

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2018～2020  
課題番号：18K08139  
研究課題名(和文)新規喘息関連遺伝子HAS2によるSiglecを介した炎症制御メカニズムの解明  
  
研究課題名(英文)An attempt to elucidate novel mechanism of Has2-Siglec mediated asthmatic airway inflammation.  
  
研究代表者  
際本 拓未(Kiwamoto, Takumi)  
  
筑波大学・医学医療系・講師  
  
研究者番号：80724773  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、当研究室が独自に発見した新規喘息感受性遺伝子HAS2が、高分子量ヒアルロン酸やSiglec等を介し気道炎症を制御する可能性を、HAS2欠損マウスを用いて検証した。その結果、Siglecとの関連は確認できなかったが、マウスの急性好酸球性気道炎症病態下においてHas2機能異常が好酸球性気道炎症の重症化、気道過敏性の亢進、Th2および炎症性サイトカインの上昇をもたらすことがわかった。Siglecとの関連は明らかにならなかったが、これらの病態の際にはCd44、Tgfb1といったヒアルロン酸結合蛋白の下流の分子も抑制されており、Has2機能異常が好酸球性気道炎症病態に関与することが示された。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

当研究室ではHAS2遺伝子が気管支喘息の疾患感受性遺伝子であることを独自に見出した。しかし、同遺伝子異常がどのように喘息病態形成に関与するかはこれまで明らかでなかった。本研究ではHas2遺伝子欠損マウスを用いることで、Has2遺伝子の異常が好酸球性気道炎症の増悪や気道過敏性の亢進をもたらすかどうか、およびSiglecの関与の有無を検証した。本研究によりHas2機能異常は急性好酸球性気道炎症の重症化をきたすこと。慢性好酸球性気道炎症や肺気腫形成モデルでも重症化することを発見した。本成果は喘息および他の炎症性肺疾患への新治療アプローチの創出といった臨床応用へと展開する基盤となるものと期待される。

研究成果の概要(英文)： We previously reported that HAS2, which can generate high-molecular-weight hyaluronan (HMW-HA), is a novel candidate gene for determining susceptibility to adult asthma. However, little is known if HAS2 dysfunction affects eosinophilic airway inflammation. To answer this question, Ovalbumin (OVA) induced eosinophilic airway inflammation model was designed for Has2 heterozygous deficient (Has2+/-) mice and their wild-type (WT) littermates. The expression of Has2 mRNA was significantly decreased in OVA-stimulated Has2+/- (Has2+/- -OVA) mice. Has2+/- -OVA mice also showed reduced mRNA expression for Cd44 and Tgfb1. Eosinophil counts, levels of various Th2 cytokines and chemokines in the BALF, and airway responsiveness were significantly increased in Has2+/- -OVA mice compared with OVA-treated WT mice. However, we didn't find the relationship between Has2 and Siglecs. Modulating HAS2 signaling might be a feasible treatment option for patients with intractable bronchial asthma.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：Has2 気管支喘息 高分子量ヒアルロン酸 CD44 TGF- IL-17

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

当研究室は日本人喘息患者によるゲノムワイド関連解析により、ヒアルロン酸合成酵素 HAS2 遺伝子多型が喘息感受性を持ち、risk 遺伝子を導入した細胞では HAS mRNA の発現量が減少していることを見出した(Yatagai Y, et al. *Clin Exp Allergy*. 2014.)。また、代表者らが当時 *Has2* ヘテロ欠損(*Has2*<sup>-/-</sup>)マウスを用いて実施した急性好酸球性気道炎症モデルの検討では、卵白アルブミン(OVA)刺激後に *Has2*<sup>-/-</sup>マウス群において高度の好酸球性気道炎症を認めた。HAS2 は抗炎症作用を有する高分子量ヒアルロン酸(HMW-HA)の合成に関与することが知られており、HMW-HA がヒト好中球・単球等に発現し炎症抑制作用を有する Siglec-9(マウス Siglec-E が該当)のリガンド活性を持つこと、Siglec-9/E が TLR4 を阻害することが明らかとなり関連が当時示唆されていた(Secundino I, et al. *J Mol Med (Berl)*. 2016. Garantziotis S, et al. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009.)。

上記背景を踏まえ本研究を計画した。

### 2. 研究の目的

本研究は当研究室が独自に発見した新規喘息感受性遺伝子 HAS2 が、高分子量ヒアルロン酸等を介し気道炎症を制御するメカニズムを、*Has2* ヘテロ欠損マウスを用いて解明する。また、その病態への HMW-HA, CD44, TLR4, TGF- $\beta$  および Siglec-E の関与の有無を検証し、解明されたメカニズムの肺気腫等の他の炎症性肺疾患への関与の有無の検証も目指した。

