

令和 6 年 5 月 12 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16308

研究課題名（和文）気道上皮角層蛋白発現と気道上皮バリアー機能を改善する新規喘息治療法の開発

研究課題名（英文）Development of airway epithelial keratinization and barrier function as a novel therapeutic target for asthma

研究代表者

井上 英樹（Inoue, Hideki）

昭和大学・医学部・兼任講師

研究者番号：80813162

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）：喘息は気道上皮バリアー機能の低下が関与する。真菌曝露による気道上皮細胞への影響を検討した。気道上皮細胞株16HBE14o-にアルテルナリア抽出液を加え遺伝子・蛋白発現を検討した。RNA-Seqにおいて、アルテルナリア曝露によりRNA制御や転写関連遺伝子の発現上昇を認めた。細胞内小器官の細胞膜機能関連遺伝子の低下を認めた。アルテルナリア曝露により炎症性サイトカインIL-6、IL-8の上昇を認め、角層蛋白フィラグリンの低下を認めた。JTC-801処理を行ったが、フィラグリンの改善は認めなかった。真菌曝露による気道炎症の制御と角層蛋白バリアー機能の保持が真菌感作喘息の病態改善に関与する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

気管支喘息は成人の5-9%が罹患する疾患であり、コントロール不良は社会経済的な損失を招く。近年、真菌感作が喘息悪化に深く関与することが示唆されており、その病態解明が重要課題となっている。本研究では、真菌曝露が気道上皮細胞に及ぼす影響を網羅的に解析し、真菌感作喘息の病態解明に新たな視点を与えることを目的とした。気道上皮細胞株16HBE14o-にアルテルナリア抽出液を曝露し、遺伝子発現解析、炎症性サイトカイン測定、角層蛋白発現解析を行った。真菌曝露により、炎症性サイトカインの放出と角層蛋白の減少、細胞膜機能の低下が認められた。これらの異常は、気道炎症の悪化と気管支喘息の発症に寄与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Epithelial barrier dysfunction is implicated in asthma. We investigated the effects of fungal exposure on airway epithelial cells. Gene and protein expression were examined in the airway epithelial cell line 16HBE14o- after exposure to alternaria extract. RNA-Seq revealed upregulation of RNA regulation and transcription-related genes upon alternaria exposure. Downregulation of genes related to cell membrane function of intracellular organelles was observed. Alternaria exposure induced upregulation of the inflammatory cytokines IL-6 and IL-8, and downregulation of the filaggrin, a keratinocyte protein. Treatment with JTC-801 did not improve filaggrin expression. Control of fungal exposure-induced airway inflammation and maintenance of the keratinocyte protein barrier may be involved in the improvement of the pathophysiology of fungal sensitization asthma.

研究分野：気管支喘息

キーワード：気道上皮細胞 角層蛋白 気管支喘息

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は、気道炎症を主たる病態とする疾患である。外界からのウイルス、アレルゲン(花粉、真菌など) 大気汚染物質などを吸入することで気道炎症が起こり、気管支喘息の状態が悪化することが知られている。気道炎症を惹起する原因の1つとして、気道上皮組織の脆弱性が想定されており、気管支喘息患者の気道上皮バリアー機能が低下していることが報告されている。気道上皮バリアー機能に関わる因子として、上皮角層蛋白がある。我々は、真菌(アルテルナリア)曝露によるアレルギー性喘息モデルマウスの気道上皮組織を用いた RNA シーケンシング(RNA-seq)を行い、フィラグリンやケラチン 6b など角層蛋白の遺伝子発現低下が示唆される結果を報告した。真菌曝露によって気管支喘息が悪化することは以前から知られていたが、真菌曝露による気道上皮への影響、特に、気道上皮角層蛋白発現や気道上皮バリアー機能に対する影響は明らかになっていない。

2. 研究の目的

真菌曝露による気道上皮角層蛋白発現への影響を明らかにし、真菌曝露の気道上皮バリアー機能への影響を検索することによって、真菌曝露による気管支喘息悪化の原因を探索することを目的とする。

