

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32680

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460660

研究課題名(和文) 気道上皮細胞の修復過程を標的とした新規薬物療法の開発

研究課題名(英文) New pharmacotherapy targeting regeneration of airway epithelial cells

## 研究代表者

山下 直美 (YAMASHITA, Naomi)

武蔵野大学・薬学研究所・教授

研究者番号：20239974

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)：気道上皮細胞は、外界に対する重要なバリアーであるが、アレルゲンや環境物質の障害を直接受け、剥離したり、粘液分泌や線維化促進細胞に変化することにより、バリアー機能および生体防御能を失い、喘息やCOPDなどの疾患を増悪させる。本研究では、その修復過程に注目して、新規薬物治療の開発を目的として検討を進めた。非神経性コリン作動物質としてSLURP-1に注目し、粘液産生細胞への分化を抑制し、気道炎症を抑制するターゲットとして有望であることを見出した。また、気道上皮細胞を標的とした自然免疫系の活性化制御の可能性も明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Airway epithelial cells, first-line cells for the barrier and defense mechanisms, play critical roles in pathophysiology of asthma and COPD. In this study, we explored the new therapy targeting repair mechanisms of airway epithelial cells. We showed that secreted lymphocyte antigen-6/urokinase-type plasminogen activator receptor-related peptide-1 (SLURP-1), one of non-neural acetylcholines, was produced by airway epithelial cells and down-regulated airway inflammation. In addition, we clarified that the modification of innate immune pathway in airway epithelial cells was a promising therapy for asthma and COPD

研究分野：臨床薬学・アレルギー

キーワード：アレルギー・ぜんそく 細胞・組織 臨床 薬理学 生体分子

### 1. 研究開始当初の背景

吸入ステロイド薬は、気道炎症をターゲットとした治療薬として喘息治療に飛躍的進歩をもたらした。しかし、気道上皮細胞については、修復を促す作用がないばかりか、アポトーシスを誘導し、障害を促進するとの報告も存在する (Dorscheid DR et al Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2006;291:L794-801)。難治性喘息を対象として抗 IgE 抗体や IL-13 関連の分子標的薬の開発も進んでいるが、気道構造の変化であるいわゆる気道リモデリングの修復は未だに解決が困難な重要課題となっている。気道上皮細胞は、アレルゲンや環境汚染物質に第一に接する細胞であり、バリアー機能とともに Human thymic stromal lymphopoietin (TSLP) を始めとするサイトカインの産生を通して、炎症惹起に大きな役割を果たしていることが示され、治療のターゲットとして注目されている (Holgate ST Allergol Int. 2008;57:1-10.)。ダニアレルゲン、細菌成分、ウイルス RNA は、気道上皮細胞に直接作用し、サイトカイン産生を誘導する。細菌成分およびウイルス RNA については細胞表面の受容体として、Toll like receptor (TLR) が同定されている。喘息発症原因として最も頻度の高いアレルゲンはダニであるが、自然免疫系の TLR4 を介する反応も惹起することが報告されている (Trompette A et al. Nature 457;585-589, 2009)。一方、TLR を介する応答は従来報告されていた 1 対 1 対応ではなく、刺激により 2 つの受容体が重合することも報告されており (Stewart CR et al Nature Immunol. 2010;11:155-61) 経路の解明が有用であると考えられる。

喘息時には、線毛気道上皮細胞が消失するとともに粘液分泌気道上皮細胞 (杯細胞) が増生し、痰による気道閉塞の原因や気道リモデリングの原因となる。申請者は、線毛上皮細胞と杯細胞の差異について検討し、コリン作動系蛋白質の産生について差異を見出している。肺を構成する気道のコリン作動系は、副交感神経節後神経から遊離されるアセチルコリン (ACh) と、非神経性の気道上皮細胞が産生・放出する ACh とによって、制御されているが、慢性喘息病変の中心となる末梢気道は非神経性の気道上皮細胞が産生・放出する ACh の制御が中心となる (Barnes et al 2007)。ACh の作用を制御する新規内因性コリン作動性蛋白質 (secreted mammalian lymphocyte antigen-6/urokinase-type plasminogen activator receptor-related protein)-1, SLURP-1) は、皮膚ケラチノサイトやマクロファージが産生する事が知られているが、肺でマウスおよびヒト線毛気道上皮細胞に特異的産生が見られることを、申請者らは証明した (Horiguchi K, Horiguchi S, Yamashita N, et al. J Neurosci Res )

