

令和 6 年 4 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17239

研究課題名（和文）好酸球の多層オミクス解析に基づく炎症病態の予測システムの開発

研究課題名（英文）Development of prediction system for inflammatory pathology based on multilayer omics analysis of eosinophils

研究代表者

宮田 純（Miyata, Jun）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：80464866

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：刺激因子の2型・1型サイトカインの存在下で培養した健常者の血中好酸球を用いてRNA-seqを実施した。RNA-seqにより各刺激因子に特異的な下流の変動因子を同定した。同様の変化をプロテオミクスとフローサイトメトリーで確認した。鼻茸好酸球の遺伝子発現データを用いて、これらの刺激因子による変化が炎症部位の好酸球で生じていることを確認した。以上から、これらの因子が複合的に病態に関与している可能性が示唆された。本研究で同定された因子群の変化は様々なアレルギー疾患の複雑な病態の解釈に有用な可能性があり、今後の研究に応用可能なデータベースの基盤を構築できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性アレルギー疾患では好酸球は炎症局所に浸潤して病態に関与する。これまでの研究では細胞機能や表面抗原等の単一の評価項目に着目しており、包括的な評価が為されていなかったため全体像を捉えることは困難であったが、マルチオミクス解析はこの問題点を解消した。今回の研究では様々な刺激因子を用いることで炎症環境で生じる細胞の変化を再現し、なおかつその変化をマルチオミクス解析で明らかとした。炎症局所の好酸球は複雑な炎症応答が組み合わさって誘導されている可能性を見出した。本知見が、今後の治療標的となる因子の同定と既存治療以外の治療選択肢の提案に貢献し、更なる治療戦略の改善に繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：RNA sequencing was conducted on healthy blood eosinophils cultured in the presence of type 2 and type 1 cytokine stimulants; the RNA sequencing analysis discerned downstream variables specific to each stimulant. Similar alterations were confirmed by proteomic analysis and flow cytometric analysis. Utilizing gene expression data from nasal polyp-derived eosinophils, we validated that the alterations induced by these stimulants manifested in eosinophils at the inflammatory site. These findings postulate the intricate involvement of these factors in pathogenesis of the disease. The elucidated variations in the factors observed in this investigation hold promise for understanding the complicated pathogenesis of diverse allergic diseases, thus laying the groundwork for a prospective research database.

研究分野：呼吸器内科学、アレルギー学

キーワード：好酸球 トランスクリプトミクス プロテオミクス リポドミクス 2型サイトカイン 1型サイトカイン 難治性アレルギー疾患

1. 研究開始当初の背景

好酸球性気道炎症は、喘息・好酸球性副鼻腔炎・慢性好酸球性肺炎・アレルギー性気管支肺真菌症等の様々なアレルギー疾患で病態に関与しており、高度な慢性炎症が既存の治療法によっても持続する症例が存在する。一方で、慢性閉塞性肺疾患、悪性腫瘍、一部の感染症など好酸球増多が認められるものの、好酸球の病態への寄与が不明である疾患も存在する。近年では、好酸球の炎症収束、筋肉再生、抗肥満・糖尿病作用といった生体の恒常性維持に貢献する役割も示されている。現在の臨床現場では、血液や喀痰の好酸球増多を指標とした診断や治療の調整が為されているが、実際には好酸球の性質の把握無しでは好酸球を治療標的とする妥当性や最適な治療法の決定も困難である。

好酸球は免疫担当細胞として、炎症性脂質メディエーターであるシステインロイコトリエンの産生、脱顆粒、活性酸素産生等の多彩な細胞機能によって炎症を増幅する。一方で、好酸球は15-リポキシゲナーゼを介したリポキシン・レゾルピン・プロテクチン等の抗炎症脂質メディエーターの高い産生能を有しており、他にもIL-10・TGF-betaを放出することで炎症制御に寄与しうる。以上の知見より、好酸球は、リンパ球やマクロファージと同様に多種多様な細胞表現型を持つ細胞である可能性が示唆されているが、各々の分化・成熟機構は明らかとなっていない。申請者は、重症喘息の末梢血由来、もしくは好酸球性副鼻腔炎の鼻茸由来の好酸球を用いた脂肪酸代謝物・蛋白質・遺伝子転写産物に対するオミクス解析(網羅的解析)を組み合わせた研究により、特徴的な脂肪酸代謝異常を同定している。脂肪酸代謝異常は炎症応答を増強し、炎症収束機構を減弱する作用によって、好酸球性炎症性疾患の発症・重症化に密接に関与している。更に、バイオインフォマティクスによる分析の結果、2型サイトカインや微生物応答の重要性が示唆されている。しかしながら、好酸球性炎症性疾患は各々の病像が多彩であり、疾患毎に異なる複雑な制御機構が存在していると推察される。

