

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790905

研究課題名(和文) 気管支喘息発作時における気道粘液過剰産生増悪メカニズムの解明とその抑制法の開発

研究課題名(英文) Mechanisms of mucus overproduction and airway inflammation in asthma

研究代表者

藤澤 朋幸 (Fujisawa, Tomoyuki)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：20402357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：気管支喘息発作時の主病態である粘液過剰産生と気道炎症増悪に関する新たな機序を探索した。NF- κ B活性因子とSTAT6活性因子の共添加をおこなったが、気道上皮細胞におけるムチン遺伝子の相乗的誘導はみられなかった。TLR3リガンドであるPolyI:Cは、TRIF/NF κ B経路を介して気道上皮細胞におけるIL-17C発現を誘導した。PolyI:CとIL-17Cは気道炎症関連遺伝子(hBD2、CSF-3、S100A12)発現を誘導し、IL-17RE(IL-17C受容体)のノックダウンによりPolyI:Cによるそれらの発現は減弱し、IL-17Cはオートクライン機序により気道炎症を促進することが示された。

研究成果の概要(英文)：The present study was conducted to elucidate the mechanisms of mucus overproduction and airway inflammation in exacerbation of asthma.

Co-treatment with NF- κ B activators and STAT6 activators did not show synergistic mucin genes expression in normal human bronchial epithelial (NHBE) cells. We demonstrated that polyI:C, the ligand to Toll-like receptor 3, induced IL-17C expression via TRIF/NF κ B pathway in NHBE cells. Both IL-17C and polyI:C increased the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines, such as human beta-defensin (hBD) 2, colony-stimulating factor (CSF) 3, and S100A12 in NHBE cells. Knockdown of IL-17 receptor E, the specific receptor for IL-17C, attenuated polyI:C-induced hBD2, CSF3, and S100A12 expression, without any reduction of polyI:C-induced IL-17C expression, which suggest that IL-17C is an essential epithelial cell-derived cytokine that enhances airway inflammation in a unique autocrine/paracrine manner in the airway epithelium.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：呼吸器内科学

キーワード：気道炎症 IL-17C 気管支喘息 Toll-like receptor 粘液過剰産生 MUC5AC MUC5B

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患 (COPD) に代表される慢性気道疾患は、気道炎症と粘液過剰産生を二大病態とする疾患である。気管支喘息発作時における過剰な気道炎症や粘液過剰産生は、気道閉塞による気流制限をもたらす死亡の一因となるが、その詳細なメカニズムは未解な点が多く、それらに対する有効な治療法は未だ十分でない。

粘液過剰産生において、Mucin (MUC) 5AC と MUC5B は気道で産生される粘液の主成分である。これまで研究代表者は、気管上皮細胞初代培養系を用いて、MUC5AC、MUC5B の転写発現機序における STAT6 や NF- κ B の関与について新たな知見を報告してきた (Respirology. 2008, J Immunol. 2009, Am J Respir Cell Mol Biol. 2011)。気管支喘息発作時における粘液過剰産生には複数因子や経路が複合的に関与することが推測されるが、多因子間の相互作用に関する基礎的研究は極めて少ない。

IL-17C は上皮組織を主要な産生部位とし IL-17RA/RE ヘテロダイマーを特異的受容体とする新たな IL-17 サイトカインファミリーで、腸管炎症や腸管感染防御に寄与することが近年報告された (Nat Immunol. 2011)。気道上皮における IL-17C 産生やその作用に関する報告は少なく、慢性気道疾患の気道炎症における IL-17C の関与は未だ明らかでない。

2. 研究の目的

気管支喘息発作時における粘液過剰産生や気道炎症増悪に関わる新たな制御機構を解明する。

- (1) 気道上皮細胞において、NF- κ B 活性化因子 (IL-1 β , IL-17A, Toll-like receptor ligands) と STAT6 活性化因子 (IL-4, 13) の共刺激が MUC5AC/MUC5B 発現を相加相乗的に誘導しうるか検証し、多因子間の相互作用を解析する。
- (2) 気道上皮における IL-17C の作用とその発現制御メカニズムを解析し、気道炎症への関与を解明する。

