

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591132

研究課題名(和文) B7-H1発現の薬物的制御によるCOPD・喘息の増悪の治療を目指す基盤研究

研究課題名(英文) Pharmacological regulation of B7-H1 expression for treating COPD and asthma exacerbation

研究代表者

松元 幸一郎 (Matsumoto, Koichiro)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：60325462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：気道のウイルス感染はCOPD・喘息の増悪の誘因となる。B7-H1(別名PD-L1)はウイルスが感染した細胞に発現が誘導され抗ウイルス免疫を減弱させる。この機序を解明することでウイルス感染の遷延化を頓挫させる治療が可能となる。我々はヒト気道上皮細胞をウイルス由来2本鎖RNAの擬似合成物であるpoly IC、あるいは呼吸器合胞体ウイルスで刺激することによってB7-H1発現を誘導する実験において、B7-H1発現がPI3キナーゼ依存性であることを明らかにした。さらにマウスのpoly IC気管内投与による気道炎症モデルを確立し、PI3キナーゼ阻害剤投与が肺におけるB7-H1発現を抑制する傾向を確認した。

研究成果の概要(英文)：Airway viral infection leads to exacerbation of COPD and asthma. B7-H1(PD-L1) is induced on virus-infected cells and works as an inhibitor of anti-viral defence. The elucidation of induction mechanisms is expected to dampen persistent infection. In an experimental model in which B7-H1 is induced by a synthetic analogue of viral double-stranded RNA, poly IC, or respiratory syncytial virus on human airway epithelial cells, we showed that virus-related induction of B7-H1 depends on the activation of PI3 kinase, a representative kinase in cell proliferation and maintaining of cell survival. Additionally, we have developed in vivo experimental model that airway inflammation with B7-H1 upregulation is induced by intra-tracheal administration of poly IC in mice. Treatment of mice with a PI3 kinase inhibitor tended to attenuate the poly IC-induced upregulation of B7-H1. These results suggest that PI3 kinase may be a therapeutic target of virus-induced pathogenesis of chronic airway diseases.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：COPD 気管支喘息 B7-H1 PD-L1 低分子化合物 ウイルス感染 2本鎖RNA

1. 研究開始当初の背景

我が国の COPD 有病率は 40 歳以上の人口の 8.5%を占め、基盤研究として進行機序の解明が重要である。COPD の進行には増悪が寄与することが指摘されている。これら増悪の多くはウイルスや細菌による気道感染によって引き起こされる。一方、気管支喘息はガイドラインに準拠した吸入ステロイド主体の定期治療が普及することによってコントロールが容易になった。その成果は喘息死件数の大幅な減少にも反映されているが、それでも年間 2000 人近くが喘息死している。喘息死の多くにウイルス感染による増悪が関わっている。増悪が成立する機序の解明には、COPD・喘息と感染の複合病態を検討することが求められる。

我々は B7-H1(別名 PD-L1)と呼ばれる共抑制分子に着目してきた。B7-H1 は病原体を含む danger signal で刺激された樹状細胞や組織構成細胞に発現が誘導される。B7-H1 はウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞を抑制することで抗ウイルス免疫を回避するエスケープ分子として機能していることが報告されている。すなわち感染の遷延により基礎疾患の増悪に関与する可能性がある。我々は培養ヒト気道上皮をウイルス関連分子 2 本鎖 RNA で刺激すると、B7-H1 の発現が増強し、その発現はステロイド抵抗性であることを報告した (Tsuda et al. 2005, *BBRC*)。また、マウス喘息モデルにおいて抗原感作時に軽度の 2 本鎖 RNA 負荷が加わると、樹状細胞に発現した B7-H1 を介して IL-13 を選択的に産生する CD8T 細胞が誘導され抗原曝露後の喘息反応が増強されることを報告した (Matsumoto et al. 2011, *AJRCMB*)。これらの検討から、ウイルス感染による COPD や喘息の増悪において、B7-H1 や自然免疫系の産物は有力な治療標的となることが示唆された。

抗 B7-H1 抗体は悪性腫瘍において減弱した腫瘍免疫を再賦活させる生物製剤として開発が進んでいるが、高コストであり感染による増悪のような病態への汎用化は困難である。そこで我々は、B7-H1 の発現機序を解析する研究を進め、その発現が転写因子 NF-kappaB 依存性であり、ステロイドと長時間作用型 beta2 刺激薬 (LABA) の併用によって抑制できることを見出した。ステロイドと LABA の配合薬は COPD や喘息の治療薬として汎用され、増悪の予防にも有効であることが示されている。一方、COPD で吸入ステロイドが肺炎を増加させる懸念や喘息に LABA を長期使用することへの懸念も指摘されており、別の作用に基づく創薬が求められる。

2. 研究の目的

気道局所における B7-H1 発現を抑制することによってウイルスを早期に排除し、COPD や喘息の増悪を予防する治療法をめざす。特にウイルス感染による B7-H1 発現誘導の機序を詳細に解明することによって、その各過程を制

