

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06431

研究課題名(和文)可溶性シアル酸認識レクチンによる呼吸器炎症抑制効果の検証

研究課題名(英文)Verification of respiratory inflammation inhibitory effect by soluble form of sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin

研究代表者

富岡 幸子(Tomioka, Yukiko)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：50374674

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)：可溶性Siglec-9(sSiglec-9)発現トランスジェニックマウス(Tg)を用いてsSiglec-9が呼吸器の炎症を抑制するか検証するため、Tgおよび同腹野生型マウス(WT)に、喘息病態あるいはCOPD病態を惹起して病理組織学的解析を行なった。喘息とCOPDいずれを誘導した場合も、TgではWTと比べて炎症性細胞の浸潤が軽度で、炎症スコアに有意な差が認められた。また、sSiglec-9は喘息モデルでは特にMUC5ACと、COPDモデルでは特にMUC5Bと共局在していた。以上より、sSiglec-9は呼吸器炎症において、ムチンに作用することで炎症を抑制すると推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、sSiglec-9が気道分泌粘液の主成分であるMUC5に結合し、MUC5と内在性Siglec-9との結合を競合阻害することで病態増悪のシグナル伝達を阻害し、呼吸器炎症を抑制することが示唆された。喘息やCOPDでは、気道粘液の制御は病態改善とQOL向上に非常に重要である。本研究では、気道粘液を非特異的に抑制するのではなく、Siglec-9とそのリガンドの相互作用を標的として炎症抑制できる可能性が示唆され、新しい治療標的を提案できたことから、医学・獣医学領域での意義は大きい。また、糖鎖と糖鎖結合分子による免疫調整機構の知見を拡充する学術的にも意義のある成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：To examine whether soluble Siglec-9 (sSiglec-9) suppresses respiratory inflammation using sSiglec-9-expressing transgenic mice (Tg), we induced asthma or COPD pathology in Tg and littermate wild-type (WT) mice and performed histopathological analysis. In both asthma- and COPD-induced pathologies, Tg showed less inflammatory cell infiltration and a significant difference in inflammation score compared to WT. In addition, sSiglec-9 co-localized with MUC5AC especially in asthma models and with MUC5B especially in COPD models. These results suggest that sSiglec-9 suppresses inflammation by acting on mucins in respiratory inflammation.

研究分野：実験動物学、獣医病理学

キーワード：Siglec-9 呼吸器炎症 気管支喘息 COPD 疾患モデル動物 トランスジェニックマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、糖鎖と糖鎖結合分子との相互作用が様々なシグナル伝達に重要な役割を持っていることが明らかになってきており、糖鎖が関わる細胞間ネットワークは疾病治療の有力な標的として探索されつつある。糖鎖結合分子の一種である Siglec はシアル酸を認識する膜貫通型レクチンであり、免疫細胞表面に発現し、糖鎖リガンドと結合すると免疫制御に働くと考えられている。これまでに我々は Siglec-9 の細胞外領域とイムノグロブリン (IgG) の Fc 領域からなる可溶性 Siglec-9 (soluble Siglec-9: sSiglec-9) を発現するトランスジェニックマウス (sSig9 Tg) を作出し、このマウスがある種のムチン発現腫瘍や細菌感染に対して抵抗性を示すことを明らかにしてきた()。この疾病抵抗性は sSiglec-9 がムチンや菌体 LPS に含有されるシアル酸に結合すること、それらリガンドと免疫細胞膜上に存在する内在性の Siglec-9 との結合を競合阻害して病態増悪に関わるシグナル伝達を阻害することで発揮されると推察された。一方、近年、気道分泌に多く含まれるムチン分子である MUC5 が Siglec-9 と結合する可能性が示唆された()。気道分泌亢進は、慢性気道炎症の増悪要因であり、気道粘液ムチンのうち喘息では MUC5AC サブタイプが、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) では MUC5B サブタイプが増加することが知られている。MUC5B は生体防御や炎症制御に働くという報告もあるが、物理的に気道分泌の粘度を亢進させ、病態を増悪させる可能性も高く、また、MUC5 分子は炎症性サイトカインの発現を促進し、さらなる病態増悪を招くと考えられた。このような背景から研究代表者は「sSiglec-9 が気道分泌の主成分である MUC5 に結合すること、MUC5 と細胞膜上の内在性 Siglec-9 との結合を競合阻害し病態増悪に関連するシグナル伝達を阻害することで、呼吸器炎症を抑制する」という仮説を立て、上述の sSig9 Tg を用いてこれを明らかにしたいと考え、本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究は、遺伝子改変マウス sSig-9 Tg を用いて可溶性 Siglec-9 による呼吸器炎症抑制効果とその機序を明らかにし、Siglec-9 とそのリガンドの相互作用を標的とした新規の分子標的医薬品候補を提案することを最終的な目的として立案した。

