

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16131

研究課題名（和文）自然免疫系気道アレルギー炎症における活性イオウ分子種の役割解明

研究課題名（英文）Elucidation of the Role of Active Sulfur Molecular Species in Innate Immune System Airway Allergy and Inflammation

研究代表者

光根 歩 (Mitsune, Ayumi)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：80895904

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）：本研究では活性硫黄分子種産生酵素(CPERS)により産生される活性イオウ分子種(RSS)が2型自然免疫リンパ球(ILC2)を介した自然免疫機序による2型気道炎症に与える影響を明らかにすることを目的とした。真菌アレルギーやIL-33により誘導される自然免疫による2型気道炎症がCPERSヘテロ欠損マウスで亢進すること、IL-33で活性化されたILC2の2型サイトカイン産生能がCPERSの発現減弱により亢進することを明らかにした。CPERSより生成されるRSSは、ILC2の増殖や2型サイトカイン産生能を抑制的に制御することで、自然免疫機序による2型気道炎症を制御している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、喘息やアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患の難治化病態に対しては、副腎皮質ステロイドや免疫抑制剤、生物学的製剤が治療の中心となっている。現行治療は長期使用による有害事象や経済性の問題を抱えている。本研究によりRSSがILC2を介した自然免疫機序を負に制御することが示唆されたこのことは、RSSが新規アレルギー戦略として極めて適応範囲が広い創薬につながる可能性を示し、社会的に学術的だけでなく、社会的にも意義のある成果と考える。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to clarify the effect of active sulfur species (RSS) produced by active sulfur species producing enzyme (CPERS) on type 2 airway inflammation mediated by type 2 innate immune lymphocytes (ILC2). We found that type 2 airway inflammation induced by fungal allergens and IL-33 is enhanced in CPERS heterozygous mice, and that type 2 cytokine production by IL-33-activated ILC2 is enhanced by reduced expression of CPERS. The results suggest that RSS generated by CPERS may regulate type 2 airway inflammation through an innate immune mechanism by suppressively regulating ILC2 proliferation and type 2 cytokine production.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：気管支喘息

1. 研究開始当初の背景

本邦では依然、性別、年齢を問わず、気管支喘息を含めたアレルギー疾患を有する者の増加がみられる。喘息のうち5~10%は吸入ステロイド薬等の既存治療に抵抗性の難治性喘息で、新規治療法の創出のためには病態難治化機序の解明が急務である。我々は、吸入ステロイド治療を受けている喘息患者および asthma-COPD overlap(ACO)患者の誘発喀痰検体の解析を行い、ACO患者喀痰検体は酸化ストレス、ニトロ化ストレス指標が喘息患者に比し有意に上昇しており、新規内因性還元物質である活性イオウ分子種(RSS)が有意に低下していることを明らかにした。さらに、ACO患者では炎症性サイトカインやケモカインが上昇しており、喘息患者に比し吸入ステロイド抵抗性の炎症病態が惹起されており(Kyogoku Y, Mitsune A, et al. JACI 2019)、このことは、ACO および重症喘息において、レドックス不均衡がステロイド抵抗性に関与していることを示唆していた。また、最近の研究により、喘息の気道2型炎症では2型ヘルパーT細胞(Th2)を中心とした獲得免疫機序のみならず、自然免疫機序においては2型自然リンパ球(ILC2)が重要な役割を果たしており、病態難治化の要因であることが明らかになりつつある ILC2 の活性化制御機構を解明することは、難治性喘息に対する新規の診断・治療および予防法の開発に必須であると考えられる。

