

令和 4 年 8 月 30 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17185

研究課題名(和文)肥満喘息の難治化における時計遺伝子と生体内細菌叢の関わり

研究課題名(英文) Relationship between clock genes and in vivo bacterial flora in obesity-associated asthma

研究代表者

高木 弘一 (TAKAGI, KOICHI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：40707866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：気道構成細胞の一つである肺線維芽細胞の培養細胞にHDAC阻害薬であるtrichostatin A (TSA)を添加することで、肥満と喘息の双方の病態への関わりが報告されているPGC-1、CD36の発現が抑制された。肥満の病態では時計遺伝子を介してHDACの活性化が制御されていることが報告されており、肥満合併喘息の病態にHDACの関与が示唆された。また、OVA感作、曝露にオゾン曝露を組み合わせ作成した喘息モデルにおいて、高脂質食を摂取させて作成した肥満マウスでは、controlと比較し有意な気道過敏性の亢進とTh2サイトカインの増加を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

気道構成細胞において、喘息と肥満の双方の病態に関わるPGC-1、CD36がHDACの活性化により制御を受けることが確認されたことで、HDAC及びHDACの活性化を制御する時計遺伝子が肥満合併喘息の難治化に関わる可能性が示された。培養細胞で認められた上記の反応が肥満マウスの喘息モデルの気道内で同様の反応が認められるか確認することで、HDAC及びHDACの活性化を制御する時計遺伝子が新たな肥満合併喘息の治療薬開発につながる可能性がある。また、今回の研究では喘息の病態を患者から採取したエクソソームで解析する新たな試みを行っており、今後の新しい研究手技についても検討を行っている。

研究成果の概要(英文)：Expressions of PGC-1a and CD36, which have been reported to be involved in both obesity and asthma, were suppressed by adding trichostatin A (TSA), an HDAC inhibitor, to cultured cells of lung fibroblasts. It has been reported that the activation of HDAC is regulated through the clock gene in the pathological condition of obesity, and it is suspected that HDAC is involved in the pathological condition of obesity-associated asthma. In addition, in an asthma model created by combining OVA sensitization and exposure with ozone exposure, obese mice prepared by ingesting a high-fat diet showed a significant increase in airway hyperresponsiveness and Th2 cytokines compared to control.

研究分野：喘息・COPD

キーワード：気管支喘息 肥満 時計遺伝子 CD36 オゾン エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は吸入ステロイドの普及によりコントロールが容易となり、喘息の死亡も大きく減少したが、依然として適切な治療を行っても症状のコントロールが不十分である難治性喘息が存在する。気管支喘息の重症化のリスク因子の一つに肥満があり、肥満合併喘息では吸入ステロイドの治療効果が減弱することが報告されているが、その機序については明らかにされていない。

腸内細菌叢の変化は喘息を誘発することが報告されている。食物繊維の少ない食事を摂取したマウスでの腸内細菌叢の変化喘息モデルの気道炎症を増悪させることが示されており、また、食物繊維の少ない食事を摂取したマウスは肥満傾向を認めることも報告されている。

近年の報告では、肥満と腸内細菌叢との関係に時計遺伝子が介在することが示されている。DNAの脱アセチル化に関わる Histon Deacetylase 3 (HDAC3) の活性化が腸内細菌叢により調節を受けることで脂質代謝に関わるが、興味深いことに腸内細菌叢による HDAC3 の調節は日内変動があり、その機序として時計遺伝子の制御に関わる REV-ERB が HDAC3 と nuclear receptor co-repressor との複合体形成を誘導し、各種遺伝子のアセチル化の日内変動に寄与していることが示されている。また、活性化された HDAC3 はエストロゲン関連受容体である ERR と細胞増殖に関わる PGC-1 と複合体を形成し、脂肪酸トランスポーターである CD36 の発現を亢進させ、高脂質食摂取マウスにおいて腸管内からの脂質の吸収を促進し、肥満を誘導する (Science 2019; 365:1428) 。ERR、PGC1、CD36 はそれぞれ喘息の病態に関わっていることが示されており (Am J Respir Cell Mol Biol 2019; 61:469) (J Immunol 2017; 199:1184) (Eur Respir J 2019; 54:1900300) 。腸内細菌叢から HDAC3、時計遺伝子を介して肥満に関わる前述の経路が肥満喘息の病態の中心的な役割を担うことが予測され、難治性肥満喘息に対する新規治療標的の開発につながる可能性がある。

exosome は、脂質二重膜で包まれた直径 50 ~ 150nm 程度の細胞外小胞である。核酸やタンパク質、脂質などを内包し、様々な細胞から分泌され細胞間のコミュニケーションに寄与している。近年、気管支喘息においても exosome 研究が行われており、喘息患者では健常者と比較し好酸球からの exosome 分泌が亢進すること (J Allergy Clin Immunol 2015; 135:1603) や、抗原提示細胞やリンパ球から分泌される各種サイトカインが exosome に内包されてレシピエント細胞に取り込まれることなど報告されている (Allergy 2015; 70:1651, Sci Rep 2018; 8:6065 など) が、気管支喘息の難治化における exosome の関与については明らかにされていない。

