

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09719

研究課題名(和文) セリンプロテアーゼインヒビターを標的とした好酸球性炎症の病態解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Pathophysiology and Treatment of Eosinophilic Inflammation Targeting Serine Protease Inhibitors

研究代表者

中村 晃 (Nakamura, Akira)

東北医科薬科大学・医学部・教授

研究者番号：20344723

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)：SLPI(Serine leukoprotease inhibitor)は、生体の代表的なセリンプロテアーゼインヒビターである。本研究は、好酸球性炎症性疾患である好酸球性副鼻腔炎において、SLPIとの疾患関連性やバイオマーカーとしてのSLPIの可能性を追求し、SLPIの発現制御機構を分子レベルで検討し、疾患の原因・増悪因子を突き止めることを主な目的とした。承認された病理検体および末梢血好酸球を用いて解析を行なった。その結果、好酸球性副鼻腔炎に罹患した多くの症例で、好酸球のSLPIの発現が低下していた。SLPIの転写に関わる因子を探索したところNrf2の発現が低下していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鼻腔内にポリープが多発する好酸球性副鼻腔炎は、ポリープ切除後も再発率が50%以上と高く、中耳炎を併発すると聾に至る指定難病である。近年、好酸球性副鼻腔炎のみならず好酸球性消化管疾患の罹患者が増加しており、ステロイドが主な治療法であることから、副作用の観点から新規治療薬の開発が急がれている。本研究ではSLPIの発現が好酸球性副鼻腔炎患者で低下していることを見出し、さらに酸化ストレスに関わるNrf2の発現も低下していることを見出した。本研究結果から、好酸球性副鼻腔炎の発症に関わる新たな分子が明らかになった。今後、これらの分子を標的とした治療薬の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：SLPI (Serine leukoprotease inhibitor) is a representative serine protease inhibitor. The main objective of this study was to investigate the disease association with SLPI and the potential of SLPI as a biomarker in eosinophilic inflammatory diseases, eosinophilic sinusitis, and to investigate the regulatory mechanism of SLPI expression at the molecular level to determine the causative and exacerbating factors of the diseases. We found the downregulation of SLPI expressions in eosinophils of many cases with with eosinophilic sinusitis. We also investigated the factors involved in SLPI transcription and found that Nrf2 expression of eosinophils was downregulated in patients with eosinophilic sinusitis.

