息増悪が引き起こされた際に、免疫細胞 (特に DC あるいは Mφ) の性状に変化があり、且つ神経伝達物質受容体の発現が認められた場合、その阻害剤投与を試み、病態改善効果が得られるか検証した。さらに、その改善効果が抗ウイルス応答サイトカインに影響するかを解析した。

4. 研究成果

(A) 気管支喘息増悪モデルの作製

気管支喘息モデル にウイルス成分である人工試薬 poly I:C を気管内投与したところ、気道過敏性 (AHR) が顕著に上昇し呼吸機能の著名な低下を示した。また、気管支肺胞洗浄液 BALF 中の炎症細胞 (マクロファージ、リンパ球、好中球、好酸球)を解析すると好酸球性の気道炎症に加えて好中球性気道炎症も有意に誘導されていることがわかった(図 1)。さらにこのとき免疫系サイトカインは、喘息病態を惹起する Th2 サイトカイン(IL-4, 5 13) に加えて、抗ウイルス応答に関係する Th1 サイトカイン(IFN-γ, IL-12) のレベルも上昇していた。抗ウイルス王都に関する他のサイトカイン IL-17 は有意な差ではなかったが、poly I:C 投与により増加する傾向にあった(図 2)。

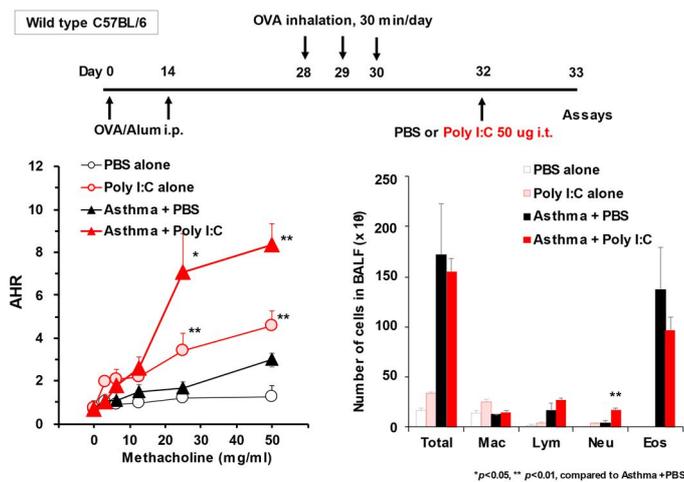


図1 喘息増悪モデルの作製(気道過敏性と気道炎症)

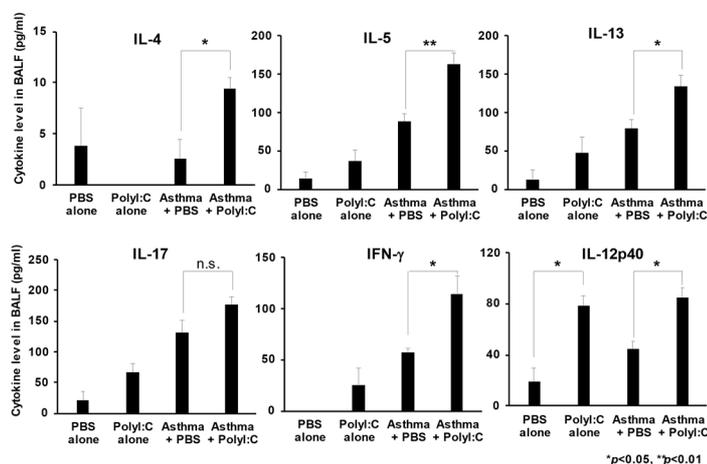


図2 喘息増悪モデルの作製(免疫系サイトカインレベル)

(B) 喘息増悪時の免疫系および神経系の変化に関する解析

喘息マウスにウイルス成分である polyI:C を投与し、ウイルス感染状態を構築すると図 1, 2 のように、喘息病態が増悪することが確認されたが、このとき様々な免疫細胞群の性状変化をフローサイトメトリーによって解析したところ、神経伝達物質の受容体である NK2R (neurokinin 2 receptor) 発現が著しく増大していることがわかった。この NK2R は、知覚神経 C 線維より放出される神経ペプチド「ニューロキニン A」の受容体である。この NK2R の発現増大はすべての免疫細胞群で認められたわけではなく、樹状細胞 (DC, CD11c⁺) やマクロファージ (Mφ, F4/80⁺) に認められた(図 3)。

