

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17176

研究課題名（和文）気管支喘息、COPDの新規バイオマーカーの探索：NGAL、sRAGEに着目して

研究課題名（英文）Search for new biomarkers in asthma and COPD: focus on NGAL and sRAGE

研究代表者

松崎 博崇 (Matsuzaki, Hirotaka)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：00782187

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）：Papainの反復気管内投与によりACOの病態を反映したマウスモデルが作成できないか検討したところ、気腫、アレルギー性気道炎症、気道過敏性亢進をもたらす事が示された。またBALF中のサイトカインアレイ解析から、本モデルは喘息やCOPDの気道炎症の特徴を反映すると考えられた。バイオマーカー候補のNGALやsRAGEのBALF中の挙動もヒトと一致し、良好なマウスモデルと考えられた。型肺胞上皮細胞のシングルセル解析にて喘息やCOPDモデルと比較してACO群に特異的な3つのクラスター(Atf5+ AT2, Meg3+ AT2, Il4i1+ AT2)を同定した。また、広くNGALの高発現を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過去にACOの病態を良好に反映したマウスモデルが開発されておらず、病態解明に向けて障壁となっていたが、本研究により良好なACOマウスモデルが樹立され、さらに新たな病態形成を担う可能性のある分子を認めた。また、NGALのバイオマーカーとしての可能性を示唆する結果を得た。本マウスモデルを用いることで、ACOにおけるバイオマーカーや治療標的分子の同定に向けた研究が期待でき、現在解析を進めている。

研究成果の概要（英文）：Repeated intratracheal administration of papain was investigated to see if a mouse model reflecting the pathology of ACO could be created and was shown to produce emphysema, allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness. The behaviour of biomarkers such as NGAL and sRAGE in BALF was also consistent with that in humans and was considered a good mouse model. Single Cell RNA Seq Analysis of type II alveolar epithelial cells showed a marked increase in the proportion of cells in the Atf5+, Il4i1+ and Meg3+ clusters in the ACO model, suggesting that they may be responsible for the pathogenesis. High expression of NGAL was widely observed in each cluster.

研究分野：喘息、COPD

キーワード：ACO 喘息 COPD バイオマーカー 型肺胞上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患 (COPD: chronic obstructive pulmonary disease) は世界的に有病率が高く、未だに予後が悪い疾患である。喘息と COPD が併存する病態 (ACO: asthma-COPD overlap) も知られ、気管支喘息、COPD 単独と比較して病態の進行が早く、急性増悪の頻度や重症度が高く合併症が多いとの報告がある。近年になり分子病態に即した気管支喘息や COPD の層別化 (エンドタイピング) に基づく治療法選択の重要性が認識されつつあるが、現在診断に活用できるバイオマーカーは気管支喘息の一部に限られ、気管支喘息・COPD・ACO の診断に広く応用できるバイオマーカーの開発が極めて重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究では気管支喘息・COPD・ACO の診断の補助や治療応答性の評価に役立つ新規バイオマーカーとして、喀痰・血液・気管支肺胞洗浄液で安定的かつ簡便に検出が可能な NGAL および RAGE・sRAGE を中心に着目し、マウスモデルを用いた研究を行い、臨床応用への基盤となる知見を創出する事を目的とした。また、その過程で ACO の病態を良好に反映したマウスモデルが存在せず、その樹立が重要と考えた。

3. 研究の方法

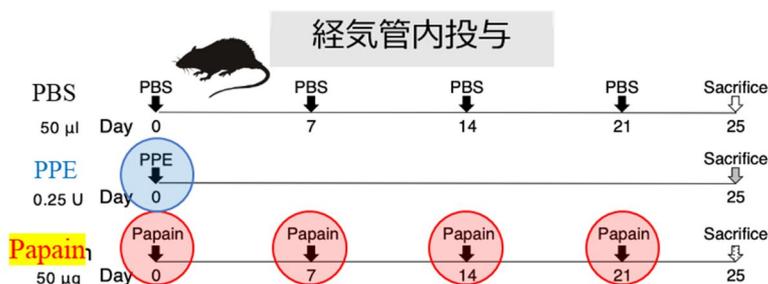
(1) コントロール、(2) COPD モデル、(3) 気管支喘息モデル (好酸球性気道炎症モデル)、(4) ACO モデルを比較する。