研究分野：免疫学

キーワード：好酸球性副鼻腔炎 セリンプロテアーゼインヒビター

1. 研究開始当初の背景

アレルギー反応のエフェクター細胞である好酸球は、細胞外マトリックスを破壊する MMP-9 などのセリンプロテアーゼを分泌して組織内に大量に浸潤し、過剰な炎症を惹起する。一方、生体にはセリンプロテアーゼを抑制するインヒビターが存在する。なかでも SLPI は、上皮細胞やマクロファージに発現し、プロテアーゼ活性のみならず転写レベルで細胞活性を抑制するなど多彩な作用を有している。申請者らは、SLPI がマウスの好塩基球と好酸球に発現していることを世界で初めて明らかにしている (Matsuba S, et al, *Front in Immunol.* 2017)。特に SLPI を欠損した好酸球は、サイトカイン産生や浸潤能が亢進しており、喘息モデルでは、SLPI 欠損マウスにおいて著名な好酸球浸潤を認めた。また、SLPI 欠損好酸球では、LPS 刺激後に、NF- κ B 経路ではなく、JNK1 及び下流の転写因子 Elk-1 のリン酸化が亢進しており (図 1)、SLPI が JNK1 の足場タンパク質である JIP (JNK-interacting protein) 3 に結合していたことから、JIP3-JNK1-Elk-1 経路を制御していることが判明した。さらに申請者らは、ヒト末梢血好酸球では、SLPI が他の白血球分画と比較して高発現していることを見出した。一方、近年、上気道好酸球性炎症疾患や好酸球性消化管疾患の罹患者が増加しており、なかでも鼻腔内にポリープが多発する好酸球性副鼻腔炎は、ポリープ切除後でも再発率が 50%以上と高く、中耳炎を併発すると聾に至る指定難病である。申請者らは、少数例の好酸球性副鼻腔炎及び鼻茸患者の組織において、好酸球の SLPI 発現について検討を行った。その結果、SLPI は鼻茸患者組織内の好酸球では検出されたが、好酸球性副鼻腔炎では、好酸球が顕著に浸潤しているにも関わらず、全例とも好酸球の SLPI の発現は殆ど認められなかった (図 3)。この結果は、SLPI 欠損マウスで得られた所見と一致しており、ヒト疾患においても SLPI の発現低下が、過剰な好酸球性炎症につながる可能性を強く示唆する所見と考えられた。さらに、アレルギー性鼻炎や気管支喘息患者で、血清や粘膜上皮細胞の SLPI 発現が有意に低下していることから、疾患との関連性が示唆されている (Runndhal M, et, al. *J Clin Invest.* 2015)。しかしながら、これまでヒト好酸球での SLPI の発現の有無や疾患との関連性を示した報告は全くない。好酸球性炎症疾患でも SLPI との相関は強く示唆されるため重要な研究課題と考えた。先天性好中球減少症では SLPI の発現が低下し、顆粒形成に異常を与えることが判明している。SLPI の転写因子の一つである C/EBP の発現を、エラストラーゼの遺伝子変異が低下させることが原因とされた (Klimenkova O, et al. *Blood* 123,1239-49, 2014)。一方、好酸球性副鼻腔炎でのゲノムワイド関連解析やエピゲノムワイド関連解析では、アトピー性皮膚炎や気管支喘息で行われた従来の報告とほぼ変わらない遺伝子がマッピングされており、SLPI やその転写因子との関連性は指摘されていない。これらの大規模スタディは、末梢血白血球や上皮組織切片をサンプルとして用いており、好酸球性炎症疾患に特徴的な細胞の絞り込みがなされておらず、重要な遺伝子を検出できなかった可能性が高い。そこで SLPI の発現が低下している組織・検体の好酸球での解析により、疾患の原因・増悪に関わる遺伝子がより明確になると考えられた。好酸球性炎症疾患は、現在もなお経口ステロイドが唯一の治療法で、代替する新規の治療薬の開発のためにも疾患の原因や増悪因子の解明や創薬につながる研究は急務である。SLPI を指標として原因や増悪に関する遺伝子を絞り込み、さらに新規バイオマーカーとしての SLPI の有用性の追求、また標的分子を明確にした治療法の検討は、学術的にも臨床的にも意義深い研究であると考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究は、指定難病の上気道好酸球性炎症疾患及び好酸球性消化管疾患において、SLPI 発現及びその転写因子の発現を病理組織学的に検討し、網羅的遺伝子解析を通じて、好酸球性炎症疾患の新たな原因・増悪に関与する分子を明らかにすることを目的とする。また、マウス副鼻腔炎・好酸球性食道炎モデルにおいて、SLPI ペプチドや SLPI が抑制している Elk-1 経路の阻害剤の有効性を追求し、臨床応用への基盤研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 保存検体を用いた好酸球性炎症疾患の病理組織学的検討

好酸球性副鼻腔炎 (中耳炎合併例含む) 及び好酸球性消化管疾患での病理組織での SLPI 発現解析を行う。東北医科薬科大学病院耳鼻咽喉科および消化器内科においてガイドラインに従い確定診断された好酸球性副鼻腔炎 (指定難病 306)・木村病及び対象群として非好酸球性疾患 (鼻茸、肥厚性鼻炎及び上部下部消化管生検検体) のホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いて SLPI の発現を免疫染色により検出した (各群 30 症例を登録した)。

(2) 好酸球性炎症疾患における血清 SLPI 及び炎症関連分子の検討

実験 1 の保存血清さらに順次登録した症例において SLPI 及び好酸球が分泌する MMP9 の発現解析を行なった。コロナ感染症対応のために患者血清の確保が大幅に遅れたが、好酸球性副鼻腔炎の重症患者の検体 (5 症例) を採取することができた。健常者検体と SLPI および SLPI の転写に関わる分子の発現を免疫染色および定量的 PCR 法にて検討した。

4. 研究成果

(1) 保存検体を用いた好酸球性炎症疾患の病理組織学的検討

好酸球性副鼻腔炎（指定難病 306）・木村病及び対象群として慢性副鼻腔炎（肥厚性鼻炎）症例で病理解析を行なった。HE 染色およびアミロイドを染色する DFS(direct fast scarlet)染色を行い好酸球を同定し、SLPI の発現解析を行なった。その結果、好酸球性副鼻腔炎および木村病では好酸球での SLPI の発現が顕著に低下していた（図 1 および表 1）。

