

令和 4 年 5 月 15 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17901

研究課題名(和文) 気管支喘息の新たな治療標的としてのプロトン感知性受容体TDAG8

研究課題名(英文) Proton-sensing TDAG8 as a new therapeutic target for bronchial asthma

研究代表者

鶴巻 寛朗 (Tsurumaki, Hiroaki)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40781331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はマウス、細胞、気管支喘息(BA)患者検体を用いて、プロトン感知性受容体の一つであるT-cell death-associated gene 8(TDAG8)がBAに關与する機序を解析し、BAの新たな治療標的としてのTDAG8の可能性を明確にすることを目的とした。BAモデルマウスにおいて、TDAG8は気道粘液産生と関係していた。気道上皮細胞株において低pH環境ではPhorbol Myristate Acetate(PMA)刺激によるMUC5AC産生は亢進したが、この現象はTDAG8-cAMPのシグナルに關与していた。BA患者の血中TDAG8発現は喘息症状、重症度、増悪と關連していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでは、好酸球やリンパ球から分泌されるサイトカインや肥満細胞から脱顆粒される炎症性メディエーターによって起こる気道収縮、気道粘液産生、気道リモデリングなどが気管支喘息の主な病態とされてきた。気道炎症によって気道上皮細胞から粘液産生が増加して喀痰が増える事が分かっているが、気道粘液が産生される機序には不明な点が残されている。本研究においては、気管支喘息の気道粘液産生が増加する機序にpH感知性受容体であるTDAG8が關わることを示した。この研究成果はTDAG8が気道粘液産生を制御し得る新しい治療標的となる可能性を示したものであり、その点において学術的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the potential of T-cell death-associated gene 8 (TDAG8), one of the proton-sensing receptors, as a new therapeutic target for bronchial asthma (BA). The mechanisms by which TDAG8 is involved in BA was analyzed using mouse, cell lines, and BA patient samples. In the BA model mouse, TDAG8 was associated with airway mucus production. In airway epithelial cell lines, Phorbol Myristate Acetate (PMA)-stimulated MUC5AC production was enhanced in a low pH environment, and this phenomenon involved TDAG8-cAMP signaling. TDAG8 expression of blood in BA patients was associated with asthma symptoms, severity, and exacerbations.

研究分野：膠原病・アレルギー、呼吸器内科学

キーワード：TDAG8 プロトン感知性受容体 気管支喘息

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗炎症治療により気管支喘息 (Bronchial asthma; BA) の多くはコントロールされた。しかし、コントロール不良の難治性喘息は残っており、それを制御する新しい治療標的を発見する必要がある。BA における気道炎症には好酸球、リンパ球、マスト細胞、好中球などの炎症性細胞及び気道上皮細胞や気道平滑筋細胞などの気道構成細胞が関わっている。このような炎症局所においては活性化細胞が集簇し、低 pH 環境になることが分かっている。そのような炎症局所における pH の変化を感知する機構の一つとして、プロトン感知性 G protein-coupled receptor (GPCR) が報告されている。この受容体には Ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 (OGR1)、T-cell death-associated gene 8 (TDAG8)、G protein-coupled receptor 4 (GPR4)、G2A があり、これらはまとめて OGR1 family と称されている。我々は、OGR1 family の一つである TDAG8 が lipopolysaccharide (LPS) 誘導性気道炎症モデルマウスにおいて、CXCL1 産生を抑制することで好中球性炎症を制御することを報告した。また、preliminary な実験では、TDAG8 は Ovalbumin (OVA) 誘導性喘息モデルマウスにおいて気道の好酸球浸潤と気道粘液産生を促進し、この気道粘液産生メカニズムには IL-4、IL-5、IL-13、TSLP などのサイトカインは関与していなかった。つまり、TDAG8 はこれらのサイトカインを介さない新たな機序で好酸球性気道炎症ならびに気道粘液産生を制御している可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまで BA の治療標的とされてきたサイトカインに関わる気道炎症とは異なるプロトン感知性受容体 TDAG8 を介した新たな喘息のメカニズムを明らかにすることである。