### 3. 研究の方法

疾患感受性遺伝子とされる HAS2 遺伝子と喘息病態の関連を検証するため、当研究室では *Has2* 遺伝子(*Has2*)欠損マウスを用いる方法を選択した。*Has2* ホモ欠損マウスは既に他施設で作成されていたが、発生段階で重篤な心臓および血管の形成異常を合併し、胎生 9.5-10.5 日で死亡するため、その後の検証は行われていなかった(Camenisch TD, et al. *J Clin Invest*. 2000.)。代表者らは本マウスがヘテロ欠損状態では生存可能な点に着目し、戻し交配を経て C57BL6 系および Balbc 系の *Has2* ヘテロ欠損マウス(*Has2*<sup>+/-</sup>マウス)を独自に作成した。作成されたマウスは発生・発達に異常はなく繁殖も可能であった。

*Has2*<sup>+/-</sup>マウス作成後、同マウスを使用し、*Has2* ヘテロ欠損状態が急性および慢性好酸球性気道炎症下で *Has2* mRNA 発現、ヒアルロン酸分画、ヒアルロン酸結合蛋白、気道炎症、気道過敏性に及ぼす影響を卵白アルブミン(OVA)の刺激モデルを使用し行った。他の炎症性肺疾患への関与についてはエラストラーゼ投与モデルでの検証を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) *Has2* 遺伝子異常がヒアルロン酸分画・ヒアルロン酸結合蛋白発現に及ぼす影響の検証

*Has2*<sup>+/-</sup>マウスの肺における *Has2* mRNA の発現量は、生理食塩水投与対照群では野生型マウスと比較し有意な差は認められなかったものの、急性および慢性 OVA 刺激後では有意に抑制されていた。また、代表的なヒアルロン酸結合分子である CD44、TLR4、および CD44 の下流で制御される TGF- $\beta$ 1 の遺伝子発現も *Has2*<sup>+/-</sup>マウスにおいて OVA 刺激後に抑制されていた。さらに肺実質より抽出したヒアルロン酸の分画を電気泳動にて比較したところ、生理食塩水投与対照群および OVA による慢性好酸球性気道炎症群では HMW-HA の量が *Has2*<sup>+/-</sup>マウスにおいて低下していた。以上より、*Has2* 遺伝子機能異常が急性好酸球性気道炎症出現時に *Has2* 遺伝子発現量の低下およびヒアルロン酸結合蛋白の発現異常をきたしていることが確認された(Tsunoda Y, Sherpa MT, et al. *Allergy. in press.*)。

#### (2) *Has2* 遺伝子異常が好酸球性気道炎症および気道過敏性に及ぼす影響の検証

次に *Has2* 遺伝子異常が好酸球性気道炎症に及ぼす影響を解析した。上述の OVA 刺激による急性好酸球性気道炎症病態作成後、気管支肺胞洗浄液(BALF)中の総細胞数・細胞分画を比較したところ、*Has2*<sup>+/-</sup>マウスは総細胞数、肺胞マクロファージ数、好中球数、好酸球数が野生型と比較し有意に上昇しており、より高度の好酸球性気道炎症を呈していた。また、メサコリン吸入による気道抵抗の変化を測定したところ、*Has2*<sup>+/-</sup>マウス群において有意に気道過敏性の亢進を認めた。さらに BALF 中のサイトカイン・ケモカイン濃度を測定したところ、*Has2*<sup>+/-</sup>マウスは IL-4, IL-5, IL-13 といった Th2 由来のサイトカインだけではなく、炎症性サイトカイン・ケモカインの有意な上昇を認めた。しかしながら、IL-17、IL-33 は野生型と比較し有意差を認めず、血清 IgE 濃度にも有意差を認めなかった(Tsunoda Y, Sherpa MT, et al. *Allergy. in press.*)。興味深いことに、慢性好酸球性気道炎症では BALF 中のサイトカイン・ケモカインでは有意差はなく、肺組織中の IL-17 は高値であった。

