

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08188

研究課題名（和文）インターフェロンによる2型自然リンパ球依存性喘息抑制作用におけるTSLPの影響

研究課題名（英文）Effect of TSLP on the suppression of type 2 spontaneous lymphocyte-dependent asthma by interferon

研究代表者

岡田 直樹（Okada, Naoki）

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・客員研究員

研究者番号：90815408

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）：IL-33によって惹起されるILC2依存的な非アトピー型喘息モデルにpoly I:C投与による疑似的なRNAウイルス感染を模した喘息モデルで、TLR3 ligandによる疑似的なRNAウイルス感染状態でBALF中のIFN- λ 上昇を認めるが、TSLP存在下ではIFN- λ の産生抑制により好酸球性炎症の抑制が阻害された。そしてそれは喘息患者が気道へのウイルス感染により喘息増悪し、その際のIFN産生量が健常者が気道へのウイルス感染した場合よりも少ないこととも一致すると考えられた。これらは喘息における新しい増悪メカニズムである可能性があり、IFN産生不全をターゲットとした新しい治療法が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症喘息の治療において生物学的製剤は重要な選択肢の一つである。特に抗TSLP抗体は近年使用されるようになり、多くの重症喘息患者に使用されている。しかし、喘息におけるTSLPの機能において2型自然リンパ球(ILC2)の活性化がわかっているが、IFNなどのサイトカインへの影響については未だ不明な部分が多い。我々はTSLPの投与によりIFN- λ の産生不全・機能不全が引き起こされることを発見した。

研究成果の概要（英文）：Using an animal model of ILC2-dependent asthma, we demonstrated that poly I:C administration mimicking viral infection could suppress eosinophilic inflammation, which was also confirmed in a recent report (3). These effects are considered dependent on the IFNs produced in response to poly I:C or the virus. Because the capacity to produce IFNs in response to viral infection is impaired in bronchial epithelial cells or plasmacytoid dendritic cells in patients with asthma (4,5), they are prone to exacerbation during viral infection. These may be new exacerbation mechanisms in asthma, and new treatments targeting IFN production deficiency are expected.

研究分野：呼吸器

キーワード：重症喘息 TSLP IL-33 ILC2

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

IFN を介した ILC2 抑制機構と喘息患者における機能不全

喘息患者の気道上皮細胞はウイルス感染時のインターフェロン(IFN)産生能が低く、ウイルス排除が遅延することが報告されており、喘息患者での IFN 産生低下が 2 型自然リンパ球(type 2 innate lymphoid cells; ILC2)を介した 2 型気道炎症をも悪化させる可能が示唆されている。申請者の所属する研究室グループにより ~ 型 IFN が ILC2 の増殖・活性化の抑制機構として重要な役割を果たすこと明らかにした。

我々はpapain気道内投与によって惹起したILC2依存的な喘息モデルマウスに、thymic stromal lymphopoietin (TSLP)の存在下、非存在下でToll-like receptor 3のリガンドのpoly I:Cを気道内投与した。その結果、poly I:C投与により気管支肺胞洗浄 (BAL) 液中のIFN- λ 、 γ の有意な濃度上昇は認められるが、IFN- α 、 β は有意な変動は認められず、TSLPの存在下でもIFN産生に影響は認められなかった。その一方、papain投与によって惹起されるILC2依存性の好酸球性炎症の程度は、poly I:Cによって抑制されるが、TSLPの存在下ではpoly I:Cによる好酸球性炎症の抑制は消失する。ここから想定される研究仮説として、IFNによってILC2活性が抑制されるはずが、TSLPの存在下ではそれが起きなくなる機序があると想定された。

2. 研究の目的

本研究では、1) 気道への疑似的なウイルス感染刺激 (Poly I:C または R848) によって誘発される ILC2 過剰活性化に起因して喘息症状が増悪するマウスモデルを構築すること、2) 疑似的なウイルス感染刺激によって増悪する喘息モデルマウスにTSLPの刺激が加わる際、TSLP存在下では ~ 型 IFNs の産生抑制が起こるかどうか、または、TSLP存在下では ~ 型 IFNs が存在するにも関わらず ILC2 活性化の抑制が回避されるかどうかについて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

気道への疑似的なウイルス感染で増悪する喘息モデルの確立 C56BL/6J マウス(雌、6 週齢)を使用し、TSLP の存在下 / 非存在下で papain、あるいは、IL-33 を 3 日間連続で気道内投与し、4 日目に vehicle、あるいは合成 2 本鎖 RNA の poly I:C、あるいは R848 を気道内投与し、その 24 時間後に気道抵抗を測定した後に BAL を施し、肺を回収する。また、Poly I:C や R848 の代わりに IFN- λ_2 、 λ_3 を投与する実験や、TSLP 受容体欠損マウス、III 型 IFN 受容体欠損マウス(共に C56BL/6 背景)も用いて同様に実験を行う。

喘息モデルマウスの病態評価 疑似的なウイルス感染刺激による喘息増悪や、薬剤投与による喘息病態の増悪抑制効果の評価方法について以下に記述する。

(1) 肺の白血球分画の解析 気管支肺胞洗浄(BAL)液中の総白血球数、白血球分画をカウントする。あるいは、肺組織を Liberase で消化し、肺組織中の ILC2、T 細胞 (CD4, CD8) 分画の細胞数変化、サイトカイン産生を FACS で解析する。

