

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17208

研究課題名(和文)新規レドックス分子の生理機能に着目したACO気道炎症機序の解明

研究課題名(英文)The role of novel redox molecules in the airway of patients with ACO

研究代表者

京極 自彦(Kyogoku, Yorihiro)

東北大学・大学病院・特任助手

研究者番号：20849400

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)：健康者由来の肺組織・喀痰と比べACO患者ではRSS産生酵素陽性細胞率の低下、NF- κ B増強、GR発現減弱、HDAC2の活性低下が認められた。更に、RSS産生酵素発現を低下させたBEAS-2B細胞では、NF- κ B発現増強、GR発現減弱、HDAC2の活性低下が認められた。現在、RNS産生モデルやステロイド前処理後のNF- κ B・GR発現、HDAC2活性の影響と抗炎症効果の変化や、RSS産生酵素を過剰発現させた場合のステロイド前処理後の抗炎症効果の程度を検討中である。RSSの産生低下は、NF- κ B発現増強、GR発現減弱、HDAC2の活性低下を介してステロイド抵抗性に関与している可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ACOは頻回の増悪・入院により医療コストがかかることが問題の一つであり、ステロイド抵抗性を改善させるような新規治療が望まれる。RSSの産生低下はNF- κ B発現増強、GR発現減弱、HDAC2の活性低下を介したステロイド抵抗性の基盤を成しており、RSSの外的投与によりこれを改善させる可能性がある。本検討はACOをはじめとするステロイド抵抗性を示す病態に対する新規治療薬の開発への基礎となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Compared with lung tissue and sputum derived from healthy subjects, patients with ACO showed a decrease in percentages of RSS-producing enzyme-positive cells, an increase in NF- κ B expression, a decrease in GR expression, and a decrease in HDAC2 activity. Furthermore, in BEAS-2B cells with decreased RSS-producing enzyme expression, enhanced NF- κ B expression, decreased GR expression, and decreased HDAC2 activity were observed. Currently, we are investigating changes in RNS production model, NF- κ B / GR expression after steroid pretreatment, HDAC2 activity, and anti-inflammatory effect. Furthermore, RSS-producing enzymes are overexpressed, and the effects of NF- κ B / GR expression, HDAC2 activity, and the degree of anti-inflammatory effect after steroid pretreatment are under investigation. It is suggested that decreased RSS production may be involved in steroid resistance through enhanced NF- κ B expression, decreased GR expression, and decreased HDAC2 activity.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：活性イオウ分子種(RSS) 活性窒素種(RNS) ACO ステロイド抵抗性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

喘息と COPD の合併病態 (asthma-COPD overlap : ACO) は、それぞれの単独疾患と比較し、増悪頻度や入院頻度がより高く、QOL がより低く、予後不良であること、更には医療コストが高いことが判明している。一方で、ACO 患者はこれまで多くの臨床的・基礎的研究から除外されており、ACO の病態機序については不明であった。研究代表者は、ACO 患者の気道では健常人のみならず同等量の吸入ステロイド剤で治療されている喘息単独患者に比して、有意に活性窒素種 (reactive nitrogen species : RNS) の産生亢進と、強力な抗酸化作用を有する活性イオウ分子種 (reactive sulfur species : RSS) の産生低下があること報告した。更にこれらレドックス分子は、ACO 患者気道中の IL-8 などの炎症性サイトカイン・ケモカインの産生量および増悪頻度や呼吸機能の低下と有意に関連していることを見出した ([Kyogoku Y, et al. J Allergy Clin Immunol. 2019](#))。ACO 患者の気道炎症や治療抵抗性獲得の基盤には RNS と RSS の不均衡状態が存在すると想定されるが、これらレドックス分子の不均衡がどのような標的分子や炎症経路に影響を与えているかについては不明である。

COPD などの炎症性肺疾患では炎症性サイトカイン遺伝子発現を制御する転写因子である核内因子 B (NF- κ B) の発現が増強している。NF- κ B の遺伝子発現はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC2) により抑制されているが、RNS は HDAC2 のチロシン残基をニトロ化することで HDAC2 を不活化しかつ分解を促進させる。したがって、HDAC2 の不活化は NF- κ B など炎症性遺伝子の発現を増幅し、ステロイド抵抗性を惹起する (Ito K, et al. NEJM.2005)。以上から、ニトロ化ストレスによる HDAC2 不活化は ACO 気道炎症機序および治療抵抗性機序の基盤となっている可能性がある。また、グルココルチコイド受容体 (GR) はシステイン残基の酸化修飾によりリガンドとの結合能や核内移行、DNA 結合能が低下する (Okamoto K, et al. JBC.1999)。しかしこれまで ACO 気道において HDAC2 や GR の発現や機能の低下が存在するか否かは解明されていない。

