

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08508

研究課題名(和文)喘息-COPDオーバーラップ病態におけるIL-33/ST2シグナルの役割の解明

研究課題名(英文) Investigation of IL-33/ST2 signaling in the pathogenesis of asthma-COPD overlap

研究代表者

鈴木 雅 (Suzuki, Masaru)

北海道大学・医学研究院・准教授

研究者番号：10374290

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)：喘息-COPDオーバーラップ(ACO)病態マウスの実験結果より、アレルギー性気道炎症により肺気腫形成が促進されることが示され、IL-33がそのメカニズムに関与していることが示された。また、IL-33とapoptosis inhibitor of macrophage (AIM)は関連しており、アレルギー性気道炎症および肺気腫形成においてIL-33上昇がAIMと関連してACO病態に関与していることが示唆された。臨床検体の解析では、COPD患者に比べて喘息およびACO患者で血清IL-33およびST2値が優位に上昇していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

喘息とCOPDの合併病態(ACO)は未だ不明な点が多いものの、今回の研究により、IL-33がACO病態の増強に関与していることが示された。今後、臨床検体でのデータ解析の追加は必要であるものの、新規の治療標的となりうるものを同定した研究として、今回の研究結果は学術的意義および社会的意義があるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Experimental results in asthma-COPD overlap (ACO) model mice showed that allergic airway inflammation promotes emphysema formation, and IL-33 is involved in this mechanism. In addition, IL-33 and apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) were associated, suggesting that IL-33 elevation is involved in ACO pathogenesis in association with AIM in allergic airway inflammation and emphysema formation. Analysis of clinical specimens showed that serum IL-33 and ST2 levels were significantly elevated in asthma and ACO patients compared to COPD patients.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：慢性閉塞性肺疾患 気管支喘息 喘息-COPDオーバーラップ IL-33

## 1. 研究開始当初の背景

気管支喘息および慢性閉塞性肺疾患(COPD)はともに慢性の気道炎症と閉塞性換気障害を特徴とする閉塞性肺疾患である。歴史的には別個の疾患として扱われてきたが、1960年代には既に両者は共通の素因を有する疾患群とするオランダ学説も登場し、類似性についても議論されてきた。さらに近年、両者の合併病態(喘息-COPD オーバーラップ: ACO)がより重症で予後不良な患者群として注目され、特に高齢者における両者の合併病態が問題となっている。しかしながら臨床的に意義のある診断基準は未だ定まっておらず、ACOの中にも異なる臨床表現型が存在することが予想されている。実際に、研究代表者である鈴木は北海道 COPD コホート研究の解析で、臨床的に喘息とは診断されていない COPD 患者において気道可逆性、末梢血好酸球増多、アトピー素因の喘息様検査所見を有する数が多いほど呼吸機能(1秒量)の経年低下が緩やかであり、また複数の喘息様検査所見を有する COPD 患者は10年間の生命予後が有意に良好であったことを報告した(Suzuki M, et al. Am J Respir Crit Care Med 2016)。この結果は、COPDと喘息の合併は予後不良な病態とされてきたこれまでの一般的な見解に一石を投じるものであり、両者の合併病態の再整理ならびに個別化医療の実践に向けた分子生物学的病態の理解が必要であることを示している。