近年、ILC2を含む免疫細胞の活性化・増殖・分化には、解糖系などの代謝調節や酸化還元制御が重要であることが報告されている。応募者の研究室では RSS の基本分子システインパーサルフィド(CysSSH)を含めた RSS がマウス諸臓器のみならずヒト肺にも存在していることを明らかにしている(Ida T, et al. PNAS 2014, Numakura T, et al. Thorax 2017)。活性イオウ分子種は新規の内因性還元分子であり、極めて高い抗酸化能を有する他、ポリスルフィド化を介したタンパク質保護・機能制御にも関与している(Ida T, et al. PNAS 2014, Akaike T, et al. Nat commun 2017)。さらに、連携研究機関の研究により、ミトコンドリア型 cysteinyl-tRNA synthetase(CPERS)が生体内の主要な活性イオウ分子種合成酵素(CPERS)であることが、CPERS 遺伝子欠損マウスの作成により判明した(Akaike T, et al. Nat commun 2017)。また最近の研究により、RSS ドナーの投与による細胞内 RSS の上昇により、Toll-like Receptor/MyD88 のシグナルが抑制的に制御されることが判明しており(Zhang T, et al. Cell Chem Biol 2019)、本研究結果は同じく受容体下流シグナリングに MyD88 を用いる、ILC2 活性化に重要な上皮サイトカイン IL-33 および受容体のシグナリングが RSS の制御を受けている可能性を示唆している。そこで、応募者は、自験例も含めたこれまでの知見を踏まえ、ILC2 機能および活性化がレドックス不均衡の影響を受けている可能性、さらに、RSS による ILC2 の機能制御の可能性を考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、CPERS により産生される RSS による ILC2 機能制御機構を解明し、喘息の自然免疫機序における RSS の病態制御作用を個体レベルで検証することで、新規難治性喘息治療を創出するための基盤確立を目的とする。

本研究は、免疫・アレルギー病態における ILC2 活性化の新規制御因子候補として、CPERS と CysSSH をはじめとする RSS の役割を明らかにするものである。CPERS により産生される RSS を介した生物学的機能は、連携研究機関である本学環境医学分野による、質量分析を応用した独自の解析技術を駆使した研究で最近明らかにされつつある(Akaike T, et al. Nat commun 2017)。今回応募者は、ともに重症喘息におけるステロイド抵抗性のメカニズムに関与していると考えられる、レドックス不均衡と ILC2 の双方に着目し、レドックス制御因子である RSS の ILC2 を中心とした自然免疫系による炎症・アレルギーにおける役割について解析するという独創的な研究を着想した。現在、喘息やアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患の難治化病態に対しては、副腎皮質ステロイドや免疫抑制剤、生物学的製剤が治療の中心となっている。現行治療は長期使用による有害事象や経済性の問題を抱えている。本研究により RSS による制御機構が明らかとなり、さらに RSS 供与体による細胞・動物投与実験により ILC2 を介した自然免疫機序を負に制御することを実証することができれば、新規アレルギー戦略として極めて適応範囲が広い創薬につながる可能性がある。以上のことから、本研究は独自性もあり、発展性のある研究と考えた。

3. 研究の方法

- (1) 野生型マウスと CPERS 遺伝子欠損ヘテロマウス(CPERS^{+/-}; ホモは胎生致死)に対して、アルテルナリア抽出物を経鼻投与し 2 型気道炎症モデルを作成する。気管支肺胞洗浄液(BALF)を採取し、BALF 中の炎症細胞数と細胞分画、IL-33 や TSLP など上皮由来サイトカインの産生量を解析する。同マウス肺組織を用いて HE 染色で好酸球性気道炎症を、PAS 染色で杯細胞過形成の病理学的評価を行う。さらにマウス肺 ILC2 数や Th2 数およびサイトカイン産生につき解析を行う。
- (2) 野生型マウスと CPERS^{+/-}マウスに対して、IL-33 を経鼻投与し 2 型気道炎症モデルを作成する。BALF 中の炎症細胞数と細胞分画を解析する。同様にマウス肺組織を用いて HE 染色にて好酸球性気道炎症を、PAS 染色で杯細胞過形成の病理学的評価を行う。IL-33 投与後のマ

ウス肺 ILC2 数およびサイトカイン産生を解析する。

- (3) 野生型および CPERS+/-マウス肺から Magnetic-activated cell sorting(MACS)および Fluorescent activated cell sorting(FACS)を用いて ILC2 を精製し、IL-33 などのサイトカインの存在下で培養した際の活性化、機能変化を flow cytometry, ELISA 等により解析する。

4. 研究成果

(1) 定常状態の Th2 細胞と ILC2 の検討

まず、定常状態における CPERS ヘテロ欠損による Th2 細胞と ILC2 への影響について検討するために、未刺激の野生型マウスと CPERS+/-マウスの肺を用いて FCM で解析した。未刺激の野生型マウスと CPERS+/-マウスの肺組織から単一細胞懸濁液を作製し表面抗原染色と細胞内染色を行った。Th2 細胞は CD45+ CD3+ CD4+ GATA3hi の細胞群と定義した。定常状態における Th2 細胞数は野生型マウスと CPERS+/-マウスとで差を認めなかった。