BA の炎症局所においては低 pH 環境となる。pH 変化を感知する TDAG8 は好酸球、マクロファージ、気道上皮細胞などの細胞に発現しているが、BA における気道炎症への関与は未だ不明である。気道の pH 変化に対する TDAG8 を介した生体調節機構を解明し、pH 変化に着目して気道炎症にアプローチすることは、新規治療薬を開発する糸口となり得る。

3. 研究の方法

プロトン感知性受容体 TDAG8 を介した新たな喘息のメカニズムを明らかにするために、以下の(1)から(3)の実験を計画した。

(1) BA モデルマウスにおける TDAG8 の機能を明らかにする。OVA 誘導 BA モデルマウスにおいて TDAG8 遺伝子改変 (TDAG8-KO) マウスと野生型 (WT) マウスを比較した結果、TDAG8 が肺胞における好酸球浸潤と気道における粘液産生を促進する一方で IL-4、IL-5、IL-13 などのサイトカイン産生に影響を与えなかった。これまでの結果を confirm する。

(2) 気道上皮細胞の粘液産生における TDAG8 の関与について明らかにする。気道上皮細胞は NCI-H292 細胞株を用いて、粘液産生能の評価を行う。NCI-H292 細胞株を Phorbol Myristate Acetate (PMA) により刺激し、MUC5AC 発現量を評価する。MUC5AC 発現量は細胞の mRNA を抽出し real time PCR 法で定量的に評価する。TDAG8 の MUC5AC 産生への関与を明らかにするために、siRNA を用いて TDAG8 をノックダウンさせた細胞株 (TDAG8-KD) とコントロールの細胞株 (CON) において前述と同様の刺激を行い、MUC5AC 発現量を比較する。更に TDAG8 の pH 変化に対する機能を明らかにする。

(3) 血中 TDAG8 発現と BA 患者における症状、重症度、Quality of life (QOL)、生理学的検査項目、増悪頻度との関連性を明らかにする。この臨床研究は既に本学における倫理審査委員会の承認を得ている。検体収集は BA 患者書面で研究の同意を受けて行う。Preliminary な実験により、BA 患者の末梢血においては OGR1 family の中で TDAG8 が最も多く発現しており、BA 治療 Step3-4 群において Step1-2 群と比較して TDAG8 が多く発現していた。観察開始時、増悪受診時、1年後の3点において、血中 TDAG8 発現量と重症度、治療内容、症状、QOL、生理学的検査項目、増悪頻度との関連性を統計学的に評価する。血中 TDAG8 発現量の評価は以下の方法で行う。末梢血を採取して浸透圧法による溶血を行い、比重遠心分離法により単球を分離する。カラム法で mRNA を抽出し、real time PCR 法で TDAG8 発現を定量的に解析する。

4. 研究成果

本研究はマウス、細胞、気管支喘息 (BA) 患者検体を用いて、プロトン感知性受容体の一つである T-cell death-associated gene 8 (TDAG8) が BA に関与する機序を解析し、BA の新たな治療標的としての TDAG8 の可能性を明確にすることを目的としている。① BA モデルマウスにおける TDAG8 の機能を明らかにすること、② 気道上皮細胞の粘液産生における TDAG8 の機能を明らかにすること、③ 血中 TDAG8 発現と BA 患者における症状、重症度、治療効果、増悪との関連性を明

らかにすることを予定した。

BA マウスにおいて、TDAG8 遺伝子改変マウスと野生型マウスの比較を行った。マウスの肺組織における TDAG8 発現量は気管支喘息モデルで有意に上昇した。また、肺を組織学的に評価したところ、気道上皮粘液産生は野生型と比較して TDAG8KO マウスでは有意に低下した。更に肺組織における MUC5AC 発現量は野生型と比較して TDAG8KO マウスでは有意に低下した。

