

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号:17701

研究種目:基盤研究(B)

研究期間:2010 ~ 2012

課題番号:22390167

研究課題名(和文) 重症喘息の分子機構解明と新治療標的の探索

研究課題名(英文) Exploration of mechanisms & new therapeutic targets for severe asthma

研究代表者

井上 博雅(INOUE HIROMASA)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号:30264039

研究成果の概要(和文): 気管支喘息の病態には、ヘルパー2型T(Th2)細胞が産生するサイトカイン(Th2サイトカイン)や脂質メディエータが重要な役割を担っていると考えられており、喘息の発症や増悪にはウイルス感染が関与している。重症喘息では、特にインターロイキン(IL-)13の関与が注目されており、喘息におけるIL-13発現の機序、ウイルス感染による喘息増悪の機序を検討した。

Th1細胞を慢性的に抗原刺激すると、転写因子E4BP4を誘導して、IL-13を発現することが判明した。また、喘息患者の末梢血T細胞でIL-13を発現する細胞の多くはE4BP4が陽性であり、喘息でIL-13を産生する細胞は、Th2細胞のみでなく、一度分化したTh1細胞もIL-13産生能を有することが明らかとなった。

喘息発症におけるウイルスの関与の検討で、抗原感作の際にウイルスが作用すると喘息反応が増強した。これは、樹状細胞に発現誘導された共刺激分子B7-H1(PD-L1)が、IL-13を選択的に産生するCD8 T細胞を誘導することによって生じることが判明した。喘息患者の気道上皮はウイルス感染に対する防御が低下しており、喘息はウイルス感染に伴い増悪する。インターフェロン(IFN-)λは感染防御を担っているが、IL-13は気道ウイルス感染に伴うIFN-λ産生を抑制することが判明した。

本研究により、喘息におけるIL-13の産生細胞とその発現誘導の機序が明らかとなり、ウイルス感染による喘息増悪の機序に関する新たな知見が得られた。これらを制御することにより、重症喘息に対する新たな治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文): Effective treatment of severe asthma is a major unmet need. T helper (Th) 2 cytokines and lipid mediators, especially IL-13, are considered to play essential roles in pathophysiology of severe refractory asthma. For the acute exacerbation of asthma, the most common trigger is respiratory tract infection with viruses. We studied here the mechanisms underlying increased production of IL-13 in asthma and the pathogenesis of asthma exacerbations after viral infection.

We hypothesized that Th1 cells could be a source of IL-13. IL-13 expression was induced after chronic stimulation of Th1 cells and IL-13 expression was regulated by the transcription factor E4BP4.

Many RNA viruses, pathogenic for the respiratory tract, generate double stranded (ds)RNA during their replication. We found that synthetic dsRNA during sensitization augmented asthma phenotypes in a mouse model, which was associated with enhanced induction of IL-13-producing CD8 T cells. Costimulatory molecules B7-H1 (also known as PD-L1) plays a crucial role in the process.

Impaired production of type III interferons (IFNs, IFN-λ) is related to the severity of asthma exacerbation. We found that dsRNA induces IFN-λ production in airway epithelial cells and alveolar macrophages and that IL-13 suppresses the IFN-λ expression. These mechanisms may contribute to the impairment of the antiviral defense in asthmatics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2012年度	2,800,000	840,000	3,640,000
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：気管支喘息、サイトカイン、ロイコトリエン B4、インターロイキン 13

1. 研究開始当初の背景

難治性喘息の治療法は確立しておらず、その病態解析から新規治療法の確立が必要である。喘息の動物モデルや遺伝子改変マウス、患者検体の解析から、インターロイキン (IL-)4、IL-5、IL-9、IL-13などのヘルパー2型T(Th2)サイトカインが喘息病態に関与していることが報告されている。重症難治性喘息では、IL-13や脂質メディエータなどが重要な役割を担っていると考えられている。

IL-13を主に産生する細胞はTh2細胞であり、一度分化したTh1細胞はIL-13を産生しないと考えられていた。しかし、IL-18の存在下で抗原刺激を受けるとIL-13を産生することなども報告され、Th1細胞やTh2細胞は分化の終着点ではなく、これまで産生のみられなかったサイトカインを産生する可塑性を有する可能性がある。そこで、喘息気道におけるIL-13産生細胞を明らかにする必要がある。

喘息の発症や増悪にはウイルス感染が関与しているが、その機序は未だ不明である。

2. 研究の目的

重症難治性喘息の気道におけるIL-13発現の機序とその制御について明らかにするとともに、ウイルス感染時の病態の変化について解析することを目的とし、以下の研究を行った。

- (1) 気管支喘息におけるIL-13の主な産生細胞の検索
- (2) 喘息におけるウイルス感染防御の低下の機序の解明
- (3) 気道にウイルス感染時、喘息が増悪する機序の解明