Th2 細胞の解析と同様に、未刺激の野生型マウスと CPERS+/-マウスの肺組織から単一細胞懸濁液を作製し、表面抗原染色を行い FCM で ILC2 を解析した。ILC2 は CD45+ Lineage- suppression of tumorigenicity 2 (ST2)+ の細胞群と定義した。肺 ILC2 数は野生型マウスと CPERS+/-マウスとで差を認めず、肺総細胞中の ILC2 の割合も野生型マウスと CPERS+/-マウスとで差はなかった。

(2) 真菌アレルゲン誘導性 2 型気道炎症モデルにおける 2 型気道炎症の検討

気管支喘息の病態形成に関わる免疫学的機序のうち、ILC2 を主体とした自然免疫機序による 2 型気道炎症における CPERS の役割を明らかにするために、野生型マウスと CPERS+/-マウスを用いて、真菌アレルゲンであるアルテルナリア抽出物を 3 日間連続で経鼻投与する 2 型気道炎症モデルを作製した。このモデルは、ILC2 を介した自然免疫機序による 2 型気道炎症モデルとして広く用いられており、抗原曝露後短期間では、Th2 細胞への分化は誘導されないことが知られている。野生型マウスと CPERS+/-マウスに対してアルテルナリア抽出物もしくは PBS を 3 日間経鼻投与し、最終投与から 24 時間後に BALF および肺組織を採取し、下記の項目について評価を行った。

アルテルナリア投与群において、BALF 中の好酸球数は CPERS+/-マウス ($1.73 \pm 0.38 \times 10^5$ cells/ml) の方が野生型マウス ($8.72 \pm 4.58 \times 10^4$ cells/ml) より有意に増加していた ($p=0.0123$)。また、好酸球の割合においても、CPERS+/-マウス ($35.0 \pm 6.9\%$) の方が野生型マウス ($24.3 \pm 2.5\%$) より有意に増加していた ($p=0.0113$)。一方、PBS 投与群において、BALF 中の細胞数、細胞分画には差を認めなかった。

次に BALF 中の 2 型サイトカインの含有量について検討した。アルテルナリア投与群の BALF 中 IL-5 は CPERS+/-マウス (131 ± 73 pg/ml) の方が野生型マウス (33.8 ± 12.5 pg/ml) より有意に増加していた ($p=0.0079$)。BALF 中 IL-13 も CPERS+/-マウス (149 ± 41 pg/ml) の方が野生型マウス (89.9 ± 23.6 pg/ml) より有意に増加していた ($p=0.0238$)。また、真菌アレルゲン誘導性気道炎症モデルでは、アラミンの中でも IL-33 と TSLP の産生が亢進することが知られていることから 57)、BALF 中の IL-33 及び TSLP の含有量を測定した。BALF 中 IL-33 は野生型マウス (3.52 ± 3.32 pg/ml) と CPERS+/-マウス (4.99 ± 4.11 pg/ml) とで差を認めず ($p=0.5505$)、BALF 中 TSLP も野生型マウス (3.80 ± 0.39 pg/ml) と CPERS+/-マウス (4.00 ± 0.20 pg/ml) とで差を認めなかった ($p=0.3251$)。

気道炎症の病理学的変化を検討するために、肺病理組織標本作製し、HE 染色と PAS 染色で検討を行った。アルテルナリア投与群の肺病理組織標本の HE 染色において、CPERS+/-マウスの気道周囲では野生型マウスに比してより高度な好酸球やリンパ球による炎症細胞浸潤を認められた。気道周囲の炎症細胞浸潤を定量化した inflammation score においても、CPERS+/-マウス (3.42 ± 0.23) の方が野生型マウス (2.70 ± 0.47) より有意に増加していた ($p=0.0156$)。また、アルテルナリア投与群の PAS 染色において、PAS 陽性細胞の割合は CPERS+/-マウス ($54.9 \pm 5.0\%$) の方が野生型マウス ($35.2 \pm 15.0\%$) より有意に増加していた ($p=0.0238$)。PBS 投与群では炎症細胞浸潤やムチン産生を認めなかった。

