

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08607

研究課題名（和文）喘息におけるneurturinの臨床的役割

研究課題名（英文）The clinical role of neurturin in bronchial asthma.

研究代表者

佐藤 俊（Sato, Suguru）

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：90464510

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：神経栄養因子は近年全身組織での発現や神経保護作用以外の役割が解明されている。神経栄養因子の一つであるNeurturin(NRTN)についてはマウスの研究では喘息などのアレルギー性気道炎症への関与が報告されていた。本研究では喘息患者から採取した誘発喀痰を用いて、喀痰中のNRTN濃度を測定したところアトピー型喘息で高濃度であったり、喀痰中の好酸球や呼気NO濃度、分子的な検討では喀痰中IL-5やIL-13との有意な正の相関を認めるなどヒトにおいても2型炎症との関連が示唆される結果であり、さらに喀痰中のMMP-9と負の相関を認め気道リモデリングとの関連も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経栄養因子は当初中枢神経組織の成長や維持に関連する物質と考えられていたが、近年全身組織における同物質の発現やその役割が解明されている。本研究では喘息患者から採取した誘発喀痰を用いて、神経栄養因子の一つであるNeurturin(NRTN)の喀痰中濃度を測定しアトピー型で高濃度で、喀痰好酸球や呼気NO濃度、分子的な検討では喀痰中IL-5やIL-13との有意な正の相関を認めるなど2型炎症との関連が示唆され、さらに喀痰中のMMP-9と負の相関を認め気道リモデリングなどとの関連も示唆された。今後NRTNの気道リモデリング抑制効果などが予想され、新たな喘息治療のターゲットとなりうる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Neurturin (NRTN) is a neurotrophic factor that was originally identified in the development and maintenance of neural cells. The purposes of the present study were to confirm the presence of NRTN in the airways and to investigate the clinical and pathogenetic roles of NRTN in asthma. All asthmatic subjects had detectable sputum NRTN levels, with a mean (SD) level of 2.04 (1.29) ng/mL. The sputum NRTN levels had significant positive correlations with sputum eosinophil and exhaled nitric oxide levels, and were significantly higher in the atopic subjects than in the non-atopic subjects. In sputum inflammatory analyses, sputum NRTN level was positively correlated with IL-5 and IL-13 levels, and negatively correlated with matrix metalloproteinase (MMP)-9 level. It is plausible that sputum NRTN could serve as a new marker for Type 2 airway inflammation, implicating its role in the process of airway remodeling in asthma.

研究分野：喘息

キーワード：Neurturin 喘息 気道アレルギー 神経栄養因子 2型炎症

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) Neurturin (NRTN) はグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) ファミリーのリガンド (GFL) の 1 種である。GDNF はトランスフォーミング成長因子 (TGF)- β に構造的に関連するタンパク質で、リガンド結合成分として作用するグリコシル-ホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型コレセプター (GFR α 1-4) を介してシグナルを媒介する^(1,2)。GDNF ファミリー (GDNF、NRTN、Artemin、Persephin) などの神経栄養因子はさまざまな神経系の成長と生存に関与することで知られている⁽³⁾。NRTN は神経細胞の機能を制御する作用があり、パーキンソン病などの神経変性疾患の治療薬として臨床試験が行われている⁽⁴⁾。また、GDNF、NRTN、およびそれらの主要な受容体 (GFR α 1 および GFR α 2) の mRNA は、胚発生中、特に上皮間葉系相互作用において発現することが報告されている。GDNF と NRTN は上皮構造の伸長に重要な役割を果たしている⁽⁵⁾。

(2) 近年神経系と免疫系が双方向の相互作用を示し、組織の恒常性と炎症に重要な役割を果たす可能性が示唆されている (神経免疫クロストーク)⁽⁶⁾。GFL は末梢組織の神経系外の炎症中に発現し、神経成長因子としての役割に加えて炎症にも関与していることが示唆されている。GDNF と NRTN はどちらも気道平滑筋細胞で検出されるが、GFR α 2、RET、および神経細胞接着分子は主に呼吸器上皮細胞で検出されている⁽⁷⁾。NRTN は LPS 刺激されたヒト末梢血単核細胞からの IL-6 および TNF α の分泌を阻害することにより抗炎症作用を認めている⁽⁸⁾。アレルギー性気道状態の急性期と慢性期の両方における抗炎症効果は、NRTN ノックアウト (NRTN^{-/-}) マウスモデルで報告されている^(9,10)。しかし、喘息患者における NRTN の役割に関してはこれまで報告されていない。

