

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07632

研究課題名(和文) 2型自然リンパ球を起点とした血管病態形成機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of pulmonary vascular pathogenesis mediated by group 2 innate lymphoid cell

研究代表者

生谷 尚士 (Ikutani, Masashi)

広島大学・統合生命科学研究科(生)・助教

研究者番号：40513718

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、難病である肺動脈性肺高血圧症の発症機序を解明し、予防・治療法開発の基盤構築を目的に開始した。代表者らが開発した疾患動物モデルを利用し、発症の引き金となる肺動脈肥厚を引き起こす2型自然リンパ球と呼ばれる細胞の動態を詳細に観察した。その結果2型自然リンパ球が肺動脈周囲に集積するために必要な分子の特定に成功した。この分子の機能を阻害すると血管肥厚は抑制されておりその重要性も確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国に今後到来する超高齢化社会では膠原病などの疾患はさらに拡大し、膠原病に合併する肺動脈性肺高血圧症も増加の一途を辿ると危惧されている。これまでも多くの研究が実施されてきたが、肺動脈性肺高血圧症の発症機序は依然として不明である。本研究は新たなアプローチから発症機序の解明を試みたものであり、これまでに想定されていなかった細胞や分子の特定に至った。同定された分子は制御可能であり、新規治療法の開発に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary arterial hypertension is an intractable disease and characterized by severe obstruction of small pulmonary arteries, leading to progressive right ventricular failure. The etiologic mechanism of pathogenesis of pulmonary arteries remains largely elusive. This study aims at elucidating the mechanism by means of a mouse model in which group 2 innate lymphoid cells (ILC2s) initiate severe arterial hypertrophy. In this project, a molecule that was key to regulate ILC2s was newly identified. An inhibitor to the molecule was effective at reducing arterial hypertrophy, contributing to development of therapeutic drugs.

研究分野：免疫学

キーワード：2型自然リンパ球 好酸球 IL-33 IL-5 肺動脈肥厚

1. 研究開始当初の背景

我が国の平均寿命は過去最高を更新しており、今後高齢化社会が確実に到来する。高齢化に伴い慢性炎症疾患の罹患率の上昇が危惧されており、疾患の早期発見と治療、そして予防が健康寿命の延伸と持続性のある医療の提供において最重要課題である。肺動脈性肺高血圧症 (Pulmonary Arterial Hypertension : PAH) は、重度の閉塞性肺動脈肥厚により肺動脈圧が上昇し右心室に過度の負担を強いる極めて予後不良な疾患である。現在も活発な研究が行われているが、発症機序は依然大部分が不明である。発症要因は多岐にわたるが、慢性炎症が背景にあると考えられており、本国ではPAH疾患の約半数が膠原病に合併する。PAH患者数は現在3,934名(令和元年度特定医療費受給者証所持者数)ではあるが、確定診断に至っていないケースを含めると1~2万人にまで高まると推定されている。治療は血管拡張薬の吸入や酸素療法などの対症療法が中心で最終的には肺移植が検討される。肺動脈肥厚の初期段階では自覚症状を伴わず、長期間が経過した後、軽作業時の呼吸困難や動悸などの自覚症状がみとめられる。したがって診断時には血管病態が末期の場合が多い。病因の解明には数十年の歳月を経て形成される肺動脈肥厚のプロセスの理解が不可欠であるが、希少疾患であるために初期病態を現す臨床検体の入手は困難である。そのためPAHの研究には動物モデルが汎用される。これまでに複数の動物モデルが報告され、様々な知見が得られてはいるが、ヒトの病態を忠実に再現するものはなく、発症機序の解明に向けた動物モデルが切望されている。

Interleukin (IL) -5は、IL-4 やIL-13 とともにT helper type 2 (Th2) サイトカインと総称され、気管支喘息などのアレルギー疾患や寄生虫感染防御に深く関与する。これらの免疫応答には好酸球の働きが重要であるが、IL-5は好酸球を制御する中心的な液性因子である。主要なIL-5生産細胞は長らくT細胞であるとされてきたが、2010年に新規に同定された2型自然リンパ球 (Group 2 Innate Lymphoid Cell : ILC2) が多量のTh2サイトカインを分泌する細胞として注目を浴びた。ILC2は気道や腸管の粘膜組織を中心に生体に幅広く局在している。粘膜の上皮細胞が外来性の異物により傷害されるとIL-33などのサイトカインが分泌され、即時にILC2が活性化され、IL-5やIL-13が多量に産生される。引き続き好酸球などの炎症細胞が局所に浸潤しアレルギー性の炎症が惹起される。IL-33は組織傷害が起こると周囲に危険を知らせるアラームの一つであり、近年アレルギー疾患のみならず膠原病などにおいても抹消血液中で増加するなど、その関与が注目されている。