具体的には、(1) sSig9 Tg において可溶性 Siglec-9 が呼吸器のアレルギー性炎症を抑制し、その病態を改善するか、(2) sSig9 Tg において可溶性 Siglec-9 が COPD における炎症を抑制し、その病態を改善するか、を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) sSig9 Tg マウスにおける気管支喘息病態の解析

sSig9 Tg および同腹 Non-Tg マウス (Non-Tg) に、卵白アルブミン (OVA) とアジュバントを 2 回 (day 0, 14) 腹腔内投与して感作させた後、三種混合麻酔下で OVA を 2 回経鼻暴露 (day 21, 22) してアレルギー性炎症 (気管支喘息) 病態を惹起した。2 回目の経鼻暴露から 5 日後 (day 27) に三種混合麻酔による深麻酔下で心採血を行ったのち、頸椎脱臼による安楽死を行った。続いて、肺組織を採取し常法に従って標本を作成して HE 染色で形態を観察したのち、sSiglec-9 および MUC5 の局在を免疫組織化学で明らかにした。喘息の臨床症例で発現が亢進する MUC5 は主にサブタイプ MUC5AC であると考えられているが、本研究では MUC5B と MUC5AC それぞれと sSiglec-9 の局在について多重蛍光免疫染色によって可視化し、sSiglec-9 と気道分泌ムチンの相互作用について検証した。また、抗 IgG 抗体を用いた Western Blot により血清サンプルから sSiglec-9 を検出した。

(2) sSig9 Tg マウスにおける COPD 病態の解析

sSig9 Tg および同腹 Non-Tg に、豚膵臓由来エラスターゼ (porcine pancreatic elastase: PPE) を三種混合麻酔下で経鼻投与した。PPE 投与から 14 日後および 17 日後にリポ多糖 (Lipopolysaccharide: LPS) を三種混合麻酔下で経鼻投与した (day 14, 17)。2 回目の LPS 投与の翌日 (day 18)、上記 (1) と同様にマウスを安楽死させたのち材料を採取し、解析を行った。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

sSig9 Tg マウスにおける気管支喘息様病態の解析

OVA 感作・曝露を行った実験群では、気管支周囲に好中球やリンパ球、好酸球などの炎症性細胞の浸潤が認められた (図 1A)。これらの変化は Tg と Non-Tg いずれにおいても観察されたが、Tg では炎症性細胞の浸潤が軽度であり (図 1A)、Tg の炎症スコアは Non-Tg に対して有意に低かった (図 1B) ($P < 0.05$)。

実験群におけるPAS染色では未処置群と比較して細気管支の粘膜上皮においてPAS陽性細胞の増加が多数認められ、杯細胞が化生および増生していた。これらの変化はTgとNon-Tgいずれにおいても観察されたが、Tgと比較してNon-TgにおけるPAS陽性杯細胞の増加は顕著であった(図2上段)。sSiglec-9に対する免疫染色では、気管支上皮細胞や肺胞壁にsSiglec-9の局在が認められた(図2下段)。また、実験群TgではPAS陽性杯細胞においてsSiglec-9強陽性像が認められた。杯細胞の細胞質中のPAS陽性分泌顆粒は、MUC5AC強陽性を示した。多重蛍光免疫染色では、気管支上皮管腔面においてsSiglec-9とMUC5ACの共局在が認められた(図未掲載)。

喘息モデルマウス血清を用いたWestern Blotでは、Tg血清中にsSiglec-9特異的バンドが検出された。TgにおけるsSiglec-9の発現量は個体差があり、炎症が軽度なTg個体では炎症が重度なTg個体よりもsSiglec-9が高度に発現していた(図3)。

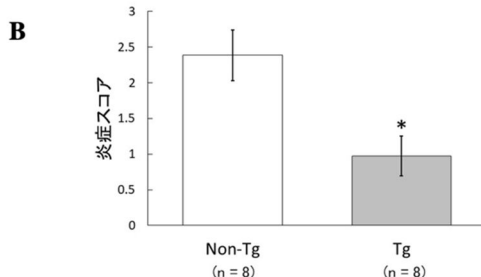
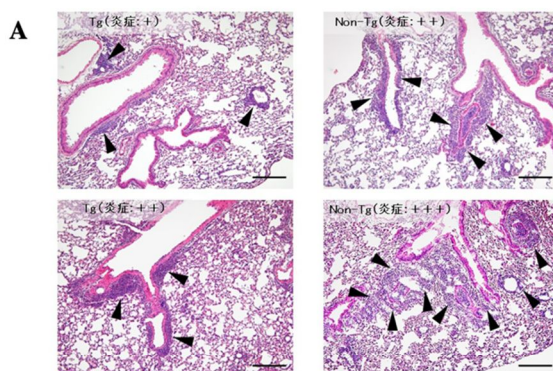