2. 研究の目的

(1) 成人喘息患者の喀痰 NRTN 濃度が測定可能か否か、また可能であれば同時期に採取された血清中濃度との関連を検討する。

(2) 喀痰 NRTN 濃度と成人喘息患者の臨床的な背景、喘息重症度と喀痰中の炎症細胞や分子病態との関係を検討する。

3. 研究の方法

(1) 本研究は福島県立医科大学附属病院呼吸器内科外来に定期通院中の成人喘息患者を対象とした横断研究である。対象患者は米国胸部疾患学会の基準に従って診断され、喘息のコントロール状態と重症度は日本アレルギー学会のガイドラインに従って評価され、重症度に基づいて軽症 (軽症間欠型および軽症持続型)、中等症 (中等症持続型)、または重症 (重症持続型) の 3 つのグループに分類し、診療録から過去 1 年間の喘息増悪歴について調査した。

(2) 少なくとも過去 4 週間に喘息の増悪がなかった状態下で、喘息のコントロール状態や炎症病態の評価のため、同日に呼気一酸化窒素濃度 (FeNO) 測定、肺機能検査、および喘息コントロール質問票 (ACT)、誘発喀痰の採取を実施。さらに、血清 NRTN の測定に同意した被験者から血清検体を採取した。

(3) 誘発喀痰検体から上清を採取し炎症性サイトカインや細胞外マトリックス測定を行った。採取した喀痰中の炎症細胞分画を計測し、好酸球、好中球の割合に基づき 4 つの炎症グループに分類した⁽¹¹⁾。4 グループはそれぞれ、好酸球性喘息 (好酸球 \geq 2%、好中球 $<$ 50%)、混合顆粒球性喘息 (好酸球 \geq 2%、好中球 \geq 50%)、好中球性喘息 (好酸球 $<$ 2%、好中球 \geq 50%)、および乏顆粒球性喘息 (好酸球 $<$ 2%、好中球 $<$ 50%) と定義した。

(4) 喀痰および血清 NRTN は ELISA 法で測定した。ELISA は喀痰 NRTN 濃度測定のため、ELISA キットを使用して実施された (LifeSpan BioSciences 社製、測定範囲: 0.313-20 ng/mL、感度 0.114 ng/mL)。Liu らの報告⁽¹²⁾から、血清 NRTN 濃度が喀痰中濃度を測定した ELISA キットの検出の測定限界未満である可能性が示唆されたため、他の ELISA キット (RayBiotech 社製、測定範囲: 0.036-10 ng/mL、感度 0.036 ng/mL) を用いて血清濃度を測定した。さらに炎症病態の分子的な検討のため、ELISA キットを用いて喀痰上清液中の IL-4、IL-5、IL-13 を 2 型炎症の指標として、IL-6 を炎症性サイトカインの指標として、インターフェロン (IFN)- γ を 1 型炎症の指標として測定した。さらに、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-2 および MMP-9 も測定した。(IL-4、IL-5 および IL-13: Invitrogen 社製; IL-6 および MMP-9: R&D Systems 社製; MMP-2: Proteintech 社製; IFN- γ : Immuno-Biological Laboratories 社製)。

(5) 測定した喀痰 NRTN 濃度について以下の検討を行った。

① 喀痰 NRTN 濃度と血清 NRTN 濃度の関連。

② 喀痰 NRTN 濃度と喘息の臨床的指標 (アトピー素因の有無、喘息重症度、増悪) との関連、

喘息コントロール指標 (FeNO、肺機能、Asthma Control Test (ACT) 点数) または喀痰炎症細胞分画との関連。

③ 喀痰 NRTN 濃度と誘発喀痰上清液中の炎症性サイトカイン濃度と細胞外マトリックス濃度との関連。

4. 研究成果

(1) 成人喘息患者 65 人が研究に参加したが臨床データ不足のため 1 人が研究から除外され、64 人 (男性 32 人/女性 32 人、平均(±標準偏差)年齢 64(±12)歳)について検討された。喘息重症度は軽症 13 人、中等症 26 人、重症 25 人。アトピー型喘息 47 人(74%)、アレルギー性鼻炎合併 35 人(55%)、慢性副鼻腔炎合併 19 人(30%)。喘息コントロール指標は、対標準 1 秒量 81.5(±22.2) %、FeNO 78(±62) ppb、ACT 点数 18.9(±5.0) 点。過去 1 年間の喘息増悪による全身性ステロイドの使用歴あり 24 人(38%)、救急外来や外来の臨時受診歴あり 17 人(27%)であった。

