

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591467

研究課題名(和文) 気道上皮細胞を介した喘息発症機序の解明

研究課題名(英文) The elucidation of pathogenic mechanisms of asthma via airway epithelial cells

研究代表者

鈴木 章一 (SUZUKI, SHOICHI)

帝京大学・医療共通教育研究センター・講師

研究者番号：40253695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、3種のヘム型ペルオキシダーゼ(LPO, MPO, EPO)及びこの酵素反応生成物であるヒポチオシアン酸の喘息病態における役割を解析した。この結果、ヒポチオシアン酸は低濃度ではPKAシグナル伝達経路を介してNF- κ Bを活性化して気道炎症反応を誘導し、高濃度ではネクロシスを誘導することを明らかにした。さらに3種のヘム型ペルオキシダーゼのうち1種の遺伝子を欠損させても喘息病態形成は顕著に軽減されないが、しかしメチマゾールで全てのヘム型ペルオキシダーゼ活性を阻害すると喘息病態が著しく軽減する事を明らかにした。これはペルオキシダーゼ阻害剤が喘息の治療薬として有効である可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we first examined effects of hypochlorite (OSCN-) on airway epithelial cells using in vitro OSCN- production system. Next we examine asthma pathogenesis of the individual knockout mice of three kinds of heme-peroxidases, LPO, MPO, EPO, which catalyze thiocyanate to produce OSCN-. Finally we checked effects of methimazole, an inhibitor of all heme-peroxidases on airway inflammation. Here we showed that OSCN- in low doses was sensed by protein kinase A followed by activation of NF- κ B in the airway epithelial cells, whereas OSCN- in high doses induced necrotic cell death. One defect of the three kinds of heme-peroxidases showed no dramatic alleviation of asthma pathogenesis, however, inhibition of all the heme-peroxidases with methimazole improved airway inflammation. Our data strongly suggest that inhibition of heme-peroxidase is a novel therapeutic strategy for asthma.

研究分野：アレルギー性炎症

キーワード：気管支喘息 ペルオキシダーゼ ヒポチオシアン酸 ペンドリン 気道上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

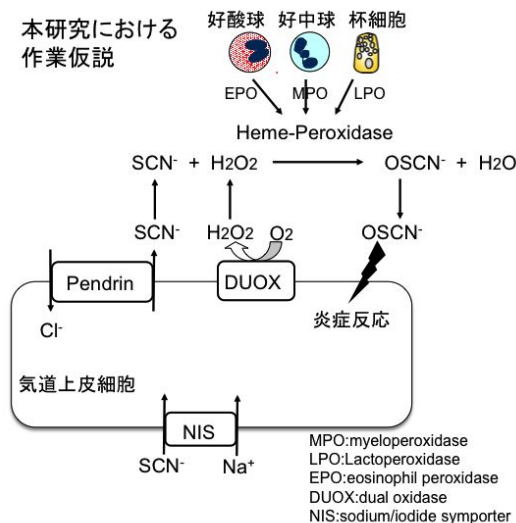
気道上皮細胞が単に生体における外界とのバリアーとしての役割を果たしているだけでなく、TSLP、IL-25、IL-33などのサイトカインや多くのケモカインを産生することにより、免疫反応に積極的に関与していることが明らかとなってきた。しかし、気道上皮細胞を介した炎症惹起の分子機構については未だ不明な点が多い。我々はアレルギー疾患において中心的な役割を果たしているIL-4やIL-13の標的細胞として、気道上皮細胞に着目し、マイクロアレイ法を用いた網羅的解析を行い、IL-4やIL-13により誘導される遺伝子のひとつとして陰イオンチャンネルであるペンドリンを見いだした(Cytokine,19,287-296,2002)。さらにこの分子の解析を進め、ペンドリンの発現が喘息モデルマウスの肺組織において増強しており、強制的にペンドリンをマウス気道上皮細胞に発現させると、気道過敏性の亢進や粘液産生といった喘息様の病態が形成されることを見だし、ペンドリンは喘息の病態を増悪させる因子であることを明らかにした。この事実よりペンドリンを透過する何らかの陰イオンがこの喘息様病態を形成していることが示唆されていたが、しかしどの陰イオンが喘息病態形成に関与しているかは不明のままであった。

