

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08789

研究課題名(和文) 気道ウイルス感染時のヒト肺血管内皮細胞における新規IL-33産生機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of novel IL-33 production mechanism in human lung microvascular endothelial cells during respiratory tract virus infection

研究代表者

杉江 真以子 (Sugie, Maiko)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・免疫アレルギー・感染研究部・研究員

研究者番号：90724336

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)：肺微小血管内皮細胞からの低容量Poly:IC曝露によるIL-33の産生誘導・放出は、単純な細胞の死や破壊によるものではなく、IL-33 mRNA合成を伴う能動的な産生機序であることを明らかにした。またウイルス感染時のIL-33誘導メカニズムとして、インフルエンザウイルス(H1N1)は肺微小血管内皮細胞では増殖しないが、気道上皮細胞にH1N1が感染し、増殖・複製する際にdsRNAを生成し、上皮障害によって放出されたdsRNAが肺微小血管内皮細胞に直接作用することで、TLR3及びIFN関連遺伝子(IFIT1)の有意な上昇を引き起こし、その後IL-33誘導を引き起こすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルス感染による喘息発症や増悪に決定的なサイトカインであるIL-33は上皮細胞内で恒常的に発現しており、細胞傷害(ネクロシス)によって放出され機能すると考えられてきた。しかしながら本研究では、ウイルス感染後の喘息増悪に関与するIL-33は気道上皮細胞ではなく肺微小血管内皮細胞が主要な産生源であること、さらに肺微小血管内皮細胞からのIL-33誘導はネクロシスを介さない能動的な機序で産生されることを明らかにした。本研究により明らかとなった肺微小血管内皮細胞からの新規IL-33誘導を標的とすることで、ウイルス感染を契機とする喘息発症・重症化の予防・治療戦略の提供が可能となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In response to low concentration of poly:IC, IL-33 protein production in human lung microvascular endothelial cells was not due to simple cell death or cell destruction, but to an active production mechanism that accompanied with IL-33 mRNA synthesis. Using influenza virus (H1N1) experiment, although H1N1 failed to multiply in lung pulmonary microvascular endothelial cells, it can produce dsRNA during viral multiplication in airway epithelial cells. Thus, after airway epithelial damage upon viral exposure, released dsRNA acted directly on lung microvascular endothelial cells and induced significant upregulation of TLR3 and IFN-related gene (IFIT1) expression, followed by upregulation of IL-33 mRNA/protein induction in lung microvascular endothelial cells.

研究分野：アレルギー

キーワード：IL-33 気管支喘息 ウイルス感染 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

【ウイルス感染とIL-33と喘息】

気管支喘息の本態は慢性好酸球性炎症(2型炎症)はであり、ウイルスによる気道感染は喘息の増悪だけでなく、喘息の発症に重要な役割を演じることが明らかとなっている。IL-33はウイルス感染による気道上皮細胞の傷害によって放出され、獲得免疫系と自然免疫系の両方を活性化し、喘息の難治化と重症化を引き起こすと考えられている。また複数のゲノムワイド関連遺伝子解析から、その多型は人種を問わず気管支喘息発症に強く関連することが報告されており、重症喘息患者組織中ではIL-33のmRNAと蛋白の上昇が確認されている。IL-33中和抗体(REGN3500)は肺機能の改善など臨床症状を緩和することから、臨床面からもIL-33は喘息増悪に重要な因子である。

【IL-33の産生機序】

IL-33はその機能が喘息発症や増悪に決定的な因子であるにも関わらず、生合成経路については不明な点が多い。IL-33は主に上皮細胞に恒常的に発現し、ウイルス感染などで傷害を受けたネクローシス細胞から受動的に放出され、Danger Signal (危険信号)として働くが、アポトーシスではカスパーゼの作用によって不活性化されると報告されている。しかし、IL-33は喘息発症に決定的かつ上皮傷害で放出するとされているのにも関わらず、喘息発症に先立つ反復喘鳴を起こした乳幼児の鼻咽頭吸引液中ではIL-33は上昇していなかった(図1)。鼻汁中のIL-33は鼻腔および気道上皮細胞由来のIL-33の量を反映していると考えられることから、ウイルス感染時には上皮細胞以外のIL-33の産生源が存在する可能性が示唆された。