(2) 喀痰 NRTN 濃度は全症例で測定可能範囲内であり、平均 2.06(±1.31) ng/mL であった。一方、血清 NRTN 濃度は 15 人で測定し、4 人の濃度は測定感度を下回っていた。11 人の NRTN 濃度は平均 0.12(±0.10) ng/mL で、血清 NRTN 濃度は喀痰中のおよそ 10 分の 1 の濃度で検出されたが、喀痰 NRTN と血清 NRTN 濃度の間に有意な関連を認めなかった ($r=0.136$, $p=0.628$) (図 1)。

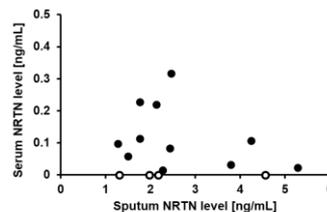


図 1

(3) 喀痰 NRTN 濃度と喘息患者の臨床的特徴との関連を検討したところ、喀痰 NRTN 濃度はアトピー型喘息で非アトピー型喘息よりも有意に高値であった (平均±標準偏差 ; 2.19±1.34 ng/mL vs 1.53±1.0 ng/mL; $p=0.046$)

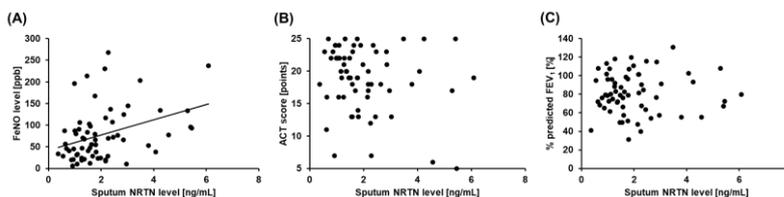


図 2

が、喘息重症度や固定性気流閉塞 (1 秒率が 70%未満) の有無、過去 1 年間の喘息増悪の有無で有意な差を認めなかった。次に喀痰 NRTN 濃度と喘息コントロール指標と関連を検討したところ、FeNO の間には有意な正の相関を認め ($r=0.364$, $p=0.003$)、喀痰 NRTN 濃度と喘息症状 (ACT スコア) または肺機能 (%予測 FEV₁) との間では有意な相関を認めなかった (図 2)。現在のガイドラインでは 2 型炎症を伴う喘息の分類において、FeNO 20 ppb というカットオフ値を用いている⁽²³⁾。今回の検討では FeNO 20 ppb 以上の喘息患者と FeNO 20ppb 未満の喘息患者の間で、喀痰 NRTN 濃度を比較したが両群間で有意差を認めなかった。好酸球性気道炎症の指標である喀痰好酸球増加 (好酸球分画≥2%) の予測因子として、喀痰 NRTN 濃度と FeNO を用いて ROC 曲線を作成したところ喀痰 NRTN 濃度と FeNO の AUC はそれぞれ 0.578 と 0.945 であった (図 3)。

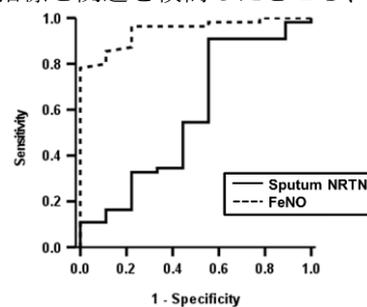


図 3

(4) 喀痰 NRTN 濃度と喀痰炎症細胞分画の関係を検討したところ、喀痰 NRTN 濃度と喀痰好酸球分画は有意な正の相関 ($r=0.348$, $p=0.005$) を認め、喀痰 NRTN 濃度と喀痰好中球分画とは有意な負の相関を認めた ($r=-0.458$, $p<0.001$)。喀痰 NRTN 濃度は、喀痰マクロファージ分画 ($r = 0.022$, $p = 0.864$) および喀痰リンパ球分画 ($r = 0.114$, $p = 0.371$) とは明らかな関連を認めなかった (図 4)。炎症細胞分画による気道炎症別の分類では、好酸球性 27 例、混合顆粒球性 28 例、好中球性 7 例、乏顆粒球性 2 例であった。喀痰 NRTN 濃度は好酸球性喘息群は混合顆粒球性喘息群よりも有意に高い濃度であった (平均±標準偏差 ; 2.56±1.57 ng/mL vs 1.58±0.78 ng/mL; $p=0.022$) (図 5)。

