

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20916

研究課題名（和文）慢性炎症性気道疾患における新規バイオマーカーの多面的検討

研究課題名（英文）Multifaceted Investigation of Novel Biomarkers in Chronic Inflammatory Airway Diseases

研究代表者

福田 健介（Fukuda, Kensuke）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50910759

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：慢性閉塞性肺疾患（COPD）は20%ほどに喘息を合併し、喘息 COPDオーバーラップ（ACO）と呼ばれる。喘息合併がないCOPDと比較してACOは臨床経過や治療方針が異なるため、ACOの診断的バイオマーカーの確立が重要である。本研究ではCOPD、喘息、ACOのマウスモデルを用い、アレルギー性気道炎症の起点となるII型肺胞上皮に着目し、各モデルから同細胞を単離してシングルセルRNA-seq解析を施行した。同解析では、ACOモデルで特異的に発現が亢進した遺伝子をいくつか同定した。これらにつきin situ hybridizationや免疫組織化学染色を行い、それぞれの発現レベルや局在を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

閉塞性呼吸器疾患の鑑別診断は、臨床的には生理学的所見や病歴、治療薬に対する反応性などから総合的に判断されることが多い。本研究から発展する知見を用いて複数のバイオマーカーを活用することで、ACO患者の病態理解が深まり、診断・治療のマネージメントの質的向上に寄与するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is associated with asthma in approximately 20% of patients, referred to as asthma-COPD overlap (ACO). Since the clinical course and treatment strategy of ACO are different compared to COPD without asthma complications, it is important to establish a diagnostic biomarker for ACO. In this study, using mouse models of COPD, asthma, and ACO, we focused on type II alveolar epithelial cells, which are the starting point of allergic airway inflammation, and isolated these cells from each model for single-cell RNA-seq analysis. The analysis identified several genes that were specifically up-regulated in the ACO model. In situ hybridization and immunohistochemical staining were performed on these genes to show their expression levels and localization.

研究分野：閉塞性肺疾患におけるバイオマーカー研究

キーワード：ACO COPD 気管支喘息 バイオマーカー NGAL YKL-40 sRAGE シングルセル解析

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、COPD はともに有病率の高い呼吸器疾患で、世界でそれぞれ約 2.4 億人、約 4 億人の患者がいると推計されている。2015 年には世界で約 320 万人が COPD に関連する病態で死亡している。したがって喘息、COPD の病態解明と診断・治療法の開発は重要な課題である。

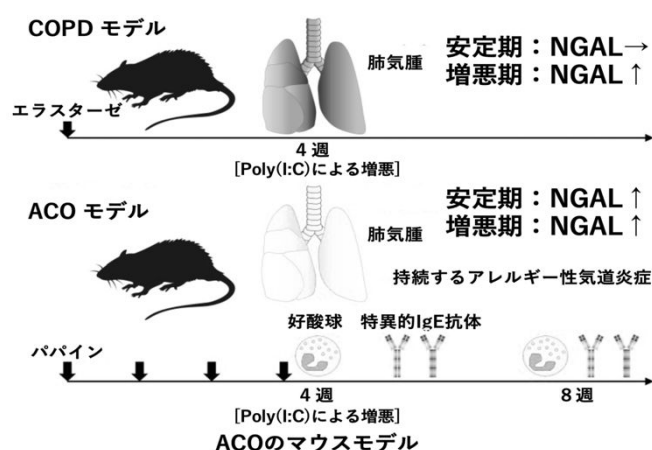
COPD のうち約 20-50% に喘息の合併があると報告され、ACO として近年注目を集めている。喘息を合併しない COPD と比較して、ACO は急性増悪や合併症の頻度が高く、吸入ステロイドを中心とした治療を行う必要がある。しかし、国際的に統一された ACO の診断基準はなく、診断的バイオマーカーも確立されていない現状である。COPD ではタバコ煙曝露やエラストーゼ経気道投与、喘息ではダニ抽出物 (HDM) の経気道投与やオボアルブミン (OVA) 感作のマウスモデルが確立されている。しかし ACO のマウスモデルは従来存在しなかった。