2. 研究の目的

肥満喘息の重症化及び治療抵抗の機序に、DNA の脱アセチル化に関わる HDAC の活性化を介した時計遺伝子及び脂肪酸トランスポーターの発現が関わっていることを明らかにする。また、細胞間のコミュニケーションに関わる exosome が肥満喘息の病態に関わっていることについても明らかにすることで、重症の肥満喘息に対する新規治療の可能性について模索する。

3. 研究の方法

気道上皮細胞、肺線維芽細胞の primary cell や気道上皮細胞の cell line (HBE-1 など)、抗原提示細胞の cell line (THP-1) を培養後、検体を採取し RNA 及び蛋白を抽出し、各種遺伝子、蛋白の発現を RT-PCR 法及び Western blot 法で調べた。肺線維芽細胞の培養細胞に、Lipofectamine iMAX を用いた small interfering RNA の遺伝子導入すること、HDAC 阻害薬添加、分化させた脂肪細胞の培養細胞との共培養による各種遺伝子、蛋白の発現の変化を調べた。

高脂質食の一定期間摂取により肥満マウスを作成した。肥満マウス、control マウスを day1、day15 に OVA をアジュバンドである Alum とともに経腹壁投与し、day26、27、28 に OVA をネブライザー投与し、喘息モデルを作成した。OVA 最終曝露後 24h に気道過敏性試験、気管支肺胞洗浄液を採取し、解析を行った。また、OVA の最終曝露後 3h に専用チャンバーを用いてオゾン曝露を行い、好中球性気道炎症を伴う喘息を再現したモデルを作成し、オゾン曝露後 24h に同様に気道過敏性試験、気管支肺胞洗浄液採取を行い、解析を行った。

肺癌の各種 cell line を用いて、細胞上清中の exosome を超遠心法で回収した。細胞及び exosome 上に発現する糖鎖は、PNGase を用いて切り出し後に蛍光標識を行い、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) と質量分析 (MS) にて糖鎖構造を解析した。また、exosome に内包される蛋白や遺伝子についても解析を行った。

4. 研究成果

肥満の病態と喘息の病態の双方への関わりが報告されている PGC-1、CD36、ERR について、気道構成細胞の各種培養細胞における発現を Western blotting で確認した。気道上皮細胞では HBE-1、NHBE (normal human bronchial epithelial cells) において、PGC-1、ERR の発現は認められたが、CD36 の発現を認めなかった。肺線維芽細胞 (normal human lung fibroblasts) では PGC-1、CD36、ERR の発現を全て認めた。肺線維芽細胞は、喘息難治化の一因である気道リモデリングに関わる細胞であり、肺線維芽細胞を用いて研究を進めた。

肺線維芽細胞の培養細胞に、HDAC 阻害薬である trichostatin A (TSA) 4 μ M を 24 時間添加し、喘息の病態に関わることが報告されて

いる PGC-1、CD36、ERR の発現を確認した。TSA 添加により、ERR の発現は変化を認めなかったが、PGC-1 及び CD36 の発現が抑制された (図 1)。これまでの報告では (Science 2019; 365:1428) 腸上皮細胞において HDAC3 が時計遺伝子の制御を受け、PGC-1、CD36、ERR の発現及び肥満の病態に関わることが報告されており、HDAC1~5 の small interfering-RNA をリポフェ