アルテルナリア経鼻投与後に採取した肺組織から単一細胞懸濁液を作製し、FCM で肺細胞中の ILC2 の割合を解析した。ILC2 の細胞数は CPERS+/-マウスで ($1.44 \pm 0.53 \times 10^5$ cells) の方が野生型マウス ($6.84 \pm 4.86 \times 10^4$ cells) より有意に増加していた ($p=0.0473$)。また、肺総細胞中の ILC2 の割合も CPERS+/-マウス ($0.536 \pm 0.172\%$) の方が野生型マウス ($0.306 \pm 0.141\%$) より有意に増加していた ($p=0.0494$)。

(3) IL-33 誘導性 2 型気道炎症モデルにおける 2 型気道炎症の検討

真菌アレルゲン誘導性気道炎症モデルにおいて、CPERS+/-マウスで肺 ILC2 数が増加し、2 型気道炎症が増強している一方で、BALF 中の IL-33 や TSLP の含有量に差を認めなかったことから、CPERS+/-マウスにおける RSS の低下が ILC2 の IL-33 に対する反応性に与える影響を直接検討するため、IL-33 誘導性気道炎症モデルを作製した。野生型マウスと CPERS+/-マウスに対し IL-33 もしくは PBS を 3 日間経鼻投与し、気管支肺胞洗浄液は最終投与の 24 時間後 (day 3) と 72 時間後 (day 5) に、肺組織は 72 時間後 (day 5) に採取した。IL-33 を 3 日間経鼻投与するモデルにおいて、2 型気道炎症や ILC2 数の増加は day 3 よりも day 5 で強く見られる一方、BALF 中サイトカインの含有量は day 3 でピークに達することが報告されており 25)、BALF は day 3 と

day 5 それぞれの時点で採取した検体を解析した。

IL-33 投与群において、BALF の総細胞数は CPERS+/-マウスの方が野生型マウスより有意に増加していた (野生型マウス 対 CPERS+/-マウス: day3 $6.0 \pm 2.17 \times 10^5$ cells/ml 対 $1.10 \pm 0.25 \times 10^6$ cells/ml, $p=0.0028$, day5 $1.14 \pm 0.31 \times 10^6$ cells/ml 対 $1.76 \pm 0.20 \times 10^6$ cells/ml, $p=0.0058$)。また、好酸球数 (野生型マウス 対 CPERS+/-マウス day3 $3.95 \pm 1.55 \times 10^5$ cells/ml 対 $8.66 \pm 2.53 \times 10^5$ cells/ml, $p=0.0023$, day5 $8.84 \pm 2.37 \times 10^5$ cells/ml 対 $1.50 \pm 0.16 \times 10^6$ cells/ml, $p=0.0015$) 及び好酸球の割合 (野生型マウス 対 CPERS+/-マウス day3 $65.5 \pm 3.2\%$ 対 $77.9 \pm 5.3\%$, $p=0.0004$, day5 $77.5 \pm 4.8\%$ 対 $85.0 \pm 1.3\%$, $p=0.0159$) も有意に増加していた。

IL-33 投与群において、day3 の BALF 中 IL-5 含有量は CPERS+/-マウス (1507 ± 517 pg/ml) の方が野生型マウス (751 ± 361 pg/ml) より有意に増加していた ($p=0.0121$)。また、day3 の BALF 中 IL-13 含有量も CPERS+/-マウス (223 ± 114 pg/ml) の方が野生型マウス (99.7 ± 63.3 pg/ml) より有意に増加していた ($p=0.0380$)。

IL-33 投与群の肺組織の HE 染色において、CPERS+/-マウスでは野生型マウスに比してより高度な好酸球やリンパ球による炎症細胞浸潤を認めた。Inflammation score においても、CPERS+/-マウス (3.14 ± 0.27) の方が野生型マウス (2.34 ± 0.30) より有意に増加していた ($p=0.0021$)。また、IL-33 投与群の PAS 染色において、PAS 陽細胞の割合は CPERS+/-マウス ($68.9 \pm 4.6\%$) の方が野生型マウス ($56.5 \pm 7.7\%$) より有意に増加していた ($p=0.0144$)。