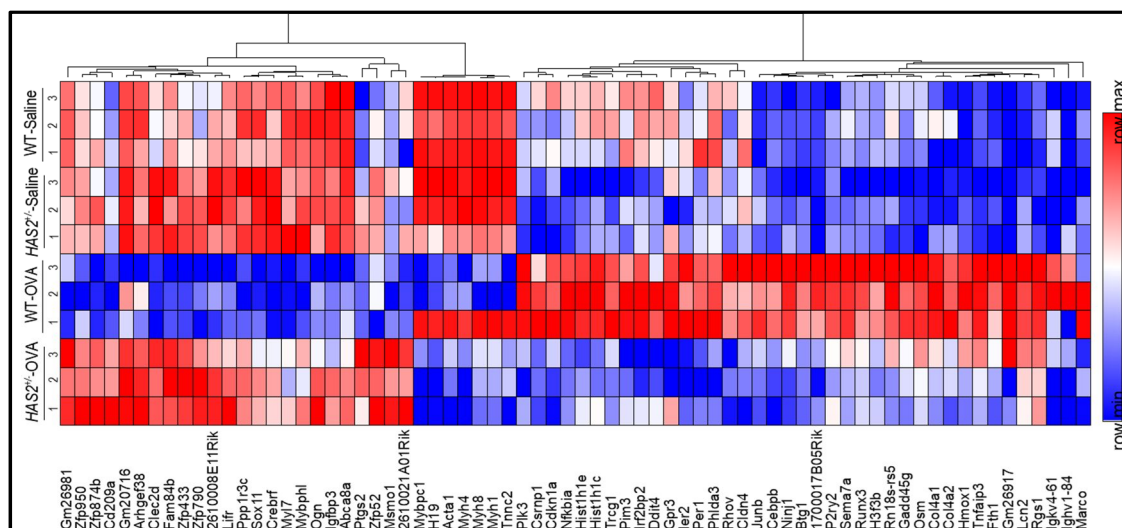
### (3) 次世代シーケンサーを用いた Has2 遺伝子異常に伴う急性好酸球性気道炎症増悪・気道過敏性亢進メカニズム解明の試み

Has2 遺伝子異常が急性好酸球性気道炎症と気道過敏性の悪化をもたらすメカニズムを解明するため、肺実質検体を用いた次世代シーケンサーによる RNA-Seq 解析を実施した。

OVA 刺激後の野生型マウスと Has2<sup>+/-</sup> マウスの発現遺伝子を比較したところ、70 の遺伝子で有意差を認めた(図 1)。これらの遺伝子を発現が亢進している群と抑制されている群に分けて実施した遺伝子オントロジー(gene ontology: GO)解析では、『apoptotic signaling pathway』、『cytokine production』、『negative regulation of smooth muscle cell proliferation』、『muscle contraction』といった経路が、Has2<sup>+/-</sup> マウスにおいて発現低下した遺伝子群より検出され、好酸球気道炎症の増悪および気道過敏性の亢進への影響が示唆された。一方で、Has2<sup>+/-</sup> マウスにおいて発現が増加した遺伝子群からは骨化に関連した経路が検出された。より詳細な経路の探索を行うため、QIAGEN 社の Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ソフトウェアを使用し、野生型マウスと Has2<sup>+/-</sup> マウスの比較を上述の 70 遺伝子を使用して実施したパスウェイ解析においては、『Integrin-linked kinase (ILK) Signaling』、『Tight Junction Signaling』、『Calcium Signaling』、『Actin Cytoskeleton Signaling』といった気道平滑筋に関連した経路が抑制されていた他、気道過敏性に関与するとされる『Protein Kinase A Signaling』も抑制されていた。興味深いことにパスウェイ解析では、『IL-17A 経路(IL-17A Signaling in Fibroblasts)』、『酸化ストレス応答経路(NRF2-mediated Oxidative Stress Response)』、『糖質コルチコイドレセプター経路(Glucocorticoid Receptor Signaling)』といった、気管支喘息の重症化・難治化に関与する経路も同様に有意な変化を認め、Has2 機能異常がこれらの要因になりうることを示唆された(Tsunoda Y, Sherpa MT, *et al. Allergy. in press.*)。

一方で当初予想された HMW-HA を介した Siglec-E と TLR4 の炎症制御機構の関与は、急性好酸球性気道炎症モデルにおいて明らかな関与は認められなかった。

同様の解析は慢性好酸球性気道炎症モデルでも実施され、小胞体ストレス応答との関連が示唆されたため、IL-17 との関連を含め今後解析をすすめる予定である。



(図 1) OVA 刺激後に野生型および Has2<sup>+/-</sup> マウス群間で有意差のあった遺伝子

(角田 義弥, 際本 拓末, *et al.* 第 59 回日本呼吸器学会発表より)

上記、急性好酸球性気道炎症モデルでの解析は各種学会発表を経て、2020 年に *Allergy* 誌に採択された。慢性好酸球性気道炎症モデルの解析についても論文を準備中である。

