

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17198

研究課題名（和文）STINGをターゲットとした気管支喘息の病態解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenesis of asthma with a focus on STING

研究代表者

辻 真世子（Tsuji, Mayoko）

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：50808186

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）：本研究では、喘息におけるアレルギー感作時のSTINGの役割について検討しました。STINGは気道上皮で発現量が多いことがわかりましたが、単純に気道上皮細胞を培養してSTINGアゴニストで刺激しても何も変化が起きませんでした。STINGは細胞内受容体であることから、気道上皮細胞を傷害する条件下でSTINGを活性化したところ、特定のサイトカインが産生されました。またSTINGアゴニストを経鼻投与したマウスでも同様に特定のサイトカインの産生が促進されることがわかりました。このサイトカインが、STING経路を介したアレルギー感作において重要な役割を担っていることが考えられました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、気道上皮におけるSTING/サイトカインシグナルが喘息の発症に重要である知見を得ることができました。STINGは細菌やウイルス感染の際に活性化される因子であり、感染契機の喘息発症の機序解明や喘息の発症予防のつながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the role of STING during allergen sensitization in asthma.

STING was found to be highly expressed in airway epithelium, but simply culturing airway epithelial cells and stimulating them with STING agonists did not cause any changes. since STING is an intracellular receptor, activation of STING under conditions that injure airway epithelial cells resulted in the production of specific cytokines were up-regulated. Intranasal administration of STING agonists also enhanced the production of specific cytokines in mice. This cytokine may play an important role in allergen sensitization via the STING pathway.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：喘息 STING 感作 アレルギー 気道上皮細胞 血管

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は、特定の抗原に暴露すると抗原提示細胞がそれを認識して naïve T 細胞が Th2 リンパ球に分化し、IL-4, IL-5, IL-13 といったサイトカインを産生し、平滑筋肥大、好酸球の集積、B 細胞のクラススイッチにより IgE 抗体産生、肥満細胞のヒスタミン放出を惹起することで、可逆性の気道閉塞をきたす。また IL-13 を産生することで気道上皮の杯細胞化が起こり、炎症性メディエーターや副交感神経の作用により気道分泌が亢進する(Tamaoki et al., *Eur Respir J* 1996, Kondo, Tsuji et al., *Clin Exp Allergy* 2017)。Th2 リンパ球以外にも、気道上皮障害により IL-33 などが細胞外へ放出され、ILC2 から II 型サイトカインを産生することで好酸球性炎症が誘導されることも知られており、リンパ球は気管支喘息の病態の中心的役割を担っている。現在、II 型サイトカインに対する抗体製剤の治療や開発が盛んであるが、発作時の治療薬は全身性のステロイドが中心であり、副作用が問題となる。近年、抗体療法が開発され、高い有用性が確認されているが、これらは高額である欠点がある。これまで、T リンパ球の分化をターゲットとした治療法は確立していない。さらに T 細胞の分化の機序や分化を起こす局在などの詳細もわかっていない事が多い。

近年、細胞内パターン認識受容体の一つである STING のアゴニスト c-di-GMP をアジュバントとして卵白アルブミン(OVA)によるアレルギーモデルマウスを作成することにより Th1/Th2 のバランスが Th1 に傾く事が報告されている (Dubensky et al., *Theor Adv Vaccine* 2013, Shakya et al., *Mol. Pharmaceutics* 2018)。この c-di-GMP をマウスに投与すると全身の血球の根源となる造血間前駆細胞が骨髄から末梢へ動員される事を申請者が客員研究員として所属するグループは報告した (Kobayashi et al., *Cell Rep.* 2015)。この c-di-GMP が気管支喘息や間質性肺炎などのリンパ球が関与する疾患の新たな治療法となるのではないかと考えた。実際にマウスに OVA を感作させた後に OVA を吸入させる事により作成した OVA モデルに c-di-GMP を腹腔内投与し、気管支肺胞洗浄液(BAL)と末梢血(PB)の分化血球を FACS により解析したところ、c-di-GMP を投与した OVA モデルマウスでは投与していないマウスと比較し BAL 中のリンパ球と好酸球、PB 中のリンパ球が減少するというデータが既に得られている(図 2)。

2. 研究の目的

本研究では、T 細胞の分化に関与する Stimulator of interferon genes (STING)に注目して気管支喘息モデルを作成し、その分子機構を明らかにした上で治療法を開発する事を目的とした。

3. 研究の方法

()肺における STING cording gene (TMEM173) の発現

肺では STING が発現しており、各種疾患の際にインターフェロンを産生することが知られているが肺のどの組織で、どの程度の発現があるのかは明らかではない。そこで公開データベースの GEO を用いて気道上皮における TMEM173 の発現を解析する。また他のパターン認識受容体との比較も行う。マウスにおいても同様に発現を見るために、麻酔下でマウス肺を取り出し、酵素処理のち抗体染色を行う。その後フローサイトメーターで CD45-VEcad-EpCAM+ 細胞を分離し RNA-seq を提出する (横浜市立大学免疫学教室 西山先生)。Tmem173 とパターン認識受容体の遺伝子発現を解析する。