3. 研究の方法

気道上皮細胞(16HBE14o-細胞株)を培地に浸した状態(submerged)にし、真菌曝露としてアルテルナリア抽出液(100 µg/ml)を加えて刺激実験を行った。アルテルナリア曝露による気道上皮細胞の遺伝子変化を検討するため、網羅的遺伝子発現解析の手法の一つである、RNA-Seqを行った。気道上皮細胞 16HBE14o-にアルテルナリア抽出液(100 µg/ml)を over night で曝露を行い、細胞回収・RNA抽出を行った。RNA-SeqはNovaSeq 6000 (Illumina)を用い、ペアエンドリード(リード長 100bp)にてRNA-Seqを行った。既知遺伝子および既知転写産物発現量を推定し、推定発現量をTPMで正規化した。解析方法として、ヒートマップ、ボルカノプロット、Gene Ontology (GO)解析、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)を行った。

気道上皮細胞への真菌曝露による気道炎症の影響を検討するため、リアルタイムPCRおよびELISAを用いて、炎症性サイトカインと上皮角層蛋白の発現の検討を行った。IL-6およびIL-8、ケラチン6B(KRT6B)、フィラグリンの遺伝子発現と蛋白発現の検討を行った。上皮角層蛋白補充療法の可能性を検討するために、フィラグリンを誘導することが知られているJTC-801(10nM)で処理を行い、炎症性サイトカインと上皮角層蛋白の発現への効果を検討した。

4. 研究成果

アルテルナリア真菌曝露による気道上皮細胞への網羅的遺伝子発現変化としてRNA-Seqを行った。コントロール群とアルテルナリア曝露群で比較を行ったところ、統計学的に有意な遺伝子発現変動遺伝子数は、6,364 遺伝子(増加 1,615 遺伝子、減少 4,749 遺伝子、図1および図2)であった。

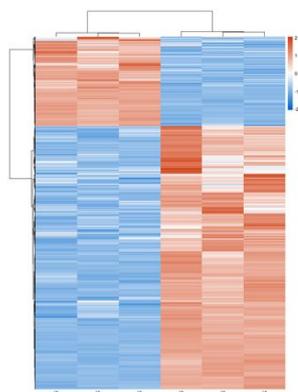


図1: ヒートマップ. 左からS4, S5, S6がアルテルナリア曝露群

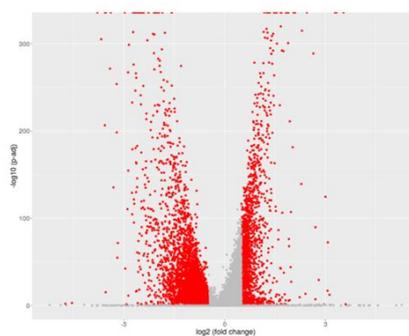


図2: 発現変動遺伝子のボルカノプロット. 縦軸は $-\log_{10}(p_{adj})$ 、横軸は avg_log_2FC . 各点は個々の遺伝子、赤色の点は発現変動遺伝子を表す

発現変動遺伝子の発現量データを用いてGO解析を行った。アルテルナリア曝露によって発現が増加した遺伝子において、濃縮が見られたGOタームとして、リボ核タンパク質複合体生成、リボソーム生成、ノンコーディングRNA(ncRNA)・リボソームRNA(rRNA)処理など、RNA制御や転写関連のGOタームが多く認められた(図3および図4)。アルテルナリア曝露によって発現が低下した遺伝子において、濃縮が見られたGOタームとしては、カルボン酸・有機酸異化経路、小分子異化経路、リソソーム膜、脂肪酸代謝経路などがあり、細胞内小器官の細胞膜機能の

