

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08569

研究課題名(和文) 気管支喘息の病態における気道上皮糖鎖修飾の役割についての解析

研究課題名(英文) The role of glycosylation in airway epithelium in the pathogenesis of bronchial asthma

研究代表者

朧 博晃 (Momi, Hiroaki)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：90794157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：気管支喘息の難治化の機序について、3型自然リンパ球(ILC3)による気道上皮細胞の糖鎖修飾変化の関わりについて研究を行った。気道上皮細胞の糖鎖修飾について、気道上皮細胞由来のエクソソームを解析する手法を行い、エクソソーム上に発現する糖鎖構造は由来細胞の糖鎖構造に一致することを示した。また、喘息におけるILC3は好中球性炎症に関与するため、好中球性炎症をきたす喘息モデルマウスを作成して喘息の病態の解析を行い、気道内のILC3について喘息の重症化への関与について研究を進めた。今回の研究において、気道上皮細胞における糖鎖修飾が喘息の病態に関与していることが示唆されており、引き続き研究を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

喘息難治化の病態の一つに、好中球性炎症が関わっていることが示されている。今回の研究において、好中球性炎症を伴う喘息について、新たにILC3や気道上皮細胞における糖鎖修飾などの関与が示唆されている。更に研究を進めることでこの機序が明らかになれば、難治性喘息における新規治療標的の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism of refractory bronchial asthma by focusing glycan modification changes in airway epithelial cells by type 3 innate lymphocytes (ILC3). Regarding glycan modification of airway epithelial cells, we analyzed exosomes derived from airway epithelial cells, and showed that the glycan structure expressed on the exosome matches the glycan structure of the derived cell. In addition, since ILC3 in asthma is involved in neutrophilic inflammation, we analyzed the pathophysiology of asthma by creating asthma model mice that cause neutrophilic inflammation and studied the involvement of ILC3 in the severity of asthma. This study suggests that glycosylation in airway epithelial cells is involved in the pathogenesis of asthma.

研究分野：喘息・COPD

キーワード：気管支喘息 自然リンパ球 糖鎖修飾 好中球性炎症

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は気道の炎症と種々の程度の気流制限により特徴づけられ、発作性の咳、喘鳴及び呼吸困難をきたす疾患である。気管支喘息は吸入ステロイド薬の普及に伴い、病状のコントロールがより容易になったが、いまだに適切な治療を行っても治療反応が乏しい難治性喘息患者が存在する。近年、喘息にはTh2リンパ球などによる獲得免疫の他に、2型自然リンパ球 (Innate lymphoid cell 2: ILC2) による自然免疫の関与が指摘されている。ILC2は気道上皮由来のサイトカインであるTSLPやIL-33の存在下でステロイド抵抗性を獲得することが報告されており、難治性喘息の病態に関与している可能性が指摘されている。ILCは現在、ILC2の他に1型 (ILC1) や3型 (ILC3) の存在も示されている。

肥満や気道感染により肺におけるマクロファージからのIL-1 産生が促され、肺内での3型自然リンパ球 (ILC3) の発現が亢進することが近年、報告されている (Nature Medicine 2014; 20:54)。ILC3はIL-17を産生することで炎症を惹起することが知られているが、抗炎症効果の指摘があるIL-22も産生する。また、炎症性腸疾患に関する報告で、自然リンパ球であるILC3から産生されるIL-22が腸管上皮細胞のフコシル化及び2型フコース転移酵素の発現を亢進し、細菌感染に対する防御能を亢進するなど上皮の恒常性に寄与することが示されている (Science 2014; 345:1254009)。また、炎症性腸疾患において、IL-22シグナルは好酸球から産生されるIL-22 binding protein (IL-22BP) により抑制を受けることも報告されている (Mucosal Immunol 2016; 9:539)。

2. 研究開始当初の目的

気道上皮において自然リンパ球が誘導するフコシル化を含めた糖鎖修飾が気管支喘息の制御に関与している可能性について明らかにし、難治性気管支喘息の新規治療標的を同定することを目的とする。今回の研究において、患者検体として気道上皮組織の採取について、COVID-19流行のため気管支鏡検査の制限が生じたため、検体の確保が困難となったことや、気管支鏡検査による喘息発作誘発など患者への負担が大きいことから、喀痰検体など非侵襲的に採取できる検体を用いて解析を行う。