### (4) Has2 遺伝子異常が好酸球性気道炎症以外の肺疾患に及ぼす影響

当初想定された病態制御メカニズムは、COPD をはじめとした他の炎症性肺疾患の発症にも関与していることが予想された。よって、Siglec-9/-E が発現する好中球・マクロファージが病態に関与する肺気腫形成過程への影響を検証するため、Has2<sup>+/-</sup> マウスへのエラストラーゼ投与モデルでの検証を行った。上述の通り、現段階で明らかな Has2 と Siglec-9/-E との関連は確認できていないが、エラストラーゼモデルにおいても Has2<sup>+/-</sup> マウスにおいてより重篤な気腫形成を認めており、形態計測においても有意差を認めた。本成果についても ATS2020 等において成果報告を行った(Osawa H, *et al. Am J Respir Crit Care Med. 2020, abstr.*)。Has2 機能異常が気腫化悪化をもたらすメカニズムが好酸球性気道炎症モデルと同一であるかどうかについては、今後解析をすすめる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yoshiya Tsunoda, Mingma Thsering Sherpa, Takumi Kiwamoto, Masashi Matsuyama, Hajime Osawa, Hirofumi Sakurai, Shigen Hayashi, Yosuke Matsuno, Yuko Morishima, Yukio Ishii, Nobuyuki Hizawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Has2 deficiency enhances OVA-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/all.14715.	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9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 M. Sherpa, T. Kiwamoto, Y. Tsunoda, K. Yoshida, H. Osawa, M. Nakajima, M. Matsuyama, Y. Matsuno, Y. Morishima, Y. Ishii, N. Hizawa
2. 発表標題 Hyaluronan Synthase 2 (HAS2) Mediates Airway Inflammation and Remodeling in Chronic Ovalbumin Model of Asthma
3. 学会等名 ATS Conference 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Sherpa, T. Kiwamoto, Y. Tsunoda, K. Yoshida, H. Osawa, M. Nakajima, M. Matsuyama, Y. Matsuno, Y. Morishima, Y. Ishii, N. Hizawa
2. 発表標題 Hyaluronan Synthase 2 (HAS2) Mediates Airway Inflammation and Remodeling in Chronic Ovalbumin Model of Asthma
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Kiwamoto, Y. Tsunoda, M. Sherpa, H. Sakurai, S. Lin, M. Matsuyama, Y. Matsuno, Y. Morishima, Y. Ishii, N. Hizawa
2. 発表標題 Hyaluronan synthase 2 (HAS2) dysfunction induce severe eosinophilic airway inflammation via inflammatory cytokines and chemokines.
3. 学会等名 ATS Conference 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Sherpa, T. Kiwamoto, Y. Tsunoda, K. Yoshida, M. Nakajima, M. Matsuyama, Y. Matsuno, Y. Morishima, Y. Ishii, N. Hizawa
2. 発表標題 HAS2 mediates airway inflammation and remodeling in chronic OVA model of asthma.
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 際本 拓未
2. 発表標題 ヒアルロン酸合成酵素異常に伴う気管支喘息発症増悪メカニズムの解明
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角田義弥、際本拓未、松山政史、Sherpa Mingma、櫻井啓文、林士元、松野洋輔、森島祐子、石井幸雄、檜澤伸之
2. 発表標題 次世代シーケンサーを用いたHAS2異常に伴う喘息病態増悪機構解明の試み
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Osawa, T. Kiwamoto, M. Sherpa, Y. Tsunoda, K. Yazaki, K. Yoshida, M. Nakajima, M. Matsuyama, Y. Matsuno, Y. Morishima, Y. Ishii, N. Hizawa
2. 発表標題 Hyaluronan Synthase 2 (HAS2) Mediates Elastase-Induced Airway Inflammation and Emphysema in Mice.
3. 学会等名 ATS Conference 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 M. Sherpa, T. Kiwamoto, Y. Tsunoda, K. Yoshida, H. Osawa, M. Nakajima, M. Matsuyama, Y. Matsuno, Y. Morishima, Y. Ishii, N. Hizawa.
2. 発表標題 Hyaluronan Synthase 2 Attenuates Airway Inflammation and Remodeling in an Ovalbumin Induced chronic model of asthma.
3. 学会等名 ATS Conference 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 M. Sherpa, T. Kiwamoto, Y. Tsunoda, K. Yoshida, H. Osawa, M. Nakajima, M. Matsuyama, Y. Matsuno, Y. Morishima, Y. Ishii, N. Hizawa.
2. 発表標題 Hyaluronan synthase 2 attenuates airway inflammation and remodeling in an ovalbumin induced chronic mouse model of asthma.
3. 学会等名 JSA/WAO Joint Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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