

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16182

研究課題名（和文）加齢による気道上皮細胞の変化が気道炎症を制御するメカニズムの解析

研究課題名（英文）Mechanisms of airway inflammation regulated by aging-related changes in airway epithelial cells

研究代表者

折茂 圭介 (Orimo, Keisuke)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・免疫アレルギー・感染研究部・リサーチアソシエイト

研究者番号：50794369

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：今回は、加齢に伴う気道上皮細胞の変化に着目して研究を行った。まずマウスの気管支上皮細胞・2型肺胞上皮細胞における、加齢に伴う遺伝子発現変化の網羅的解析を行い、気管支上皮細胞において老化関連シグナルパスウェイが亢進していることを明らかにした。次に、加齢マウスに主要な喘息の抗原であるハウスダストマイトを吸入させる高齢喘息モデルを用いて、老化関連シグナルパスウェイの高齢喘息病態への関与を検討した。喘息モデルマウスにおいて老化関連シグナルパスウェイを抑制する物質Aを投与すると、好酸球性気道炎症が抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

気道上皮構成細胞は、物理的な外界からの防御機構としての役割だけでなく、サイトカインや脂質などの刺激により免疫細胞の表現形を変化させることで多くの呼吸器疾患の病態形成に関与することが明らかになってきた。一方で、外界と常に接し、多くの刺激を受け続けている気道上皮細胞そのものの加齢による変化に対する理解は、呼吸器疾患の病態メカニズムへの更なる理解を深めるために必要不可欠である。今回、気道上皮細胞のうち、とくに気管支上皮細胞では、加齢に伴い老化関連シグナルパスウェイが亢進しており、高齢者の喘息の病態に寄与することが示唆された。高齢者の喘息の新たな治療ターゲットの1つとして研究が進むことが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the changes in airway epithelial cells associated with aging. First, we conducted a comprehensive analysis of gene expression changes due to aging in bronchial epithelial cells and type II alveolar epithelial cells in mice. This analysis revealed that aging-related signaling pathways are enhanced in bronchial epithelial cells. Next, we examined the involvement of these aging-related signaling pathways in the pathology of late-onset asthma using an aging mouse model that inhaled house dust mite, a major asthma antigen. When Substance A, which inhibits aging-related signaling pathways, was administered to the asthma model mice, eosinophilic airway inflammation was suppressed.

研究分野：免疫・アレルギー

キーワード：気道上皮細胞 喘息 加齢

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

呼吸器疾患と加齢には切ってもきれない関係がある。COPD や肺線維症、高齢発症喘息から悪性腫瘍に到るまで、加齢が発症に関与している。発症だけでなく病態に関しても、例えば、好酸球性疾患では、幼少期と成人期で、加齢により明らかに異なる病態メカニズムやフェノタイプを示すことが知られている。もちろん、常に外界と接している気道は、COPD でいう喫煙のような外的要因に長時間曝露されていることの影響は大きい。しかし、加齢による肺の環境の変化も、呼吸器疾患の発症に影響を与えていることは想像に難くない。多くの免疫細胞は、周囲の組織環境に刺激を受けてその表現形を変え、免疫反応・炎症に関与すると考えられている。そのため、組織環境を司る組織構成細胞、そしてその中でも外界と常に接し、多くの刺激を受け続けている気道上皮細胞の加齢による変化に対する理解は、呼吸器疾患の病態メカニズムへの更なる理解を深めるために必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、高齢者の呼吸器疾患における病態メカニズムを明らかにし、新たな治療標的を探索することである。呼吸器疾患では、腫瘍・炎症性疾患を問わず、多様な免疫細胞が関与することは広く知られており、研究が進んでいる。また、気道上皮構成細胞は、物理的な外界からの防御機構としての役割だけでなく、サイトカインや脂質などの刺激により免疫細胞の表現形を変化させることで多くの呼吸器疾患の病態形成に関与することが明らかになってきた。しかしながら、気道上皮細胞の構成や表現形の変化については、まだ研究が進んでいない分野である。今回は特に加齢に伴う変化に着目することで、実際の呼吸器疾患の病態メカニズムの解明により近づくことができる研究である。

3. 研究の方法

(1) 気道上皮構成細胞の分離・ソート方法の確立

気道上皮は、2 型肺胞上皮細胞・気管支上皮細胞など複数の異なる細胞から構成されていることが知られている。以降の解析の基盤を確立するため、異なる細胞分離方法を比較し、最も効率よく上皮細胞を採取できる方法を検討した。続いて、各上皮細胞特異的に発現する表面マーカーを、フローサイトメトリーを用いて評価することによって、気道上皮構成細胞を種類ごとに同定する方法を検討した。さらに、セルソーターを使用し、気管支上皮細胞・2 型肺胞上皮細胞を種類ごとにソートする方法を検討した。

(2) 気管支上皮細胞・2 型肺胞上皮細胞における、加齢に伴う遺伝子発現変化の網羅的解析

気道上皮細胞は、加齢に伴って性質が変化することが予想される。壮年マウス・加齢マウスの肺から、(1)で確立した方法を用いて気管支上皮細胞・2 型肺胞上皮細胞をソートし、それぞれに対する RNA-seq を実施し、網羅的解析を行った。壮年マウスと加齢マウスの遺伝子解析結果を比較し、年齢依存的に発現変動する遺伝子を同定した。さらに、発現変動がみられた遺伝子に関して上流解析を行い、加齢による変化を司るパスウェイを推定した。