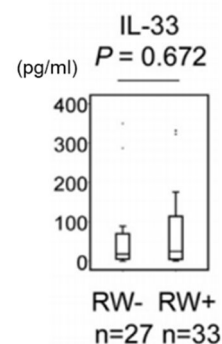
【新規IL-33誘導機序】

本研究に先立ち、我々はウイルス感染後のIL-33の主要な産生細胞を探索するために、ウイルスdsRNAの合成アナログ(polyI:C)を用いて様々な気道構成細胞(上皮、血管内皮、線維芽、平滑筋細胞)を刺激する予備検討を行った。すると驚くべきことに、IL-33の主要産生細胞とされている気道上皮細胞ではなく、肺微小血管内皮細胞のみIL-33 mRNAと蛋白の著しい増強を認めた(図2)。また、このIL-33誘導は、様々なPAMPsや炎症性サイトカイン(合計14種類)による刺激や、肺以外の臓器由来の内皮細胞では誘導されず、polyI:C刺激後の肺微小血管内皮細胞に特異的であることが明らかとなった。

2. 研究の目的

IL-33の産生機序は未だ不明な点が多く、これまでIL-33は細胞破壊で放出されるという考えが定説になっており、短時間で一過性に蛋白が放出される報告のみである。一方、我々が見出した新規産生誘導機序は、polyI:C刺激後に死細胞から放出(ネクローシス)されるのではなく、36時間以降と非常に長い時間をかけてIL-33を誘導する機序であり、産生されるIL-33の量は上皮細胞からの産生量や細胞破壊で放出される量よりはるかに多いことから、ウイルス感染では、肺微小血管内皮細胞が主要なIL-33の産生源なり、細胞破壊とは異なる機序で喘息発症や増悪に関与している可能性が示唆される。

疫学的に、下気道炎による喘息発症のリスク増大はウイルスの種類によらないことから、本研究で



Suagi K et al. J Allergy Clin Immunol. 2016;137(3):774-81

図1. 乳幼児初回喘鳴時の鼻咽頭吸引液中ではIL-33は上昇しない。

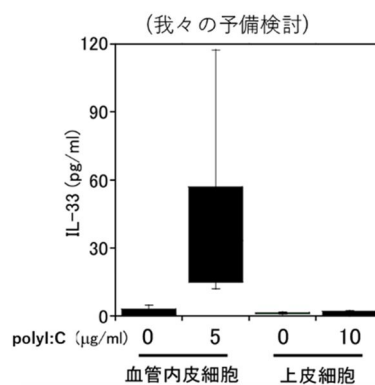


図2. 肺血管内皮細胞は上皮細胞よりIL-33を産生する

はpolyI:Cおよびインフルエンザウイルスを用いて肺微小血管内皮細胞からの新規IL-33産生誘導機構を解明することで、ウイルス感染を契機とする喘息発症・重症化の予防・治療戦略の基盤となる情報提供を目的としている。

3. 研究の方法

1) 細胞死とIL-33 産生誘導機序の解明

(a) アポトーシスとIL-33 誘導についての検討

カスパーゼ阻害剤の存在下でIL-33産生誘導を検討する。またIL-33誘導を引き起こす成分が液性成分かそれとも細胞成分かを検討するため、マクロファージと共培養し、IL-33mRNA誘導量をqPCRで測定した。

(b) IL-33 誘導が細胞外に分泌された分子か細胞内分子による誘導か検討する

IL-33はpolyI:C刺激後、非常に遅く(36時間)誘導されることから、細胞外に分泌された分子がIL-33誘導に関与するか、polyI:C刺激後の細胞上清を用いてIL-33mRNA誘導量をqPCRで測定した。