図1 喘息モデルの肺の病理と炎症スコア

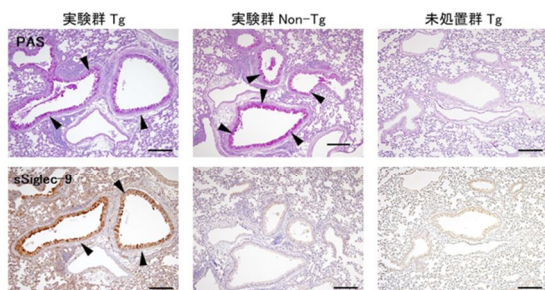


図2 喘息モデルのPAS染色像およびsSiglec-9の免疫染色像



図3 喘息マウス血清におけるsSiglec-9の検出

sSig9 Tg マウスにおける COPD 様病態の解析

実験群において、肺胞壁や細気管支周囲に好中球をはじめとした炎症性細胞の浸潤が認められた(図4A)。また、COPDの病理学的特徴である毛細血管壁破壊による肺胞腔内への出血や気腫性変化が時折認められた。これらの変化はTgとNon-Tgいずれにおいても観察されたが、Non-Tgと比較してTgでは、炎症性細胞の浸潤や気腫性変化が軽度な傾向が認められた(図4A)。COPDモデルTgの炎症スコアはNon-Tgに対して有意に低かった(図4B)($P < 0.05$)。

実験群におけるPAS染色では、未処置群と比較して細気管支の粘膜上皮においてPAS陽性杯細胞の増加がわずかに認められた。また、気管支上皮線毛細胞の管腔面に限局してPAS陽性粘液の付着が認められた。これらの変化はTgとNon-Tgいずれにおいても観察され、差異は認められなかった(図5上段)。実験群TgではsSiglec-9はPAS陽性の気管支上皮管腔面や杯細胞に局在していた(図5下段)。PAS陽性の気管支上皮における杯細胞の細胞質では、MUC5B陽性領域が認められ、多重蛍光免疫染色では、気管支上皮表層でsSiglec-9とMUC5Bの共局在が認められた(図未掲載)。

COPDモデルマウス血清を用いたWestern Blotでは、Tg血清中にsSiglec-9特異的なバンドが

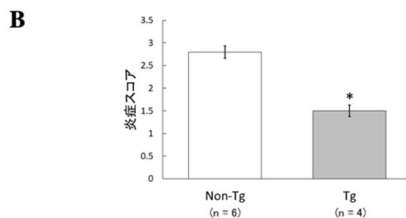
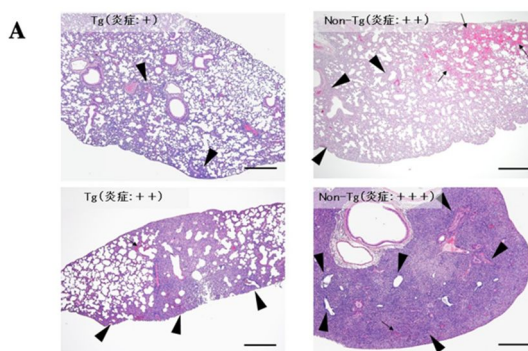


図4 COPDモデルの肺の病理と炎症スコア

認められた。喘息モデル同様、Tg における sSiglec-9 の発現量は個体差があり、炎症が軽度であった Tg 個体は炎症が重度な Tg 個体よりも sSiglec-9 が高度に発現していた (図 6)。

(2) 結論・考察

喘息・COPD の両モデルにおいて Tg の病理組織学的変化は Non-Tg よりも軽度だった。また、Tg 実験群内でも、sSiglec-9 高発現個体では低発現個体よりも炎症や病態の増悪が軽度だった。さらに、各種ムチン類 (MUC5AC・MUC5B) と sSiglec-9 の共局在が確認された。以上より、sSiglec-9 は喘息や COPD といった炎症性肺疾患において炎症や病態増悪を抑制することが示唆された。このメカニズムとして sSiglec-9 がムチン類 (MUC5AC・MUC5B) に結合し、その病態増悪作用を阻害する可能性が推察された。本研究成果により、sSiglec-9 は喘息・COPD の治療やそれらの合併症 (asthma-COPD overlap syndrome: ACOS) の治療のための分子標的薬として利用できる可能性が示唆された。