ペンドリンを透過することが示されている陰イオンの中で、我々は次の報告からチオシアネートイオン(SCN⁻)に着目した。

(1) SCN⁻は過酸化水素(H₂O₂)存在下で、ヘムペルオキシダーゼよりヒポチオシアン酸イオン(OSCN⁻)へ変換される(Jpn J Infect Dis,57,S30,2004)

(2) OSCN⁻は血管内皮細胞に対して炎症反応を誘導する(Blood,107,558,2006)。

これらの報告から我々は OSCN⁻は血管内皮細胞だけでなく気道上皮細胞に対しても炎症反応を誘導するのではないかと考え、「ペンドリンを透過した SCN⁻は酵素反応により



OSCN⁻へ変換され、この OSCN⁻が気道上皮細胞に作用し喘息病態を増悪させる」という作業仮説を立て、これを証明することにした。この仮説を支持する根拠として、我々は本研究開始当初、既に OSCN⁻で気道上皮細胞を刺激すると NF-κB が活性化されることを見いだしていた。

2. 研究の目的

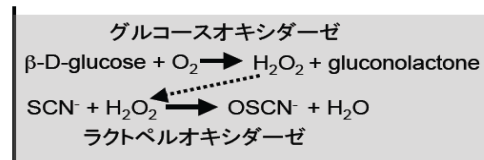
上記の仮説を実証し、ペンドリン/ヘム型ペルオキシダーゼを介した SCN⁻の透過と反応産物 OSCN⁻による炎症惹起機構の解明を目的とし下記の項目について解析した。

- (1) OSCN⁻が気道上皮細胞に及ぼす作用の解析。
- (2) 喘息病態形成を担うヘム型ペルオキシダーゼの同定。
- (3) 喘息病態形成に対するヘムペルオキシダーゼ阻害剤の影響。

3. 研究の方法

(1) 気道上皮細胞に対する OSCN⁻の作用

OSCN⁻による NF-κB 活性化機構の解明：下図のようにグルコースオキシダーゼとラクトペルオキシダーゼならびに SCN⁻を培地に添加し、気道上皮細胞を OSCN⁻で刺激した。



OSCN⁻刺激5時間後、細胞を回収し核抽出液を調製して NF-κB の活性化の状態を EMSA 法で解析した。OSCN⁻により活性化される NF-κB 構成因子を明らかにするために、各種抗体を用いたスーパーシフトアッセイを行った。さらに、NF-κB がどのようなシグナル伝達経路を経て活性化されるのかを明らかにするために、各種シグナル伝達経路の阻害剤が OSCN⁻による NF-κB の活性化に及ぼす影響を調べた。

高濃度の OSCN⁻による細胞死誘導の解析：グルコースオキシダーゼ濃度を高くし、高濃度の OSCN⁻より細胞死が誘導されるか否かをアネキシン V とヨウ化プロピジウムを用いたフローサイトメトリーにより解析した。

(2) 喘息病態形成を担うヘムペルオキシダーゼの同定

喘息病態におけるヘムペルオキシダーゼの発現量の解析：卵白アルブミンで感作(0日目、12日目)した後、暴露(22、26、30日目)を3回行い、喘息を誘導した。喘息マウス及び正常マウスの肺から RNA を単離し、3種のヘム型ペルオキシダーゼ、すなわちラクトペルオキシダーゼ(LPO)、好中球ペルオキシダーゼ(MPO)、好酸球ペルオキシダーゼ(EPO)の mRNA の発現量を非喘息マウスと比較した。