気道上皮細胞の粘液産生における TDAG8 の関与を明らかにするため、気道上皮細胞株 (NCI-H292) を用いて実験を行った。気道上皮細胞株においては、Phorbol Myristate Acetate (PMA) 刺激により TDAG8 発現量および MUC5AC 発現量は上昇した。同様に IL-13 と TGF α を用いて気道上皮細胞株を刺激

したが、TDAG8 も MUC5AC も上昇せず、これらのサイトカインは単独では両者の発現に関与していなかった。気道上皮細胞株において siRNA を用いて TDAG8 をノックダウンさせたところ、PMA 刺激による TDAG8 発現量の上昇は抑制され、また、MUC5AC 発現量の上昇も抑制

された。pH を低下させた培養液で気道上皮細胞株を培養し PMA 刺激を加えたところ、MUC5AC 産生は亢進した。この現象は TDAG8 をノックダウンすることで抑制された。酸性環境では気道上皮細胞の粘液産生が亢進し、その機序に TDAG8 が関与していると考えられた。MUC5AC 産生において TDAG8 が関与する機序を明らかにするために、TDAG8 をノックダウンした気道上皮細胞株を PMA で刺激し、細胞内 cAMP 濃度を上昇させる作用のある Forskolin を加えた。TDAG8 のノックダウンにより MUC5AC 発現量は抑制されたが、Forskolin を加えると抑制の一部は解除された。このことから TDAG8 は cAMP を介して MUC5AC 産生に関与していることが明らかになった。

BA 患者の血中 TDAG8 発現と症状スコア、重症度、QOL、増悪との関連性を解析した。末梢血において OGR1 family 発現量を real time PCR 法を用いて評価したところ、TDAG8 発現量は他の OGR1 family と比較して有意に高かった。また、血中 TDAG8 発現は、気管支喘息の症状スコアである Asthma control test (ACT) と負の相関を示した。更に、血中 TDAG8 は過去の増悪を経験しなかった群では増悪を経験した群と比較して有意に高かった。

本研究の成果の一部は学会で発表し、論文文化を進めている。気管支喘息における気道粘液産生に TDAG8 が関与していることを明らかにした報告はこれまでになく、気管支喘息の病態に関わる新しい機序を発見した点において本研究の学術的意義はありとされる。今後は、気道粘液産生のカスケードにおいて TDAG8 が

作用する部位を明らかにすることで、気管支喘息の治療標的に繋がっていく可能性がある。

また、末梢血における TDAG8 発現量が気管支喘息の症状スコアや増悪と関与していることは、気道上皮における粘液産生の他にも TDAG8 が気管支喘息のメカニズムに関与する可能性を唆するものであり、本研究の広がり期待させる結果と考えられた。

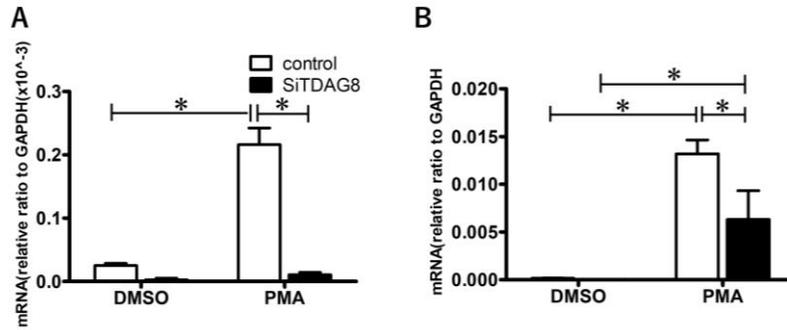


図1. 気道上皮細胞株におけるTDAG8およびMUC5AC発現

気道上皮細胞株(NCI-H292)をPhorbol Myristate Acetate(PMA)により刺激した。更に、siRNAを用いてTDAG8をノックダウンさせて、A. TDAG8およびB. MUC5AC発現量を real time PCR法を用いて解析した。* $p < 0.05$
GAPDH; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, DMSO; Dimethyl sulfoxide, PMA; Phorbol Myristate Acetate, TDAG8; T-cell death associated gene 8, MUC5AC; mucin 5AC