低下が示唆される結果であった（図5および図6）。

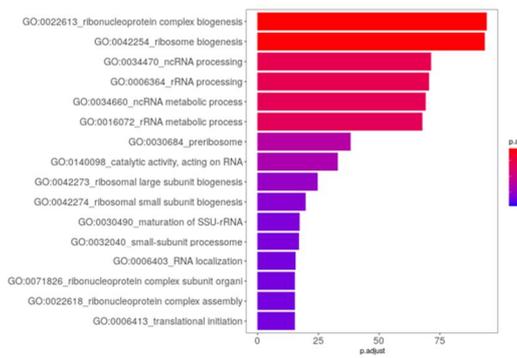


図3：アルテルナリア曝露で発現が増加した遺伝子に対するGO解析結果。調整済みp値<0.001のGOタームのうち、調整済みp値の低い順に上位15を表示

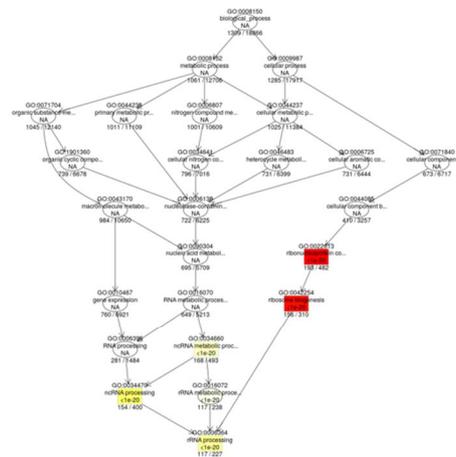


図4：アルテルナリア曝露で発現が増加した遺伝子に対するGOターム解析結果。調整済みp値の低い順に上位5のタームを四角で、その他のタームを楕円で表示。四角及び楕円の背景色は白色、黄色、赤色の順に統計的な有意性が高い

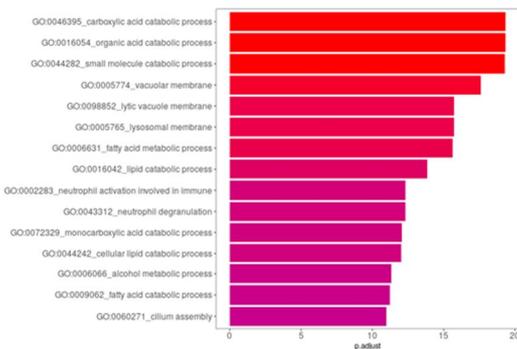


図5：アルテルナリア曝露で発現が低下した遺伝子に対するGO解析結果。調整済みp値<0.001のGOタームのうち、調整済みp値の低い順に上位15を表示

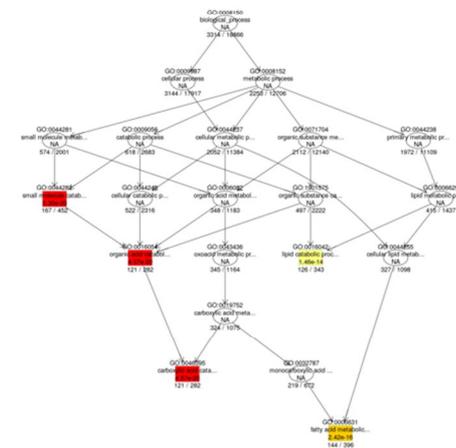


図6：アルテルナリア曝露で発現が低下した遺伝子に対するGOターム解析結果。調整済みp値の低い順に上位5のタームを四角で、その他のタームを楕円で表示。四角及び楕円の背景色は白色、黄色、赤色の順に統計的な有意性が高いことを示す

リアルタイム PCR を用いて、上皮角層蛋白と炎症性サイトカインの遺伝子発現の検討を行った。アルテルナリア曝露によって、代表的な炎症性サイトカインである IL-6 および IL-8 の遺伝子発現上昇が認められた（図7）。角層蛋白遺伝子の発現について、ケラチン 6B(KRT6B)およびフィラグリンの遺伝子発現の上昇が認められた。蛋白発現について ELISA を用いて検討した。炎症性サイトカインである IL-6 および IL-8 について、細胞培養上清において測定を行い、アルテルナリア曝露によって発現上昇を認めた（図8）。フィラグリンおよびケラチン 6B について、細胞溶解液において測定を行い、アルテルナリア曝露によってフィラグリンの発現低下をみとめた。ケラチン 6B については変化を認めなかった。フィラグリンを誘導することが知られている JTC-801(10nM)で処理を行い、炎症性サイトカインの発現への効果を検討した。JTC-801 単独処理でフィラグリンの増加を確認できたが、アルテルナリア曝露と JTC-801(10nM)を同時に処理したものでは、IL-6 および IL-8 の減少効果は認めなかった（図8）。