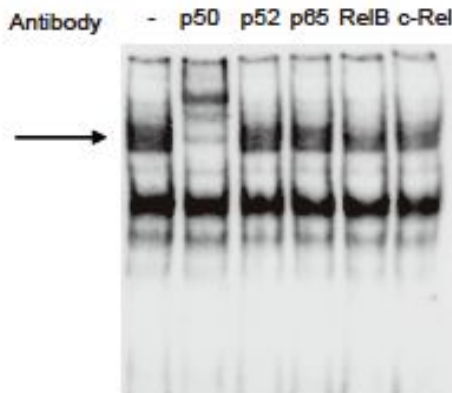
それぞれのヘムペルオキシダーゼを欠損したマウスを用いて卵白アルブミン誘導喘息マウスを作製し、メサコリンに対する気道過敏性と肺への炎症細胞浸潤の程度を比較し、どのヘムペルオキシダーゼが喘息の病態に深く関与しているかを調べた。

(3) 喘息病態形成に対するヘム型ペルオキシダーゼ阻害剤の効果:ヘム型ペルオキシダーゼ阻害剤であるメチマゾールを卵白アルブミンによる暴露の期間、飲水投与し喘息の病態(気道過敏性、肺への炎症細胞浸潤)を比較した。

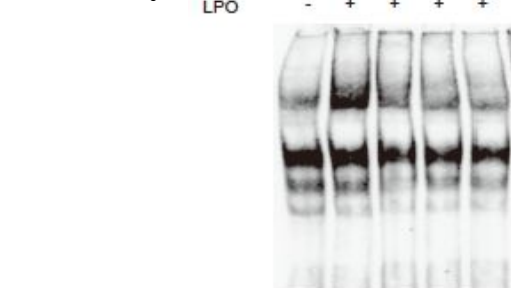
4. 研究成果

(1) 気道上皮細胞に対する OSCN の作用

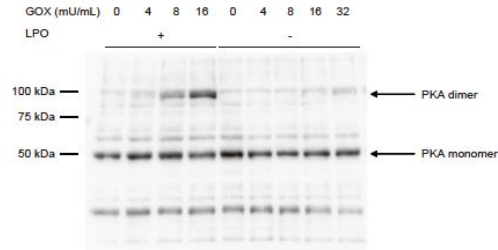
OSCNによるNF-κB活性化機構の解明: 各種抗体を用いたスーパーシフトアッセイを用いて解析したところ、OSCNより活性化されるNF-κB構成因子はp50のホモダイマーであり、p52、RelA、RelBやc-Relといった他の因子ではないことがわかった。



次にOSCNによるNF-κBの活性化に関するシグナル伝達経路を知る目的で、c-jun N-terminal kinase、Extracellular Signal-regulated Kinase、protein kinase A (PKA) の主要シグナル伝達経路因子の阻害剤を培養液に添加しOSCNで刺激後、NF-κBの活性化状態を解析したところPKAの阻害剤によりOSCNによるNF-κBの活性化が抑制されること



PKAは過酸化水素よりS-S結合によるホモダイマーを形成し活性化することが知られているので、OSCN刺激後ウェスタンブロット法によりPKAの状態を解析したところ、無刺激ではモノマーであったが、刺激後はホモダイマーを形成していることがわかった。この結果からOSCNはPKAを介してNF-κBを活性化し炎症反応を誘導する事が強く示唆された。



