

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16165

研究課題名（和文）RNA認識受容体の2型自然リンパ球制御機構から見た気管支喘息新規治療探索

研究課題名（英文）Innate immune receptors recognizing RNA as regulating ILC2 function related with pathogenesis of asthma

研究代表者

石井 崇史（Takashi, Ishii）

東京大学・保健・健康推進本部・助教

研究者番号：30803118

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）：本研究では既存データベースでILC2での発現が示唆されており、細胞質RNA認識受容体であるMDA5やRIG-I(RLRs)に焦点を当て、その機能や認識するリガンド、気管支喘息病態への関与をマウス生体モデルを用いて解明する事、創薬候補としての可能性を検証する事を目的とした。結果としてはMDA5がダニ誘発気管支喘息モデルにおいて保護的な役割を持つこと、またILC2においてもIL-33に起因する可能性があるリガンドへの反応活性の差がMDA5によりもたらされる事が示唆された。引き続きRLRsの気管支喘息における保護的機序の解明やILC2における外因性/内因性核酸の役割を検討していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では気管支喘息の病態における自然免疫受容体のMDA5やRIG-I(RLRs)に焦点を当て、気管支喘息病態への関与をマウス生体モデルを用いて解明する事、特に気管支喘息病態に重要な細胞集団の一つである2型自然リンパ球(ILC2)に着目してRLRsの役割を検証した。結果としてはMDA5がマウスの発気管支喘息モデルにおいて保護的な役割を持つこと、またILC2においてもMDA5による制御が示唆された。今後特にMDA5の気管支喘息における保護的機序の解明やILC2における詳細な役割を検討する事で、気管支喘息の新規治療候補の土台の一つとなりうる意義がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on MDA5 and RIG-I (RLRs), cytoplasmic RNA recognition receptors, whose expression in ILC2 has been suggested by existing databases. Our aim was to elucidate their functions, recognized ligands, and involvement in the pathogenesis of bronchial asthma using a mouse model, as well as to assess their potential as drug candidates. The results indicated that MDA5 plays a protective role in a house dust mite-induced bronchial asthma model. Additionally, it was suggested that MDA5 contributes to the difference in response activity to ligands potentially derived from in vivo reactivity with IL-33 in ILC2. We will continue to investigate the protective mechanisms of RLRs in bronchial asthma and the roles of exogenous/endogenous nucleic acids in ILC2.

研究分野：呼吸器疾患、免疫/炎症

キーワード：気管支喘息 自然免疫 RNA ILC2

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は慢性アレルギー性気道炎症を背景とする呼吸器疾患で、吸入ステロイド治療の導入後に予後は大幅に改善されたが、難治性喘息患者も依然一定割合で存在し、新規治療の探索が課題となっている。病態形成においては抗原提示細胞・T細胞の相互作用から IgE 依存的アレルギー性気道炎症を背景とする適応免疫系の視点から当初より解析されている一方、自然免疫系の関与が、近年様々な視点から示されている。自然免疫受容体には核酸を認識する受容体があり、DNA を認識するものとして Toll-like receptor 9(TLR9)や cGAS-STING 経路、RNA を認識する受容体として TLRs の TLR3,7 から TRIF を経由するシグナル、RIG-I,MDA5 の RIG-I-like receptors (RLRs)から MAVS を経由するシグナルが知られている。RNA を認識する受容体は DNA と同様ウイルス由来核酸を認識し、インターフェロン分泌を介したウイルス駆除に貢献する。TLR に関しては TLR7 アゴニストが気管支喘息患者においてアレルギー応答を減弱させる等、病態関与が指摘されているが、RLRs に関しては気管支喘息病態での役割は不明な点が多い。

ILC2(2型自然リンパ球)は主に上皮細胞から分泌される IL-33 等に応答し、肺においては IL-5/IL-13 を多量に産生してアレルギー性気道炎症に深く関与する細胞として近年注目されている。公開マイクロアレイデータベース上、TLR3 や TLR7 は発現が乏しい一方、RIG-I や MDA5、MAVS の発現が認められている。DNA 受容体の STING は ILC2 に発現し、アレルギー性気道炎症を抑制する事が指摘されている。一方で RIG-I や MDA5 に関しては ILC2 における役割は未解明である。