(c) ネクローシスを起こした細胞成分によるIL-33 誘導の検討

ネクローシスを起こした細胞成分ではIL-33誘導が起きないことの確認として、気道上皮細胞や肺血管内皮細胞の細胞破碎液中を用いてIL-33mRNA誘導活性を測定した。

2) インフルエンザウイルス感染とIL-33 産生誘導

本研究では、ウイルス成分が内皮細胞にまで到達する重症感染を想定し、喘息発症と増悪が報告されているインフルエンザウイルスA (H1N1)を用いてIL-33誘導を測定した。ウイルス感染はまずは気道上皮細胞で起こるため、本研究では肺微小血管内皮細胞への直接感染のみではなく、気道上皮細胞で増殖したウイルス由来dsRNAを介したIL-33の誘導量も測定した。

(a) H1N1感染後の気道上皮細胞が増殖・複製する際に生成するdsRNAの肺微小血管内皮細胞におけるIL-33産生誘導の検討

(b) H1N1 感染後の肺微小血管内皮細胞における IL-33 産生誘導の検討

4. 研究成果

1) 細胞死とIL-33産生誘導機序の解明

気管支喘息発症や増悪に決定的なサイトカインIL-33は定説では細胞内に恒常的に発現した蛋白が細胞傷害(ネクローシス)により放出され機能すると考えられている。しかしながら、定説と異なり、肺微小血管内皮細胞ではウイルス由来dsRNAアナログ(polyI:C)刺激後、TLR3を介する新規機序でIL-33mRNA発現を誘導することを明らかにした。(図3)

(a) **アポトーシスとIL-33 誘導についての検討:** polyI:C刺激後のIL-33産生誘導は、個々のカスパーゼ阻害剤の存在下では有意に抑制できなかった。また細胞上清中に存在するIL-33誘導因子は液性成分かそれとも細胞成分かを検討するため、polyI:C刺激後の肺微小血管内皮細胞とマクロファージ(U937)を共培養し、細胞成分を取り除くことでIL-33誘導活性を検討した。以上のことから、polyI:C刺激後に細胞外に放出する因子がIL-33誘導に関与していることを明らかにした。

(b) ネクローシスを起こした細胞成分によるIL-33誘導の検討:

肺微小血管内皮細胞から能動的にIL-33が誘導されていることを確認するため、気道上皮細胞と

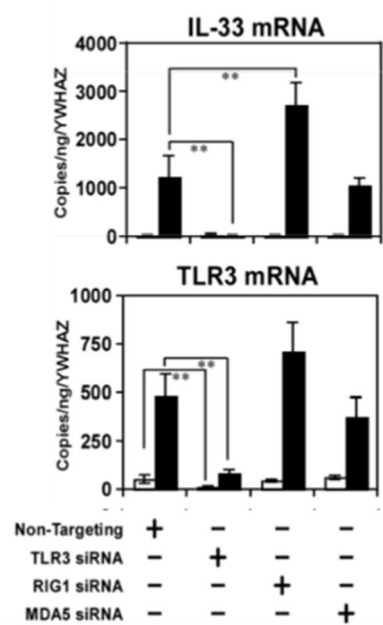


図3 polyI:C刺激後のIL-33はTLR3を介して誘導される

肺微小血管内皮細胞の細胞破砕液を用い、新たに用意した肺微小血管内皮細胞に作用させた。既報通り、細胞破砕液中には微量のIL-33蛋白が存在したが、肺微小血管内皮細胞に細胞破砕液を直接作用させてもIL-33mRNA/proteinの誘導は確認できなかった。

以上のことから、肺微小血管内皮細胞からの低容量Poly:IC曝露によるIL-33の産生誘導・放出は、単純な細胞の死や破壊によるものではなく、能動的な産生であると考えられる。