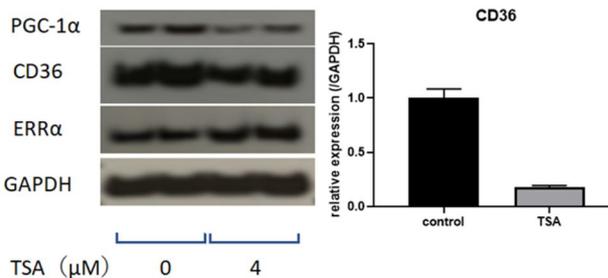


図1. 肺線維芽細胞 (NHLF) にHDAC阻害薬 (TSA) 添加24h後

クタミン法で遺伝子導入して、PGC-1、CD36 の発現の差を確認したが、各 HDAC で有意な差を認めなかった。次に、肥満の病態により肺線維芽細胞における上記反応が変化するか確認するため、分化させた脂肪細胞と肺線維芽細胞を共培養し、各蛋白の発現について確認を行った。脂肪細胞との共培養では、肺線維芽細胞における PGC-1、CD36 の発現は変化なく、HDAC の活性化の指標となるリン酸化についても変化は認めなかった。今後、パルミチン酸などの脂質を直接、肺線維芽細胞の培養液に加えることでの変化を確認するなどの追加の細胞実験を予定している。また、今回の研究では培養気道上皮細胞について、HBE-1 などの cell line や健康人の primary cell を用いて実験を行っているが、CD36 の発現は検出範囲以下と低かった。研究開始当初は喘息患者から気管支鏡を用いて気道上皮細胞を採取し、実験に用いる予定であったが、COVID-19 流行のため、エアロゾルを発生させる気管支鏡検査について制限があり、検体の確保が困難であった。今後、COVID-19 流行が終息した後に検体の収集を再開する予定である。

高脂質食の摂取にて作成した肥満マウスを用いて、OVA の感作と曝露を行い、喘息モデルを作成した。気道過敏性や気管支肺

胞洗浄液中の細胞数、細胞種類、各種サイトカインについて、肥満マウスと control マウスを比較したが、喘息の病態に両群間で有意な差を認めなかった。肥満合併喘息の病態には好酸球の他に好中球性炎症の関わりが指摘されており、気道の好中球性炎症を惹起するオゾン O₃ を OVA の感作と曝露後に加えて、喘息の病態についてそれぞれのマウスで確認した。具体的には、OVA 最終曝露 3h 後にマウスをオゾン曝露専用のチャンパーに入れ、

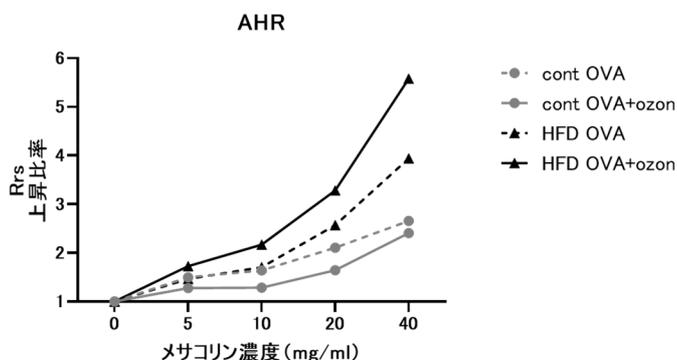


図2. 肥満マウスではOVAとオゾンの共曝露にて、気道過敏性がcontrolと比較し、亢進する。HFD:高脂質食摂取

3h のオゾン曝露を加えた。オゾン曝露 24 h 後に気道過敏性試験、気管支肺胞洗浄を行った。肥満マウスにおいて、control マウスと比較し、オゾン曝露を加えた群で気道過敏性が有意に亢進し (図 2)、気管支肺胞洗浄液中の IL-5 や IL-13 などの Th2 サイトカインの有意な増加を認めた

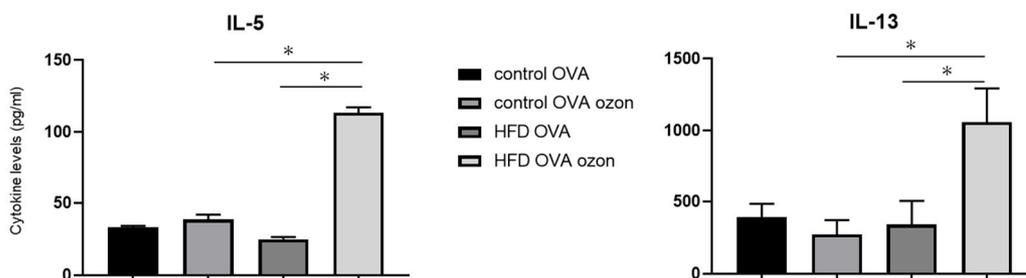


図3. 肥満マウスではOVAとオゾンの共曝露にて、気管支肺胞洗浄液中のTh2系サイトカインの発現がcontrolと比較し、亢進する。HFD:高脂質食摂取、* p<0.05

(図 3)。今後、フローサイトメトリーなどを用いて、各気道構成細胞や免疫細胞における HDAC の

活性化や PGC-1、CD36 の発現を確認することや、HDAC 阻害薬の気道内投与をすることで肥満マウスにおける喘息の重症化が抑制されるかなどについて確認を行う予定である。また、近年の報告で、肥満マウスにおけるアトピー性皮膚炎の重症化に PPAR による Th2 系サイトカインと Th17 系サイトカインの発現の変化が関与していることが明らかにされており、肥満合併喘息においても同様の機序が関わっているか追加の実験を計画している。