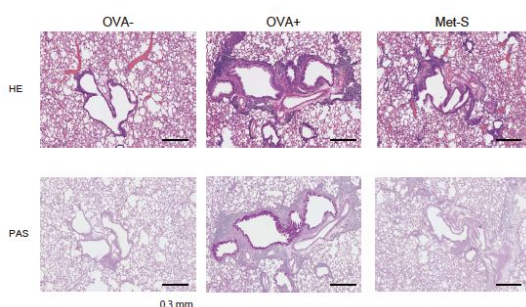
高濃度の OSCN による細胞死誘導の解析: 低濃度の OSCN で刺激した場合は、NF-κB が活性化されたが、高濃度の OSCN で刺激した場合には細胞死が顕微鏡下で観察された。この細胞死の様式をアネキシン V と PI を用いて詳細に解析したところ、細胞死を起こした細胞は全てアネキシン V 陰性であったことから、高濃度の OSCN はネクローシスを誘導し、アポトーシスは誘導しないことが明らかとなった。さらに、喘息病態形成との関連性で注目されている IL-33 がネクローシスに伴い細胞内から細胞外へ放出されるのではないかと考え、この可能性を ELISA により調べたところ、OSCN でネクローシス を起こした細胞の培養液中には確かに IL-33 が存在するを見いだした。以上の結果より、高濃度の OSCN は気道上皮細胞のネクローシスを誘導し、細胞内 IL-33 を細胞外へ放出させることで喘息病態を増悪させている可能性が強く示唆されると共に、OSCN を産生するヘム型ペルオキシダーゼの発現量や酵素活性の強さが気道炎症の強さに反映されるという我々の仮説が支持された。

(2) 喘息病態形成を担うヘム型ペルオキシダーゼの同定

野生型喘息マウスの肺組織ではミエロペルオキシダーゼ(MPO)、好酸球ペルオキシダーゼ(EPO)、およびラクトペルオキシダーゼ(LPO)の何れも発現量が顕著に増加していた。次に、各種ペルオキシダーゼ欠損マウスに卵白アルブミンで喘息を誘導し、喘息病態の程度を気道過敏性、肺胞洗浄液中の細胞種並びに細胞数を指標にして比較解析した。野生型マウスの喘息病態と比較して、MPO および EPO 欠損マウスにおいては気道過敏性および肺胞洗浄液中の細胞腫や細胞数にほとんど違いは認められなかった。一方、LPO 欠損マウスにおいては気道過敏性並びに肺胞洗浄液中の細胞数に低下傾向が認められた。この結果より冗長性のため3種のペルオキシ

ダーゼのうち1種を欠損させても喘息病態形成に顕著な差は生じないものの、しかしこれらの中では LPO が最も関与していると考えられた。

(3) 喘息病態形成に対するヘム型ペルオキシダーゼ阻害剤の効果
野生型マウスにペルオキシダーゼ阻害剤であるメチマゾールを暴露の期間に投与すると気道過敏性及び肺胞洗浄液中の細胞数が顕著に低下した。PAS 染色により喘息病態を組織学的に解析したところメチマゾールを投与したマウスでは杯細胞の形成が顕著に抑制されていた(下図 Met-S)。



以上の結果から、ヘム型ペルオキシダーゼ及びこの酵素反応生成物が喘息病態形成に深く関与していると考えられ、喘息の治療にヘム型ペルオキシダーゼ阻害剤が有効であることが強く示唆された。

現在の気管支喘息に対する治療は吸入ステロイド剤が基本となっている。しかし10-15%の患者はステロイド抵抗性を示し、それに対する新規の治療薬の開発が期待されている。ヘム型ペルオキシダーゼは気管支喘息の特徴的な病態である気道過敏性に直接関係しているエフェクター分子であると考えられるので、ヘム型ペルオキシダーゼ阻害剤は気道過敏性を直接的、あるいは選択的に抑制できることが期待される。これはステロイド剤とは異なる機序であり、吸入ステロイド剤抵抗性の患者に対しても有効性を示す可能性がある。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

小川雅弘、鈴木章一、太田昭一郎、有馬和彦、出原賢治
ペルオキシダーゼによる気道上皮細胞における炎症惹起機序
第 64 回日本アレルギー学会学術大会
2015, 5 26 東京

〔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
<http://www.biomol.med.saga-u.ac.jp/medbiochem/publications.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 章一 (SUZUKI SHOICHI)
帝京大学・医療共通教育研究センター・講師

研究者番号：40253695

(2) 研究分担者

出原 賢治 (IZUHARA KENJI)
佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：00270463

(3) 連携研究者

()

研究者番号：