2) インフルエンザウイルス感染とIL-33 産生誘導

インフルエンザウイルス(H1N1)は、国立感染症研究所 感染病理部より譲渡して頂き、成育医療研究センター研究所にてウイルス価測定の系を立ち上げた。肺微小血管内皮細胞にA/PuertoRico/8/34(H1N1)株を添加して上清中のIL-33濃度を測定したが、全く産生誘導が認められなかった。そこで肺微小血管内皮細胞でのH1N1の増殖能を確認したところ、肺血管内皮細胞にH1N1は感染するものの、増殖を起こさず、dsRNAも生成していないためTLR3の刺激が入らずIL-33誘導が起きないことが明らかになった。そこで、H1N1の増殖が確認されている気道上皮細胞株(A549)にH1N1を感染させ、ウイルスを増殖・複製する際に生成するdsRNAを刺激実験に用いることにした。H1N1を感染させた気道上皮細胞株の細胞破砕液中のdsRNAを肺微小血管内皮細胞に48時間作用させたところ、IFN関連遺伝子(IFIT1)の有意な上昇と、若干のIL-33mRNA誘導を確認した。(図4)

以上のことから、肺微小血管内皮細胞からの低容量 poly:I:C曝露によるIL-33の産生誘導・放出は、単純な細胞死や細胞破壊によるものではなく、IL-33 mRNA合成を伴う能動的な産生機序であることを明らかになった。またウイルス感染時の血管内皮細胞からのIL-33誘導メカニズムとして、気道上皮細胞に感染したウイルスが、増殖・複製する際にdsRNAを生成し、その後上皮傷害によって放出されたdsRNAが肺微小血管内皮細胞に直接作用することでIL-33誘導を引き起こすことを明らかにした。

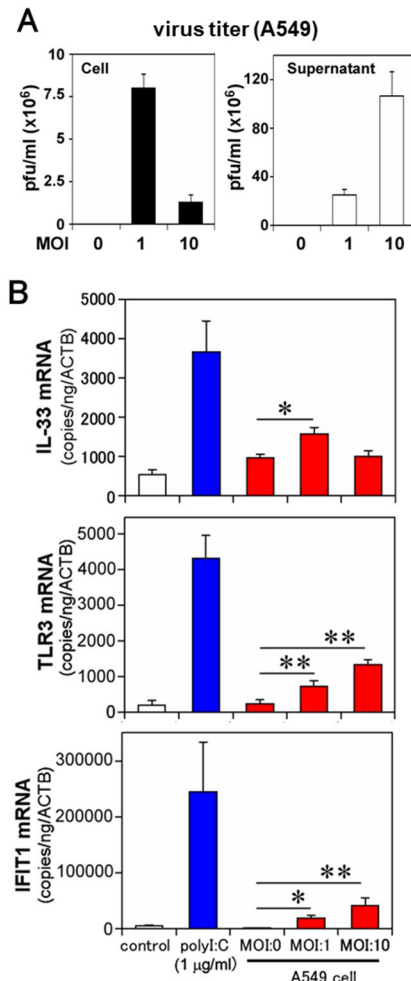


図4 H1N1を感染後の上皮細胞(A549)の細胞上清を血管内皮細胞に作用させるとIL-33が誘導する

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 0件）

1. 著者名 Emi-Sugie Maiko, Shoda Tetsuo, Futamura Kyoko, Takeda Tomohiro, Ainai Akira, Hasegawa Hideki, Saito Hirohisa, Matsumoto Kenji, Matsuda Akio	4. 巻 146
2. 論文標題 Robust production of IL-33 and TSLP by lung endothelial cells in response to low-dose dsRNA stimulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 1449 ~ 1452.e2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaci.2020.03.042	査読の有無 有
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Emi-sugie M, Kato M, Miyaji Y, Narita M, Hirai K, Shoda T, Ota M, Inagaki S, Yamamoto-Hanada K, Natsume O, Saito H, Ohya Y, Mochizuki H, Matsumoto K
2. 発表標題 Low serum IFN-related molecule levels in wheezing young asthmatics
3. 学会等名 Asia Pacific Academy of Pediatric Allergy, Respiriology&Immunology（国際学会）
4. 発表年 2022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
---------	---------