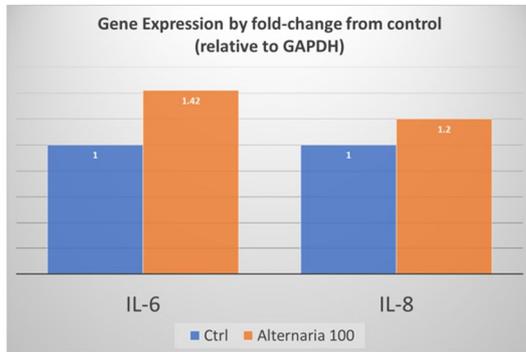


図7：アルテルナリア曝露後、炎症性サイトカインIL-6及びIL-8の遺伝子発現上昇が認められた

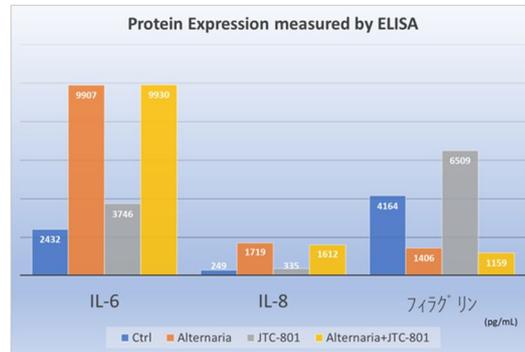


図8：アルテルナリア曝露後、炎症性サイトカインIL-6及びIL-8の蛋白発現上昇とフィラグリン蛋白発現の低下が認められた。JTC-801の効果は限定的であった

以上の結果から、気道上皮細胞において、アルテルナリア曝露により、リボソーム蛋白関連の遺伝子発現の上昇が認められた。また、細胞内小器官の細胞膜機能関連の遺伝子の低下が認められた。その下流因子の候補として、IL-6 や IL-8 の炎症性サイトカインの遺伝子および蛋白発現の上昇が認められ、またフィラグリンでみた上皮角層蛋白の低下が認められた。真菌曝露による気道上皮障害の治療候補として JTC-801 の効果を検証した。アルテルナリア曝露後の JTC-801 によるフィラグリン機能の回復については今後の検討課題として残った。真菌曝露による気道炎症の制御と角層蛋白バリアー機能の保持が真菌感作喘息に関与する可能性が示唆された結果であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohta Shin, Tanaka Akihiko, Okazaki Tomoko, Mikuni Hatsuko, Uno Tomoki, Uchida Yoshitaka, Kimura Tomoyuki, Fukuda Yosuke, Jinno Megumi, Hirai Kuniaki, Miyata Yoshito, Inoue Hideki, Homma Tetsuya, Yamamoto Mayumi, Suzuki Shintaro, Sagara Hironori	4. 巻 44
2. 論文標題 Fetal Lung Cells Transfer Improves Emphysematous Change in a Mouse Model of Neutrophil Elastase-Induced Lung Emphysema	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Issues in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 3923 ~ 3929
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cimb44090269	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Hideki, Akimoto Kaho, Ikeda Hitoshi, Sato Hiroki, Uno Tomoki, Uchida Yoshitaka, Kawahara Tomoko, Fukuda Yosuke, Hirai Kuniaki, Miyata Yoshito, Homma Tetsuya, Ohta Shin, Yamamoto Mayumi, Suzuki Shintaro, Tanaka Akihiko, Sagara Hironori	4. 巻 183
2. 論文標題 Comprehensive Gene Expression Signature Using RNA-Seq in Airways of Mouse Model of Severe Asthma with Fungal Sensitization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Archives of Allergy and Immunology	6. 最初と最後の頁 142 ~ 152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000519172	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
---------	---------