3. 研究方法

気道上皮細胞由来の細胞外小胞 (エクソソーム) における糖鎖構造の解析

COVID-19流行の影響や患者への侵襲を考慮し、喀痰検体中に含まれる気道上皮細胞のエクソソームを用いて、気道上皮細胞の糖鎖解析に代用する方法を用いる。エクソソーム上に発現する糖鎖構造が由来する気道上皮細胞と一致するか確認するため、気道上皮由来の肺癌細胞を培養し、細胞上清からエクソソームを抽出し、糖鎖構造の解析を行う。

気管支喘息モデルマウスを用いた解析

OVA、Papain、HDMを用いた気管支喘息モデルマウスを作成し、気道内のILC3を採取し、IL-17やIL-22などの発現について確認する。喘息における好中球性炎症を再現するオゾン曝露も加えての解析も行う。気管支喘息モデルマウスから採取した気道上皮細胞や気管支洗浄液中のエクソソームを用いて、糖鎖解析を行う。

気管支喘息患者の喀痰検体から抽出したエクソソームの糖鎖構造の解析

気管支喘息患者の喀痰検体を採取し、エクソソームを抽出する。抽出したエクソソームについて、フコシル化を含めた糖鎖解析を行う。

気管支喘息の難治化に関わる糖鎖構造の特定

気管支喘息の難治化の病態に関わることが想定された糖鎖構造の変化について、気管支喘息モデルマウスでその変化を抑制することによる病態変化について確認する。

4. 研究結果

研究開始当初の予定では、気管支鏡を用いて気管支喘息患者の気道検体を採取し、気道上皮細胞や自然リンパ球におけるサイトカイン産生能や糖鎖構造について確認する予定であったが、前述の通りCOVID-19流行のため気管支鏡検査に制限が生じたことや、気管支鏡検査による患者への侵襲を考慮し、喀痰など非侵襲的に採取できる検体で解析を行う方針とした。喀痰中のエクソソームの糖鎖構造を解析することで、由来する気道上皮細胞の糖鎖構造の代替となりうるか確認する必要があり、今回の研究ではエクソソームの由来細胞を明らかにするため、エクソソーム表面に発現する糖鎖構造の解析を行い、由来細胞毎で糖鎖構造の変化があるか確認を行った。エクソソーム上の糖鎖構造の解析には大量のエクソソームを要するため、今回の研究

では研究の効率化を考慮し、培養速度の速い気道構成細胞由来の肺癌cell lineを用いた。肺癌のcell lineについては複数の非小細胞肺癌、小細胞肺癌のcell lineを用いた。それぞれの細胞培養液から採取されたエクソソーム表面の糖鎖構造を解析し、由来する細胞の違いで糖鎖構造が変化する結果が得られた(図1)(図2)(Journal of Biological Chemistry. 2022; 298:101950)。このことで、生体内で採取したエクソソーム表面の糖鎖構造を解析することで由来細胞が特定でき、エクソソーム上の糖鎖

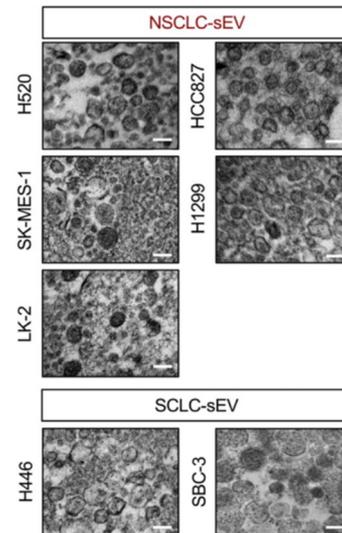


図1. 各種肺癌cell lineの細胞培養液から採取したexosome

修飾や内包される蛋白を解析することで由来細胞における糖鎖修飾や蛋白発現の確認などに代替できることが示された。

OVA、HDM、Papainを用いて作成した気管支喘息モデルマウスから採取した気道検体からILC3の抽出を試みたが、少数であり解析が困難であった。ILC3は好中球性炎症に関わる自然リンパ球であり、好中球性炎症の強い気管支喘息モデルマウスを作成するため、オゾン曝露による気管支喘息モデル