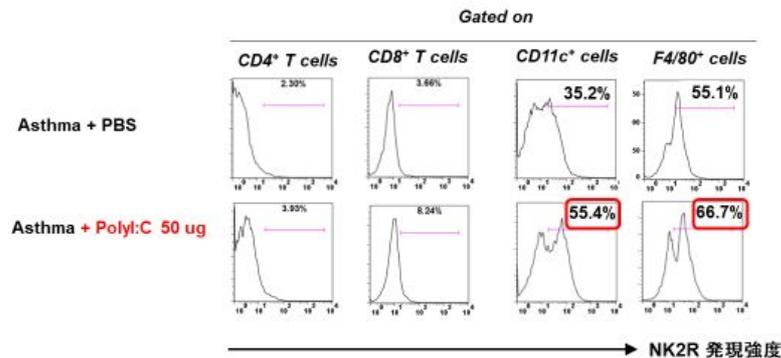


図3 喘息増悪時のNK2R発現

(C) 免疫細胞と神経系のクロストーク依存的な喘息増悪メカニズムの証明と阻害剤の有効性の検討

抗ウイルス応答状態において、喘息症状が急激に悪化している肺組織内で、免疫細胞の DC や Mφ の表面上に、神経伝達物質のレセプターNK2R が著しく発現する現象は、免疫系と神経系のクロストークを考えるうえで非常に有用な治療ターゲットになり得る可能性が高い。そのため、poly I:C を投与して喘息病態が増悪するタイミングに、NK2R 阻害剤の気管内投与を行い、喘息増悪が軽減するかどうか検討した。その結果、NK2R 阻害剤を投与することで気道過敏性上昇が抑制され、好中球浸潤も消失することが確認された (図 4)。また、NK2R 阻害剤によって病態が改善された際に、肺内のサイトカインレベル (IL-4, 5, 13, IFN-γ, IL-17 など) はほとんど変化しなかった。

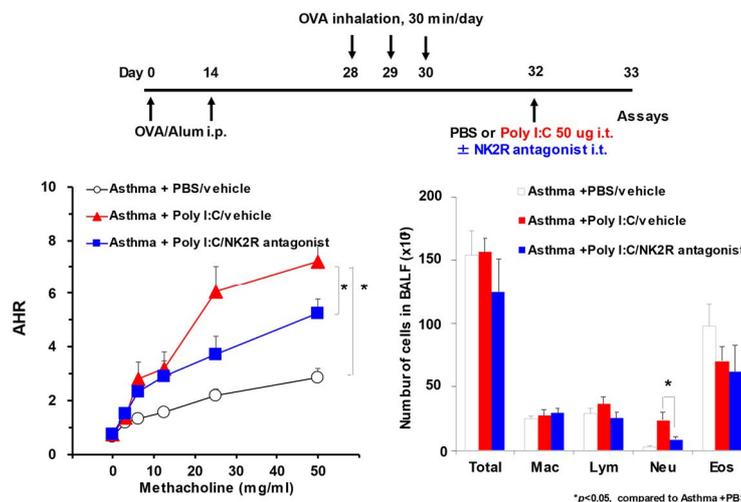


図4 NK2R阻害剤による喘息増悪の改善効果

以上の(A)~(C)の解析結果より、ウイルス成分により喘息増悪が引き起こされる際に、免疫細胞の DC や Mφの細胞表面上に神経ペプチド neurokinin A 受容体である NK2R が発現することが、喘息増悪メカニズムに関係していることが明らかにされた。また、その NK2R に対する阻害剤が病態軽減効果を有することが示され、治療ターゲットになり得ることが考えられた。NK2R 阻害剤投与によって喘息増悪が回避されたときの免疫系サイトカインレベルには変化がなかったことから、何らかのサイトカインに依存して NK2R 発現が誘導されたことが推察される。しかし未だ NK2R 発現のサイトカイン依存性は明らかにされていないため、今後その機序を解明する予定である。この点について、抗ウイルス応答の免疫反応に着目して考えると、NK2R 阻害剤によって抗ウイルス応答サイトカインレベル (IL-17 や IFN- γ) が変化していなかったことから、NK2R シグナルを阻害すること自体は、ウイルス排除の生体防御機構を維持したまま、ウイルス感染が誘導する喘息増悪を回避することができる有用な薬剤であると考えられ、易感染性の副作用を生じることなく喘息増悪を制御できると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wang Meiqin, Strand Matthew J., Lanser Bruce J., Santos Carah, Bendelja Kreso, Fish Jennifer, Esterl Elizabeth A., Ashino Shigeru, Abbott Jordan K., Knight Vijaya, Gelfand Erwin W.	4. 巻 15
2. 論文標題 Expression and activation of the steroidogenic enzyme CYP11A1 is associated with IL-13 production in T cells from peanut allergic children	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0233563
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0233563	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Zaim E, Ashino S, Osaka T, Yanagisawa N, Yagi J	4. 巻 65
2. 論文標題 Effect of Cholecalciferol in Food Allergy Mouse Model Is Associated with Decrease of CD69+ CD4+ T Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)	6. 最初と最後の頁 113-122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3177/jnsv.65.113	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

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のため abstractのみ発表）（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（国際学会）
4. 発表年 2020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のため abstractのみ発表) (国際学会)
4. 発表年 2020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 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

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------