3. 研究の方法

(1) 気道上皮における MUC5AC、MUC5B 発現の検討

正常ヒト気管上皮初代培養細胞 (normal human bronchial epithelial cell: NHBE) を用

いて、NF- κ B を誘導する前炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-17A, TNF- α) や TLR ligands (pam3csk, LPS, PolyI:C, flagelin) と STAT6 を活性化する Th2 サイトカイン (IL-4, 13) を、単独に添加、あるいはそれぞれを組み合わせた共添加 (IL-1 β + IL-13, IL-17A + IL-4, TLR ligand + IL-13 など) を行い、MUC5AC、MUC5B mRNA 発現を RT real-time PCR で測定した。単独刺激と比較して、共刺激が MUC5AC、MUC5B を相加相乗的に誘導しうるか検討した。ヒト気道上皮細胞由来の cell line である HBE1 細胞を用いて同様の検討を行った。

(2) 気道上皮細胞における IL-17C 発現の検討

NHBE を種々の TLR リガンドで刺激し、IL-17C 発現を real-time PCR 法、ELISA 法を用いて測定した。シグナル経路の検討として、TLR 経路、NF- κ B 経路に着目し、特異的経路阻害剤 (TRIF 阻害タンパク、I κ B- α リン酸化阻害剤、NF- κ B 活性化阻害剤)、NF- κ B p65-siRNA を用いて IL-17C 発現の変化を検討した。あわせて、NHBE における TLR リガンドによる気道炎症・生体防御関連遺伝子 (human β -defensin (hBD) 2、colony-stimulating factor (CSF) 3、S100A12) 発現誘導を検討した。

(3) 気道上皮細胞における IL-17C の機能解析

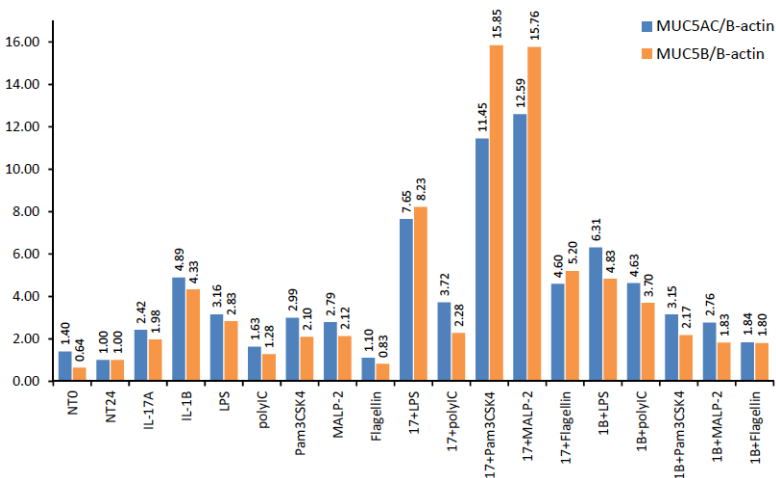
IL-17C 添加が、NHBE における気道炎症・生体防御関連遺伝子 (hBD2、CSF-3、S100A12) 発現を誘導するか否か、real-time PCR 法を用いて検討した。また、IL-17C のオートクライン/パラクライン機序に着目し、IL-17C の特異的受容体である IL-17RE を siRNA を用いてノックダウンして、TLR リガンド刺激による IL17C、hBD2、CSF-3、S100A12 発現の変化を解析した。

4. 研究成果

(1) 気道上皮細胞における MUC5AC/MUC5B 発現の検討 -共刺激の効果-

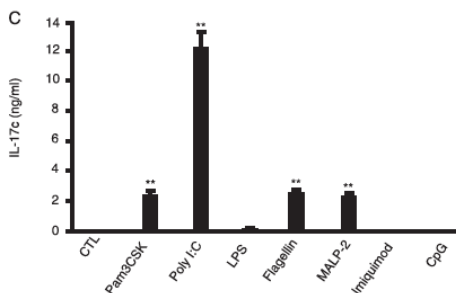
NHBE と HBE1 を用いて、前炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-17A)、各種 TLR ligands (pam3csk, LPS, PolyI:C, flagelin)、Th2 サイトカイン (IL-4, 13) を、単独あるいはそれらを組み合わせた共添加を行い、MUC5AC、MUC5B mRNA 発現誘導を検討したが、NF- κ B 活性化因子と STAT6 活性化因子の共刺激による MUC5AC/MUC5B の相乗的発現誘導はみられなかった。一方、HBE1 細胞において、IL-17A と TLR ligands の共添加 (IL-17A + pam3csk, IL-17A + MALP2 など) による相加的な MUC5AC/MUC5B 誘導が確認された (図)。一方、NHBE において同様の共添加による相加的 MUC5AC/MUC5B 誘導は確認さ

