

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 6 年 6 月 1 日現在

機関番号：32680

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15261

研究課題名（和文）喘息における炎症収束機構の解明とその制御を基盤とした難治性喘息治療法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of inflammatory resolution in asthma and development of treatment for refractory asthma based on the regulation of inflammatory resolution

研究代表者

成田 知也（Narita, Tomoya）

武蔵野大学・薬学部・助教

研究者番号：10834765

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：喘息において炎症が慢性化するメカニズムはよくわかっていないが、炎症収束機構の破綻が炎症慢性化の原因のひとつとして想定されている。申請者のこれまでの実験からButyrophilin-like9（Btnl9）が肺において炎症収束に関与する可能性が示されていた。そこで、本研究はアレルギー性気道炎症の収束におけるBtnl9の役割を明らかにすることを目的に解析を行なった。その結果、アスペルギルス誘導性アレルギー性気道炎症の収束においてBtnl9が好中球の制御に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症収束機構の破綻は喘息における炎症慢性化の原因となっている可能性があり、炎症収束機構破綻の是正は治療標的となることが望める。しかし、アレルギー性気道炎症における炎症収束の詳しいメカニズムはわかっていない。本研究の結果から、Btnl9が好中球の制御を介してアレルギー性気道炎症の収束に関与している可能性が示唆された。今後、さらに研究が進みBtnl9がアレルギー性気道炎症を収束させる詳細なメカニズムが明らかにできれば、難治性喘息の有望な治療標的となることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of chronic inflammation in asthma remains unclear, but dysregulation of inflammatory resolution process is one of the cause of chronic inflammation. Our previous experiments suggested the possibility that Butyrophilin-like 9 (Btnl9) may be involved in the inflammatory resolution process in the lung. Therefore, we investigated the role of Btnl9 in resolution of allergic inflammation. Consequently, we found that Btnl9 was involved in the regulation of neutrophils in resolution of aspergillus-induced allergic inflammation.

研究分野：免疫学

キーワード：喘息

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

喘息は慢性の気道炎症により気道の狭窄および閉塞や気道過敏性の亢進が引き起こされる炎症性肺疾患である。喘息の治療は吸入ステロイド薬の普及によって目覚ましい進歩を遂げ、ここ30年で喘息死する患者は格段に減った。しかし、吸入ステロイド薬による治療に抵抗性を示す患者や、経口ステロイド薬や抗体製剤のような高度な治療をもってしてもコントロールすることができない患者は依然として存在している。このような難治性喘息患者は未だ存在する喘息死患者の大部分を占めており、これらの患者をいかに治療するかが課題として残されている。

喘息の研究は2型自然リンパ球が発見されたことで飛躍的に進展したが、喘息の病態には未だ不明な点が多く残されている。喘息の本態は気道の慢性炎症であり、難治化にも慢性炎症が深く関わっているが、喘息において炎症が慢性化するメカニズムはよくわかっていない。炎症が慢性化するメカニズムのひとつとして炎症収束機構の破綻が想定されているが、アレルギー性気道炎症における炎症収束の詳しいメカニズムはわかっておらず、実際に喘息において炎症収束機構が破綻しているかどうか不明である。

ButyrophilinはB7分子に類似した構造を持つ免疫グロブリンスーパーファミリーである。一部のButyrophilinには組織常在型T細胞を制御する機能があることがわかっているが、それ以外のButyrophilinの機能は未だ明らかになっていない。申請者は遺伝子発現解析と遺伝子欠損マウスの解析からButyrophilinのひとつであるButyrophilin-like9 (Btnl9)が肺において炎症収束因子として機能しており、その発現低下の持続や欠損が炎症の慢性化や喘息難治化を引き起こす可能性を見出した。