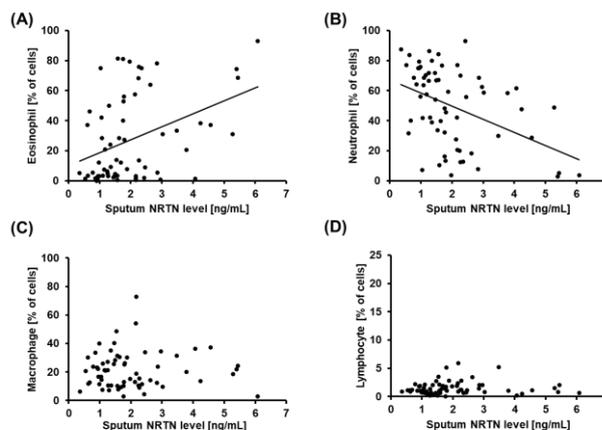


図 4

(5) 喀痰 NRTN 濃度と気道炎症病態との関連を検査するため、喀痰上清を用いて分子的探索を行った。採取できた喀痰上清量に制限があり、全検体についての全ての炎症性分子を測定することは困難であった (IL-4 と IL-5:44 例、IL-13:51 例、IL-6:36 例、IFN- γ :38 例、MMP-2:33 例、MMP-9:37 例を測定)。2 型炎症性サイトカインでの検討では、喀痰 NRTN 濃度は IL-4 とは明らかな関連を認めなかった ($r=0.107$, $p=0.488$) (図 6A) が、IL-5 ($r=0.315$, $p=0.037$) および

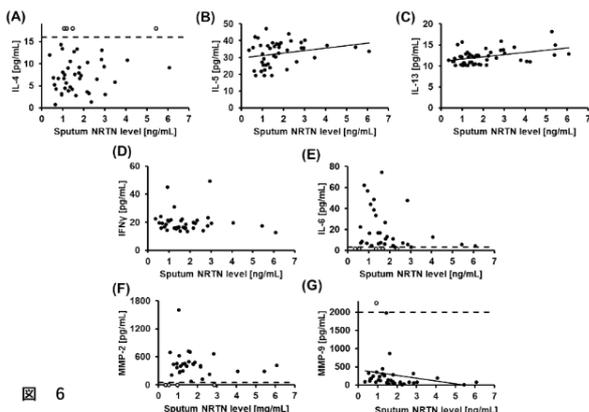


図 6

(6) これまではヒトの末梢組織で NRTN の発現が報告されているが^(8,13)、定量的評価に関する報告は少ない。NRTN は健康な受胎可能女性群および閉経女性群と比較して、早期卵巣機能不全患者の血清中で低下していたとの報告されている⁽¹²⁾。本研究では測定した全成人喘息患者において、喀痰中の NRTN が ELISA 法によって検出および定量化することが可能であった。さらに、喀痰中の濃度は血清中の約 10 倍であった。本研究では肺組織の免疫組織学的解析は行わなかったが、これまでの報告から誘発喀痰で測定された NRTN は気道上皮細胞に由来するものと考えられる^(14,15)。今回の結果は気道に NRTN が存在し、さらに血清よりも高い濃度で存在する可能性が示唆された。