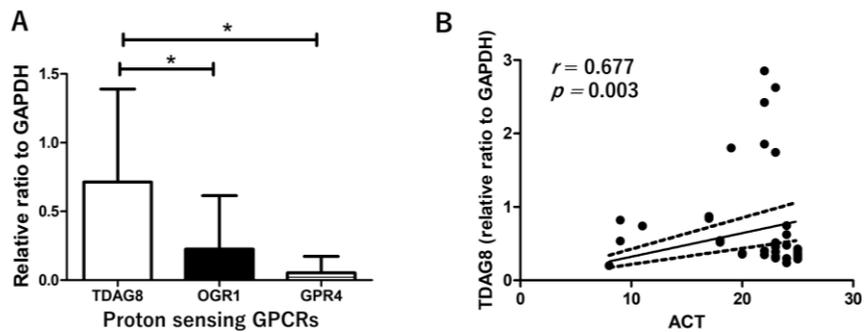


図2. 気管支喘息患者におけるTDAG8発現

気管支喘息患者の末梢血におけるTDAG8発現量を real time PCR法を用いて解析した。A. 末梢血におけるProton sensing GPCRs発現量を評価した。B. 末梢血TDAG8発現量と気管支喘息症状スコア(Asthma control test; ACT) とをスピアマンの相関係数 (r) を用いて評価した。* $p < 0.05$
GAPDH; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GPCRs; G protein coupled receptors, TDAG8; T-cell death associated gene 8, OGR1; Ovarian cancer G protein-coupled receptor 1, GPR4; G protein-coupled receptor 4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 鶴巻寛朗、齋藤悠、久田剛志	4. 巻 40
2. 論文標題 気管支喘息の新たな治療標的としてのプロトン感知性受容体について	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 32-35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 鶴巻寛朗
2. 発表標題 ECRS併存重症気管支喘息において抗IL-5/IL-5R 抗体から抗IL-4R 抗体に切り替えた症例の検討
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鶴巻寛朗
2. 発表標題 好酸球性副鼻腔炎併存重症気管支喘息において抗IL-5R 抗体から抗IL-4R 抗体に切り替えた症例の検討
3. 学会等名 第2回日本喘息学会総会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鶴巻寛朗
2. 発表標題 好酸球性副鼻腔炎を併存した気管支喘息に対するデュピルマブの治療効果
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroaki Tsurumaki
2. 発表標題 T-cell death-associated gene 8 is a new biomarker for the severity and the exacerbation in bronchial asthma
3. 学会等名 JSA/WAO Joint Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鶴巻寛朗
2. 発表標題 気管支喘息における新規バイオマーカーとしてのT-Cell death-associated gene8
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroaki Tsurumaki
2. 発表標題 The therapeutic effect of Mepolizumab on eosinophilic polyangiitis granulomatosis
3. 学会等名 29th Congress of Interasma Japan and North Asia (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鶴巻寛朗
2. 発表標題 気管支サーモプラスティ後に生物学的製剤の追加または変更を要した症例の検討
3. 学会等名 第43回 日本呼吸器内視鏡学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroaki Tsurumaki
2. 発表標題 T cell death associated gene 8 mediates MUC5AC expression in acidic conditions
3. 学会等名 2019 ERS International Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鶴巻寛朗
2. 発表標題 T cell death associated gene 8はOvalbumin誘導喘息モデルにおいてMUC5ACを制御する
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 鶴巻寛朗
2. 発表標題 重症気管支喘息に対するBenralizumab投与例の検討
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

〔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
---------	---------