まずは ACO マウスモデルの構築に取り組んだ。植物パパイアに由来するシステインプロテアーゼであるパパイン (Papain) に注目した。Papain は食肉加工や製薬にも用いられ、臨床的には Papain に起因する職業性喘息が過去に報告されている。マウス研究において、Papain により肺上皮細胞の障害が生じ、上皮由来のサイトカイン (IL-33, TSLP, IL-25) が放出され、ILC2 などの自然免疫系や Th2 細胞が活性化され、急性から亜急性の好酸球性気道炎症が惹起されることが報告されている。また、システインプロテアーゼであるため、マウスモデルでの気腫の形成も報告されている。以上から、Papain を反復投与することにより ACO の病態を反映したマウスモデルが作成できないか検討した。

さらに (1) - (4) のマウスモデルの II 型肺胞上皮細胞を分離し、Bulk RNA-seq、シングルセル RNA-seq 解析を行い、発現比較を行った。

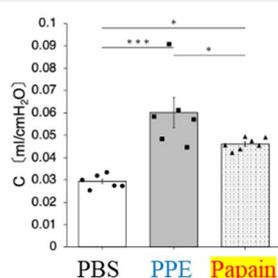
4. 研究成果

(1) ACO マウスモデルの構築

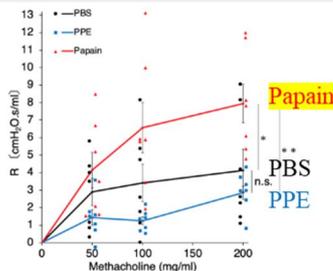


各々は気管内挿管を行い、スプレイヤーにて経気管内投与を施行した。コントロール群は PBS を使用し、COPD モデルはエラスターゼ (PPE: porcine pancreatic elastase) を用いた。

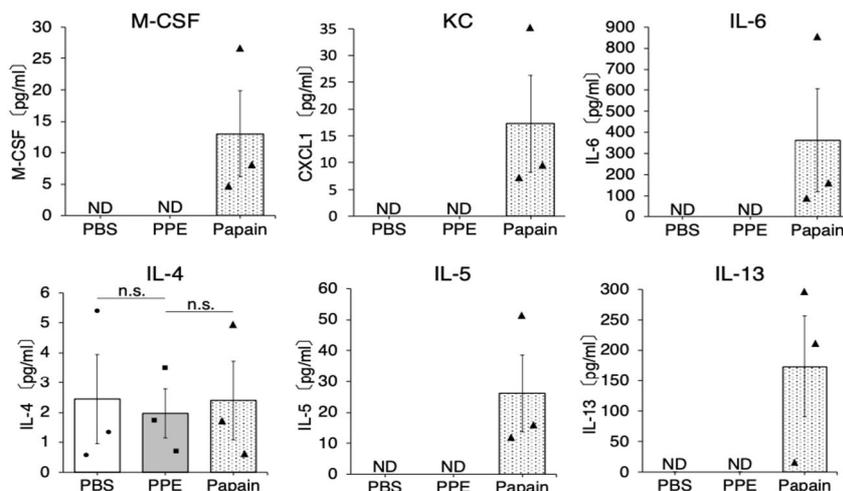
肺コンプライアンス



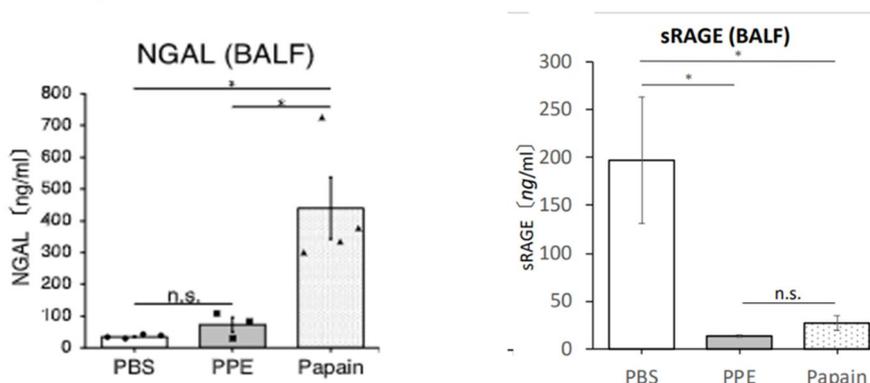
気道過敏性試験



フレキシベントによる呼吸生理の解析であるが、PPE 群及び、Papain 群で肺コンプライアンスの上昇を認め、Papain 群で気道過敏性の亢進を認めることが示された。病理組織上は、Papain を投与した組織では気腫の形成が見られ、肺組織中への好酸球浸潤が見られた。以上から、毎週の Papain の反復投与は、気腫、アレルギー性気道炎症、気道過敏性亢進をもたらす事が示された。