2. 研究の目的

RNA 受容体の中で RLRs の一つの MDA5 に着目し、ILC2 に発現する MDA5 がアレルギー性炎症に関わる IL-5,IL-13/IL-10 を含む炎症性/抗炎症性メディエーターやの発現/分泌を制御する事で気管支喘息病態に関与するという仮説を立て、気管支喘息病態の新規治療標的として MDA5 が候補となりうるかを検証した。

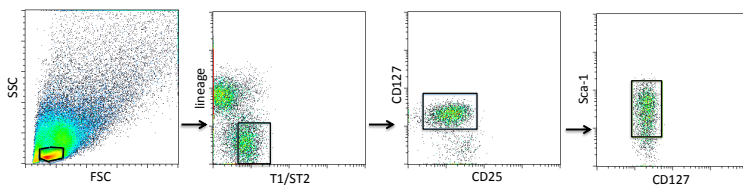
RLRs は定常状態では自己 RNA を認識しないが、自己 RNA が分解されず安定化する条件ではそれらを認識し、自己免疫疾患に関与する事も指摘されている。また、ミトコンドリア由来 2本鎖 RNA が MDA5 に認識されることも指摘されており(Dhir et al. Nature 2018)、内因性 RNA 認識機序が炎症制御に関与する可能性もある。本研究においては、RLRs の ILC2、気管支喘息病態における役割だけでなく、認識するものが外因性核酸か、内因性核酸であるのかにも着目し、各々のアレルギー性気道炎症やメディエーター産生に関する役割と治療標的としての可能性を検討した。

3. 研究の方法

自然免疫受容体の中で気管支喘息との関わりにおいて未解明な部分が多い RLRs に着目し、ILC2 を野生型/MDA5 KO マウスから採取、培養した。RLRs を刺激するものとして外因性核酸を用いてその反応性を解析した。また、ILC2 が増加すると知られている、ダニ誘発気管支喘息モデルを用いて両マウスで表現型を解析した。

(1) ILC2 における RLRs リガンド刺激解析

マウスに IL-33 を点鼻投与後に肺を採取し、肺 ILC2 の分離法、培養に関しては過去の自研究と同様に下図のように施行し、IL-2(10ng/ml)存在下に培養を行った。MDA5 は比較的長鎖 dsRNA を主に認識する。細胞刺激用の核酸リガンド(一本鎖 RNA:5' ppp-RNA, 二本鎖 RNA:Lyovec® poly(I:C) (以下 Lyovec_PIC))と、陽性コントロールとして IL-33(10ng/ml)を野生型/MDA5KO 由来 ILC2 に投与後のアレルギー炎症性/抗炎症性メディエーター産生を qPCR や ELISA、マルチプレックスサイトカインアッセイで検討した。



(2) ILC2 核酸認識に関する生体内での役割の解明

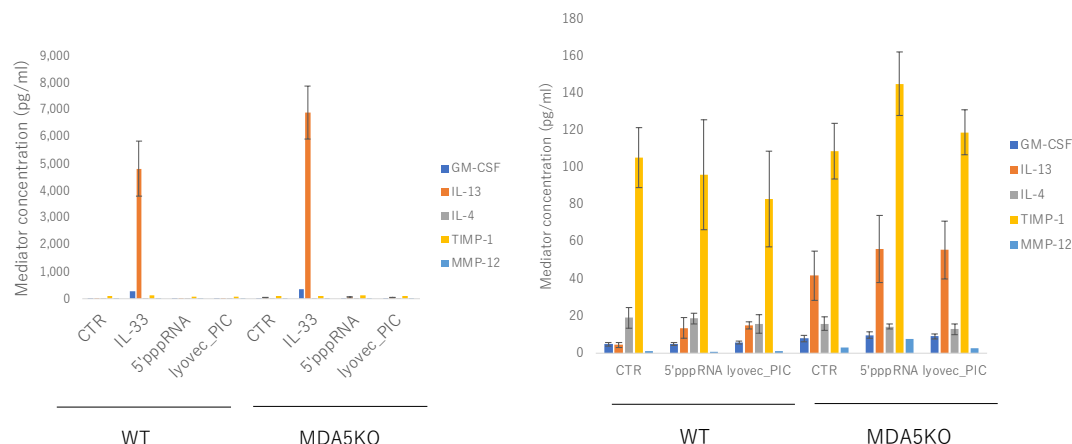
マウス気管支喘息モデルにおける表現型解析・・・野生型/RLRs 遺伝子改変マウスを用いてダニ抽出液を用いた気管支喘息モデルを作成し、表現型を解析する。評価項目は①BALF を用いた細胞分画解析と ELISA/マルチプレックスサイトカインアッセイにてメディエーター定量、②気道周囲リンパ節から単細胞懸濁液を得て抗原再刺激を行い、IL-5/IL-13 を ELISA で測定 ④肺組織 mRNA を用いたアレルギー炎症関与遺伝子の qPCR 発現解析、⑤メサコリン誘発気道