研究代表者はIL-33を比較的長期間マウスに投与することによって、ヒトPAHで観察される血管病態に類似する血管肥厚を誘導されることを発見し、新規の動物モデルとして報告した。IL-5や好酸球を欠損するマウスでは、血管肥厚は顕著に抑制されており、これらの関与を確認した。さらに肥厚血管の周囲を組織学的に観察したところ、ILC2と好酸球の集積がみられた。しかしながら、ヒトPAHでは肥厚血管の周辺にはILC2や好酸球は存在しない。ヒトの場合は血管肥厚には長期間を要する。そこでマウスへのIL-33の投与期間を延長すると、肥厚血管の周辺にはILC2や好酸球は観察されなかった。これはこれらの細胞の関与が血管病態形成過程の比較的早期に限定されているためだと考えられる。したがって、ヒトPAHの肺組織検体ではILC2や好酸球はすでに離脱しているためにその存在がみとめられなかった、と推察する。近年、PAH疾患において末梢血液中にIL-33 シグナル関連分子の関与が報告された。研究代表者は膠原病などでの慢性炎症時に上昇するIL-33 が、長期間肺組織に影響し続け、ILC2 と好酸球を起点とした重度の血管肥厚を誘導すると考えている。

PAHの発症機序の解明と治療法の開発には従来にないアプローチが求められており、本研究はそれを実践するものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、PAHに至る肺動脈肥厚のプロセスを理解し、治療・予防法開発の基盤を構築することである。ILC2が肺動脈の周囲に呼び集められる機序の解明が、PAH発症の原因を突き止めることにつながり、新規の治療標的の同定や有効な予防法の開発に貢献できると考える。以下の2点の課題に取り組んだ。

(1) ILC2の血管周囲への移行過程の解明

(2) 肺動脈肥厚に係る候補遺伝子の機能解析

3. 研究の方法

本研究では代表者が報告した動物モデルを活用し、上述の(1)、(2)の課題に取り組んだ。肺動脈肥厚はリコンビナント IL-33 を 1 週間に 1 度、計 3 回投与することで誘導される。投与後 21 日目に肺の組織切片を作成し、HE 染色と EVG 染色で炎症反応と血管肥厚を検討した。また、同実験スケジュールで、肺組織の細胞を調整しフローサイトメトリー法で ILC2 と好酸球の数的変移を観察した。

(1)の課題については、免疫細胞の移動や局在に関わるインテグリン分子に着目した。インテグリン分子は α 鎖と β 鎖がそれぞれ複数存在し、それらが会合して機能する。これまでに代表者は、 $\beta 1$ 鎖が ILC2 の動態に係ることを証明しており、今回まずそのパートナー分子の同定を行った。IL-33 もしくは溶媒コントロールをマウスに投与し、想定される α 鎖の発現をフローサイトメトリー法で検出した。 α 鎖を確定した後、 α 鎖欠損マウスを導入し IL-33 の投与を行い、肺動脈肥厚の度合いと ILC2 と好酸球について試験した。

(2)の課題については、これまでの研究において選定した候補遺伝子についての研究を行った。候補遺伝子の選定は、野生型マウスに IL-33 もしくは溶媒コントロールを長期間投与し、肺組織細胞を調整後、マイクロアレイ法によって候補遺伝子を抽出した。既知の機能などの情報を基にさらに選別し、最終的に本研究の対象遺伝子を決定した。本研究では現在までに作成した候補遺伝子の欠損マウスを用いた試験を実施した。同様に IL-33 を投与し、肺動脈肥厚と ILC2、好酸球について検討した。さらにこれまでに不明であった発現細胞の同定にも取り組んだ。肺組織から細胞を調整し、代表的な免疫細胞の系統と上皮細胞をフローサイトメトリー法で分取し RT-PCR 法によって遺伝子発現を検出した。

4. 研究成果

(1)と(2)の課題についてそれぞれが順調に進捗した。

(1)の課題においては、ILC2 の制御に必要な α 鎖の同定に成功した。この α 鎖は通常 ILC2 の細胞表面上には発現していないが、長期間の IL-33 投与によって顕著な発現上昇を示した。続いて α 鎖欠損マウスを入手し IL-33 により肺動脈肥厚を誘導した。その結果、 α 鎖を欠損するマウスでは、野生型に比べ有意な血管肥厚の抑制がみられた。続いてフローサイトメトリー法で、ILC2 と好酸球を比較したところ、どちらの細胞も α 鎖欠損マウスで顕著に減少していた(図1)。さらに α 鎖の機能阻害抗体を使用し検証すると、 α 鎖欠損マウスでみられた抑制ほどではないが、効果的に肺動脈肥厚が減弱することも判明した。蛍光免疫組織染色での試験も実施したが、肥厚血管周囲の ILC2 と好酸球は α 鎖欠損マウスで減少しており、整合的な結果が得られた。これらの結果から、長期的な IL-33 の刺激によって ILC2 上のインテグリンの発現パターンに変化が生じ、血管周囲への移動が始まると推測する。

