

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16353

研究課題名（和文）気道上皮細胞の炎症記憶への介入による新規気道炎症制御法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a novel method to control airway inflammation by intervening in the inflammatory memory of airway epithelial cells

研究代表者

影山 貴弘（Kageyama, Takahiro）

千葉大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：40894267

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）：野生型マウスに慢性アレルギー性気道炎症を誘導した後、気道上皮細胞を単離し、Single Cell ATAC およびRNA解析に供した。その結果、アレルギー炎症後に、一部の細胞集団にRNA発現では変化がないものの、オープンクロマチン領域が誘導されていることを同定した。この炎症記憶が誘導されたと考えられる領域に関連する遺伝子を抽出し解析を行なった。その結果、気道上皮細胞に誘導されたオープンクロマチン領域には、細胞動態、刺激への応答性などに関連する遺伝子が濃縮していることが明らかとなった。炎症記憶の誘導機構、機能についての解析を進めており、今後、新規気道炎症制御法に繋がる実験を進める予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

気管支喘息の治療は、各種抗体療法の登場などにより、長期管理薬の選択肢が増えた。しかし感染などを契機とした喘息の急性増悪は今も多く経験され、新たな機構を標的とした治療法の開発が必要である。近年、上皮細胞などの非免疫系細胞に免疫記憶が誘導されることが報告されたが、アレルギー性炎症に起因して非免疫細胞に免疫記憶が誘導されるのか、またその意義の詳細は不明であった。本研究の成果によって、アレルギー性気道炎症によって、気道上皮細胞にエピジェネティック炎症記憶が誘導されることが明らかとなった。今後、この誘導機構、機能をさらに解析することで、新たな治療法の開発に繋がるものと考えている。

研究成果の概要（英文）：After induction of chronic allergic airway inflammation in wild type mice, airway epithelial cells were isolated and subjected to single cell ATAC and RNA analysis. Open chromatin regions were induced in some cell populations after allergic inflammation, although RNA expression was not changed. I analyzed genes associated with the regions where inflammatory memory was thought to have been induced. The open chromatin regions induced in airway epithelial cells were shown to be enriched with genes related to cell dynamics and responsiveness to stimuli. I am currently analyzing the mechanism of induction of inflammatory memory and its function, and plan to conduct further experiments that will lead to a novel method of controlling airway inflammation.

研究分野：アレルギー

キーワード：気道上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息(以下、喘息)は、人口の約6%が罹患する最も有病率の高いアレルギー性呼吸器疾患である。吸入ステロイドに加え、IgE、IL-5、IL-4/IL-13を標的とした抗体医薬が開発・臨床応用され、2型炎症が優位な喘息に対する長期管理薬の選択肢は増えた。さらに、炎症性サイトカインや細胞内情報伝達分子を標的とした新たな長期管理薬の開発も進んでいる。一方で、喘息の病勢が安定している患者においても、気道感染症を契機として急性増悪が起こり、時に生命を脅かす。また、喘息はインフルエンザウイルスや肺炎球菌などの気道感染症の罹患・重症化のリスク因子と報告されている。この喘息と気道感染症の相互増悪機構は、臨床的に極めて重要な現象であるが、未だその分子機構の詳細は解明されていない。従って、喘息治療において、長期管理薬の開発のみでなく、気道感染症の制御を可能にする治療戦略を開発することが必須と考えた。

気道上皮細胞はウイルスや細菌に対する物理的バリアとして機能するだけでなく、first responderとしての働きを有しており、急性気道炎症における気道上皮細胞の重要性は多くの研究で示されてきた。近年、喘息患者由来の気道上皮細胞は、健常人由来の気道上皮細胞に比して、ウイルス感染応答が遅延し、その結果、感染症の重症化に繋がることが報告されたが(Veerati, *Front Immunol.* 2020)、その詳細な分子機構は明らかになっていない。

他方、最近の研究により、皮膚の上皮幹細胞が過去の炎症を記憶し組織損傷に対する反応性を変化させること(Naik, *Nature* 2017)や、鼻粘膜基底細胞がIL-4/IL-13受容体からの刺激をエピジェネティック変化を介して記憶すること(Ordovas, *Nature* 2018)が示された。しかし、気道炎症における気道上皮細胞の炎症記憶の役割は不明である。

以上の背景より、アレルギー性気道炎症に起因する気道上皮細胞の炎症記憶がその後の気道炎症の強度に影響するという仮説を立てた。そして、慢性アレルギー性気道炎症に起因する気道上皮細胞の炎症記憶への介入による新規気道炎症制御法の開発基盤を目指す本研究の着想に至った。