れず、その誘導は初代培養細胞と cell line で異なる結果であった。

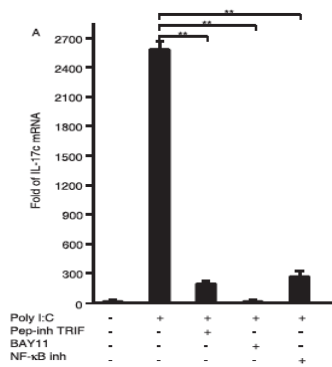


(2) 気道上皮細胞における IL-17C 発現の検討

種々の TLR リガンドを NHBE に添加し、IL-17C 発現を検討した。TLR リガンドのうち PolyI:C (TLR3 リガンド) は、NHBE における IL-17C 発現を mRNA レベル、蛋白レベルで強力に誘導した (図)。



この発現は TRIF 阻害タンパク、I κ B- α リン酸化阻害剤、NF- κ B 活性化阻害剤により減弱した (図)。また、PolyI:C は、NHBE において

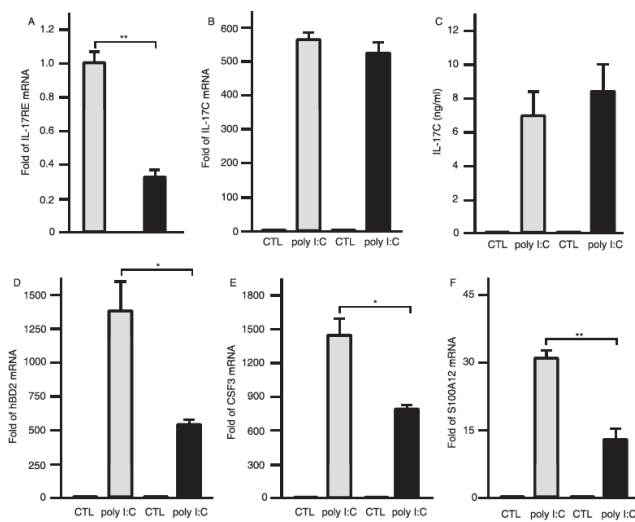
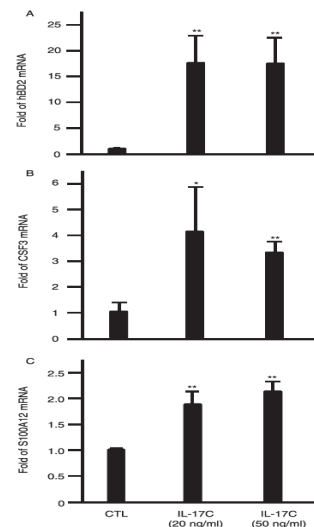


TLR3/TRIF/NF- κ B 経路を介して IL17C と同様に hBD2、CSF-3、S100A12 発現を誘導した。

(3) 気道上皮細胞における IL-17C の機能解析

NHBE において、IL-17C 添加は hBD2、CSF-3、S100A12 発現を誘導し (図) IL-17C は気道上皮に直接作用し気道炎症への関与することが示された。

さらに、IL-17RE siRNA を用いて IL-17RE をノックダウンすることにより、PolyI:C による IL-17C 発現に変化を与えず、PolyI:C による hBD2、CSF3、S100A12 発現を減弱した (図)。すなわち、PolyI:C によって誘導された IL-17C は、オートクライン/パラクライン機序を介して NHBE に作用し、hBD2、CSF3、S100A12 発現を促進していると考えられた。



Negative control (shaded bars), IL-17RE siRNA (solid bars)

以上より本研究において、新たな気道上皮由来サイトカインとして IL-17C を見出すと共に、IL-17C はオートクライン/パラクライン機序を介して気道炎症を促進させることが示された。

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9件)

1. Kusagaya H, Fujiwara T, et al.
TLR-Mediated Airway IL-17C Enhances Epithelial Host Defense in an Autocrine/Paracrine Manner. Am J Respir Cell Mol Biol. 査読有り 50(1):2014, 30-9.
doi: 10.1165/rcmb.2013-0130OC.