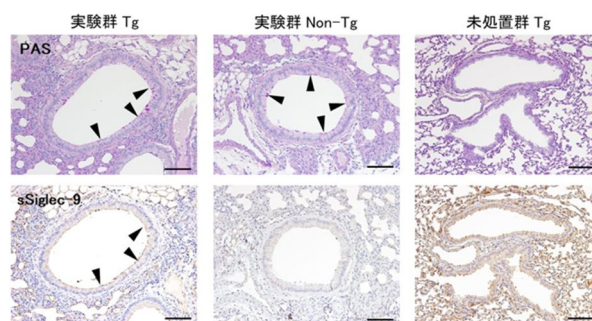


図5 COPDモデルのPAS染色像およびsSiglec-9 の免疫染色像



図6 COPDモデルの血清におけるsSiglec-9の検出

(3) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

COPD 患者で Siglec-9 および細胞外ドメインのみからなる内在性の sSiglec-9 の発現が増強していることが近年報告されている ()。この報告では、細胞外領域のみからなる sSiglec-9 が細胞膜上の Siglec-9 とリガンドとの結合を阻害する可能性があると考えられている。しかしながら、実験的に、呼吸器炎症病態における Siglec-9 と sSiglec-9 の機能を明らかにし、治療に応用した例は未だない。また、関連研究としては、細胞外ドメインのみからなる sSiglec-9 を関節リウマチモデル動物に投与すると、M1 マクロファージの活性抑制を介して炎症を抑制することが明らかにされ、新規治療薬としての可能性が示唆されている ()。このように Siglec-9 とそのリガンドを介したシグナル伝達機構は、各種疾病の治療標的として近年注目されはじめた分野と言える。一方、本研究では Siglec-9 の細胞外ドメインと IgG Fc 部位からなる融合型タンパク質を sSiglec-9 として提案した。この融合タンパク質は細胞外領域のみの sSiglec-9 より安定性と可溶性が高い、IgG Fc 部位のオプソニン化による相乗効果も期待できる、などの利点が考えられるだろう。世界的に増加傾向にある気管支喘息、死亡原因の上位となる COPD や肺炎では、いずれも気道粘液産生亢進が病態増悪の要因となるが、その気道粘液分泌亢進の機序は多様で、未だ不明な点も多い。このような背景から、糖鎖に関する細胞間ネットワークに着目し、新規の治療標的を提案した本研究成果の社会的意義は大きい。

本研究では、マウスにおいて sSiglec-9 が炎症性肺疾患病態の増悪を抑制することが示唆されたが、その詳細な機序については解明に至っていない。今後、炎症性肺疾患に対する臨床応用を検討するためには、sSiglec-9 発現モデルの気道における炎症性細胞や各種サイトカインの動態を明らかにし、病態増悪抑制メカニズムの機序を解明する必要があるだろう。

< 引用文献 >

Tomioka Y, Morimatsu M, Nishijima K, Usui T, Yamamoto S, Suyama H, Ozaki K, Ito T, Ono E. A soluble form of Siglec-9 provides an antitumor benefit against mammary tumor cells expressing MUC1 in transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 450:532-537. 2014.

Saito M, Yamamoto S, Ozaki K, Tomioka Y, Suyama H, Morimatsu M, Nishijima KI, Yoshida SI, Ono E. A soluble form of Siglec-9 provides a resistance against Group B Streptococcus (GBS) infection in transgenic mice. *Microb Pathog.* 99:106-110.2016.

Jia Y, Yu H, Fernandes SM, Wei Y, Gonzalez-Gil A, Motari MG, Vajn K, Stevens WW, Peters AT, Bochner BS, Kern RC, Schleimer RP, Schnaar RL. Expression of ligands for Siglec-8 and Siglec-9 in human airways and airway cells. *J Allergy Clin Immunol.* 135:799-810. 2015.

Zeng Z, Li M, Wang M, Wu X, Li Q, Ning Q, Zhao J, Xu Y, Xie J. Increased expression of Siglec-9 in chronic obstructive pulmonary disease. *Sci Rep.* 7:e10116. 2017.

Matsumoto T, Takahashi N, Kojima T, Yoshioka Y, Ishikawa J, Furukawa K, Ono K, Sawada M, Ishiguro N, Yamamoto A. Soluble Siglec-9 suppresses arthritis in a collagen-induced arthritis mouse model and inhibits M1 activation of RAW264.7 macrophages.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中谷淳司、富岡幸子、竹内崇師、八木田晴香、尾崎絹代、山本沙代、森松正美、小野悦郎
2. 発表標題 可溶性Siglec-9による気道炎症抑制効果の検証
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
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
研究分担者	小野 悦郎 (Ono Etsuro) (00160903)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	

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