()各種気管支喘息モデルマウスに対し STING アゴニストを投与しその効果を見る

次に、STING の気道上皮での機能を確認する目的で、STING アゴニストである cGAMP を経気道的に投与し、組織を解析する。まずは HE 染色により組織学的に解析を行い、変化があった部分に関して、免疫組織染色をおこないその変化を詳細に解析する。また、cGAMP と House dust mite (HDM)を同時に点鼻投与する事で経気道的に感作を成立させ、HDM 暴露により喘息モデルを作成する。肺を取り出し、2 型炎症細胞の 2 型自然リンパ球(ILC2; Lineage⁻CD45⁺Sca1⁺KLRG⁺CD25⁺)や 2 型通常型樹状細胞(cDC2; CD45⁺F4/80⁻MHC⁺CD11c⁺CD11b⁺CD103⁻) の数をフローサイトメーターにより解析する。

(III)気道上皮培養細胞における STING の作用

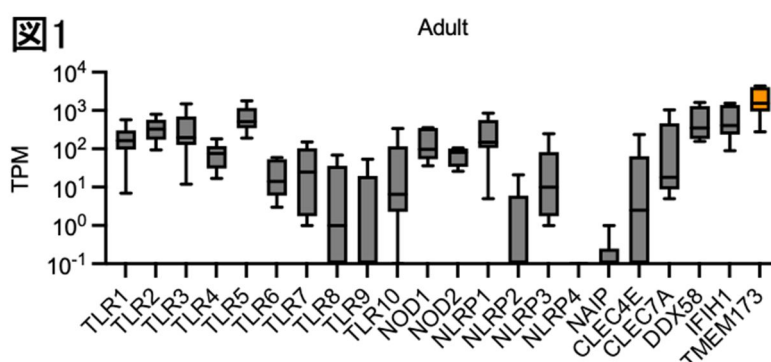
申請者は、気道上皮細胞の細胞株をコラーゲンコート of 3.5cm ディッシュに細胞をまき、60-80%フルエントになったところでコラーゲンコート of 24 well プレートに細胞を移すことで気道上皮の培養を行ってきた。()で気道上皮での発現を認めたことから、STING の気道上皮に対する直接的な作用を明らかにする目的で cGAMP 存在下に気道上皮の培養を行ない、サイトカインの解析を行なう。

()サイトカインのノックアウトマウスの作成

サイトカイン X の機能解析の目的で、X ノックアウトマウスを CRISPR-Cas9 により作成し(東京女子医科大学実験動物研究所 本田先生) STING アゴニスト投与による肺組織・サイトカインの変化を見る。更に STING アゴニストをアジュバントとし、抗原感作を起こさせた。

4. 研究成果

()公開データベース GEO で気管支鏡を用いた正常人の気道上皮生検の RNA-seq データを解析したところ TMEM173 は他のパターン認識受容体と比較して、最も発現量が多いことを見出した(図 1)。この結果は、成人と小児で同様であった。



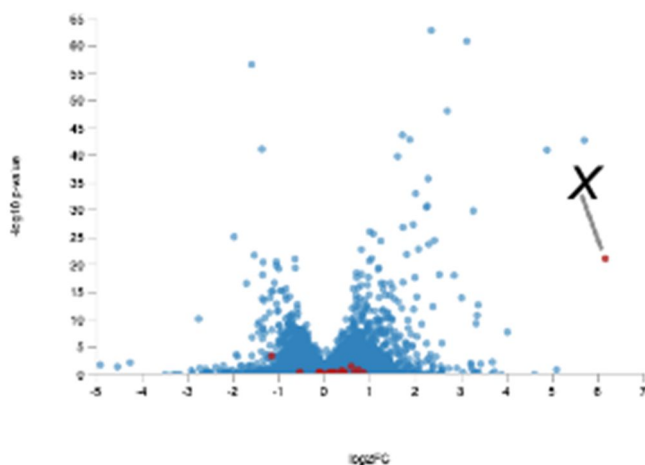
()気道上皮細胞株を上記の方法で培養し、cGAMP で刺激しサイトカインを測定したと

ころ、明らかな変化は見られなかった。STING は細胞内受容体であることから、気道上皮細胞を傷害する条件下で cGAMP が細胞内に到達するようにしたところ、特定のサイトカイン X が産生された(図 2)。

()また STING アゴニストを経鼻投与したマウス肺の CD45-VEcad-EpCAM+ 細胞を RNA-seq に提出し解析した結果、同様に特定のサイトカインの産生が促進されることがわかった。

()さらにこのサイトカイン X は、単独でも感作を促進することも明らかとなった。すなはち、このサイトカインが、STING 経路を介したアレルギー感作において重要な役割を担っていることが考えられた。現在、X ノックアウトマウスを CRISPR-Cas9 により作成中である。

図 2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------