2. Akamatsu T, Shirai T, Fujisawa T, et al. Switching from salmeterol/fluticasone to formoterol/budesonide combinations improves peripheral airway/alveolar inflammation in asthma. *Pulm Pharmacol Ther.* 査読有り 27(1), 2014:52-6. 2014 doi: 10.1016/j.pupt.2013.04.001.
3. Hozumi H, Nakamura Y, Fujisawa T, Suda T, et al. Acute exacerbation in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease: a retrospective case control study. *BMJ Open.* 査読有り 13;3(9):2013, e003132. doi: 10.1136/bmjopen-2013-003132.
4. Enomoto N, Suda T, Fujisawa T, Chida K, et al. Amount of elastic fibers predicts prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med.* 査読有り 107(10): 2013, 1608-16 doi:10.1016/j.rmed.2013.08.008.
5. Fujisawa T, Yasui H, Suda T, Chida K, et al. Alveolar nitric oxide concentration reflects peripheral airway obstruction in stable asthma. *Respirology.* 18(3): 2013, 522-7. 査読有り doi:10.1111/resp.12031.
6. Kusagaya H, Nakamura Y, Fujisawa T, Suda T, Chida K, et al. Idiopathic pleuroparenchymal fibroelastosis: consideration of a clinicopathological entity in a series of Japanese patients. *BMC Pulm Med.* 査読有り 5;12:72, 2012. doi: 10.1186/1471-2466-12-72.
7. Nakamura Y, Suda T, Fujisawa T, Colby TV, Chida K, et al. Rheumatoid lung disease: prognostic analysis of 54 biopsy-proven cases. *Respir Med.* 査読有り 106(8): 2012, 1164-9, doi: 10.1016/j.rmed.2012.04.004.
8. Suzuki Y, Suda T, Fujisawa T, Chida K, et al. Mouse CD11b^{high} lung dendritic cells have more potent capability to induce IgA than CD103⁺ lung dendritic cells in vitro.

Am J Respir Cell Mol Biol. 査読有り
46(6): 2012, 773-80. doi:
10.1165/rcmb.2011-0329OC.

9. Yasui H, Fujisawa T, Suda T, Chida K, et al. Impact of add-on pranlukast in stable asthma; the additive effect on peripheral airway inflammation. *Respir Med.* 査読有り 106(4):2012, 508-14. doi: 10.1016/j.rmed.2011.12.014.

〔学会発表〕(計5件)

1. Kusagaya H, Fujisawa T, et al. Profile of IL-17C expression in human bronchial epithelial cells. American Thoracic Society 2014, 2014年5月15日～21日、サンディエゴ、アメリカ合衆国
2. 草ヶ谷秀樹、藤澤朋幸 他：気道上皮細胞において TLR を介して誘導された IL-17C は自己分泌的に気道生体防御を増強する：第54回日本呼吸器学会学術講演会、2014年4月25～4月27日、大阪
3. 草ヶ谷秀樹、藤澤朋幸 他：ヒト気道上皮細胞における TLR を介した IL-17C の制御機構と機能についての検討：第63回日本アレルギー学会秋期学術大会、2013年11月28日～11月30日、東京
4. Fujisawa T, et al.: Alveolar Nitric Oxide Concentration Reflects Peripheral Airway Obstruction In Stable Asthma. American Thoracic Society. 2013年5月17日～22日、フィラデルフィア、アメリカ合衆国
5. 藤澤朋幸 他、気管支喘息患者における Alveolar NO 濃度に関わる因子の検討、第52回日本呼吸器学会学術講演会 2012年4月20日～4月22日、神戸

〔図書〕(計3件)

1. 藤澤朋幸, I型アレルギーのバイオマーカー. 臨床検査. Vol58, No.2 医学書院, 253-258. 2014
2. 藤澤朋幸, 千田金吾; 病態生理. 新しい診断と治療の ABC サルコイドーシス 最新医学社, 呼吸器 3. 55-62. 2012
3. 藤澤朋幸, 榎本紀之, 千田金吾; 膠原病に合併する間質性肺炎. 特発性間質性肺炎-最近の進歩と展望- 最新医学社, 第66巻/第6号 特集 1188-1195. 2011

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤澤 朋幸 (FUJISAWA, Tomoyuki)
浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：20402357

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：