BALF中のサイトカインアレイ解析により、Papain 群でM-CSF(マクロファージコロニー刺激因子)、KC(好中球走化性因子)の上昇が見られた。また、IL-5、IL-13といったtype2 cytokineの上昇も見られた。Papainを用いたACOマウスモデルは喘息やCOPDの気道炎症の特徴を反映すると考えられた。また、血清の解析にてIgEの増加が見られた。



バイオマーカー候補として知られるNGAL及びsRAGEのBALF中の発現の解析を行った。Papain群ではBALF中のNGALの増加を認めた。これは、最終投与からさらに4週間あけた8週間後も同様の傾向が維持された。また、sRAGEを評価したが、Papain群及びPPE群で減少を示した。これはヒトで報告されている気道中の発現変動と一致した。

以上、併せるとPapainの反復投与はCOPD、気管支喘息の特徴を再現し、さらにはバイオマーカーの挙動も一致し、良好なマウスモデルと考えられた。本結果は、国際誌に報告した(Allergy.2021 Jan;76(1):390-394.)

(2)各マウスモデルのII型肺胞上皮細胞の解析

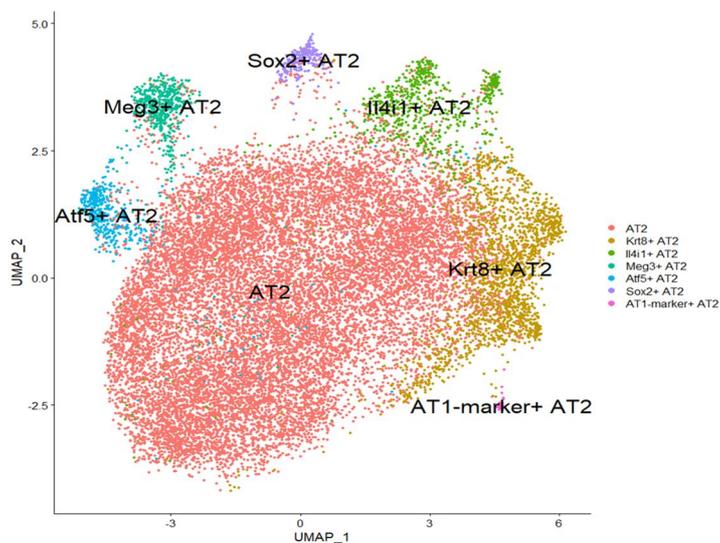
本マウスモデルを用いて、II型肺胞上皮細胞の解析を行った。まずはBulk RNA-seqを行った。コントロール群とPapain群が主成分分析によりきれいに分離され、全く異なるトランスクリプトームを示すことが分かった。クラスタリングを行い、IL-33、CXCL1などのサイトカイン、ケモカイン、Krt5などbasal cell markerがACO群で上昇を認めた。

Pathway解析にて、ACO群でinnate immune response, cytokine-mediated signaling pathway、IL-17 signaling等がenrichしていることが分かった。

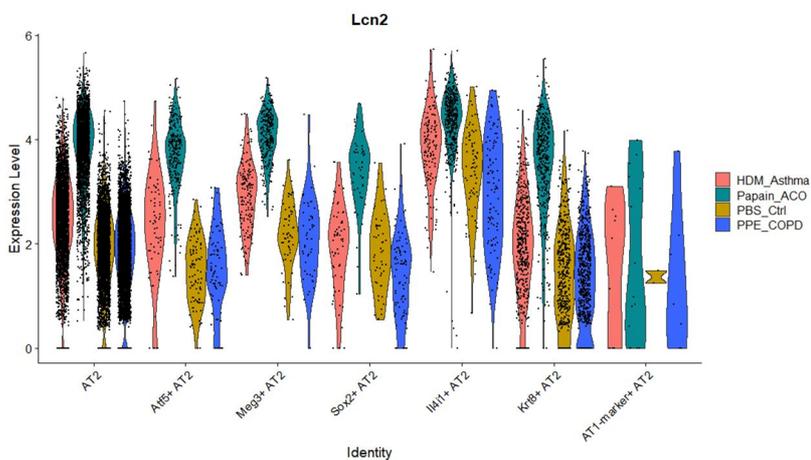
以上よりBulk RNA-seqからはACOモデルのII型肺胞上皮細胞はサイトカイン・ケモカインの産生などを含め、コントロール群と全く異なるトランスクリプトームを示した