本研究では interleukin-33 (IL-33) およびその受容体である ST2 に注目する。IL-33 は 2005 年にクローニングされた IL-1 ファミリーに属する 18kDa の分泌型サイトカインである。IL-33 は気道上皮細胞の核内に恒常的に発現しており、外的刺激に応じて速やかに分泌されるアラミン(alarmin)として作用する。特に気管支喘息の病態においては、気道上皮から放出された IL-33 が ST2 を発現する Th2 細胞、2 型自然リンパ球(ILC2)を刺激し、type 2 炎症(好酸球性炎症)を惹起する(Smith DE. Clin Exp Allergy 2010)。一方で、COPD の主なりスク因子である喫煙刺激によっても気道上皮細胞の IL-33 産生は亢進し、重症 COPD 患者肺でも IL-33 の発現亢進が示されているが、必ずしも好酸球性炎症を生じるのではなく、むしろマクロファージや NK 細胞上の ST2 を介して type 1 炎症を惹起する(Kearley J, et al. Immunity 2015)。すなわち、喘息と COPD の病態形成において外的刺激に応じて気道上皮細胞から放出される IL-33 は共通しているがその下流シグナルが異なることで、そのバランスによりオーバーラップ病態の多様性が存在している可能性がある。すなわち、両者の合併病態を理解・解明する上で IL-33/ST2 シグナルの影響を詳細に検討することが必須であり、IL-33/ST2 シグナルが喘息-COPD オーバーラップ病態の多様性を形成し、さらに治療標的となるか? という点が本研究課題の核心をなす学術的問いである。

## 2. 研究の目的

アレルギー気道炎症と喫煙曝露を様々な条件で組み合わせたマウスモデルを作製し、その特徴や多様性について IL-33/ST2 シグナルを中心に検討することと、喘息、COPD、およびオーバーラップ患者を含めた前向き観察コホート研究の臨床検体をを用いて、血清 IL-33 値および分泌型 ST2 と臨床的特徴および臨床経過の関係を検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 喘息-COPD オーバーラップ(ACO)病態マウス作製の試みと解析

気管支喘息のマウスモデルとして卵白アルブミン(OVA)感作・曝露モデルならびに IL-33 気管内投与モデル、COPD のマウスモデルとしてブタ隣エラストラーゼ(PPE)誘導性肺気腫モデルを選択し、それらを組み合わせて実験を施行した。OVA + PPE モデルでは、7 週齢の野生型 C57BL/6J マウスに 50 µg OVA + 4 mg alum を day 0、7、14 に腹腔内投与にて OVA 感作し、day 21~day 24 で 1%OVA をネブライザーを用いて曝露し、OVA 誘導性アレルギー性気道炎症モデルを作製した。IL-33 + PPE モデルでは、7 週齢の野生型 C57/BL6 マウスにリコンビナント IL-33 0.05 µg を day 0~2、7~9、14~16 に気管内投与し、IL-33 誘導性アレルギー性気道炎症モデルを作製した。各々のアレルギー性気道炎症モデルと PPE の併用群(ACO モデル)では、PPE 0.1 U を day 0、7、14 の 3 回気管内投与を行った。Day 24 にマウスを安楽死させ、肺組織をホルマリン固定し、H&E 標本を作成の上、平均肺胞間距離(MLI)を算出し、肺気腫の形成を評価した。

### (2) IL-33 関連気道炎症と AIM との関連の解析

Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM)はアポトーシス抑制、生体内異物排除、オートファジーへの関与など多彩な機能が報告されている。アレルギー性気道炎症への関与を検討するために、AIM 欠損マウスを用いて IL-33 誘導性アレルギー性気道炎症モデルおよび PPE 誘導性肺気腫モデルを作製した。

