

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08466

研究課題名(和文) 気管支喘息での神経系-免疫系クロストークにおける好酸球の役割の解明

研究課題名(英文) The role of eosinophils in cross-talk between neuron and immune system

研究代表者

長瀬 洋之 (Nagase, Hiroyuki)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：40365945

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)：喘息病態において、神経免疫連関の関与が想定されてきた。アセチルコリン(Ach)は副交感神経から放出され、気道平滑筋を収縮させる神経伝達物質である。喘息の中心的な炎症細胞である好酸球は、肺の神経末端周辺に集積し、Ach放出を抑制するM2受容体(M2R)の機能を阻害する。しかし、好酸球が神経終末に集積する機序には不明な点が多く、我々はAchが好酸球を直接活性化する可能性を想定して検討した。Achはヒト好酸球の生存延長、接着分子発現調節、遊走を惹起し、その機能はM3R依存的、MEKとPI3K経路依存的であった。これらの知見は喘息病態における神経免疫連関のメカニズムの一端を説明する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

喘息の治療体系は、抗炎症療法と気管支拡張療法に二分される。前者は吸入ステロイド薬が、後者は長時間作用性 $\beta_2$ 刺激薬と長時間作用性ムスカリン受容体拮抗薬(LAMA)が担っている。しかし、LAMAは気管支拡張作用のみならず、気道炎症の関与が想定される増悪も抑制することが報告されている。LAMAの作用点は、今回Achによる好酸球活性化の責任受容体と同定されたM3Rであり、LAMAの増悪抑制効果は、部分的に好酸球機能抑制による可能性が想定された。喘息病態には多様性があり、今回の知見は、好酸球性気道炎症を有する患者にLAMAが奏効する可能性を示唆しており、層別化医療の基盤となる知見となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The involvement of neuro-immune interaction has been postulated in asthma pathogenesis. Acetylcholine (Ach) is a neurotransmitter released by the parasympathetic nervous system that causes contraction of airway smooth muscle. Eosinophils, the central inflammatory cells in asthma, accumulate around nerve endings in the lungs and inhibit the function of the M2 receptor (M2R), which inhibits Ach release. However, the mechanism by which eosinophils accumulate around nerve endings remains unclear, and we hypothesized that Ach may directly activate eosinophils. Ach induces prolonged survival, modulation of adhesion molecule expression, and migration of human eosinophils, and its function is M3R-dependent and MEK- and PI3K-pathway-dependent. These findings may in part explain mechanisms of the neuro-immune linkage in asthma pathogenesis.

研究分野：呼吸器内科学・アレルギー学

キーワード：Eosinophils Acetylcholine Asthma M3 muscarinic receptor

## 1. 研究開始当初の背景

アセチルコリン (Ach) は副交感神経伝達物質であり、喘息や COPD における気道平滑筋収縮や粘液分泌の誘導に関与している。肺副交感神経から放出された Ach は平滑筋上のムスカリン M3 受容体 (M3R) を刺激し、気管支収縮を誘導する。同時に、副交感神経からの Ach の放出は、神経終末上の抑制性ムスカリン M2 受容体 (M2R) によって抑制され、Ach 放出の負のフィードバック機構となっている。

好酸球は、喘息モデルや喘息死剖検肺の神経細胞末端周辺に集積することが報告されている。さらに、M2R 機能は神経あたりの好酸球数と逆相関していた。様々な好酸球由来の顆粒タンパク質の中で、Major Basic Protein (MBP) は M2R の選択的アンタゴニストとして機能し、好酸球 MBP の中和は抗原チャレンジ動物において M2R 機能を維持し、気道過敏性を予防した。

これらの結果は、喘息での迷走神経を介した気管支収縮の亢進につながる M2R 機能不全に、好酸球が重要な役割を果たしていることを示唆している。

## 2. 研究の目的

しかし、好酸球が神経末端周辺に集積するメカニズムは完全には解明されていなかった。Ach は気道における主要な神経伝達物質であるが、好酸球機能に対する Ach の直接的な作用は解明されていない。

そこで我々は、Ach が好酸球を直接活性化するという仮説をたて、生存期間の延長、接着分子の発現、遊走、脱顆粒など、ヒト好酸球の機能に対する Ach の影響を検討することとした。

## 3. 研究の方法

- 好酸球分離: 比重遠心分離により単離し、その後抗 CD16 結合マイクロ磁気ビーズと抗 CD14 結合マイクロ磁気ビーズを用いたネガティブセレクションを行った。好酸球純度は 99% 以上、生存率は常に 95% 以上であった。
- 細胞生存: アネキシン V とヨウ化プロピジウム (PI) の二重染色で分析し、アポトーシスまたはネクローシス状態はフローサイトメトリーで解析した。
- 細胞遊走: 24 ウェルプレート用 5  $\mu$ m 孔付き Chemotaxicell で解析した。
- EDN および TGF- $\beta$  濃度: ELISA で測定した。
- 接着分子発現: CD11b, CD62L 発現をフローサイトメトリーで解析した。
- ムスカリン受容体 mRNA 発現: リアルタイム PCR で解析した

## 4. 研究成果

### 1. Ach は好酸球の生存期間を延長した

まず、Ach が好酸球の生存率を直接増加させるかどうかを分析した。10 mM の Ach はコントロールと比較して有意に好酸球の生存期間を延長し、アポトーシスとネクローシスを減少させた。生存延長効果は IL-5 には及ばなかった。Ach による有意な生存延長効果は 20 時間まで持続したが、44 時間後にはその効果は観察されなかった。M1/M3R アゴニストであるピロカルピンも、1 mM で生存を増加させる傾向を認めた。