抵抗の測定、⑥肺組織病理の評価(HE/PAS 染色による気道周囲/近傍静脈周囲の炎症細胞浸潤や気道杯細胞の過形成)を行った。

4. 研究成果

(1) WT/MDA5KO マウスに IL-33 を点鼻投与後に肺を採取し、ILC2 を分離した。両系統で ILC2 総数に明らかな差は認めなかった。5' ppp-RNA は細胞内に取り込まれるようにリポフェクション法を使用した。(lyovec_PIC は既処理済)

IL-33 投与により、既知の通り IL-13 が高濃度で検出された。MDA5KO ILC2 の方が IL-13 をより高濃度で検出する傾向を認めた(左下図)。また、GM-CSF も検出され、類似の傾向を認めている(WT vs MDA5KO, 288 ± 23 363 ± 42 , pg/ml)。右下図は核酸物質刺激の結果であるが、IL-33 と比して IL-13 産生能は微力であった。一方で MDA5KO ILC2 は陰性コントロールから GM-CSF や IL-13 が高い傾向があり、刺激後の数値も野生型と比して高値であった。

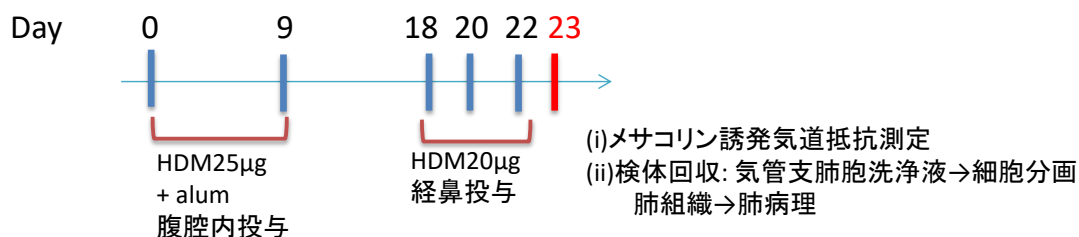


Lyovec_PIC に関しては細胞数を 5000/well → 30000/well に増加して刺激を行った。すると GM-CSF や IL-13 は両群でコントロールより上昇傾向を認めたが、MDA5KO ILC2 においても同等以上の数値を認め、MDA5 でない RLRs の関与の可能性が示唆された。

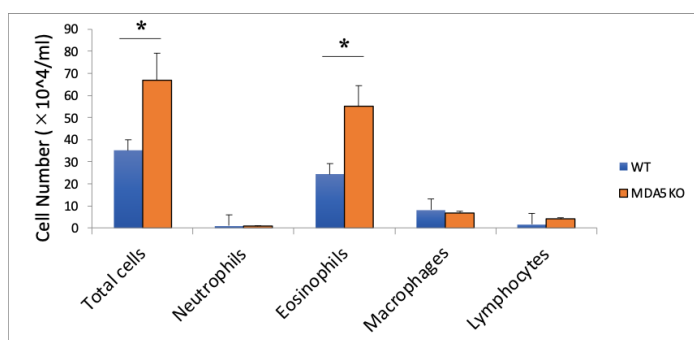
MDA5KO ILC2 の群で全般的に GM-CSF や IL-13 が高値であった事は更なる検証が必要であるが、MDA5KO マウスが IL-33 投与に対し、より高い ILC2 活性化を受けていた可能性も示唆される。