IL-33 の投与後に採取した肺組織から単一細胞懸濁液を作製し、FCM で肺細胞中の ILC2 を解析した。肺 ILC2 の細胞数は CPERS+/-マウス ($7.80 \pm 3.20 \times 10^5$ cells/lung) の方が野生型マウス ($5.37 \pm 1.80 \times 10^5$ cells/lung) より有意に増加していた ($p=0.0477$)。肺総細胞中の ILC2 の割合も CPERS+/-マウス ($2.11 \pm 0.55\%$) の方が野生型マウス ($1.57 \pm 0.47\%$) より有意に増加していた ($p=0.0261$)。

(4) マウス肺から回収した活性化 ILC2 の再刺激実験

活性化 ILC2 の 2 型サイトカイン産生能が IL-33 や TSLP などのサイトカイン刺激によりどのように変化するかを検討するため、活性化 ILC2 を RPMI 完全培地のみ、IL-33 含有 RPMI 完全培地、IL-33 及び TSLP 含有 RPMI 完全培地の 3 条件で培養した。24 時間培養後の培養上清を回収し、上清中の IL-5 及び IL-13 の含有量を ELISA で測定した。RPMI 完全培地のみで培養した培養上清中の 2 型サイトカイン含有量は、IL-5 (野生型マウス 対 CPERS+/-マウス: 193 ± 23 pg/ml 対 245 ± 32 pg/ml, $p=0.0391$)、IL-13 (野生型マウス 対 CPERS+/-マウス: 121 ± 15 pg/ml 対 171 ± 26 pg/ml, $p=0.0168$) とともに CPERS+/-マウスの方が野生型マウスよりも有意に増加しており、FCM での検討と同様の結果であった。RPMI 完全培地に IL-33 を加えると、野生型マウス、CPERS+/-マウスともに培養上清中の IL-5、IL-13 の含有量は RPMI 完全培地の培養した場合より増加しており、IL-5 は CPERS+/-マウス (910 ± 311 pg/ml) の方が野生型マウス (508 ± 104 pg/ml) よりも有意に増加していた ($p=0.0495$)。さらに、IL-33 に TSLP を加えて培養すると、IL-33 のみ加えて培養した場合よりもさらに IL-5、IL-13 産生が増加しており、IL-5 (野生型マウス 対 CPERS+/-マウス: 2365 ± 219 pg/ml 対 2836 ± 139 pg/ml, $p=0.0109$)、IL-13 (野生型マウス 対 CPERS+/-マウス: 2106 ± 534 pg/ml 対 2828 ± 244 pg/ml, $p=0.0492$) とともに CPERS+/-マウスの方が野生型マウスよりも有意に増加していた。

本研究により、CPERS 由来の RSS は、IL-33 に対する反応性や ILC2 の増殖を負に制御することで、自然免疫機序による 2 型気道炎症を抑制的に制御している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yamada M, Motoike IN, Kojima K, Mitsune A, Ohe T, Ichinose M, Yamamoto M, Sugiura H.
2. 発表標題 Genetic Loci for Lung Function in Japanese Adults with Adjustment for Exhaled Nitric Oxide Levels as an Indicator of Type 2 Inflammation in Airway.
3. 学会等名 The International Conference of the American Thoracic Society 2022 San Francisco. USA. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木歩, 沼倉忠久, 山田充啓, 松本周一郎, 佐々木優作, 光根歩, 奥山祐子, 石井直人, 赤池孝章, 一ノ瀬正和, 杉浦久敏.
2. 発表標題 2型自然リンパ球における活性イオウ分子種の役割についての検討
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 Ayumi Suzuki, Mitsuhiro Yamada, Tadahisa Numakura, Yusaku Sasaki, Yorihiro Kyogoku, Rie Tanaka, Ayumi Mitsune, Yuko Okuyama, Naoto Ishii, Takaaki Akaike, Masakazu Ichinose, Hisatoshi Sugiura
2. 発表標題 The role of the principal cysteine persulfide synthase in the innate immunity of type 2 airway inflammation
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 Ayumi Suzuki, Mitsuhiro Yamada, Tadahisa Numakura, Yusaku Sasaki, Yorihiro Kyogoku, Rie Tanaka, Ayumi Mitsune, Shuichiro Matsumoto, Yuko Okuyama, Naoto Ishii, Takaaki Akaike, Masakazu Ichinose, Hisatoshi Sugiura.
2. 発表標題 A cysteine persulfide synthase is involved in the regulation for innate immunity of type 2 airway inflammation
3. 学会等名 The 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (APSR 2021) (国際学会)
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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