2. 研究の目的

請者は好酸球性炎症性疾患の未知な部分を解明するため、以下の2点を目的とする。

- ・好酸球のサイトカイン等の上流因子による制御機構を特定し、各因子に特徴的な分子の発現の挙動パターンを同定する。
- ・好酸球の表現型を解析することで、細胞外環境を予測可能なシステムを開発する。

3. 研究の方法

本研究課題では、<好酸球の多層オミクス解析に基づく炎症病態の予測システム>を開発するため、下記の方法を用いて研究を進めた。

1. オミクス解析データベースの分析による表現型を誘導する上流因子の候補の探索
既に臨床検体の集積とオミクス解析が完了している重症喘息・好酸球性副鼻腔炎患者由来の好酸球の解析データを用いて、上流因子の候補の絞り込み作業を行った。バイオインフォマティクスを用いた解析については、既に施行したパスウェイ解析(IPA)に加えて、主成分分析・パスウェイ解析(KEGG)・遺伝子オントロジーエンリッチメント解析・転写因子エンリッチメント解析を行い、多角的な検討により表現型の誘導において主要な役割を担う上流因子を確定した。

2. in vitroにおける長期培養による評価系での表現型の解析
2型サイトカインのIL-5の存在下で3-7日間以上の長期培養を健常者の末梢血由来の好酸球で行うと、炎症組織中の好酸球に類似した細胞を再現できる。この培養系を応用し、培養上清にIL-4・IL-33等のサイトカインや微生物応答刺激因子を加えることで、其々の因子が細胞の成熟機構において果たす役割について個別に検証した。表現型については簡易に検出できる細胞マーカーの探索を目指したフローサイトメトリーによる表面抗原の解析と細胞機能の包括的理解を目指した網羅的解析(プロテオミクス・リポドミクス)を順次行った。

3. 表現型の規定因子の分子機序の評価
前述の研究計画により同定された上流因子に特異的な変化を示す分子について、好酸球の表現型全体への影響をアゴニスト・アンタゴニストによる機能制御を行うことで検証した。既存のデータベースの解析結果から脂肪酸代謝酵素の重要性が示唆されており、合わせて評価を行った。細胞機能の評価項目は、以前の研究成果で既に確立されている脱顆粒・活性酸素産生・生存能・脂質メディエーター産生を指標とした。

4. 臨床検体を用いた炎症病態の予測システムの検証
同定した規定因子の発現パターンに基づくアルゴリズムを作成し、上流因子の予測システムを構築した。主要なサイトカインや刺激因子については個別に上流因子として判別可能であることを最低条件とした。現時点において倫理委員会で承認され準備が完了している慢性好酸球性肺炎・アレルギー性気管支肺真菌症の患者の末梢血・気管支肺胞洗浄液から単離した好酸球について予測システムを適用し、妥当性を検証した。既存の重症喘息・好酸球性副鼻腔炎のデータについても予測システムを反映させる事で、新規の知見の集積を試みた。

4. 研究成果

刺激因子の2型サイトカイン(IL-5, IL-4, IL-33)、1型サイトカイン(TNF-alpha, IFN-gamma, IFN-alpha)の存在下で培養した健常者の血中好酸球を用いてRNA-seqを実施した。RNA-seqにより発現上昇因子として、IL-5とIL-4に共通するGGT5、IL3RA、IL-5特異的なIL2RA、CCL23、IL-4特異的なTGM2、IL1RL1(IL-33受容体)、IL-33とTNF-alphaに共通するC3、CCL4、IL1A/B、IFN特異的なGBP、TRIMなどを同定した。同様の変化をプロテオミクスとフローサイトメトリーで確認し、これらの因子が蛋白翻訳後に機能的分子となりうることを示した。