### 2. Ach は接着分子発現を調節する

10 mM の Ach は CD11b 発現を有意に上昇させ、CD62L 発現を低下させた。IL-5 の効果は Ach の効果に比べ、より顕著であった。ピロカルピンも 1 mM で CD11b の発現を増加させ、CD62L の発現を減少させる傾向を示した。

### 3. Ach による好酸球遊走

1 mM の Ach に対する有意な好酸球遊走が観察された。1 mM の Ach による遊走の程度は、コントロールの  $206.8 \pm 50.1\%$  であった。

### 4. EDN 放出および TGF- $\beta$ 分泌に対する Ach の影響

IL-5 刺激の有無にかかわらず C5a および IL-5 を含む 1 または 10 mM の Ach は、コントロールと比較して EDN 放出を増加させる傾向を示した。Ach による TGF- $\beta$  放出の有意な増強は観察されなかった。

### 5. M1R, M3R, nAChR アンタゴニストの Ach 誘発生存延長に対する影響

次に、M1R と M3R のアンタゴニストを用いて、Ach による好酸球の生存延長の責任受容体を検討した。10  $\mu$ M の M3R 特異的アンタゴニスト 4DAMP のみが、Ach による生存延長を有意に抑制し、この生存延長は M3R に依存していることが示唆された。

さらに、nAChR アンタゴニストであるメカミラミンは、生存抑制効果を示さなかったことから、Ach の効果は nAChR に依存しないことが示唆された。

### 6. Ach による生存延長に対する nAChR アゴニストの効果

さらに、nAChR アゴニストである DMPP の好酸球生存に対する影響も解析した。Ach と対

照的に、高濃度の DMPP は好酸球の生存率を低下させ、その効果は nAChR アンタゴニストであるメカミラミンによって抑制された。DMPP の生存抑制効果は nAChR を介して誘導されることが示唆された。

好酸球を Ach と DMPP の両方でインキュベートした場合、Ach による生存延長は、高濃度の DMPP によって部分的に抑制され、DMPP の効果は nAChR アンタゴニストであるメカミラミンによって部分的に逆転した。

#### 7. Ach による CD11b 発現増強は、MEK および PI3K 経路に依存していた

Ach 刺激後の下流のシグナル伝達経路を検討するため、Ach による CD11b 発現上昇に対する MEK1/2 阻害剤 PD98069 と PI3K 阻害剤 LY294002 の効果を検討した。PD98069 と LY294002 は、Ach による CD11b 発現増強を有意に抑制した。これらの結果から、Ach による CD11b 発現の亢進は、MEK および PI3K 経路に依存していることが示唆された。

#### 8. 好酸球におけるムスカリン受容体の mRNA 発現

最後に、様々な細胞や組織におけるムスカリン受容体の mRNA 発現を real-time PCR 法を用いて比較した。ムスカリン受容体は脳組織で顕著に発現しており、次いで肺や大腸組織で発現していた。気道上皮細胞株である BEAS-2B 細胞はムスカリン受容体を強く発現していたが、好酸球、好中球、線維芽細胞での発現は他の細胞に比べ低かった。

#### ● 考察とまとめ

我々は、Ach が好酸球の生存延長、接着分子の発現調節、遊走など様々な側面で好酸球を活性化することを明らかにした。Ach による活性化の程度は IL-5 よりも小さく、好酸球活性化に必要な Ach 濃度は比較的高かった。しかし、喘息患者の炎症組織部位では Ach の局所放出が亢進していると想定され、好酸球の活性化に必要な Ach の局所濃度は達成可能なレベルである可能性がある。これらの知見は、以前の報告で M3R 拮抗薬による抗炎症作用が喘息モデルマウスで観察されたことの一部を説明する可能性がある。

他の細胞としては、神経細胞もムスカリン受容体拮抗薬によってアポトーシスを起こすが、神経細胞は M1R も利用していることが報告されている。

nAChR は好酸球に発現しており、nAChR アゴニストは *in vitro* で好酸球の機能を抑制することが報告されているが、今回の研究でも、DMPP による好酸球のアポトーシス増加が観察された。Ach と DMPP の効果のバランスとしては、Ach による生存延長は、DMPP によって部分的にしか阻害されなかったことから、生存に対する効果は M3R の寄与がより大きいことが示唆された。さらに、nAChR アンタゴニストであるメカミラミンは Ach による生存延長の抑制効果を示さなかったことから、nAChR に対する Ach の作用は限定的であると考えられた。結論としては、Ach は主として M3R を介して好酸球を活性化する機能が優位であると考えられた。

#### ● 結論

我々は、Ach が好酸球を様々な側面で直接機能的に活性化することを明らかにした。これらの知見は喘息病態における神経免疫連関のメカニズムの一部を説明できるかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長瀬洋之
2. 発表標題 好酸球の最前線～重症好酸球性疾患の制御に向けて～. Keynote lecture
3. 学会等名 日本アレルギー学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹下裕理、伊東彩香、宇治野真理子、山岸静香、小林このみ、杉本直也、長瀬洋之
2. 発表標題 アセチルコリンによる好酸球活性化の責任受容体と活性化プロファイルの検討
3. 学会等名 日本アレルギー学会総会
4. 発表年 2021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
研究分担者	杉本 直也  (Sugimoto Naoya)  (40724175)	帝京大学・医学部・客員研究員   (32643)	
研究分担者	小林 このみ  (Kobayashi Konomi)  (70800118)	帝京大学・医学部・助手   (32643)	

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