

令和元年5月22日現在

機関番号：81303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16287

研究課題名(和文) Keap1-NRF2系による小児アレルギー疾患制御の解明と治療戦略への応用

研究課題名(英文) Keap1-NRF2 system is a potential therapeutic strategy to regulate pediatric allergic disease.

研究代表者

長島 隆一 (Nagashima, Ryuichi)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・がん先進治療開発研究部・研究技師

研究者番号：20783707

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)：異常な活性化によりアレルギーを惹起する2型自然リンパ球(ILC2)における酸化ストレスの役割を解析した。肺のILC2において、酸化ストレス除去に重要なNRF2を欠損すると細胞増殖能が高くなり、NRF2を活性化すると細胞数が減少した。この減少効果は、アレルギー治療に頻用されるステロイドとは異なる機序によるものだが、ステロイドと同等にILC2減少効果をもたらした。実際に、肺にアレルギー性炎症を誘導したマウスにNRF2活性化剤を投与すると、肺におけるILC2の減少と好酸球浸潤の軽減を認めたことから、NRF2活性化剤は喘息を含むアレルギー治療に有用である可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、小児期に懸念されるステロイド使用における問題点を克服するべく、比較的安全性の高いNRF2活性化剤に着目した。アレルギー性炎症を引き起こすILC2をステロイドと同等に減少させることから、NRF2活性化剤はステロイドに代替するアレルギー疾患制御薬として期待される。またNRF2活性化剤は、アレルギーを惹起する活性化したILC2に有効であり、常在ILC2には無害であったことから、治療による副作用を軽減出来る可能性も考えられる。ステロイド耐性重症喘息患者に対する新規治療法としての可能性を切り開いた点で、社会的意義も高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The Keap1-NRF2 system plays a pivotal role in the oxidative-stress response. Under stress, damaged epithelial cells release cytokines that activate type 2 innate lymphoid cells (ILC2s), which mediate the allergic immune response. Here we investigated the role of the Keap1-NRF2 pathway in ILC2 homeostasis and allergic inflammation, using NRF2-knockout mice. ILC2s from NRF2-deficient mice showed highly proliferative capacity. In contrast, activating NRF2 with a chemical inducer decreased the viability of the wild-type, but not of the NRF2-deficient ILC2s. Using a mouse allergy model, we found that the activation of NRF2 in vivo decreased the number of pulmonary ILC2s and eosinophils. These findings indicated that NRF2 is an important regulator of the allergic response, by determining the survival and death of ILC2s, and suggest that NRF2 activation is a potential therapeutic strategy for steroid-resistant allergy alleviation.

研究分野：免疫学

キーワード：アレルギー ILC2 Nrf2

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

喘息を含むアレルギー疾患は年々増加の一途を辿っており、小児期のアレルギー罹患率の高さが問題となっている。アレルギー発症には遺伝的要因と環境要因の2大要因があるが、近年の患者急増の原因としては環境因子が注目を浴びており、外部環境に応答する免疫系が重要であると考えられている。興味深いことに、アレルギーに関連する応答の形成は胎児期から小児期にかけて決定されるとされ、小児期におけるアレルギー疾患の克服は急務である。近年の研究により、2型自然リンパ球（ILC2）がアレルギー性炎症を引き起こすことが多数報告されている。ILC2は上皮下や粘膜下に常在し、アレルゲンや寄生虫の侵入によって傷害された上皮細胞から放出されるIL-33やTSLPなどのサイトカインはILC2を強く活性化し、IL-5やIL-13などを大量に分泌することで、好酸球の活性化、粘液産生亢進および気道平滑筋の収縮が強烈に誘導され、異物の排除が達成される。しかし、ILC2の異常な活性化は、慢性炎症やアレルギー発症に繋がることから、ILC2をターゲットとした治療は、次世代の「抗アレルギー療法」に繋がるものと期待が高まっている。