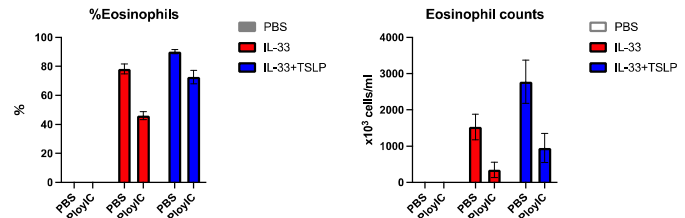
(2) 肺組織の評価 BAL 施行後に肺組織を摘出し、一部を mRNA 抽出用に切除結紮した後に、ホルマリンで固定して病理組織切片を作成する。May-Giemsa 染色で好酸球やリンパ球浸潤、肺組織中の誘導性気管支関連リンパ組織の形成、PAS-Alcian Blue 染色で陽性に染まる気道粘液産生細胞などについて評価する。

4 . 研究成果

BALF 中細胞数の比較

IL-33 の気管内投与により、BALF 中の好酸球数の著名な増加を認めた($P < 0.001$)。また IL-33 に加え TSLP の同時投与を行なった場合には IL-33 単独群に加えて BALF 中好酸球数の有意な増加を認めた($P < 0.001$)。これらの IL-33 及び TSLP により誘導された喘息モデルに対して Poly I:C を投与すると、IL-33 単独投与群及び IL-33 + TSLP 同時投与群ともに BALF 中好酸球数は有意に抑制された($P < 0.001$)。しかし、IL-33 + TSLP 同時投与群では、Poly I:C による BALF 中の好酸球抑制効果が減弱する傾向があった。(図 1)

図 1 : TSLP は Poly I:C による好酸球性気道炎症の抑制を減弱する。



BALF 中 型サイトカインの比較

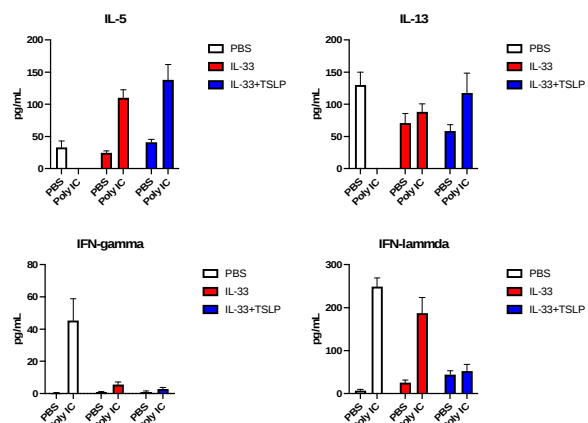
次に BALF 中の IL-5、IL-13、IFN-gamma、および IFN-lambda の値を比較した(図 2)。IL-33 単独群では BALF 中の IL-5 値は変わらなかったが、Poly I:C を投与した群では、有意な上昇を認めた ($P < 0.001$)。TSLP は Poly I:C 併用の有無に関わらず、IL-5 値に影響を与えなかった。IL-13 値も IL-5 値と同様の傾向があった ($P = 0.02$)。

Poly I:C の投与により、IL-33 投与の有無に関わらず、BALF 中の IFN-gamma および IFN-lambda の濃度を有意に増加させた ($P = 0.02$ および $P = 0.005$)。しかし、TSLP の存在下では、BALF 中の IFN-gamma の濃度は明らかな低下を認めたが、IFN-lambda は低下を認めなかった ($P = 0.01$)。

考察

ILC2 依存性喘息モデルを用いて、Poly I:C の投与が気道の好酸球性炎症を抑制できることを実証した。これらの効果は、Poly I:C またはウイルス感染に対して産生される IFN の効果に依存すると考えられる。喘息患者の気管支上皮細胞または樹状細胞では、ウイルス感染に対する IFN 産生の低下により、ウイルス感染により急性増悪の一因となることがわかっている。今回のモデルは、ウイルス感染により産生される TSLP が、ILC2 依存性の好酸球性気道炎症に対する Poly I:C の IFN の誘導による好酸球性炎症の抑制効果を減弱させる可能性があることを示唆している。我々は以前、IFN が ILC2 の増殖と 型サイトカインの合成を抑制すること また、TSLP が STAT5 媒介シグナル伝達を増強することにより、コルチコステロイドにより誘導される ILC2 のアポトーシスを阻害することを報告した。そのため TSLP による IFN の抑制は、IFN の ILC2 への抑制を減弱させ、好酸球性気道炎症を増悪していることが示唆された。我々は TSLP 受容体を発現し、IFN の産生源である樹状細胞が、TSLP を介した肺における IFN 合成抑制の一因となると推察している。このメカニズムを明らかにすることによりウイルス感染による重症喘息の治療方法についてより明確になると考えている。

図 2 : TSLP の投与により BALF 中の IFN-lambda の濃度が低下する。



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