RSS はシステインパースルフィド (CysSSH) やグルタチオンパースルフィド (GSSH) などに代表される新規の内因性抗酸化分子である。RSS はシステイン (CysSH) やグルタチオン (GSH) に複数のイオウ原子 (S) が付加された構造を持つ。RSS は付加したイオウ原子の生化学的な特性により CysSH や GSH に比し 10-100 倍の高い還元能を有している。RSS は標的分子をポリスルフィド化することにより酸化修飾に対する保護作用を有することが証明されており、標的分子の構造や機能を制御する (Fujii S, et al. Br. J. Pharmacol.2019)。しかし、RSS の低下がどのようなメカニズムを介して ACO の気道炎症の増幅および治療抵抗性の獲得に影響しているかは不明である。

2. 研究の目的

本研究では、(1) ACO 患者気道では GR および HDAC2 の発現/機能の低下が存在するか否か、(2) RSS の低下が HDAC2 および GR の機能/発現の低下を惹起するか、(3) RSS 産生酵素の過剰発現や RSS 供与体の投与が HDAC2 および GR の機能/発現の低下を抑制しうるかどうか、を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ACO 患者の肺及び気道における GR、HDAC2 の発現および機能解析
対象患者から得られた手術肺組織や喀痰細胞における RNS 産生量及び RSS 産生酵素発現量に

については3-ニトロチロシン及びRSS産生酵素に対する免疫組織化学を用いる。GR、NF Bの発現量については、肺組織からタンパク、核成分を抽出し、ウエスタンブロッティング(WB)法を用い、HDAC2の活性化はHDAC活性キットを用いる。得られたデータは、患者の臨床情報(呼吸機能や増悪頻度)との関連を検討する。

(2) siRNAを用いたRSS産生酵素発現低下モデルによる検討

ヒト気道上皮細胞に対してsiRNAを用いてRSS産生酵素の発現を低下させた際に、同細胞内のRNS産生量をWB法で、またRSS産生量はRSS特異的蛍光プローブ(SSP-4)で測定する。NF B、GRの発現量およびHDAC2の活性についても前述の方法で解析する。さらに同細胞に対してタバコ抽出物を投与したRNS産生モデルを作成して、RSSの低下が、過剰なRNSによるNF B、GRの発現量およびHDAC2の活性に対する影響を明らかにする。また、これらの条件にステロイドを前処理した際の、ステロイドの抗炎症効果の変化についても検証する。

(3) RSS産生酵素過剰発現モデルおよびRSS供与体を用いた検討

レンチウィルスベクターを用いてRSS産生酵素を過剰発現させ、上述と同様に炎症の程度、NF B、GRの発現量およびHDAC2の活性について解析する。また、RSS供与体を前処理した条件で、細胞内RNSの産生量、炎症の程度、NF B、GRの発現量およびHDAC2の活性について解析する。また、これらの条件にステロイドを前処理した際の、ステロイドの抗炎症効果の変化についても検証する。

4. 研究成果

(1) ACO患者の肺及び気道におけるGR、HDAC2の発現および機能解析

健常者と比較してACO患者の喀痰では、3-ニトロチロシン陽性細胞の割合が有意に増加する一方で、RSS産生酵素陽性細胞の割合は有意な低下を認めた(図1)。また、手術肺組織においても同様に、健常者と比較してACO患者の肺組織中の気道上皮のRSS産生酵素陽性細胞の発現は低下する傾向が認められた。ACO患者の肺組織では、健常者の肺組織と比べてNF Bのタンパク発現が増強、核抽出後のGR発現は減弱し、HDAC2の活性化は健常者に比べACO患者で低下する傾向が認められた。臨床情報との関連では、RSS産生酵素陽性細胞の割合と気流制限の程度は相関関係が認められた。