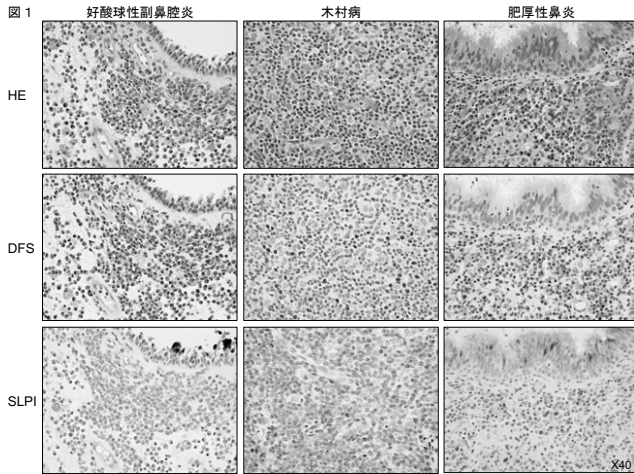


図 1: 好酸球性副鼻腔炎の好酸球における SLPI の発現解析

HE、DFS 染色（アミロイド染色）及び SLPI の免疫組織染色像を示す。DFS 陽性細胞（好酸球）における SLPI の発現は好酸球性副鼻腔炎及び木村病の患者で低下していた。一方、粘膜上皮細胞では SLPI は発現していた。また、肥厚性鼻炎の好酸球では SLPI の発現は低下していなかった。

表 1

	好酸球性副鼻腔炎	木村病	慢性副鼻腔炎
Eosinophils (%)	68.1±22.6**	47.1±20.6*	9.3±4.8
SLPI± eosinophils (%)	100**	100**	42.9±2.5
SLPI+/+ eosinophils (%)	0	0	57.1±2.5
Nrf2± cells/eosinophils (%)	93.5±22.6	91.0±6.7	54.7±25.8
Nrf2+/+ cells/eosinophils (%)	6.4±7.7**	6.8±2.1**	50.8±16.7

(2) 好酸球性炎症疾患における血清 SLPI 及び炎症関連分子の検討

血清より採取した好酸球において SLPI、MMP9 及び転写因子の発現解析を行なった。当初想定していた MMP9 の発現は、好酸球性副鼻腔炎と肥厚性鼻炎患者での有意な差を認めなかったが、SLPI の転写因子の一つで酸化ストレスに関わる転写因子 Nrf2 の発現が低下していた。そこで病理組織標本での解析を行なったところ、好酸球性副鼻腔炎及び木村病でも Nrf2 の発現が低下していた（表 1 及び図 2）。この結果から、SLPI 及び Nrf2 が好酸球性炎症性疾患において重要な役割を果たしていることが判明した。SLPI の補充療法や Nrf2 活性化薬が好酸球性炎症性疾患の新たな治療法につながる可能性が示唆された（投稿準備中）。

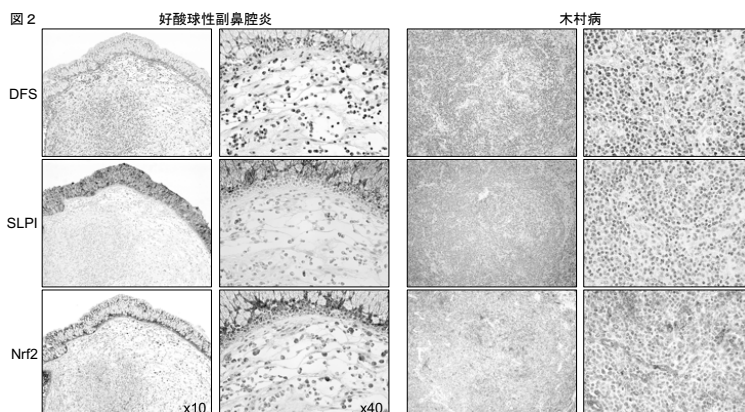


図 2: 好酸球性副鼻腔炎の好酸球における SLPI 及び Nrf2 の発現解析

DFS 染色、SLPI の及び Nrf2 の免疫組織染色像を示す。Nrf2 は粘膜上皮細胞では発現が認められたが、好酸球では発現が低下していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kohada Y, Kuromoto A, Takeda K, Iwamura H, Atobe Y, Ito J, Kaifu T, Kaiho Y, Nakashima I, Hinata N, Nakamura A, Sato M	4. 巻 2
2. 論文標題 Circulating PMN-MDSC level positively correlates with a poor prognosis in patients with metastatic hormone-sensitive prostate cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Urology	6. 最初と最後の頁 967480
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fruro.2022.967480	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 -
1. 著者名 Morimoto A, Kikuta J, Nishikawa K, Sudo T, Uenaka M, Furuya M, Hasegawa T, Hashimoto K, Tsukazaki H, Shigeto Seno S, Nakamura A, Okuzaki D, Sugihara F, Ninomiya A, Yoshimura T, Takao-Kawabata R, Matsuda H, Ishii M	4. 巻 12
2. 論文標題 SLPI is a critical mediator that controls PTH-induced bone formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-22402-x	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 -
1. 著者名 Kohada Yuki, Kaiho Yasuhiro, Takeda Kazuya, Kuromoto Akito, Ito Jun, Teishima Jun, Nakamura Yasuhiro, Kaifu Tomonori, Nakamura Akira, Sato Makoto	4. 巻 4
2. 論文標題 Analysis of the circulating myeloid derived suppressor cells during androgen deprivation therapy for prostate cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 IJU Case Reports	6. 最初と最後の頁 367 ~ 370
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/iju5.12351	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 -
1. 著者名 Hiroki Shimada, Shuko Hata, Yuto Yamazaki, Yuri Otsubo, Ikuko Sato, Kazue Ise, Atsushi Yokoyama, Takashi Suzuki, Hironobu Sasano, Akira Sugawara, Yasuhiro Nakamura	4. 巻 23
2. 論文標題 YM750, an ACAT Inhibitor, Acts on Adrenocortical Cells to Inhibit Aldosterone Secretion Due to Depolarization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12803
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms232112803	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 -