御する低分子化合物を同定し、低リスク・低コストの創薬をめざす。

3. 研究の方法

(1) 培養気道上皮を用いた in vitro 実験計画：ヒト気道上皮培養株 BEAS-2B を合成 2 本鎖 RNA である poly IC あるいは呼吸器合胞体ウイルス (RSV) で刺激することによって B7-H1 発現を誘導させる in vitro 実験系を使用し、汎 PI3-キナーゼ阻害剤、選択的 PI3-キナーゼガンマ阻害剤、および選択的 PI3-キナーゼデルタ阻害剤の影響を検討した。B7-H1 の発現はフローサイトメトリーを用いた。さらにキナーゼの活性化を誘導する上流シグナル系について、特にオキシダントの関与を検討し、また、下流シグナルとして代表的な転写因子である NF-kappaB の関与を検討した。解析手段としてはウエスタンブロットイング、免疫染色法などを使用した。

(2) マウス気道炎症モデルを用いた実験計画：

(1) によって培養気道上皮における B7-H1 発現増強に PI3-キナーゼ系が関与していることを確認したため、その病態生理学的意義を検証するために poly IC の気管内投与によって気道炎症と肺構成細胞に B7-H1 の発現を誘導させる in vivo モデルの作成に着手した。C57B6 系のマウス (7 ~ 10 週令) に吸入麻酔をおこない、poly IC 溶液を気管内に投与する技法を確立した。摘出肺を細切して細胞浮遊液を作成し、各種標識抗体で細胞集団を分離認識し、フローサイトメトリーにて B7-H1 の発現強度を解析した。PI3-キナーゼデルタ阻害剤を経気管的に投与し、炎症や B7-H1 発現に対する効果を検討した。

(3) PI3-キナーゼデルタ阻害剤の多面的効果を検証する実験計画：

我々が効果を確証した PI3-キナーゼデルタ阻害剤は低分子化合物であり、ウイルス感染による慢性気道疾患の増悪を予防する創薬のシードとなる可能性があるが、他の炎症調節作用や免疫修飾作用も想定され、多面的効果が期待される。炎症の消退過程ではエフェロサイトーシスと呼ばれるマクロファージを主体としたアポトーシス細胞の除去が重要な役割を果たす。このエフェロサイトーシスが減弱すると、炎症が遷延する。タバコ煙は肺胞マクロファージのエフェロサイトーシスを減弱させるという報告に基づき、この減弱過程における PI3-キナーゼデルタの関与と、その阻害剤の効果を検証した。すなわち、ヒト末梢血から好中球を分離し、紫外線照射によってアポトーシスを誘導した。マウス肺から気管支肺胞洗浄によって肺胞マクロファージを収集し、アポトーシス細胞の貪食処理 (エフェロサイトーシス) をフローサイトメトリーで検討した。タバコ煙抽出物で処理したマクロファージにおけるエフェロ

サイトーシスとそれに対する PI3-キナーゼデルタ阻害剤の効果を検証した。

4. 研究成果

(1)の結果：

ヒト気道上皮培養株 BEAS-2B を poly IC で刺激すると用量依存性に B7-H1 の発現誘導が増強した。過剰な刺激は細胞をアポトーシスに誘導するため、遷延性感染のモデルとしての妥当性を確保するためにアポトーシス誘導が低レベルにとどまるように poly IC の刺激濃度を設定した。また、各種化合物の効果を判定する時間は細胞の生存率を参照にして 24 時間後を基本的に設定した。

Poly IC による B7-H1 の発現増強は汎 PI3-キナーゼ阻害剤投与で強力に抑制され、選択的 PI3-キナーゼデルタ阻害剤で部分的に阻害され、選択的 PI3-キナーゼガンマ阻害剤は影響を与えなかった。このような効果は RSV 感染によって発が現誘導された B7-H1 に対しても同様に観察された。既報によれば、PI3-キナーゼデルタの発現は炎症細胞が主体であり、気道上皮のような組織構成細胞での発現の報告はほとんどみられていなかった。気道上皮にもこの酵素が発現しているかどうかを検証する必要が生じた。ウエスタンブロッティングによって BEAS-2B 細胞における PI3-キナーゼデルタ蛋白発現を認め、その蛋白発現は PI3-キナーゼデルタに対する siRNA 処置を 48 時間おこなうことによって有意に抑制され、また B7-H1 発現も部分的に抑制された。すなわち、気道上皮においても機能的 PI3-キナーゼデルタが発現していることが証明された。

