

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08152

研究課題名(和文) ST2陽性Th2細胞に着目したステロイド抵抗性喘息の病態解明と新規治療の展望

研究課題名(英文) Contribution of ST2+CD4+ T cells in the mechanism of steroid-resistant asthma

研究代表者

間藤 尚子 (Mato, Naoko)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80406149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ステロイド抵抗性喘息の機序は解明されていない。申請者は、気道上皮下層に常在する記憶型ST2陽性Th2細胞が、気道上皮細胞より放出されるInterleukin-33 (IL-33)に反応してステロイド抵抗性の好酸球性炎症を惹起することを見出した。ステロイド抵抗性の機序としてはIL-33により活性化したMAPKによる細胞内のグルココルチコイド受容体(GR)の核内移行阻害が想定された。一方で、ステロイド抵抗性と経口ステロイド血中濃度の相関検討のため、実際にヒトでステロイドの血行動態を調査した結果、BMIが血中濃度の低下と相関し、ステロイド抵抗性の病態では効果的な投与量に常に配慮する必要性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ステロイド抵抗性喘息の中心となる細胞や機序は不明であった。申請者は本研究でその機序に迫り、気道上皮下層に常在するST2陽性Th2細胞が、気道上皮細胞より放出されるInterleukin-33 (IL-33)に反応してステロイド抵抗性の好酸球性炎症を惹起することを見出した。IL-33シグナルおよびST2陽性Th2細胞は、難治性病態であるステロイド抵抗性病態の治療標的になると考えられた。また本研究によりBMI、体重増加が経口ステロイドの血中濃度を低下させ効果を減弱する可能性が示された。ステロイド抵抗性病態において、本研究は新たな治療標的と薬物代謝という新しい視点を提示したと考える。

研究成果の概要(英文)：Interleukin (IL-)33 drives the type 2 immune response by activating ST2-expressed immune cells. Here we found that IL-33 induced the increase of numbers of ST2+Th2 cells in the lung and production of IL-5 and IL-13, and drove asthma-like reaction. IL-33-mediated inflammation was not fully developed in T cell-deficient mice, and dexamethasone treatment showed limited effects on ST2+Th2 cells. Our study showed that ST2+ Th2 cells contributed to the pathogenesis of steroid-resistant refractory asthma. In addition, IL-33-induced MAPK activation was considered to inhibit the cellular translocation of glucocorticoid receptor(GR) and GR-associated signal transduction. Finally, we investigated the correlation between steroid-resistance and plasma concentration of oral corticosteroid. We discovered plasma levels were negatively correlated with body weight and BMI. Therefore, true effective dose of corticosteroid should be taken into consideration in the refractory asthma patients.

研究分野：呼吸器

キーワード：IL-33 ST2陽性Th2細胞 ステロイド抵抗性喘息 ステロイド血中濃度

1. 研究開始当初の背景

障害を受けた気道上皮細胞はサイトカインを放出し、気道周囲の炎症を惹起する。インターロイキン-33 (Interleukin-33 (IL-33))は上皮細胞由来サイトカインであり、IL-33 レセプター(ST2)を有する2型自然リンパ球、2型ヘルパーT細胞 (Th2細胞)などを介して好酸球性炎症を惹起する。申請者は、好酸球性肺炎を合併した重症気管支喘息患者でIL-33が高値であることを見出し (Mato et al. *Allergol Int.* 2013)、気管支喘息の重症化におけるIL-33の重要性を示してきた。さらにIL-33に反応するST2陽性Th2細胞を同定した千葉大学免疫発生学講座の平原らと共同研究を行い、

1) IL-33投与による気管支喘息モデルマウスの肺において、ST2陽性Th2細胞は気道上皮下層に常在し、2) T細胞欠損マウスでは好酸球性炎症が顕著に抑制され、Th2細胞の移入により炎症が再燃する事を示し、IL-33誘導性の好酸球性炎症におけるTh2細胞の重要性を明らかにした(Mato et al. *Sci Rep.* 2017)。

一方で、気管支喘息の1割は治療抵抗性を示し難治性と称される。その中でもステロイド抵抗性喘息は、気道炎症を反復し、リモデリングの進行により不可逆的に肺機能が低下する。これまでステロイド抵抗性喘息の病態は不明な点が多く、IL-33に反応するST2陽性Th2細胞においてもステロイド抵抗性の有無は不明であった。またヒトでは好酸球性副鼻腔炎患者の鼻粘膜でIL-5を高産生するST2陽性Th2細胞が同定されているが、ヒト肺におけるST2陽性Th2細胞の局在や機能は解明されていない。