本研究の成果は、喘息における気道感染症重症化の軽減や気道感染症を契機とする急性増悪の予防に繋がることが期待できる。さらに、本邦において40歳以上の人口の8.6%が罹患していると推定される慢性閉塞性肺疾患(COPD)は、喘息と同様に、気道感染症の罹患・重症化リスクであり、さらに気道感染症の合併が原疾患の急性増悪に繋がることが知られている。COPDと喘息は、閉塞性換気障害や慢性気道炎症など共通する病態も多く、本研究の成果は、急性増悪の阻止などCOPD患者の予後の改善にも貢献すると考える。さらに本研究を通じて、気道上皮細胞の炎症記憶機構を明らかにすることにより、間質性肺炎や新型コロナウイルス感染症など様々な呼吸器疾患の病態の理解に繋がると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、「慢性アレルギー性気道炎症に起因する気道上皮細胞の炎症記憶の分子機構を解析し、気道炎症重症化の抑制戦略の基礎を築くとともに、気道上皮細胞の炎症記憶への介入による新規気道炎症制御法の開発基盤を構築すること」を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 気道炎症における気道上皮細胞の炎症記憶の役割の解明

野生型(WT)マウスにHouse dust mite(HDM)を経気道的に反復投与し、慢性アレルギー性気道炎症を惹起する。コントロールとしてPBS投与群を置く。その後、肺から気道上皮細胞を単離し、気液界面(ALI)培養、およびオルガノイド培養を行う。培養気道上皮細胞に、リポポリサッカライド(Lipopolysaccharide, LPS)やPoly:ICを添加し、急性炎症に関わる蛋白の発現解析を行う。

(2) アレルギー性気道炎症による気道上皮細胞の炎症記憶の誘導機構の解明

WTマウスにHDM慢性気道炎症を惹起する。コントロールとしてPBS投与群を置く。経時的に気道上皮細胞を単離し、RNA-seq、ATAC-seq解析を行い、遺伝子発現およびエピジェネティック変化について網羅的に解析する。その結果から、炎症記憶に関わる遺伝子を抽出し、関連するシグナル伝達経路および標的分子の候補を抽出する。上記で抽出した気道上皮細胞の炎症記憶の責任分子候補について、どのような刺激によって誘導されるのかをALI培養、およびオルガノイド培養の系を用いて評価する。さらに、候補分子の阻害薬あるいは遮断抗体の投与を行うことで、炎症記憶への影響を検討する。

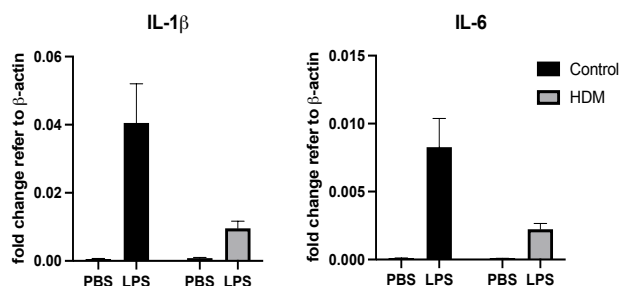
4. 研究成果

(1) 気道炎症における気道上皮細胞の炎症記憶の役割の解明

WT マウスに HDM 慢性気道炎症を誘導し、アレルギー性炎症が収束した後の肺から気道上皮細胞を単離し、ALI 培養を行い、リポポリサッカライド (Lipopolysaccharide, LPS) 刺激による培養気道上皮細胞の炎症性サイトカインの発現を解析した。その結果、HDM 慢性気道炎症収束後の肺から得た上皮細胞では、コントロール群と比して、LPS 投与による炎症性サイトカインの発現が著しく低下していることを見出した (図 1)。

この結果から、アレルギー性気道炎症後の気道上皮細胞は、LPS などの刺激に対する急性炎症の応答が遅延していることが示唆された。

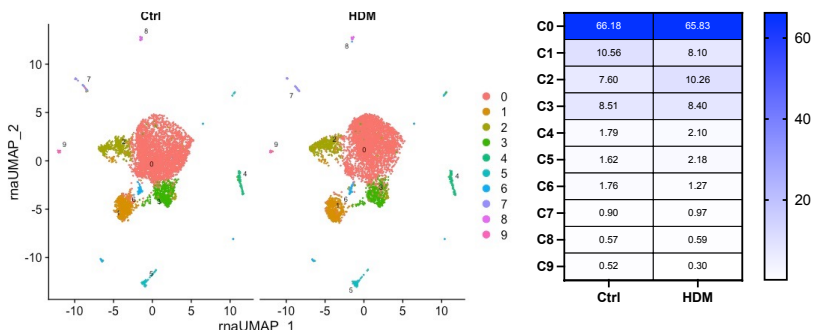
図1 アレルギー性気道炎症収束後におけるLPS刺激による気道上皮細胞の炎症性サイトカイン産生