我々は以前の研究で B7-H1 の発現が転写因子 NF-kappaB 依存性であり、ステロイドと長時間作用型 beta2 刺激薬 (LABA) の併用によって抑制できることを見出していた。しかしながら、B7-H1 発現は転写因子 NF-kappaB 活性化を介するが、PI3-キナーゼデルタ阻害剤投与は NF-kappaB の活性化には影響しないことをウエスタンブロッティングおよび蛍光免疫法で確認した。また、PI3-キナーゼデルタの活性化はオキシダント産生と密接に関連していることが知られているが、poly IC 刺激によって BEAS-2B 細胞にオキシダントが産生されること、抗オキシダント剤である N-アセチルシステイン投与が B7-H1 発現を抑制することを確認した。さらにこの poly IC によるオキシダント産生はキサンチンオキシダーゼ系の活性化を介するが、他の典型的な細胞内オキシダント産生系である NADPH オキシダーゼ系やミトコンドリア系の関与はないことを確認した。

これらの実験結果から、ウィルス感染による B7-H1 発現誘導にはキサンチンオキシダーゼ系活性化によるオキシダント産生と PI3-キナーゼデルタ活性化が関与することが明らかになった。

また、poly IC による B7-H1 発現には他の

調節因子も関与している可能性があり、実地臨床で気道疾患に汎用される抗コリン薬や PDE4 阻害薬、各種抗菌薬の効果も検討をおこなった。抗コリン薬は非生理的濃度である高濃度では B7-H1 の発現を抑制する傾向がみられた。PDD4 阻害剤では Roflumilast が抑制効果を有することを見出した。各種抗菌薬では明らかな抑制効果はみられなかった。さらに、STAT シグナル系の関与についても試験的に検討をおこない、STAT1, STAT5 は関与しないが、STAT3 の活性化は poly IC 刺激による B7-H1 発現増強に対し、部分的にだが抑制作用を示すことを見出した。

(2)の結果：

Poly IC の気管内投与量について予備実験を繰り返し 3 microgram、および 30 microgram の 2 種類の 1 回投与方法によって用量依存性に好中球性気道炎症と肺構成細胞における B7-H1 の発現増強が誘導されることを確認した。好中球性炎症は poly IC 投与後、数日で消退するが、B7-H1 の発現は 1 週間近く持続することが確認された。

PI3-キナーゼデルタ阻害剤を poly IC 投与の 4 時間前に投与しておくこと、3 microgram の poly IC 投与によって生じる B7-H1 の発現増強は部分的に抑制されたが、好中球性炎症には明らかな影響を与えなかった。30 microgram の poly IC による B7-H1 の発現増強と好中球性炎症には PI3-キナーゼデルタ阻害剤の処置は影響を与えなかった。

本実験系においては上皮系細胞を主たる解析標的細胞としていたため蛍光色素標識した抗サイトケラチン抗体で認識したが、同抗体は活性化した炎症細胞も一部認識する傾向があり、細胞特異的な B7-H1 の発現を厳密に評価することは困難であった。現在は、2 種類の標識抗体を組み合わせた技法の開発によって上皮系と炎症細胞系、免疫担当細胞系のそれぞれにおける B7-H1 の発現動態を検証する研究に着手している。

(3)の結果：

肺胞マクロファージによるアポトーシス細胞のエフェロサイトーシスはタバコ煙抽出物処置によって濃度依存性に減弱した。この減弱にはエピジェネティックな分子発現調節に関与するヒストン脱アセチル化酵素の活性低下が関与していた。またヒストン脱アセチル化酵素阻害剤によってタバコ煙暴露と同様の濃度依存性の減弱がみられた。PI3-キナーゼデルタ阻害剤の処置によってタバコ煙によるマクロファージのエフェロサイトーシス能力の回復が得られた。PI3-キナーゼデルタ活性化はヒストン脱アセチル化酵素活性を抑制することが報告されており、今回明らかにした知見は抗炎症過程であるエフェロサイトーシスの機能不全においても PI3-キナーゼデルタ阻害剤が有効な創薬候補であることを示唆するものと考えられる。

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2件)

Kan-o Keiko, Matsumoto Koichiro, Asai-Tajiri Yukari, Fukuyama Satoru, Hamano Saaka, Seki Nanae, Nakanishi Yoichi, Inoue Hiromasa:
PI3K-delta mediates double-stranded RNA-induced upregulation of B7-H1 in BEAS-2B airway epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 435: 195-201 2013.

Noda Naotaka, Matsumoto K, Fukuyama Satoru, Asai Yukari, Kitajima Hiroko, Seki Nanae, Matsunaga Yuko, Kan-o Keiko, Moriwaki Atushi, Morimoto Kounosuke, Inoue Hiromasa, Nakanishi Yoichi:
Cigarette smoke impairs alveolar macrophage phagocytosis for apoptotic neutrophils via inhibition of histone deacetylase/Rac/CD9 pathways. Int Immunol. 25: 643-650, 2013.

〔学会発表〕(計1件)

松元幸一郎：

COPD と喘息における気道炎症慢性化のメカニズム-気道炎症慢性化における感染の関与-
第53回日本呼吸器学会学術講演会 2013年4月19日、東京(シンポジウム)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0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0件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

松元 幸一郎 (MATSUMOTO Koichiro)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：60325462

(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

(3)連携研究者

なし