リポミクスではIL-4とIL-5の刺激によりLTD4の産生量が相乗的に増加することを確認し、発現したGGT5などの脂肪酸代謝酵素が実際に脂肪酸代謝パターンを変化させ、特定の脂質メデイエーターの産生に寄与することが証明した。GGT5の発現上昇は鼻茸由来の好酸球のみならず、好酸球性喘息・好酸球性多発血管炎性肉芽腫症の血中好酸球でも生じていることを確認した。喘息患者の喀痰細胞におけるGGT5とIL-33受容体の発現上昇は特にIL-4と強い正の相関を示した。

IL-33とTNF-alphaに共通する発現上昇因子として酸化LDLの受容体であるOLR1があることを同定した。好酸球に対する酸化LDLの刺激は、好酸球の生存延長と接着因子発現の制御に關与していた。酸化LDL刺激に特異的に変化する因子としてFACR、PLAURなどの因子を同定した。

IFN-gammaとIFN-alphaの誘導因子にはGBP、TRIMなどの抗ウイルス分子が挙げられ、多くの場合その発現変動パターンは類似していた。IFN-g特異的に発現が上昇する因子として、ICAM-1、FCGR1A、IL5RAなどを同定した。対照的な発現変動を示す因子として、生存延長因子のPIM-1を同定し、IFN-gammaはPIM-1発現上昇によって生存延長作用を示し、IFN-alphaは逆の作用により細胞死を誘導しうることを確認した。

私たちが保有している鼻茸好酸球の遺伝子発現データを用いて、これらの刺激因子による変化が実際の炎症部位の好酸球で生じているかどうか検証した。IL-5、IL-4、IL-33、TNF-alpha、IFN-gammaによる変化と同じ遺伝子発現パターンの変化が複合的に生じていることが確認された。以上から、IL-5、IL-4、IL-33、TNF-alpha、IFN-gammaが複合的に病態に關与している可能性が示唆された。酸化LDLの下流で発現上昇する因子も同様に変化が認められ、局所での脂質分子の關与の可能性が見出された。IFNについてはIFN-gammaの下流因子は受容体の発現とともに上昇していたが、IFN-alphaの下流因子は受容体の発現とともに減少していたため、これらの拮抗する制御機構が明らかとなった。本研究で同定された因子群の変化は副鼻腔炎、喘息を含む様々なアレルギー疾患の複雑な病態の解釈に有用な可能性があり、今後の研究に応用可能なデータベースの基盤を構築できたと考えている。