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、各気道構成細胞、免疫細胞における時計遺伝子や HDAC、CD36 の発現について確認し、BMI との相関など肥満喘息の病態との関連について調べる予定であったが、前述の通り COVID-19 流行のため気管支鏡検査の制限が生じたため、検体の確保が困難であった。侵襲の少ない代替的な検体採取を検討し、喀痰検体や血液検体から喘息に関わる免疫細胞や気道構成細胞由来の exosome を抽出することで研究を行うことを計画した。これまでの報告で喘息患者では健康者と比較し好酸球からの exosome 分泌が亢進すること (J Allergy Clin Immunol 2015; 135:1603) や、抗原提示細胞やリンパ球から分泌される各種サイトカインが exosome に内包されてレシピエント細胞に取り込まれることなど報告されている (Allergy 2015; 70:1651、Sci Rep 2018; 8:6065 など)。しかし、生体内から採取された exosome がどの細胞、臓器に由来するか確認するための手技はまだ確立されておらず、今回の研究では exosome の由来細胞を明らかにするため、exosome 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研究を行った。exosome 上の糖鎖解析を行うために大量の exosome が必要であり、必要量の exosome を確保するために、より多くの細胞培養を行う必要が生じたため、まず培養速度の速い肺癌の cell line を用いて研究を行った (図 4)。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 exosome 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 5)。このことで、生体内から採取した exosome 表面の糖鎖構造を解析することで由来細胞が特定でき、exosome に内包される蛋白などを解析することで由来細胞における蛋白発現の確認などに代替できることが示された。今後、マウスから採取した検体にて exosome、糖鎖解析を行うとともに、喘息患者から採取した exosome の解析を合わせて進めていく予定である。

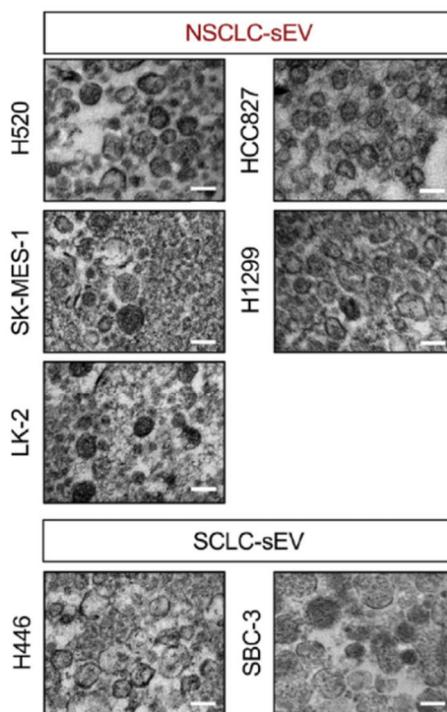


図4. 各種肺癌 cell line の細胞培養液から採取した exosome

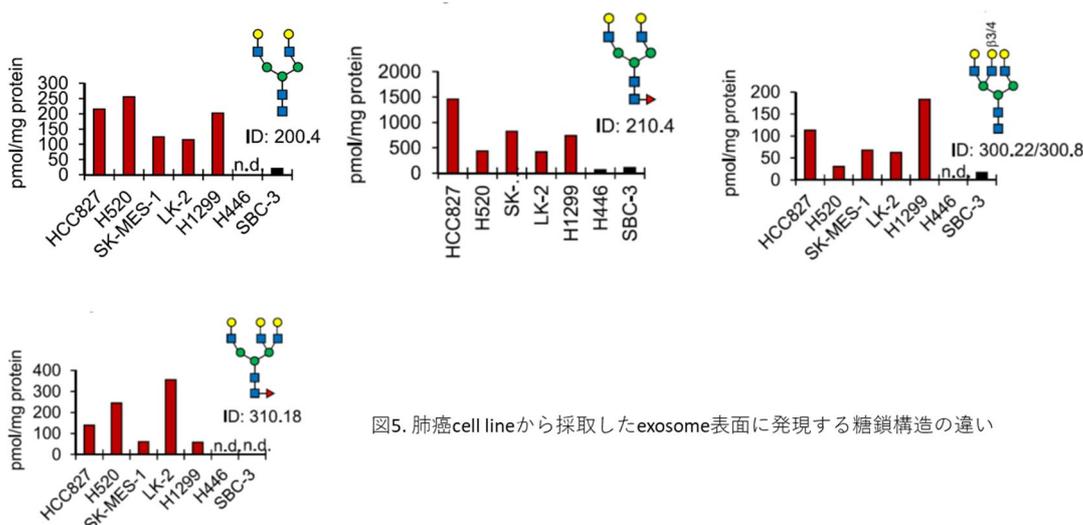


図5. 肺癌 cell line から採取した exosome 表面に発現する糖鎖構造の違い

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

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