研究代表者はパパイン(システインプロテアーゼ)の経気道的な反復投与により、好酸球性気道炎症・気道過敏性亢進・肺気腫・肺コンプライアンス上昇が生じることを示し、ACO 病態を良好に再現する新規マウスモデルを確立した

(Fukuda K et al, *Allergy*. 2021・右図)

さらに、研究代表者は確立した ACO

マウスモデルを基盤として、ウイルス RNA を模倣する合成二本鎖 RNA アナログ: Poly(I:C) 刺激による気道炎症の急性増悪モデルも作成した。エラストーゼ投与による COPD (肺気腫) モデルとは対照的に、パパイン投与による ACO モデルでは気管支肺胞洗浄液中の NGAL が上昇していること、さらに Poly(I:C) 刺激によって血清中でも発現が亢進することを見出した。これは喘息や COPD 単独と比較して ACO 患者の喀痰中で NGAL が高値になるとの臨床的知見 (Iwamoto H et al, *Eur Respir J*. 2014) とも一致していた。



2. 研究の目的

本研究では、研究代表者の確立した ACO モデルと、喘息モデル (HDM 投与) COPD モデル (エラストーゼ投与) との比較検討をさらに進め、ACO の分子病態のさらなる理解を目指した。すなわちアレルギー性気道炎症と気腫性変化が併存することにより、構造的・機能的な変化が気道・肺胞領域に生じることが、分子レベルでいかなる変容を伴っているのかを検証した。さらに、喘息や COPD 単独と ACO との鑑別診断に活用できるようなバイオマーカーの同定を目指し、個体レベル・細胞レベルでの遺伝子発現変化を網羅的に検証した。

すでに研究代表者は ACO マウスモデルにおいて、バイオマーカー候補である NGAL や YKL-40 (James AJ et al, *Am J Respir Crit Care Med*. 2016) の上昇や、sRAGE (Sukkar MB et al, *Eur Respir J*. 2012) の低下を確認していた。これら分子の産生細胞や産生機序を解明することで、ACO 病態の理解が深まるものと考えられた。ACO は喘息と COPD が様々な程度で合併した heterogeneous な疾患概念である。複数のバイオマーカーを活用することで、ACO 患者の病態理解が深まり、診断・治療のマネジメントの質的向上に寄与するものと期待された。

3. 研究の方法

研究代表者は ACO モデル、COPD モデルに加えて、HDM の経気道投与による喘息モデルの作出も行っている。病態解析の手法として、組織学的解析、液性因子（サイトカイン・ケモカイン・増殖因子など）の発現プロファイリング、呼吸生理学的検査を用いて検討を重ねている。前述の通り、各疾患の患者の病態が再現されており臨床的妥当性のあるモデルであることを確認している。本研究ではより詳細な解析を進めるため、各疾患モデルの肺組織のトランスクリプトームの比較解析（bulk RNA-sequencing）を施行した。

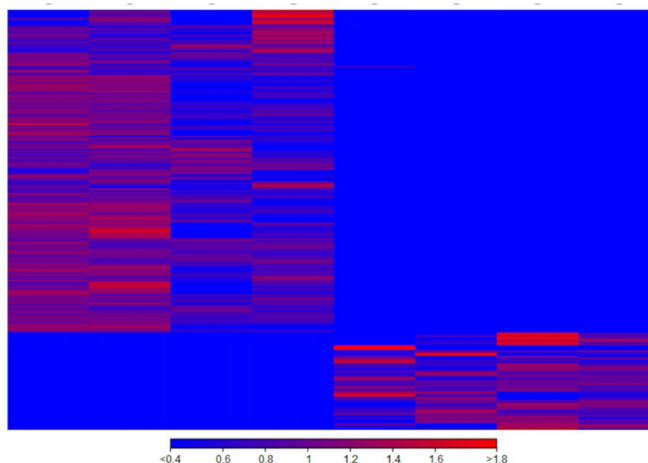
型肺胞上皮細胞はマウスにおいて IL-33 などのアラージン分子を産生してアレルギー性気道炎症の起点となるほか、肺胞上皮の修復・再生に寄与するため、喘息や COPD の病態形成において重要である。そこで、病態に応じた 型肺胞上皮細胞の多様性の変化を同定するためシングルセル解析を施行した。