### 2. 研究の目的

小児アレルギーにおいてILC2を制御する方法があれば、新たな選択的治療が開発できる可能性がある。実際に、吸入ステロイド薬（ICS）がILC2を抑制することが国内グループから報告された。この結果は、ILC2を対象とした治療法の妥当性を強く示唆している。ILC2の制御に関わる新たな標的を求めて、マウスにアレルギー性の喘息を誘発する実験系を構築し、環境要因に応答する因子のスクリーニングを行った結果、酸化ストレス応答系のKeap1-NRF2系がILC2制御の鍵を握っていることを見出した。しかしながら、ILC2の分化や活性化において酸化ストレスがどのような貢献をしているか？などの基礎的情報が決定的に足りないため、ILC2の制御に向けたKeap1-NRF2系の治療への展望が開けずにいた。そこで、酸化ストレスによるILC2制御の役割を明らかにするため、NRF2遺伝子欠損(NRF2-KO)マウスの解析を行ったところ、NRF2-KOマウスではIL-33気管内投与後のIL-5とIL-13産生能が亢進しており、アレルギー症状が悪化することを突き止めた。これらのTh2サイトカインはアレルギー病態を支配する因子であり重要な知見である。興味深いことに、喘息様症状を呈したマウスから得られたILC2は活性化において野生型と顕著な差異を示し、NRF2はILC2機能を負に制御している可能性を示唆した。一方、これまでNRF2によるILC2制御の報告はほぼ皆無である。これら事実から、「Keap1-NRF2制御系がILC2を制御しており、酸化ストレス応答の異常がILC2の暴走を許し慢性炎症やアレルギー疾患を引き起こしている」という仮説を立て以下の実験を行った。

### 3. 研究の方法

アレルギー病態の成立と維持におけるNRF2の役割を明らかにするため、野生型およびNRF2-KOマウスに対し、以下の解析を行った。

平成29年度

#### 【計画1】

1, 2) IL-33 または真菌抗原を経気管投与し、①アレルギー性喘息所見の解析（気道抵抗測定および病理組織解析）②BALF（気管支肺胞洗浄液）中のサイトカイン（IL-33、IL-5 およびIL-13）の測定、③肺におけるILC2と好酸球集団の解析(FACS)を行う。

3) ILC2は寄生虫排除機構に重要であり、感染に即応して2型免疫応答を引き起こす。ネズ

ミ線虫 *N.brasiliensis* (NB:調整済) を経皮感染させ、①ILC2 応答、②寄生虫排除能について解析する。

4) 条件付き Keap1 欠損マウスに IL-33 を経気管投与し、NRF2 活性化状態における ILC2 応答を解析する。

#### 【計画2】

WT および NRF2-KO マウスの肺から ILC2 を分取し、in vitro で ILC2 機能を解析する。

1) サイトカイン産生能解析: IL-5, IL-13, CCL11 を ELISA 測定する

2) ILC2 増殖解析: ILC2 を NRF2 活性化剤で処理し、細胞増殖解析を行う

3) ILC2 細胞死解析: 上記と同様に細胞死を解析する。差異を認めた場合、細胞増殖および細胞死関連シグナルについて解析する。

4) ILC2 細胞内シグナル解析: NF- $\kappa$ B, p38MAPK などを調べる。

### 平成30年度

#### 【計画3】

1) 骨髄細胞からリンパ球共通前駆細胞 (common lymphoid progenitor:CLP) をソーティングにより分取し、OP9-DL1 細胞と共培養し ILC2 を誘導する。分化の過程における NRF2 の影響を解析する。

2) 免疫不全マウス (C57/BL6 Rag1<sup>-/-</sup>, Rag2<sup>-/-</sup>, IL2rg<sup>-/-</sup> マウス) に対し CLP を移植し、ILC2 の分化に NRF2 が影響するのか、in vivo レベルでも解析する。

3) マイクロアレイ・次世代エクソームシーケンスを用いた NRF2 標的遺伝子の網羅的スクリーニング

#### 【計画4】

1) NRF2 活性化剤による治療モデル:アレルギーを誘導したマウスに NRF2 活性化剤 (CDDO-Im, ジメチルフルマル酸等) を投与し、アレルギー症状の改善がみられるか検討する。

2) プロスタグランジン投与による治療への挑戦: プロスタグランジンの一部には、NRF2 を活性化するもの (15d-PGJ<sub>2</sub>) も存在する。ILC2 機能抑制や ILC2 細胞死を誘導するプロスタグランジンをスクリーニングし、プロスタグランジンを介した新しいアレルギー治療法にチャレンジする。

## 4. 研究成果

### 平成29年度

#### 【計画1】

1, 2) 各マウスに IL-33 または真菌抗原投与し、アレルギーを誘導した。NRF2-KO マウスでは ILC2 と好酸球数の増加や Th2 サイトカイン産生量が亢進した。病理組織解析(HE 染色、PAS 染色)においても、NRF2-KO マウスではアレルギー性炎症の程度が高かった。

3) 線虫感染の実験系では、線虫の維持・管理が当施設では極めて難しく、実施しなかった。

4) 条件付き Keap1 欠損マウスでの解析では、予想に反して優位な差を認めなかった。後述するが、IL-33 気管内投与によって誘導されるアレルギー性炎症は、NRF2 活性化剤の投与によって減弱することから、Keap1 欠損マウスでも同様の反応が起こると予想していた。この違いとして、NRF2 を活性化する環境に差異がある(定常状態と炎症状態)ことが要因ではないかと考えられる。