2. 研究の目的

炎症収束におけるBtnl9の役割を明らかにするとともに、Btnl9による炎症収束メカニズムを分子レベルで解明することで、難治性喘息の新規治療法開発のための基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)蛍光標識したリコンビナントBtnl9を用いてBtnl9標的細胞を染色した後、セルソーターによりBtnl9標的細胞およびBtnl9非結合細胞を単離した。そして、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析を行なった。遺伝子発現解析の結果をもとにBtnl9標的細胞で発現の高い遺伝子をいくつかピックアップし、フローサイトメーターでピックアップされた遺伝子がタンパク質としてBtnl9標的細胞に発現しているかどうかをフローサイトメーターで調べた。

(2)アスペルギルス抗原を用いてC57BL/6背景およびBALB/c背景のBtnl9ノックアウトマウスにアレルギー性気道炎症を誘導し、炎症の急性期および収束期における肺に浸潤する炎症細胞をフローサイトメーターで調べた。

4. 研究成果

(1)Btnl9標的細胞における遺伝子発現解析

これまでの解析から、Btnl9がB細胞の一部に結合すること、Btnl9が結合するB細胞には抑制性サイトカインIL-10を産生するB細胞が多いことを見出していた。これまでに制御性B細胞(Breg)がIL-10を産生することは知られているが、Btnl9が結合するB細胞は既存のBregマーカーでは分類できないことから、Btnl9標的B細胞は固有の機能を持った特殊な細胞集団である可能性が考えられた。そこで、Btnl9標的B細胞に特徴的な遺伝子発現パターンを明らかにするために、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、Btnl9が結合しないB細胞に比べBtnl9標的B細胞で発現が有意に高かったのは243遺伝子、有意に低かったのは122遺伝子あった。発現が高かった遺伝子には*Il18*や*Grn*、*Pirb*など免疫に関わる遺伝子もいくつか含まれており、Btnl9標的B細胞がこれらを介して免疫制御に関与することが予想された。Btnl9結合B細胞に特異的なマーカー分子を同定するため、発現が高かった遺伝子のうちコードされているタンパク質が細胞表面に発現しているもの(*CD68*、*Csf2rb*、*Adgre1*、*Ly6c2*、*Pirb*)についてフローサイトメーターで解析した。しかし、これらの遺伝子がコードするタンパク質はBtnl9が結合するB細胞の表面に検出できなかった。今後、他の遺伝子についても検討する必要がある。

(2)アスペルギルス抗原誘導性アレルギー性気道炎症におけるBtnl9の役割の解析

これまでの研究で、C57BL/6背景Btnl9ノックアウトマウスではアスペルギルス抗原誘導性アレルギー性気道炎症の収束が遅延傾向になることが観察されていた。しかし、再現性に問題があったためBALB/cマウスへの戻し交配によってBALB/c背景Btnl9ノックアウトマウスを作製した。BALB/cマウスはTh2応答が誘導されやすい系統であり、アレルギー性気道炎症を誘導したBtnl9ノックアウトマウスの表現型がより鮮明に観察できるのではないかと考えたためである。

BALB/c 背景 Btl9 ノックアウトマウスにアスペルギルス抗原でアレルギー性気道炎症を誘導したところ、C57BL/6 背景 Btl9 ノックアウトマウスと同様に急性期では肺に浸潤する炎症細胞の違いは見られなかった。一方で、炎症誘導から 1 週間後（収束期）における BALB/c 背景 Btl9 ノックアウトマウスにおいては、野生型マウスに比べ肺に好中球が多く残っている傾向にあった。さらに、炎症誘導から 2 週間後になると Btl9 ノックアウトマウスの肺では好中球が 1 週間後に比べ多くなっており、野生型マウスとの差はより大きくなっていった。これらの結果は、Btl9 がアレルギー性気道炎症の収束期において好中球の抑制に機能していることを示唆している。興味深いことに、C57BL/6 背景 Btl9 ノックアウトマウスとは異なり、BALB/c 背景 Btl9 ノックアウトマウスでは好酸球に変化は見られなかったことから、Btl9 の機能はマウスの遺伝背景により異なる可能性が考えられた。

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