また、臨床的な観点では、ステロイドは広く普及している薬剤でありながら、ステロイド抵抗性の要因として、ステロイド製剤の血中濃度が有効域に達しているか、血中濃度に影響する因子は何か、といった薬理学的な検討は少ない。

2. 研究の目的

これらの背景を踏まえて申請者は、以下を本研究の目的とした。

① モデルマウスを用いた検討

ST2陽性Th2細胞におけるステロイド抵抗性とその機序を解明する。

② ヒトを対象とした検討

(1)肺におけるST2陽性Th2細胞を同定し、病態(炎症、リモデリング)への関与を検討する。

(2)臨床的な検討として、ステロイド製剤の血行動態を調査し、治療効果およびステロイド抵抗性との関連を調査する。

3. 研究の方法

① ST2陽性Th2細胞におけるステロイド抵抗性の検討

BALB/cマウスにrecombinant IL-33 (5 μ g)を経気管投与し、気管支喘息マウスモデルを作成した。さらにステロイド(デキサメサゾン)を治療量投与し、経時的に肺組織からST2陽性Th2細胞を単離しサイトカイン産生を評価した。また肺組織の好酸球性炎症を組織学的に評価した。更にIL-33およびデキサメサゾン添加後にST2陽性Th2細胞を単離し、ステロイド抵抗性の機序について検証した。

②ヒトを対象とした検討

(1)ヒト肺のST2陽性Th2細胞の同定

当学病理学講座および呼吸器外科講座と共同研究とし、当学生命倫理委員会の承認を得て、気管支喘息に加え、間質性肺炎などの線維化を伴う基礎疾患のある患者肺の手術検体を得た。病理学講座にて切除肺の一部を速やかに凍結切片とし、まずはTh2細胞を免疫組織学的に同定し、その局在と病巣における炎症/線維化関連因子の発現を検討する。

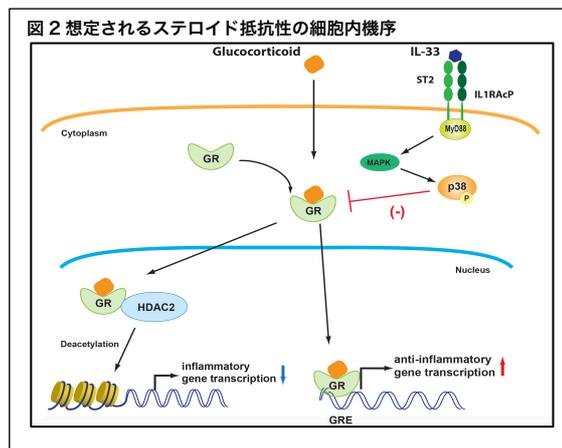
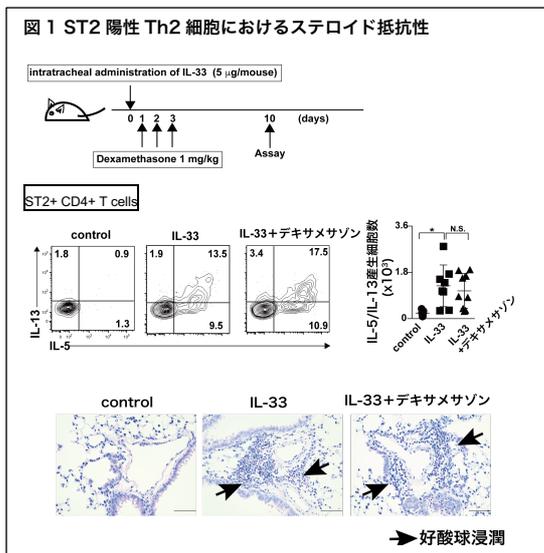
(2)ヒトにおけるステロイド代謝に関与する因子の検討

当学生命倫理委員会の承認の元、プレドニゾロン(PSL)の血中濃度の推移と関与する因子(体重、BMI、投与経路など)との相関を解析した。2017-18年にPSLを投与した当科入院患者45名から血漿を採取し、固相抽出法にて薬剤の抽出・精製を行い、液体クロマトグラフ(島津製作所製 Prominence UFLC)および質量分析計(AB Sciex社製 API4000)によってPSL血中濃度を測定した。