(3) 喘息、COPD、およびオーバーラップ患者を含めた前向き観察コホート研究の臨床検体における血清 IL-33 と ST2 の測定

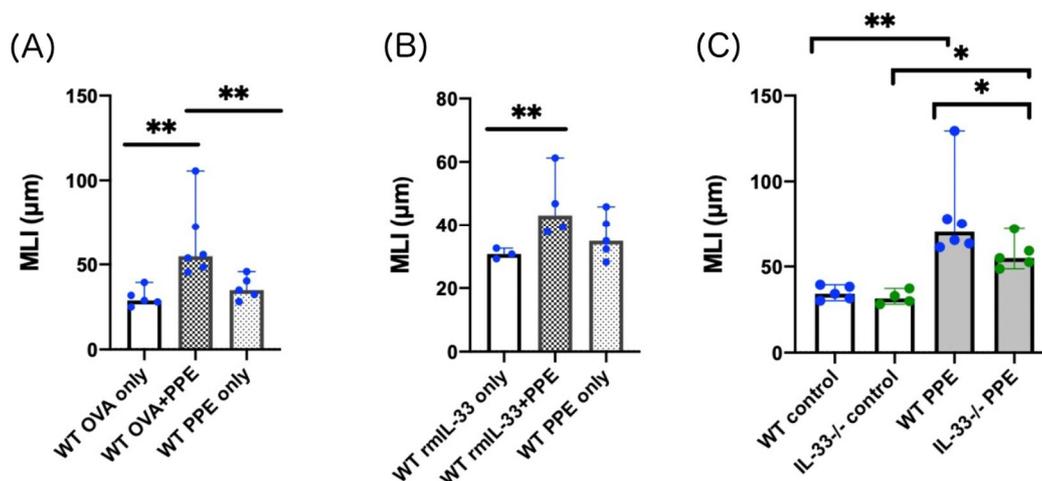
多施設前向き観察研究である「気管支喘息と COPD の合併病態に焦点を当てた慢性気道疾患患者の包括的前向きコホート研究(PIRICA study)」を計画し、患者の登録を行った。本研究では、55 歳以上の気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、肺気腫、慢性気管支炎のいずれかの病名と診断された患者を対象として広く患者をリクルートし (phase I 調査) そのうち ACO が疑われた患者に対しては原則北海道大学病院での検査を行う (phase II 調査) プロトコールとした。2021 年 9 月末で患者登録が終了し、計 1,139 名より研究参加の同意を取得した。そのうち、血清保存に承諾された 728 例において、ELISA 法を用いて血清 IL-33 と ST2 値を測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 喘息-COPD オーバーラップ(ACO)病態マウス作製の試みと解析

OVA + PPE 併用群で PPE 単独群に比べて有意に MLI が増加していた (図 1A)。IL-33 + PPE 併用群でも PPE 単独群に比べて MLI が増加している傾向を認めた (図 1B)。さらに、IL-33 欠損マウスを用い、PPE 気管内投与を行った。その結果、IL-33 欠損マウスでは野生型マウスと比較して MLI が有意に低下しており、肺気腫形成が抑制されていた (図 1C)。以上より、アレルギー性気道炎症により気腫形成が促進されることが示され、IL-33 がそのメカニズムに関与していることが示唆された。