(2)の課題では、候補遺伝子の欠損マウスに IL-33 を投与し検討した。野生型に比べて欠損マウスの肥厚血管の数と度合いは亢進していた。また、ILC2 と好酸球の数も欠損マウスで増加していた。候補遺伝子の発現は上皮細胞に高くみとめられた。免疫組織染色でも上皮細胞での発現を確認した。これらの結果から、候補遺伝子は IL-33 の刺激によって上皮細胞で発現し、何らかの機構で ILC2 と好酸球の活性化を抑制していると思われる。今後は上皮細胞による発現が IL-33 の直接的な作用によるものか否かを検討し、ILC2 の抑制機構の解明に努める。

本研究では、ILC2 が肺動脈周囲に移行するために必要な分子の同定に成功した。また特異的抗体による血管肥厚の抑制も確認した。そのパートナー分子である $\beta 1$ 鎖の機能を阻害することでも血管肥厚は減弱するが、 $\beta 1$ 鎖は免疫細胞に幅広く発現しており、その影響は大きい。一方、本研究で試験した α 鎖を発現する細胞は限られており、創薬の観点からは副作用が少ないなどのメリットがある。治療法の開発に向けた基盤に貢献するものであると考える。今後はこの α 鎖の発現調節機構を調査し、その発現を制御することで肺動脈の肥厚を抑止する手法を検討したい。本研究で得られた知見をベースとし ILC2 による肺動脈肥厚のメカニズムの解明を進め、PAH 疾患の治療法開発の基盤を今後も構築していく。

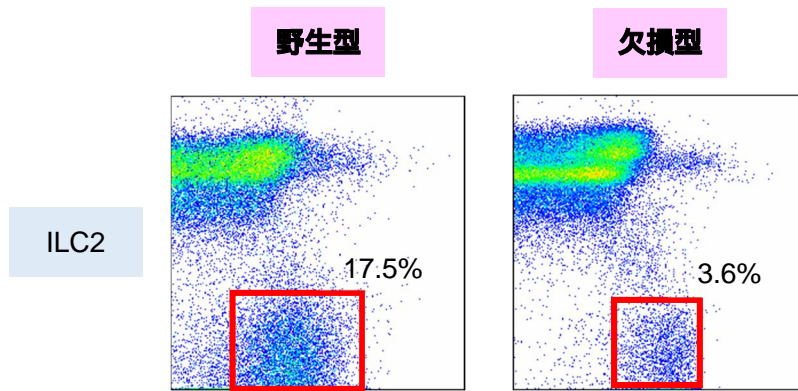


図1：インテグリン 鎖欠損による ILC2 の減少

IL-33 を投与した野生型（左）と 鎖欠損（右）マウスの肺組織の ILC2 をフローサイトメトリー法により検出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Arae Ken, Ikutani Masashi, Horiguchi Kotaro, Yamaguchi Sachiko, Okada Youji, Sugiyama Hiroki, Orimo Keisuke, Morita Hideaki, Suto Hajime, Okumura Ko, Taguchi Haruhiko, Matsumoto Kenji, Saito Hirohisa, Sudo Katsuko, Nakae Susumu	4. 巻 11
2. 論文標題 Interleukin-33 and thymic stromal lymphopoietin, but not interleukin-25, are crucial for development of airway eosinophilia induced by chitin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5913
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-85277-4	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 -

1. 著者名 Unno Hirotooshi, Arae Ken, Matsuda Akira, Ikutani Masashi, Tamari Masato, Motomura Kenichiro, Toyama Sumika, Suto Hajime, Okumura Ko, Matsuda Akio, Morita Hideaki, Sudo Katsuko, Saito Hirohisa, Matsumoto Kenji, Nakae Susumu	4. 巻 533
2. 論文標題 Critical role of IL-33, but not IL-25 or TSLP, in silica crystal-mediated exacerbation of allergic airway eosinophilia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 493 ~ 500
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.09.046	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 Orimo Keisuke, et. al	4. 巻 77
2. 論文標題 Direct platelet adhesion potentiates group 2 innate lymphoid cell functions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 843 ~ 855
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/all.15057	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0件

〔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
---------	---------