次にII型肺胞上皮細胞(AT2)のシングルセル解析を行った。ACOモデル、喘息モデル、COPDモデル、コントロール群で行い、5000細胞 平均35000-50000リード数と非常に良いデータを得ることができた。喘息群はHDMを用いた。

ACO 特異的な AT2 subgroup の同定



各クラスターにおける NGAL の発現



シングルセル RNA-seq 解析により heterogeneity を探索したところ、喘息や COPD のマウスモデルでは認められなかった ACO 群に特異的な AT2 の 3 つのクラスター (Atf5+ AT2, Meg3+ AT2, Il4i1+ AT2) を同定した。ACO モデルでは Atf5+, Il4i1+, Meg3+ のクラスターの細胞比率が著増しており、これらの細胞が ACO の病態形成を担っている可能性が示唆された。また、NGAL (LCN2) の発現を確認したが、各クラスターにおいて広く NGAL の高発現を認めた。

以上から、本研究により Papain の反復投与により、良好な ACO マウスモデルを樹立され、新たな病態形成を担う可能性のある分子が同定された。また、NGAL のバイオマーカーとしての可能性を示唆する結果を得た。

さらに現在、ACO マウスモデルの AT2 の scATAC-seq 解析を行い、喘息モデル・COPD モデルとの比較検討を行っている。また肺組織を用いて空間的トランスクリプトーム解析 (VISIUM) を施行し、組織内での細胞の局在・発現などを検証している。II 型肺上皮細胞の不均一性とその特徴的転写ネットワーク形成、及び ACO の病態形成の解明に向けた解析を進めており、バイオマーカーや治療標的分子の同定に繋げていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Tanosaki T, Mikami Y, Shindou H, Suzuki T, Hashidate-Yoshida T, Hosoki K, Kagawa S, Miyata J, Kabata H, Masaki K, Hamamoto R, Kage H, Miyashita N, Makita K, Matsuzaki H, Suzuki Y, Mitani A, Nagase T, Shimizu T, Fukunaga K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 1 Deficiency Promotes Pulmonary Emphysema via Apoptosis of Alveolar Epithelial Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10753-022-01659-4.	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 Isago H, Mitani A, Kohno S, Nagoshi S, Ishimori T, Saito M, Tamiya H, Miyashita N, Ishii T, Matsuzaki H, Yatomi Y, Nagase T, Jo T.	4. 巻 44
2. 論文標題 The Japanese Herbal (Kampo) Medicine Hochuekkito Attenuates Lung Inflammation in Lung Emphysema	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull	6. 最初と最後の頁 39-45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00556.	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 Fukuda K, Matsuzaki H, Mikami Y, Makita K, Miyakawa K, Miyashita N, Hosoki K, Ishii T, Noguchi S, Urushiyama H, Horie M, Mitani A, Yamauchi Y, Shimura E, Nakae S, Saito A, Nagase T, Hiraishi Y.	4. 巻 76
2. 論文標題 A mouse model of asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap induced by intratracheal papain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 390-394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.14528. Epub 2020 Aug 19.	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 Miyashita N, Horie M, Mikami Y, Urushiyama H, Fukuda K, Miyakawa K, Matsuzaki H, Makita K, Morishita Y, Harada H, Backman M, Lindskog C, Brunnstr;m H, Micke P, Nagase T, Saito A.	4. 巻 489
2. 論文標題 ASCL1 promotes tumor progression through cell-autonomous signaling and immune modulation in a subset of lung adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Lett	6. 最初と最後の頁 121-132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2020.06.002. Epub 2020 Jun 10.	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 Yanagiya M, Hamaya H, Matsuzaki H, Ikemura M, Nakajima J.	4. 巻 110
2. 論文標題 Atypical Type A Thymoma Variant Manifesting Polymyalgia Rheumatica	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Thorac Surg	6. 最初と最後の頁 e253-e255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.athoracsur.2020.02.004. Epub 2020 Mar 7.	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
---------------------------	-----------------------	----

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