(2) マウス家ダニ(HDM)誘発喘息モデルにおける WT/MDA5KO マウスの表現型の検証

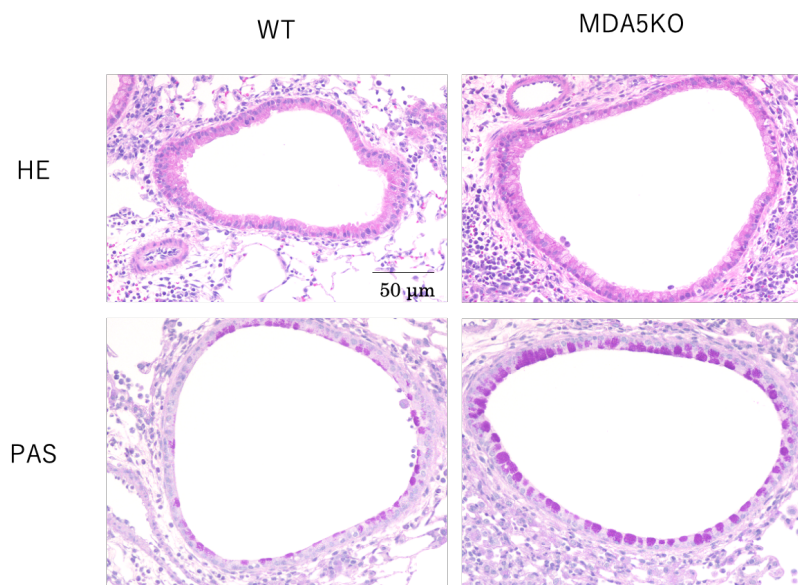
WT, MDA5KO マウスに関しては C57BL/6N をバックグラウンドであるが、RIG-I KO マウスに関しては ICR 系統で C57BL/6N 系統と戻し交配をすると致死的な肝障害が誘発されやすくなる。そのため、使用系統は WT, MDA5KO 二種とした。HDM 誘発喘息モデル作成スケジュールは以下とした。



気管支肺胞洗浄液の細胞分画は下図のように総細胞数、好酸球数の増多を認めたが、MDA5KO マウスでより顕著であった。



肺組織の HE 染色/PAS 染色を以下に示す。MDA5KO マウスにおいて気道周囲の小円形細胞の浸潤、PAS 染色陽性杯細胞が多く認められた。



また、メサコリン誘発気道抵抗を測定したが、MDA5KO マウス群にて、WT 群より有意な上昇を認めた。一方で肺組織 RNA を用いた qPCR では、type2 cytokine の代表である IL-5, IL-13 いずれも WT と MDA5KO で有意差は認められなかった。BALF を用いたマルチプレックスサイトカインアッセイも施行したが、IL-13 は有意差を認めなかった。一方で MDA5KO 群でより高い上昇を認める因子 2 つが同定されており、今後詳細な解析を進める予定としている。

本研究で MDA5 が気管支喘息に保護的な役割を持つこと、また ILC2 においても IL-33 に起因する可能性があるリガンドへの反応活性の差が MDA5 によりもたらされる事が考えられており、引き続き気管支喘息における保護的機序の解明や ILC2 における外因性/内因性核酸の役割を検討していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 石井崇史, 鈴川真穂, 成田知也, 村上祐輔, 熊野恵城, 鹿毛秀宣
2. 発表標題 RNA認識自然免疫受容体MDA5の気管支喘息病態への関与
3. 学会等名 第73回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Takashi Ishii Masahumi Horie Hirokazu Urushiyama Yusuke Murakami Tomoya Narita Naomi Yamashita Keiki Kumano Akira Saito Hidenori Kage1
2. 発表標題 The RNA sensor MDA5 regulates inflammatory and profibrotic responses of Immune Cells In Bleomycin-induced Lung Fibrosis
3. 学会等名 the 64th Annual Meeting of the Japanese Respiratory Society (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Takashi Ishii Yusuke MurakamiTomoya Narita Takahide Nagase Naomi Yamashita
2. 発表標題 RNA-recognizing immune sensor regulates bleomycin-induced activation of macrophages, lymphocytes, and neutrophils and subsequent lung fibrosis
3. 学会等名 APSR 2022 Congress in Seoul (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023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
研究協力者	鈴川 真穂 (Suzukawa Maho)	国立病院機構東京病院・臨床研究室長	

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