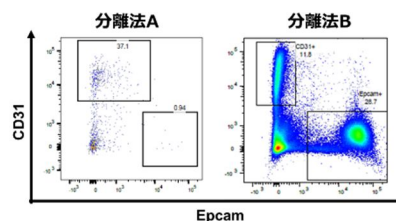
(3) 老化関連シグナルパスウェイの同定、疾患への応用

(2)の上流解析によって得られた、加齢に伴い気道上皮細胞で亢進するパスウェイについて、文献検索を行い、呼吸器疾患との関連を検討した。同定したパスウェイと関連があることが示唆された呼吸器疾患について、加齢マウスを用いた疾患マウスモデルの検討によって、病態形成や治療への応用を検討した。

4. 研究成果

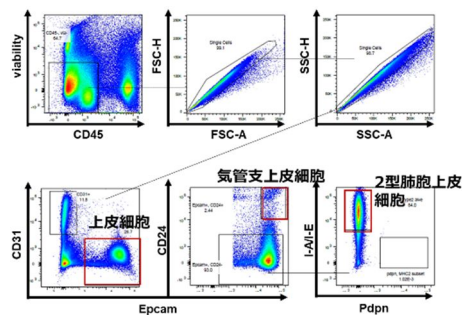
(1) 気道上皮構成細胞の分離・ソート方法の確立

当研究室で主に肺の免疫細胞を分離するために行ってきた Collagenase, Hyaluronidase を使用する分離法 A では、Epcam 陽性の上皮細胞がほとんど分離できなかったのに対し、Dispase を用いた分離法 B では、Epcam 陽性の上皮細胞が、非免疫細胞全体の 30% 程度を占めるほど分離効率を上げることができた。そのため、以降の気道上皮細胞の検討に関しては分離法 B を使用した。



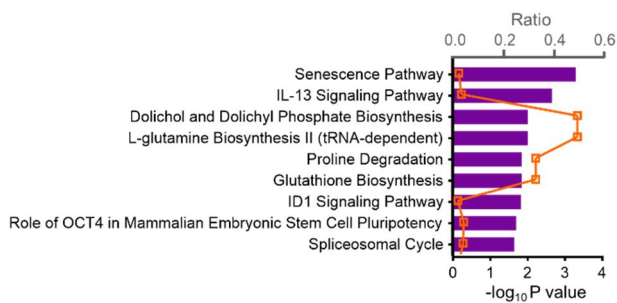
この方法を用いて分離した肺ホモジネートに対し、気管支上皮細胞・2型肺胞上皮細胞・血管内皮細胞などに特異的に発現する表面マーカーで染色を行い、フローサイトメトリーを用いて気道構成細胞の種類ごとに評価する方法を検討した。結果として、図に示す gating strategy で気管支上皮細胞と2型肺胞上皮細胞を同定することが可能となった。さらに、異なる週齢のマウスの肺を分離法Bで分離し、週齢によらず安定的に上皮細胞が同定できることを確認した。

続いて、セルソーターを用いて、週齢の異なるマウス(壮年マウス・加齢マウス)の肺から気管支上皮細胞と2型肺胞上皮細胞を分取した。



(2)気道上皮構成細胞のRNA-seq・パスウェイ解析

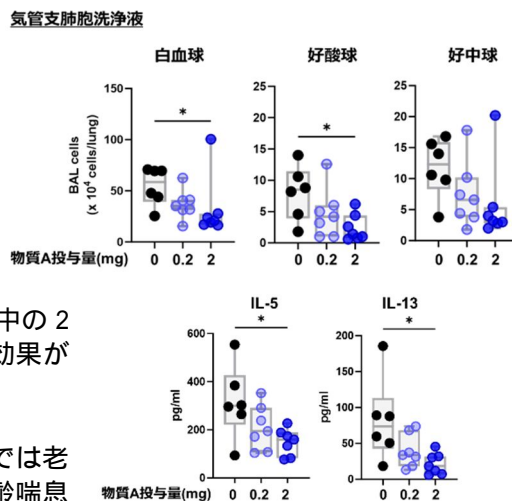
壮年マウス・加齢マウスの肺から分取した気管支上皮細胞・2型肺胞上皮細胞を用いて、RNA-seqを行い、網羅的解析を行った。その結果、気管支上皮細胞では、年齢依存的に発現が変動する遺伝子群が124遺伝子であり、2型肺胞上皮細胞では362遺伝子であった。発現に変動がみられた遺伝子群について上流解析を行ったところ、気管支上皮細胞において、老化関連シグナルパスウェイが亢進していることが明らかとなった(図)。



(3)老化関連シグナルパスウェイの高齢喘息病態への関与

(2)で判明した老化関連シグナルパスウェイについて文献検索を行ったところ、気管支喘息の病態に寄与することが報告されているものであった。そこで、加齢マウスに主要な喘息の抗原であるハウスダストマイルト(HDM)を吸入させる高齢喘息モデルを用いて、老化関連シグナルパスウェイの高齢喘息病態への関与を検討した。加齢マウスに繰り返しHDMを吸入させ、感作を成立させたマウスに再びHDMを吸入させると、気管支肺胞洗浄液中の好酸球数・好中球数が上昇するが、好酸球性気道炎症が惹起されるが、老化関連シグナルパスウェイを抑制する物質Aを同時に投与すると、好酸球性気道炎症が抑制された(図)。さらに、物質Aは気管支肺胞洗浄液中の2型サイトカインであるIL-5、IL-13を抑制する効果があることを示した(図)。

以上のことから、加齢に伴い気管支上皮細胞では老化関連シグナルパスウェイが亢進しており、高齢喘息の病態に寄与することが示唆された。今後さらに詳細な検討を行い、高齢喘息発症のメカニズムの解明と、新規治療の応用につながる研究へと展開することが期待できる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------