(7) NRTN^{-/-}マウスの喘息モデルでは正常のマウスと比較して、肺組織および肺排出リンパ節細胞における好酸球および 2 型免疫応答の数の増加と関連していた^(9,10)。さらに慢性炎症期において、NRTN^{-/-}マウスは気道組織へのコラーゲン沈着、好中球、MMP-9、TNF- α 、IL-6 の高発現などの気道リモデリング関連マーカーの増加を認めた。さらに、NRTN^{-/-}マウスに抗原曝露前に NRTN を投与すると気道リモデリングが抑制された。NRTN はアレルゲンからの刺激に対する応答として気道上皮細胞によって産生され、樹状細胞などの上皮細胞や免疫細胞を調節する可能性、慢性炎症期では NRTN は TNF- α 発現を制御し、気道リモデリングを抑制する可能性が示唆される。本研究では、喀痰 NRTN 濃度は FeNO および喀痰好酸球と有意に関連しており、この関連は 2 型サイトカイン (IL-5 および IL-13) での検討においても裏付けられた。さらに、アトピー型喘息患者の喀痰 NRTN 濃度は、非アトピー型喘息患者よりも有意に高値であった。今回の検討群では喀痰 NRTN と同様に、喀痰好酸球および FeNO についても、アトピー性喘息被験者で有意に高く、一方で末梢血好酸球には両群間で有意差は認められなかった。アトピー状態による喀痰 NRTN 濃度の違いは喘息における 2 型気道炎症の影響による可能性が示唆された。本研究の結果は NRTN^{-/-}マウスを用いた研究結果⁽¹⁰⁾とは逆説的であり、喘息気道における強い 2 型免疫応答に対するネガティブフィードバックとして気道中で NRTN が上昇している可能性を示している。しかしながら、後ろ向きに検討した喘息増悪や気流閉塞の有無での検討では、喀痰 NRTN 濃度に明確な違いは認めず、臨床的検討では気道において NRTN が強い 2 型炎症を緩和し、疾患の病勢を抑制するかどうかは明らかではなかった。さらに、喀痰 NRTN が好酸球性気道炎症を反映するマーカーとなりうるかを ROC 曲線で解析したが FeNO のような好酸球性気道炎症の敏感マーカーであるとは結論付けることはできなかった。NRTN の 2 型炎症抑制効果を臨床的に検討するためには、喀痰中の NRTN 濃度の経時的变化の検討などさらなる研究が必要と考えられた。

(8) 喀痰 NRTN 濃度は、好酸球群よりも混合顆粒球性喘息群で有意に低値であった。喀痰好酸球分画 2%以上かつ好中球分画 50%以上の混合顆粒球性喘息患者は肺機能経年低下が大きかったと報告されている^(11,16)。本研究結果からは低 NRTN 濃度も混合顆粒球性喘息における気道リモデリングのリスクである可能性があることを示唆している。さらに喀痰 NRTN 濃度は喀痰上清の MMP-9 濃度と負の相関を認めた。MMP-9 は喘息患者の血液、気管支肺胞洗浄液、喀痰、および経気管支生検検体に見られる主要な MMP であり、組織での MMP-9 活性の増加は、気道壁におけるコラー

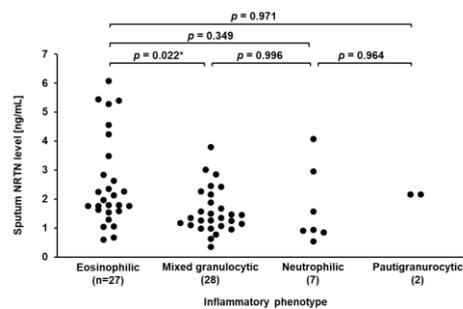


図 5

IL-13 ($r=0.374$, $p=0.007$) と有意な正の相関を示した (図 6B、6C)。また喀痰 NRTN 濃度と IFN- γ および IL-6 との間に有意な関連を認めなかった (それぞれ $r=-0.132$, $p=0.431$ および $r=-0.207$, $p=0.226$) (図 6D、6E)。喀痰上清中の細胞外マトリックスの解析では、喀痰 NRTN 濃度は MMP-9 と有意な負の相関が認められた ($r=-0.478$, $p=0.009$)、MMP-2 との間に有意な関連を認めなかった ($r=0.019$, $p=0.918$) (図 6F、6G)。

ゲン沈着の増加に関連して⁽¹⁷⁾。さらに本研究では、固定性気道閉塞を喘息安定期における気道リモデリングの指標として使用したが、この2つの指標間で喀痰NRTN濃度に有意差は認められず、喀痰NRTN濃度と喘息の気道リモデリングに関連する炎症性サイトカインであるIL-6との関連も認められなかった。気道NRTNが喘息状態における気道リモデリングを抑制するかどうかを明らかにするためには、今後喀痰中のNRTN濃度とともに経年的な呼吸機能の変化を観察するような前向きな検討が必要と考える。