も用いた。OVA感作曝露にオゾン曝露を加えたモデルではコントロール群と比較し気道過敏性やサイトカインなどで喘息の病態は変化を認めなかったが、高脂質食を用いて作成した肥満マウスを用いた実験ではオゾン曝露により喘息の病態が悪化することを認めた(図3)(図4)。この結果より、肥満マウスを用いてのILC3や、気道上皮細胞及び気道上皮細胞由来のエクソソームを用いての解析を現在進めている。また、細胞実験として気道上皮細胞を生体内に近い状態で培養できるAir Liquid Interface培養を用いての研究も加えての解析を進めている。

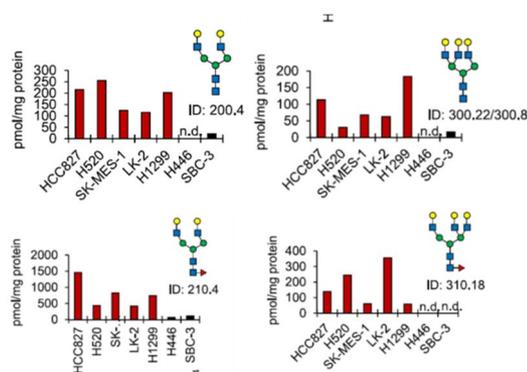


図2. 肺癌cell lineから採取したexosome表面に発現する糖鎖構造の違い

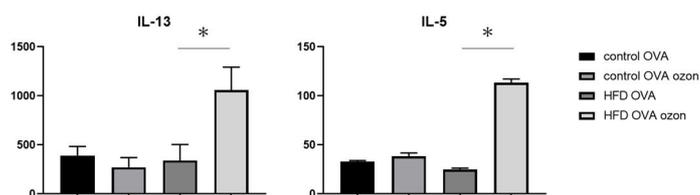


図3. 肥満マウスではOVAとオゾンの共曝露にて、気管支肺胞洗浄液中のTh2系サイトカインの発現がcontrolと比較し、亢進する。HFD:高脂質食摂取、*p<0.05

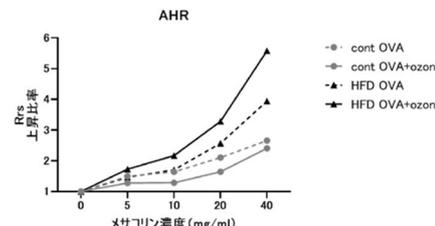


図4. 肥満マウスではOVAとオゾンの共曝露にて、気道過敏性がcontrolと比較し、亢進する。HFD: 高脂質食摂取

5. 今後の展望

エクソソームの解析やマウスからのILC3抽出に時間を要しており、研究の進捗が遅れているが、肥満マウスやオゾン曝露の追加などを用いることで、重症喘息モデルマウスについて安定した再現を得られており、これらのモデルマウスを用いた研究を引き続き進める。喘息の重症化に関与する糖鎖修飾が明らかになれば、重症喘息患者より採取した喀痰検体中のエクソソームを用いて、同様の糖鎖修飾が生じているか確認を行うとともに、喘息の重症化に関与する糖鎖修飾をマウスの気道内で抑制することで、喘息の重症化が抑制されるか検証を行い、重症喘息に対する新規治療標的について研究を進める。

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 Kondo Kiyotaka, Harada Yoichiro, Nakano Miyako, Suzuki Takehiro, Fukushige Tomoko, Hanzawa Ken, Yagi Hirokazu, Takagi Koichi, Mizuno Keiko, Miyamoto Yasuhide, Taniguchi Naoyuki, Kato Koichi, Kanekura Takuro, Dohmae Naoshi, Machida Kentaro, Maruyama Ikuro, Inoue Hiromasa | 4. 巻 298 (6) |
| 2. 論文標題 Identification of distinct N-glycosylation patterns on extracellular vesicles from small-cell and non-small-cell lung cancers cells. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry | 6. 最初と最後の頁 101950 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.101950 | 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 | 井上 博雅 (Inoue Hiromasa) (30264039) | 鹿児島大学・歯学部医学系・教授 (17701) | |
| 研究分担者 | 高木 弘一 (Takagi Koichi) (40707866) | 鹿児島大学・歯学部総合研究科・特任助教 (17701) | |

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