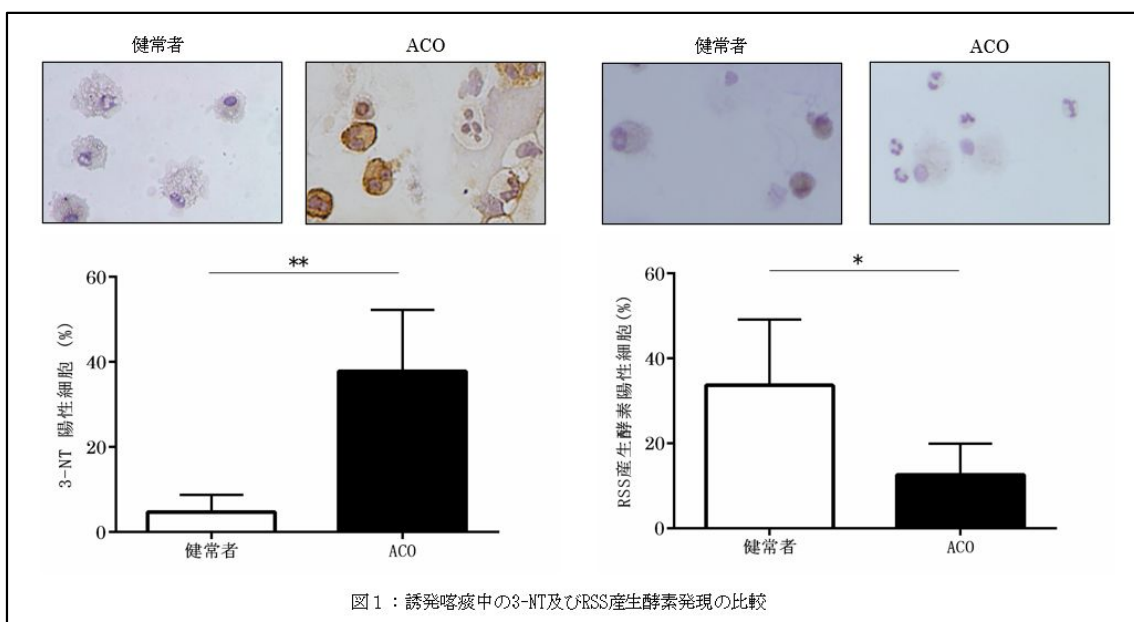
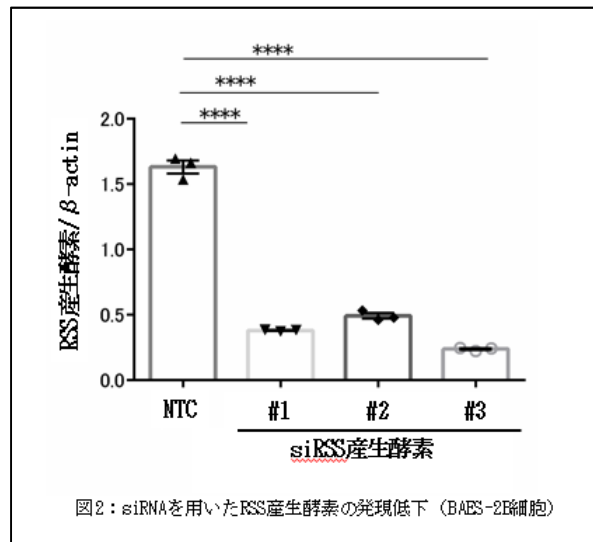


図1：誘発喀痰中の3-NT及びRSS産生酵素発現の比較

(2) siRNA を用いた RSS 産生酵素発現低下モデルによる検討

ヒト気道上皮細胞株 (BEAS-2B 細胞) に対して、siRNA を用いた RSS 産生酵素発現の低下を RT-qPCR にて確認し (図 2) 更に WB 法でも確認した。siRNA を用いてノックダウンした BEAS-2B 細胞の RNS 産生量は増加、RSS 産生量は有意に低下した。更に、ノックダウンした BEAS-2B 細胞では、NF B 発現が増強、GR 発現は減弱し、HDAC2 の活性の低下を認めた。現在、タバコ抽出物投与後の NF B 及び GR 発現、HDAC2 の活性への影響と、ステロイド前処置による、炎症性サイトカイン・ケモカイン産生量について検討を進めている。



(3) RSS 産生酵素過剰発現モデルおよび RSS 供与体を用いた検討

レンチウイルスベクターを用いて BEAS-2B 細胞における RSS 産生酵素を過剰発現させた。この細胞株と RSS 供与体を前処置した細胞を用いて NF B 及び GR 発現、HDAC2 の活性と、ステロイド前処置による炎症性サイトカイン・ケモカイン産生量の変化について検討を進めている。

以上から、ACO 患者の肺及び気道では、RSS 産生酵素発現の減弱と、RNS 産生の増強が見られ、更に GR および HDAC2 の発現/機能が低下していることが示唆された。また、RSS 産生酵素の発現を低下させた BEAS-2B 細胞では、GR および HDAC2 の発現/機能が低下しており、RSS 産生酵素低下に伴う RNS 産生増強と RSS 産生低下が GR および HDAC2 の発現/機能の低下に寄与している可能性が示唆された。このことから、ステロイド抵抗性に関与する GR および HDAC2 の発現/機能の低下は、RNS の産生増強と RSS の産生低下が原因となっている可能性が考えられた。本検討によって、ACO をはじめとするステロイド抵抗性を示す病態において、RSS を用いた新規治療の創薬における基礎となる成果が得られたと考えている。

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 Saito Tsutomu, Ichikawa Tomohiro, Numakura Tadahisa, Yamada Mitsuhiko, Koarai Akira, Fujino Naoya, Murakami Koji, Yamanaka Shun, Sasaki Yusaku, Kyogoku Yorihiro, Itakura Koji, Sano Hirohito, Takita Katsuya, Tanaka Rie, Tamada Tsutomu, Ichinose Masakazu, Sugiura Hisatoshi	4. 巻 22
2. 論文標題 PGC-1 regulates airway epithelial barrier dysfunction induced by house dust mite	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Respiratory Research	6. 最初と最後の頁 1~16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12931-021-01663-6	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
---------	---------