<引用文献>

- ① Heuckeroth RO, Enomoto H, Grider JR, et al. Gene targeting reveals a critical role for neurturin in the development and maintenance of enteric, sensory, and parasympathetic neurons. *Neuron*. Feb 1999;22(2):253-63.
- ② Pulleyn LJ, Newton R, Adcock IM, Barnes PJ. TGFbeta1 allele association with asthma severity. *Hum Genet*. Dec 2001;109(6):623-7.
- ③ Horger BA, Nishimura MC, Armanini MP, et al. Neurturin exerts potent actions on survival and function of midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci*. Jul 1 1998;18(13):4929-37.
- ④ Fjord-Larsen L, Johansen JL, Kusk P, et al. Efficient in vivo protection of nigral dopaminergic neurons by lentiviral gene transfer of a modified Neurturin construct. *Exp Neurol*. Sep 2005;195(1):49-60.
- ⑤ Widenfalk J, Nosrat C, Tomac A, Westphal H, Hoffer B, Olson L. Neurturin and glial cell line-derived neurotrophic factor receptor-beta (GDNFR-beta), novel proteins related to GDNF and GDNFR-alpha with specific cellular patterns of expression suggesting roles in the developing and adult nervous system and in peripheral organs. *J Neurosci*. Nov 1 1997;17(21):8506-19.
- ⑥ Kabata H, Artis D. Neuro-immune crosstalk and allergic inflammation. *J Clin Invest*. Mar 4 2019;129(4):1475-1482.
- ⑦ Lieu T, Kollarik M, Myers AC, Udem BJ. Neurotrophin and GDNF family ligand receptor expression in vagal sensory nerve subtypes innervating the adult guinea pig respiratory tract. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. May 2011;300(5):L790-8.
- ⑧ Vargas-Leal V, Bruno R, Derfuss T, Krumbholz M, Hohlfeld R, Meinel E. Expression and function of glial cell line-derived neurotrophic factor family ligands and their receptors on human immune cells. *J Immunol*. Aug 15 2005;175(4):2301-8.
- ⑨ Michel T, Theresine M, Poli A, et al. Increased Th2 cytokine secretion, eosinophilic airway inflammation, and airway hyperresponsiveness in neurturin-deficient mice. *J Immunol*. Jun 1 2011;186(11):6497-504.
- ⑩ Mauffray M, Domingues O, Hentges F, Zimmer J, Hanau D, Michel T. Neurturin influences inflammatory responses and airway remodeling in different mouse asthma models. *J Immunol*. Feb 15 2015;194(4):1423-33.
- ⑪ Hastie AT, Mauger DT, Denlinger LC, et al. Mixed Sputum Granulocyte Longitudinal Impact on Lung Function in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med*. Apr 1 2021;203(7):882-892.
- ⑫ Liu J, Huang X, Cao X, Feng X, Wang X. Serum biomarker analysis in patients with premature ovarian insufficiency. *Cytokine*. Feb 2020;126:154876.
- ⑬ Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2023. July, 2023. Updated July 2023.
- ⑭ Morel L, Domingues O, Zimmer J, Michel T. Revisiting the Role of Neurotrophic Factors in Inflammation. *Cells*. Apr 2 2020;9(4):865.
- ⑮ Connolly E, Morgan DJ, Franklin M, et al. Neurturin regulates the lung-resident macrophage inflammatory response to viral infection. *Life Sci Alliance*. Dec 2020;3(12):e202000780.
- ⑯ Abdo M, Pedersen F, Kirsten AM, et al. Longitudinal Impact of Sputum Inflammatory Phenotypes on Small Airway Dysfunction and Disease Outcomes in Asthma. *The journal of allergy and clinical immunology In practice*. Jun 2022;10(6):1545-1553 e2.
- ⑰ Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. Jan 2003;28(1):12-24.

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 Sato Suguru, Suzuki Yasuhito, Kikuchi Masami, Rikimaru Mami, Saito Junpei, Shibata Yoko | 4. 巻 Volume 16 |
| 2. 論文標題 Sputum Neurturin Levels in Adult Asthmatic Subjects | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Asthma and Allergy | 6. 最初と最後の頁 889 ~ 901 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/JAA.S421742 | 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 |
|-------------------|--|--|----|
| 研究 分 担 者 | 鈴木 康仁 (Suzuki Yasuhito) (70769596) | 福島県立医科大学・医学部・助教 (21601) | |

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 |
|---------|---------|
| | |