3. 研究の方法

Th1細胞に1週間の間隔で4回の抗原刺激をくり返すことで慢性的な抗原刺激を行っ

た。慢性的な抗原刺激前後のIL-13産生しないTh1細胞と産生するようになったTh1細胞との間での遺伝子の発現パターン比較はマイクロアレイや定量RT-PCRを用いた。サイトカインや蛋白の発現は、サスペンションアレイシステム、フローサイトメトリー解析、共焦点顕微鏡を用いた。

培養気道上皮は、ヒト由来のBEAS-2B細胞株、マウス由来のTGMBE-02-3細胞株を用い、ウイルス関連分子による刺激は合成2本鎖RNA (ポリイノシン・ポリシチジン酸, poly IC))を用いた。

アレルギー性喘息のマウスモデルは、卵白アルブミンの感作、吸入曝露により作成し、喘息反応として、麻酔人工換気下の吸入アセチルコリンに対する気道過敏性、気管支肺泡洗浄液中の好酸球数、気道杯細胞の増生などを指標とした。共刺激分子の関与は、抗B7-H1抗体やB7-H1欠損マウスを用いた。

脂質メディエータの一つロイコトリエン B4 (LTB4) の受容体BLT1/BLT2の機能解析には、各受容体の欠損マウスを用いた。

喘息患者由来の検体として、末梢血より分離したCD4 T細胞を用い、フローサイトメトリーや共焦点顕微鏡を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) Th1細胞もIL-13を産生する可能性があることから、そのTh1細胞からのIL-13発現誘導のメカニズムを解析した。ナイーブCD4T細胞をTh1条件で慢性的に抗原刺激をすると、Th1サイトカインであるインターフェロン (IFN)- γ を発現すると同時にIL-13を発現した。慢性的抗原刺激前後のTh1細胞で遺伝子の発現パターンを比較し、浮上した16の候補タンパク質をTh1細胞に発現させたところ、時計遺伝子のレギュレーターとして同定されていた基本ロイシンジッパー転写因子E4BP4がIL-13発現を誘導する能力があることが判明した。また、喘息患者の末梢血T細胞で、IL-13

を発現する細胞の多くはE4BP4が陽性であった。

すなわち、Th1細胞においてIL-13の可塑的な産生を制御するタンパク質としてE4BP4を発見し、IL-13の発現機構が判明した。

(2) 喘息患者の気道上皮はウイルス感染に対する防御が低下しており、喘息はウイルス感染に伴い増悪する。IFN- λ は気道ウイルスに対する感染防御を担っている。IFN- λ 産生に対するIL-13の影響を検討したところ、IL-13は気道ウイルス感染に伴うIFN λ 産生を抑制することが判明し、喘息増悪予防のターゲットが明らかとなった。

(3) マウス喘息モデルにおいて、抗原感作の際にウイルス関連分子である二本鎖RNA(dsRNA)が作用すると、抗原再曝露による喘息様反応が著明に増強した。これは、樹状細胞に発現誘導された共刺激分子B7-H1(PD-L1)が、IL-13を選択的に産生するCD8 T細胞を誘導することによって生じることが判明した。

この成果は、ウイルス気道感染時の喘息増悪機序の解明に繋がるとともに、治療薬の作用メカニズム解析に応用できるものと考えられる。

一方、抗原再曝露時には気道の樹状細胞や肺胞マクロファージにB7-DCが発現し、インターフェロン(IFN)- γ を介して喘息様反応を抑制させた。

これら共刺激分子や共抑制分子の機能を制御することによって、喘息病態に対する新たな治療が可能と考えられた。

(4) 脂質メディエータの一つロイコトリエンB4(LTB4)の低親和性LTB4受容体BLT4の生理作用は不明な点が多かったが、生理作用のない脂肪酸と考えられていた12-HHT(ヒドロキシヘプタデカエイコサテトラエン酸)がLTB4よりも低濃度でBLT2を活性化することが近年判明した。BLT2の発現を制御し、アレルギー性喘息モデルの解析、及び喘息患者検体でのBLT2発現レベルの解析の結果より、12-HHT/BLT2系はCD4陽性T細胞でIL-13発現をコントロールすることにより、免疫・アレルギー反応を負に制御し、CD4陽性T細胞におけるBLT2の発現レベルの低下が喘息の病態に関与していることが判明した。

本研究により、喘息におけるIL-13の産生細胞とその発現誘導の機序が明らかとなり、ウイルス感染による喘息増悪の機序に関する新たな知見が得られ、喘息病態に対する新たな

治療ターゲットが明らかとなった。これらを制御することによって、重症難治性喘息に対する新たな治療の開発が可能と考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件) 全て査読あり

(1)Matsunaga Y, Fukuyama S, Okuno T, Sasaki F, Matsunobu T, Asai Y, Matsumoto K, Saeki K, Oike M, Sadamura Y, Machida K, Nakanishi Y, Kubo M, Yokomizo T, Inoue H. Leukotriene B4 receptor BLT2 negatively regulates allergic airway eosinophilia. *FASEB J* 2013 in press
doi:10.1096/fj.12-217000