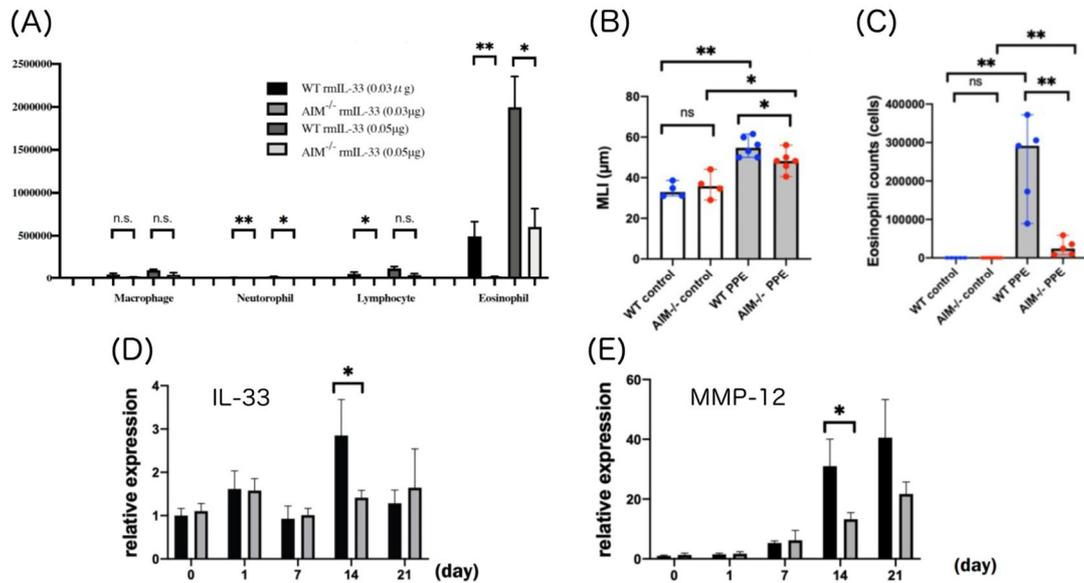
図 1



(2) IL-33 関連気道炎症と AIM との関連の解析

IL-33 誘導性アレルギー性気道炎症モデルにおいて day 6 に安楽死させ、気管支肺胞洗浄液 (BALF)にて白血球分画を検討したところ、AIM 欠損マウスにおいて有意に BALF 中の好酸球数が低下していた (図 2A)。次に、AIM 欠損マウスを用いて PPE 誘導性肺気腫モデルを作製したところ、AIM 欠損マウスでは野生型マウスと比較して MLI が有意に低下しており (図 2B) day 21 の BALF 中の好酸球数が有意に低下していた (図 2C)。また、AIM 欠損マウスでは day 14 における IL-33 mRNA 発現が有意に低下しており (図 2D)、肺気腫形成に関わると報告されているマトリックスメタロプロテアーゼである MMP-12 の mRNA 発現が低下していた (図 2E)。以上より IL-33 と AIM は関連しており、アレルギー性気道炎症および肺気腫形成において IL-33 上昇が AIM と関連して ACO 病態に関与していることが示唆された。

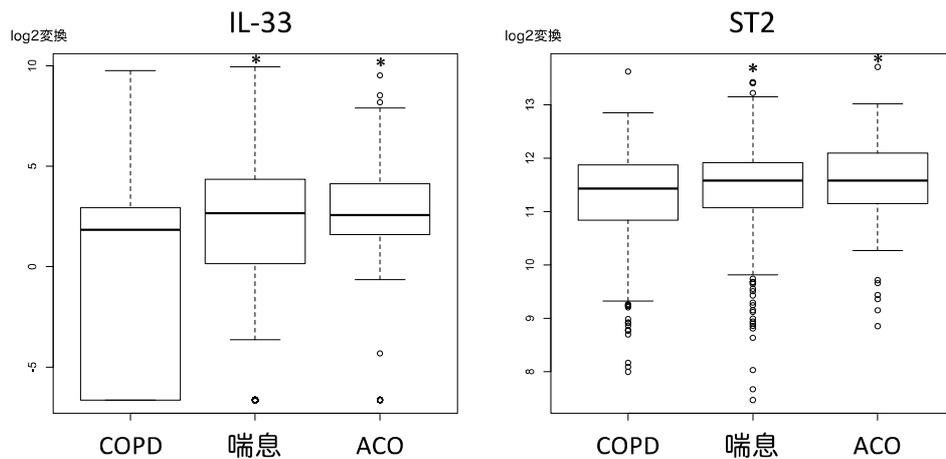
図2



(3) 喘息、COPD、およびオーバークラップ患者を含めた前向き観察コホート研究の臨床検体における血清 IL-33 と ST2 の測定

PIRICA study に参加した COPD、喘息、ACO 患者（病名は主治医の診断）の血清 IL-33 および ST2 値を測定した。その結果、COPD 患者に比べて喘息および ACO 患者で血清 IL-33 および ST2 値が有意に上昇していた（図 3）。PIRICA study はまだ追跡進行中の前向きコホート研究であり、今後は増悪イベントや呼吸機能低下などの縦断的アウトカムとの関連を検討する。

図3



\*p<0.05 vs. COPD

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<br>Michiko Takimaoto-Sato, Masaru Suzuki, Hiroki Kimura, Haiyan Ge, Munehiro Matsumoto, Satoshi Konno |
| 2. 発表標題<br>Apoptosis Inhibitor of Macrophage (AIM)/CD5L is involved in the Pathogenesis of COPD               |
| 3. 学会等名<br>第63回日本呼吸器学会学術講演会   |
| 4. 発表年<br>2023年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|