1. 著者名 Shuko Hata, Hiroki Shimada, Naomi Sato, Mayu Koshiishi, Kazue Ise, Tomoaki Ogata, Shinichi Yamashita, Akihiro Ito, Hironobu Sasano, Yasuhiro Nakamura	4. 巻 55
2. 論文標題 Expression and clinicopathological significance of glucocorticoid receptor, SGK1, and NDRG1 in hormone naive prostate carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 283-291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-022-00332-x	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 -

1. 著者名 Nobuo Ohta, Shion Shirane, Shigeru Fukase, Rei Kawata, Teruyuki Sato, Nozomi Satani, Takahiro Suzuki	4. 巻 12
2. 論文標題 OK-432 Treatment of Ranula Intruding into the Cervical Region	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinics and Practice	6. 最初と最後の頁 215-218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/clinpract12020025	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10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 澤邊敦哉、中村晃、後飯塚僚、海部知則
2. 発表標題 Gタンパク質共役受容体の機能不全による中枢神経系自己免疫疾患の増悪化機序の解析
3. 学会等名 第195回日仏生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuya Takeda, Tomonori Kaifu, Akira Nakamura
2. 発表標題 Analysis of sialylated glycolipids and N-glycans between Theiler's murine encephalomyelitis virus binding and non-binding cells
3. 学会等名 第50回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kaifu T, Chung S-H, Nakamura A, Iwakura Y
2. 発表標題 Interaction of DCIR and asialo-N-glycan ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating DC function
3. 学会等名 第50回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田和也、姫田敏樹、海部知則、大原義朗、中村晃.
2. 発表標題 タイラーマウス脳脊髄炎ウイルス受容体に関する糖脂質・糖タンパク質の解析
3. 学会等名 第68回 日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澤邊敦哉、中村晃、後飯塚僚、海部知則
2. 発表標題 自己免疫疾患におけるGタンパク質共役型受容体の機能解析
3. 学会等名 第85回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉村成央、大類孝、武田和也、海部知則、中村晃、跡部百合、佐々木高信、菅原崇史、田畑俊治
2. 発表標題 Dynamic alteration of peripheral immune cells in patients with advanced NSCLC received anti-PD-1 therapy and clinical efficacy
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 吉村成央、大類孝、武田和也、海部知則、中村晃、跡部百合、佐々木高信、菅原崇史、田畑俊治
2. 発表標題 Dynamic alteration of peripheral immune cells in patients with advanced NSCLC received anti-PD-1 therapy and clinical efficacy
3. 学会等名 第18回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉村成央、大類孝、武田和也、海部知則、中村晃、跡部百合、佐々木高信、菅原崇史、田畑俊治
2. 発表標題 Dynamic alteration of peripheral immune cells in patients with advanced NSCLC received anti-PD-1 therapy and clinical efficacy
3. 学会等名 第18回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大友 梓、川向俊朗、吉村成央、田中章子、海老名雅仁、大類孝、黒澤恵美子、武田和也、海部知則、中村晃
2. 発表標題 ペンブロリズマブにより早期に高度のPseudoprogressionを認めた肺腺癌の1例
3. 学会等名 第59回日本肺癌学会東北支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 海部知則、武田和也、岩倉洋一郎、中村晃
2. 発表標題 C型レクチン受容体欠損による中枢神経系自己免疫疾患自然発症機序の解明
3. 学会等名 第67回日本実験動物学会総会
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	太田 伸男 (Ohta Nobuo) (20282212)	東北医科薬科大学・医学部・教授 (31305)	
研究 分担者	中村 保宏 (Nakamura Yasuhiro) (80396499)	東北医科薬科大学・医学部・教授 (31305)	

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