#### 【計画2】

1) NRF2-KO マウスの ILC2 は WT と比較し、in vitro で IL-33 への反応性が高く、IL-5, IL-13 を多量に産生した。

2) NRF2-KO マウスの ILC2 において、IL-2, IL-7, IL-33 への反応性が高いことから、NRF2 欠損 ILC2 では細胞増殖能が高かった。

3) NRF2 活性化剤の投与によって、ILC2 は減少した。既存のアレルギー治療薬であるステロイドでは、アポトーシス実行因子であるカスパーゼ3の活性化を認めたが、NRF2 活性化剤では検出されなかった。また、既報の細胞死経路（アポトーシス、ネクロトーシス等）を阻害する薬剤を組み合わせる処理したが、NRF2 活性化による ILC2 減少効果は改善しなかったことから、ILC に特有の新規細胞死機構である可能性が考えられた。ILC いくつかの亜群が存在するため、ILC2 以外の ILC 集団においても同様の細胞死機構が関連するのか、引き続き解析を行う必要がある。

4) IL-33 受容体からの刺激で活性化する NF- $\kappa$ B や p38 MAPK を解析したが、NRF2 の有無および活性化において優位な差は認めなかった。また、IL-2 や IL-7 受容体の下流にある JAK1, Erk1/2, Akt は NRF2 欠損 ILC2 で優位に活性化していた。これらの活性化が、NRF2 欠損 ILC2 の増殖能の高さを示唆していると考えられた。一方、NRF2 活性化剤で処理しても、これらのシグナルは不変であった。

#### 平成 30 年度

##### 【計画 3】

1) WT および NRF2-KO マウスの骨髄から、CLP (Lineage- CD127+ Flt3+ Sca-1+) を分取し、OP9-DL1 細胞上で培養した。骨髄の CLP 細胞数は、WT と NRF2-KO マウスで優位な差は認めなかった。また分化の過程においても、NRF2 有無の影響は認められなかったことから、ILC2 分化への影響はないものとした。

2) 上記実験において優位な差を認めなかったため、マウスを用いた実験系は実施しなかった。

3) マイクロアレイを実施したが、アレルギーに関連する NRF2 標的遺伝子の増減はみられなかった。

##### 【計画 4】

1) アレルギー性炎症を誘導したマウスに NRF2 活性化剤 (CDDO-Im) を投与すると、肺の ILC2 と好酸球数が著明に減少した。この減少は NRF2-KO マウスでは認められず、NRF2 特異的であった。さらに、HE 染色および PAS 染色による病理解析においても、NRF2 活性化剤によって炎症が減弱していた。これら結果から、NRF2 活性化剤はアレルギー治療薬として有効である可能性を示唆した。

2) プロスタグランジン D<sub>2</sub> の代謝産物である 15d-PGJ<sub>2</sub> は、NRF2 を活性化することが知られている。この 15d-PGJ<sub>2</sub> も CDDO-Im と同様に、in vitro で ILC2 を減少させたことから、NRF2 は種々の機序によって活性化するが、どの経路でも最終的には ILC2 を抑制可能であることを示唆した。今後、in vivo でのさらなる検討が必要と考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Nagashima R, Kosai H, Masuo M, Izumiyama K, Noshikawaji T, Morimoto M, Kumaki S, Miyazaki Y, Motohashi H, Yamamoto M, Tanaka N. Nrf2 Suppresses Allergic Lung Inflammation by Attenuating the Type 2 Innate Lymphoid Cell Response. *J Immunol.* 202(5): 1331-39, 2019

〔学会発表〕（計 3 件）

Ryuichi Nagashima, Hitomi Kosai, Keiko Izumiyama, Nobuyuki Tanaka. Nrf2 suppresses allergic lung inflammation by attenuating the type2-innate lymphoid cell response. The 3rd international conference on innate lymphoid cells (ILC2018), 2018.11.29-12.1, Tokyo.

Ryuichi Nagashima, Hozumi Motohashi, Nobuyuki Tanaka, Nrf2 activation suppressed lung allergic inflammation induced by type2-innate lymphoid cells. 第 46 回日本免疫学会. 2017.12.12-14, 仙台

長島 隆一, 小斎 仁美, 田中 伸幸. Nrf2 活性化による 2 型自然リンパ球 (ILC2) 抑制現象の発見とステロイド抵抗性アレルギーに対する新規治療法への展開, 第 71 回 細菌学会 東北支部総会. 2017.8.3-4, 仙台

〔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〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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。