4. 研究成果

① ST2 陽性 Th2 細胞におけるステロイド抵抗性の検討

気道上皮下層に常在する ST2 陽性 Th2 細胞は IL-33 に反応し IL-5/IL-13 を産生するが大量のステロイド存在下でも、IL-33 刺激による IL-5/IL-13 産生は抑制されなかった。また組織学的にも好酸球浸潤が抑制されない事が示された。以上より ST2 陽性 Th2 細胞は IL-33 の刺激下でステロイド抵抗性を有することが示された(図 1) (Mato et al. *Sci Rep.* 2017)。さらに、Th2 細胞におけるステロイド抵抗性の機序としては、IL-33 のシグナル経路の検討の結果、IL-33 により活性化される MAPK が細胞のグルココルチコイド受容体(GR)の核内移行を阻害することで GR を介した情報伝達を阻害し、ステロイド抵抗性を示す可能性が最も考えられた(図 2) (Hirahara, Mato et al. *J Leukoc Biol.* 2018)



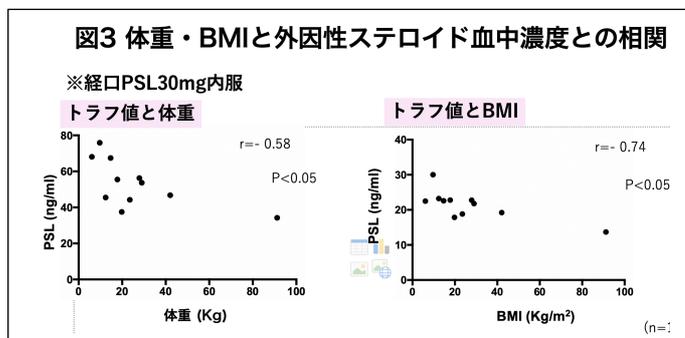
②ヒトを対象とした検討

②-1 ヒト肺の ST2 陽性 Th2 細胞の同定

主として肺癌手術で肺切除を行なった間質性肺炎、気管支喘息合併患者の肺検体を用い解析を開始した。しかし本研究費の研究期間では解析が終了せず、期間終了後も継続する方針である。

②-2 ステロイドの血行動態の基礎的検討

ステロイドは主として内服プレドニゾロン(PSL)を対象とした。血中濃度は内服 2 時間後をピークとして漸減した。また、PSL の血中濃度は体重/BMI と有意な負の相関を示した(図 3)。また同量の静注 PSL と内服 PSL との比較では、内服 PSL でトラフ値が有意に高値であった。合成ステロイド製剤の血中濃度は製剤の種類、体重・BMI に影響を受け、濃度測定により投与量を根拠を持って調整しようと考えられた(以上、2019 年間質性肺炎細胞分子病態研究会にて発表、論文作成中)



今後の展望は、難治性喘息の機序解明にむけて、今回結果を得られなかったヒトの肺を用いた Th2 細胞の局在解析とリモデリングへの関与の検討を継続する。また臨床的な観点から、ステロイド抵抗性の一機序として、血行動態に影響する因子、個体差についても解析を進めていく。

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 1件）

1. 著者名 Ichikawa T, Hirahara K, Kokubo K, Kiuchi M, Aoki A, Morimoto Y, Kumagai J, Onodera A, Mato N, Tumes DJ, Goto Y, Hagiwara K, Inagaki Y, Sparwasser T, Tobe K, Nakayama T.	4. 巻 20(11)
2. 論文標題 CD103 hi T reg cells constrain lung fibrosis induced by CD103 lo tissue-resident pathogenic CD4 T cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 1469-1480
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41590-019-0494-y.	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yasumaro Fujiki, Naoko Mato
2. 発表標題 Clinical significance of adiponectin in the patients with interstitial pneumonia
3. 学会等名 Congress of American Thoracic Society 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 間藤尚子
2. 発表標題 合成ステロイド製剤の生体内動態と副作用に関する検討
3. 学会等名 日本呼吸器学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 間藤尚子
2. 発表標題 ステロイド抵抗性気管支喘息における肺組織常在性リンパ球の関与
3. 学会等名 日本呼吸器学会学術講演会
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
研究 分 担 者	平原 潔 (Hirahara Kiyoshi) (00707193)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授 (12501)	

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
---------	---------