(2)Kan-o K, Matsumoto K, Inoue H, Fukuyama S, Asai Y, Watanabe W, Kurokawa M, Araya J, Kuwano K, Nakanishi Y. Corticosteroids plus long-acting beta2-agonists prevent double-stranded RNA-induced upregulation of B7-H1 on airway epithelium. *Int Arch Allergy Immunol* 2012;160(1):27-36
doi: 10.1159/000338430

(3)Matsumoto K, Asai Y, Fukuyama S, Kan-o K, Matsunaga Y, Noda N, Kitajima H, Inoue H. IL-6 induced by double-stranded RNA augments allergic inflammation via suppression of Foxp3+T cell/IL-10 axis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012;46(6):740-7
doi: 10.1165/rcmb.2010-04790C

(4)Motomura Y, Kitamura H, Hijikata A, Matsunaga Y, Matsumoto K, Inoue H, Atarashi K, Hori S, Watarai H, Zhu J, Taniguchi M, Kubo M. The transcription factor E4BP4 regulates the production of IL-10 and IL-13 in CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2011;12(5):450-9
doi:10.1038/ni.2020

(5)Moriwaki A, Matsumoto K, Matsunaga Y, Fukuyama S, Matsumoto T, Kan-o K, Noda N, Asai Y, Nakanishi Y, Inoue H. IL-13 suppresses double-stranded RNA-induced IFN-lambda production in lung cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;404(4):922-7
doi:10.1016/j.bbrc.2010.12.082

[学会発表] (計 8 件)

(1)Inoue H et al. Role of leukotriene B4 receptor BLT2 in allergic airway inflammation. Keystone Symposia

Conference “Pathogenic Processes in Asthma and COPD” 2013年1月 Santa Fe

(2)井上博雅 ほか 重症気管支喘息の病態：炎症細胞と炎症性サイトカイン 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会 2012年11月 大阪市

(3)井上博雅 気管支喘息における気道炎症の機序 第23回日本アレルギー学会春季臨床大会 2011年5月 千葉市

(4)井上博雅 シンポジウム：アレルギー病態におけるレギュラトリーT細胞の役割をめぐって「気管支喘息病態とTreg」 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010年11月 東京都

(5)井上博雅 教育セミナー：喘息・COPDにおける類似点と相違点 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010年11月 東京都

(6)井上博雅 シンポジウム：シグナル伝達分子：ベンチからベッドサイドへ、ベッドサイドからベンチへ「SOCS、JAK 阻害薬による喘息の治療」 第75回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2010年6月 北九州市

(7)Matsunaga Y, Inoue H. et al. Role of 12-HHT receptor (low affinity leukotriene B4 receptor, BLT2) in allergic airway inflammation 2010 International Conference of the American Thoracic Society 2010年5月 New Orleans

(8)Inoue H, et al. IL-13 Suppresses double-stranded RNA-induced IFN-lambda production in respiratory Cells. 2010 International Conference of the American Thoracic Society 2010年5月 New Orleans

〔図書〕(計4件)

(1)井上博雅. 気管支喘息. 今日の治療指針2013年版 p288-290. 山口徹・北原光夫・福井次矢編集, 医学書院, 東京, 2013
<http://www.igaku-shoin.co.jp/bookDetail.do?book=84344>

(2)町田健太朗, 東元一晃, 井上博雅. 喘息に対する抗サイトカイン療法. Annual Review呼吸器 2012. 永井厚志・巽 浩一郎・桑野和善・高橋和久編集, 中外医学社, 東京, 2012
https://www.chugaiigaku.jp/modules/shop/index.php?main_page=product_info&cPath=4_47&products_id=1222

(3)井上博雅. 慢性閉塞性肺疾患(COPD). 今日の治療指針 2011年版 山口徹・北原光夫・福井次矢編集, 医学書院, 東京, 2011
<http://www.igaku-shoin.co.jp/bookDetail.do?book=81359>

(4)井上博雅, 町田健太朗, 浅井友香里. 気管支喘息におけるIL-33. Annual Review呼吸器 2011. 永井厚志・巽 浩一郎・桑野和善・高橋和久編集, 中外医学社, 東京, 2011
https://www.chugaiigaku.jp/modules/shop/index.php?main_page=product_info&cPath=4_47&products_id=1121

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 博雅 (INOUE HIROMASA)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：30264039

(2)研究分担者

福山 聡 (FUKUYAMA SATORU)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：50380530

前山 隆茂 (MAEYAMA TAKASHIGE)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号：40380456
(H22&H23)

(3)連携研究者

中西 洋一 (NAKANISHI YOICHI)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：20172356

久保 允人 (KUBO MASATO)
東京理科大学・生命科学研究所・教授
研究者番号：40277281

鈴木 敦史 (SUZUKI ATSUSHI)
九州大学・生体防御医学研究所・教授
研究者番号：30415195

横溝 岳彦 (YOKOMIZO TAKEHIKO)
順天堂大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：60302840