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 1件）

1. 著者名 Miyata J, Yokokura Y, Moro K, Arai H, Fukunaga K, Arita M.	4. 巻 12:687192
2. 論文標題 12/15-lipoxygenase regulates IL-33-Induced eosinophilic airway inflammation in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontier in Immunology	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） 10.3389/fimmu.2021.687192	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22件（うち招待講演 5件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Miyata J, Arita M, and Fukunaga K
2. 発表標題 Transcriptomic analysis of peripheral blood eosinophils from patients with severe asthma revealed characteristic regulatory signaling.
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮田 純
2. 発表標題 好酸球の多様性で紐解く難治性好酸球性炎症の機序
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 持丸 貴生、宮田 純、砂田 啓英也、奥隅 真一、正木 克宜、加畑 宏樹、有田 誠、福永 興吉
2. 発表標題 多層オミクス解析を用いたIL-33による炎症性好酸球の誘導機序の検討
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 砂田 啓英也、宮田 純、持丸 貴生、奥隅 真一、正木 克宜、加畑 宏樹、有田 誠、福永 興彦
2. 発表標題 多層オミクス解析を用いたIL-4によるアレルギー性好酸球の誘導機序の検討
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miyata J, Mochimaru T, Sunata K, Okuzumi S, Masaki K, Kabata H, Kawana A, Arita M, and Fukunaga K.
2. 発表標題 Multiomics analysis revealed regulatory phenotype of all-trans retinoic acid-stimulated human eosinophils.
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木寿、宮田純、川島祐介、福永興彦、川名明彦
2. 発表標題 多層オミクス解析を用いたIFN-誘導性好酸球の細胞性質の評価
3. 学会等名 アレルギー・好酸球研究会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮田純、有田誠、正木克宜、加畑宏樹、茂呂和代、福永興彦
2. 発表標題 12/15-リボキシゲナーゼによる難治性気道2型炎症の制御機構の解明
3. 学会等名 第62回 日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮田 純
2. 発表標題 難治性好酸球性炎症の成立機序と治療戦略
3. 学会等名 第71回日本アレルギー学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松山笑子, 宮田純, 砂田啓英也, 佐々木寿, 持丸貴生, 正木克宜, 加畑宏樹, 福永興彦
2. 発表標題 短鎖脂肪酸の好酸球に対する抗炎症作用の検討
3. 学会等名 第71回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 持丸貴生, 宮田純, 砂田啓英也, 松山笑子, 佐々木寿, 正木克宜, 加畑宏樹, 福永興彦
2. 発表標題 酸化低比重リポ蛋白質 (oxidized LDL) の好酸球に対する直接作用の検討
3. 学会等名 第71回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木寿, 宮田純, 川島祐介, 福永興彦, 川名明彦
2. 発表標題 IFN-誘導性好酸球の抗ウイルス活性と続発性アレルギー応答促進作用の機序について
3. 学会等名 第71回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木寿、宮田純、松山笑子、砂田啓英也、奥隅真一、持丸貴生、正木克宜、加畑宏樹、川名明彦、植木重治、浅野浩一郎、福永興彦
2. 発表標題 アスペルギルス抽出物によるヒト好酸球の活性化機序に関する検討
3. 学会等名 アレルギー・好酸球研究会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木寿、宮田純、松山笑子、砂田啓英也、正木克宜、加畑宏樹、川名明彦、植木重治、浅野浩一郎、福永興彦
2. 発表標題 アレルギー性気管支肺真菌症における好酸球の表面抗原の網羅的解析
3. 学会等名 第72回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村玲奈、宮田純、砂田啓英也、松山笑子、佐々木寿、正木克宜、加畑宏樹、福永興彦
2. 発表標題 好酸球の細胞死と性質変化におけるステロイド抵抗性機序の検討
3. 学会等名 第72回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 砂田啓英也、宮田純、松山笑子、佐々木寿、正木克宜、加畑宏樹、有田誠、福永興彦
2. 発表標題 2型サイトカイン誘導性のアレルギー性好酸球の細胞性質と病的意義の解明
3. 学会等名 第72回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松山笑子、宮田純、砂田啓英也、佐々木寿、持丸貴生、正木克宜、加畑宏樹、福永興彦
2. 発表標題 プロテオミクス解析による短鎖脂肪酸の好酸球に対する作用の検討
3. 学会等名 第72回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大津陽、宮田純、松山笑子、砂田啓英也、佐々木寿、正木克宜、加畑宏樹、福永興彦
2. 発表標題 プロスタグランジンE2の好酸球に対する抗炎症作用の検討
3. 学会等名 第72回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮田純
2. 発表標題 難治性気道アレルギー疾患における脂質メディエーターの産生異常
3. 学会等名 第72回日本アレルギー学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮田純
2. 発表標題 好酸球の多様性に基づく病原性の獲得機序と生体恒常性の維持作用の誘導機序
3. 学会等名 第87回日本皮膚科学会東京支部学術大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐々木寿、宮田純、小野里隆太、松山笑子、砂田啓英也、正木克宜、加畑宏樹、川名明彦、福永興彦
2. 発表標題 トランスクリプトーム解析によるMDP誘導性好酸球の細胞性質の解明
3. 学会等名 第37回アレルギー・好酸球研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大津陽、宮田純、砂田啓英也、松山笑子、佐々木寿、正木克宜、加畑宏樹、福永興彦
2. 発表標題 TGF-betaの好酸球性疾患における機能的意義の検討
3. 学会等名 第37回アレルギー・好酸球研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮田純
2. 発表標題 多層オミクス解析を駆使した好酸球研究の現状・課題・展望
3. 学会等名 第37回アレルギー・好酸球研究会（招待講演）
4. 発表年 2023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
研究協力者	有田 誠 (Arita Makoto)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	川島 祐介 (Kawashima Yusuke)		

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