次に、バイオマーカー候補となる新規分子や NGAL・YKL-40・RAGE の、発現細胞や発現部位を同定し、各疾患の病態における継時的な発現変化を調べるため、各疾患のマウスモデル肺組織検体で免疫組織染色および RNA *in situ* hybridization を施行した。

4. 研究成果

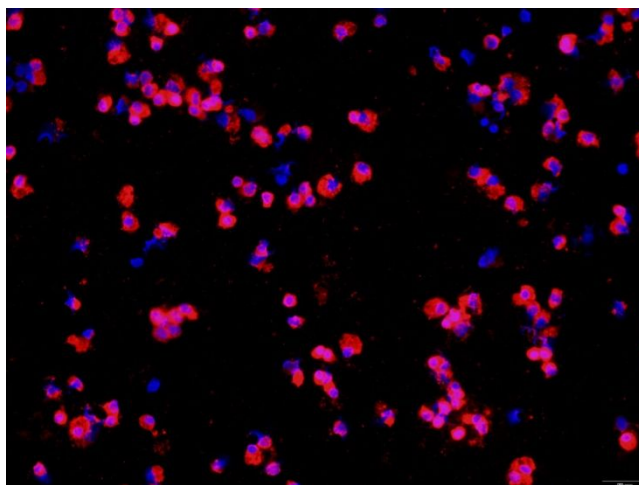
(1) 全肺ホモジネートの bulk RNA-sequencing 解析

まず予備実験として、各モデルマウスにおいて全肺ホモジネートを用いた bulk-RNA-sequencing 解析を施行した。右図は COPD 単独および喘息単独モデルで有意な発現変動が見られた遺伝子を除外して、ACO モデル（左 4 群）および PBS コントロール群（右 4 群）の発現変動遺伝子を示したヒートマップである。このように、ACO モデルで特異的に発現が変動する遺伝子の存在が示唆された。

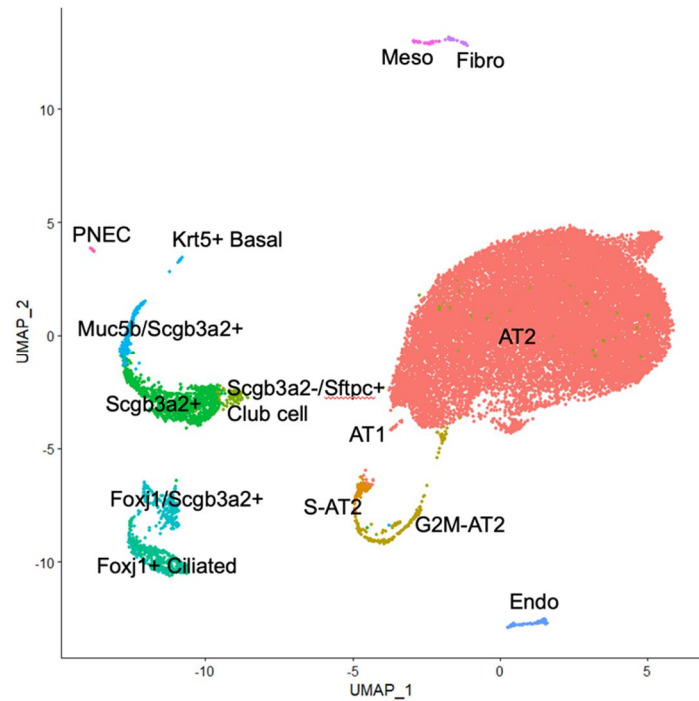


(2) 型肺胞上皮細胞を用いた各マウスモデルのシングルセル解析

シングルセル解析を行うため、高純度でマウス 型肺胞上皮細胞を単離した。 型肺胞上皮細胞の単離には magnetic-activated cell sorting を用い、90%以上の純度、80%以上の生存率で安定していずれのマウスモデルからも 型肺胞上皮細胞が単離可能であることを確認した。