(2) アレルギー性気道炎症による気道上皮細胞の炎症記憶の誘導機構の解明

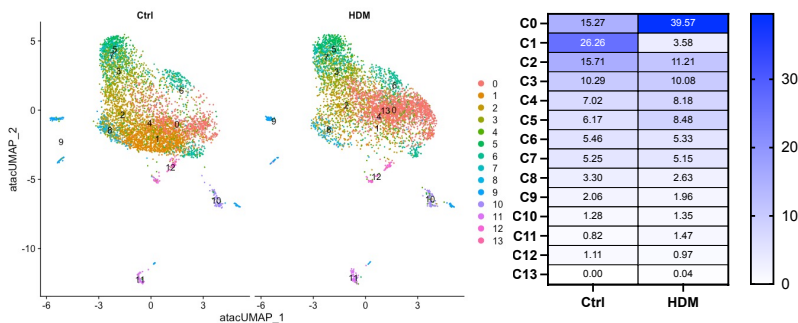
WT マウスに HDM 慢性気道炎症を誘導し、アレルギー性気道炎症が収束した後の肺から気道上皮細胞を単離し、single cell ATAC + Gene Expression 解析に供した。その結果、遺伝子発現解析 (scRNA-seq 解析) では、HDM 慢性気道炎症群とコントロール群間で、各クラスターの割合に大きな変化を認めなかった (図 2)。

図2 気道上皮細胞のscRNA-seq解析



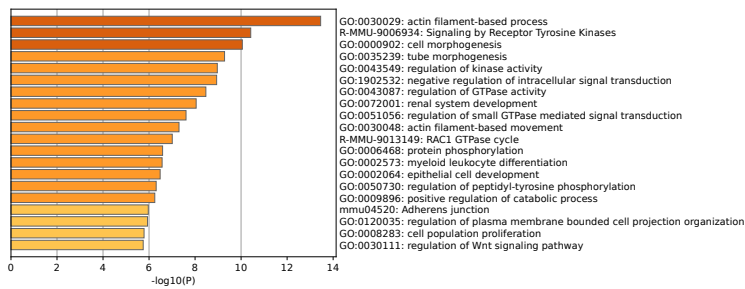
一方で、エピジェネティック変化を検出する scATAC-seq 解析では HDM 慢性気道炎症群とコントロール群間で、一部のクラスターに偏りを認めた (図 3)。この結果から、アレルギー性気道炎症によって、遺伝子発現レベルでは変化がないが、エピジェネティックレベルでは変化を有する細胞集団が存在することが示唆された。

図3 気道上皮細胞のscATAC-seq解析



さらに、HDM 慢性気道炎症収束後に増加しているクラスターを特徴づけるオープンクロマチン領域を同定し、関連する遺伝子について、Gene Ontology 解析を行なった(図 4)。その結果、気道上皮細胞に誘導されたオープンクロマチン領域には、細胞動態、刺激への応答性などに関連する遺伝子が濃縮していることが明らかとなった。

図4 オープンクロマチン領域に関連するGene Ontology解析



(3) 結語

以上より、アレルギー性気道炎症によって気道上皮細胞に炎症記憶が誘導され、その後の急性炎症に関与することが示唆されたため、その機構についていくつかの候補遺伝子を標的として炎症記憶の制御の解析を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Suga Kensuke, Suto Akira, Tanaka Shigeru, Sugawara Yutaka, Kageyama Takahiro, Ishikawa Junichi, Sanayama Yoshie, Ikeda Kei, Furuta Shunsuke, Kagami Shin-Ichiro, Iwata Arifumi, Hirose Koichi, Suzuki Kotaro, Ohara Osamu, Nakajima Hiroshi	4. 巻 8
2. 論文標題 TAp63, a methotrexate target in CD4+ T cells, suppresses Foxp3 expression and exacerbates autoimmune arthritis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e164778
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.164778	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suga Kensuke, Kiuchi Masahiro, Kageyama Takahiro, Kokubo Kota, Tanaka Shigeru, Iwata Arifumi, Suzuki Kotaro, Hirahara Kiyoshi, Nakajima Hiroshi	4. 巻 72
2. 論文標題 Single-cell RNA sequencing of peripheral blood mononuclear cells from Kimura disease patient successfully treated with dupilumab	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 610 ~ 613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2023.06.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishikawa Junichi, Suto Akira, Abe Kazuya, Hayashi Yuki, Suga Kensuke, Tanaka Shigeru, Kageyama Takahiro, Iwata Arifumi, Suzuki Kazumasa, Suzuki Kotaro, Nakajima Hiroshi	4. 巻 14
2. 論文標題 IL-21 is required for the maintenance and pathogenesis of murine V _H 4+ IL-17-producing T cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 Online
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2023.1211620	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kasuya Tadamichi, Tanaka Shigeru, Tamura Jun, Etori Keishi, Shoda Jumpei, Hattori Koto, Endo Yusuke, Kitajima Masayuki, Kageyama Takahiro, Iwamoto Taro, Yokota Masaya, Iwata Arifumi, Suto Akira, Suzuki Kotaro, Suzuki Harumi, Ziegler Steven F., Nakajima Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Epithelial cell-derived cytokine TSLP activates regulatory T cells by enhancing fatty acid uptake	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 Online
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-28987-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔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 須賀謙介、影山貴弘、田中繁、岩田有史、鈴木浩太郎、中島裕史
2. 発表標題 デュピルマブが奏効した木村病患者の治療前後における末梢血単核球のシングルセル(sc)RNA-seq解析
3. 学会等名 第72回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 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
---------------------------	-----------------------	----

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