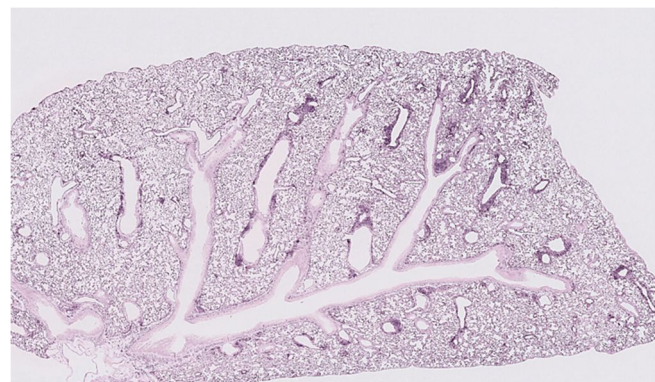
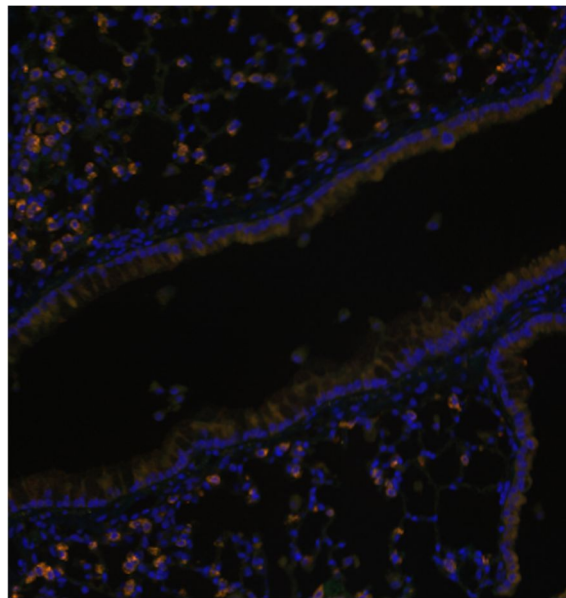


次に、単離された全細胞を用いた UMAP を右図に示す。SP-C 陽性で型肺胞上皮細胞と考えられる細胞集団の中に、異なる特性を示す細胞群がいくつか存在することが示唆された。これらの中には炎症性気道疾患における役割が未報告である遺伝子で特徴づけられる細胞群が散見され、これらについてもさらに検討を進めた。



(3) 各種バイオマーカー候補についての免疫組織染色および RNA *in situ* hybridization

NGAL、YKL-40、RAGE など閉塞性肺疾患・炎症性気道疾患におけるバイオマーカーとして臨床報告のある分子に加えて、(2) で同定された新規バイオマーカー候補についても、各マウスモデル肺で免疫組織染色および RNA *in situ* hybridization を施行した。各モデルマウスに対して各対象遺伝子での検討を行ったため、Figure が多数となり割愛するが、右図の通り蛍光免疫組織化学染色や RNA *in situ* hybridization の技法を用いて、各遺伝子の発現細胞、colocalization、RNA/蛋白レベルでの発現評価を行うことができた。これらの知見は、各種バイオマーカーの変動が見られた際に、肺組織においてどのような細胞がどの程度障害を受けているか、などの臨床情報を与え、病態の本態に迫る情報が得られるものと考えられる。



現在は手術検体から得られるヒト肺組織を集積中であり、これら組織検体に対しても同様の検討を行うことで、より臨床応用に近づく知見が得られるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀江 真史, 福田 健介, 松崎 博崇, 田中 秀憲, 三上 優, 鹿毛 秀宣, 齋藤 朗, 長瀬 隆英, 平石 尚久
2. 発表標題 トランスクリプトーム解析によるAsthma-COPD Overlap (ACO) の分子病態の解明
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

〔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
---------	---------