### 2. 研究の目的

肺は外界に常にさらされ、アレルゲンや環境汚染物質の曝露を受ける臓器である。その中で、気道上皮細胞は、バリアー機能を果たす細胞であるが、外界の刺激に反応し活性化しサイトカイン産生および障害を受けアポトーシスに陥るなどの反応を示す。一方、気道上皮細胞は、非神経性コリンの主要な産生細胞であり、炎症を制御する機能を果たす可能性がある。喘息では線毛気道上皮細胞が粘液分泌細胞や線維芽細胞に変化 (形質転換) することにより、肺の構造的変化 (気道リモデリング) が惹起され難治化する。線毛上皮細胞、粘液分泌細胞および線維芽細胞を標的として、アレルゲンに対する反応、自然免疫の賦活化および非神経性コリン産生細胞としての反応の差異を解明し、難治性呼吸器疾患の肺の構造の変化 (肺のリモデリング) 修復を目指す。

### 3. 研究の方法

ヒト気道上皮細胞を用いた *in vitro* の実験および治療介入の可能性を検証する目的でのマウス *in vivo* の実験を組み合わせて行う。研究は次の 4 項目について行う。気道上皮細胞の自然免疫系活性化に関与するメカニズムを解析する。刺激としては、ダニ刺激とともにエラスターゼ + LPS を用いる。さらに、この活性化に対するニコチン受容体刺激の修飾を解析する。マウスモデル動物を用いて、ニコチン受容体を介した刺激およびダニアレルゲン刺激の気道リモデリングの制御について検証する。

### 4. 研究成果

非コリン作動物質 SLURP-1 の気道上皮障害における役割の解析 ヒト気道上皮細胞は、線毛上皮細胞に分化すると非コリン作動物質 SLURP-1 を分泌し、粘液産生気道上皮細胞は、分泌が低下する。この SLURP1 の働きを調べたところ、異物排除にかかわる線毛運動活性化に働いた。SLURP1 中和抗体を作用させると炎症性サイトカイン産生抑制に働き、逆に iSRNA で SLURP1 の発現を抑制すると炎症性サイトカインの産生が上昇した。以上より SLURP1 は気道の恒常性維持に関与していることが明らかになった (発表論文)。またリコンビナント SLURP を作成し培養気道上皮細胞に添加すると濃度依存性に炎症性サイトカイン産生 (TNF- $\alpha$  および IL-6) を抑制した。以上より、気道炎症を制御する生体由来の低分子物質として有望であると考えられた。

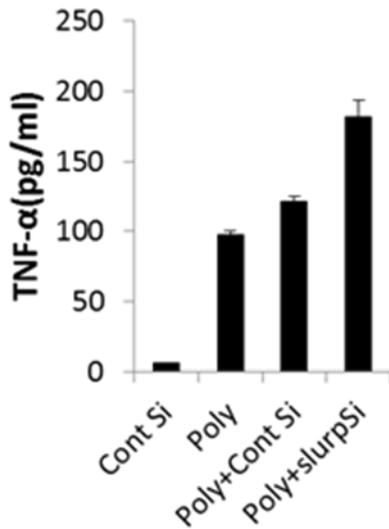


図1 SLURP 1 炎症性サイトカイン産生に及ぼす効果 (NHBE を線毛上皮細胞に分化させる条件で培養し、PolyIC 刺激を加え TNF- $\alpha$  産生を誘導した。SLURPSiRNA で PolyIC 刺激前に処置し、SLURP の発現を抑制した。SLURP の発現が抑制されていることはイエステランプロット法で確認した。)

さらにアレルギー刺激を加える事によっても SLURP 産生は低下することを明らかにした。次に生体内での動態を検討することを試みた。ヒトの喘息患者で低下を認めるか、生体の検体を測定する目的で倫理委員会の承認を得てサンプルを採取したが、SLURP1 は血液、尿、呼気凝縮液では測定は不可能であった。測定感度をさらに上げる工夫が必要だった。

ダニアレルゲンの自然免疫系活性化の解析 気道上皮細胞のダニアレルゲンを介する自然免疫賦活化について解析した。Kitajima らとの共同研究(発表論文)でダニアレルゲン刺激は TLR4 を介する刺激の他 TLR 1 + TLR2、TLR+TLR 6 を介しても NF $\kappa$ B を誘導することが明らかになった。ヒト気道上皮細胞初代培養でも TLR 1 + TLR2 を PAM 3、TLR+TLR 6 を MALP 2 で刺激すると活性化され濃度依存性に TNF- $\alpha$  および IL-6 を分泌した。

自然免疫系の活性化経路には NF $\kappa$ B とともに IRF3 が存在する。IRF3 を介する経路が病態形成にどのように関与するかを解析した。エラストラーゼ + LPS で肺気腫病変を形成について野生型と IRF3KO マウスとを比較検討した。IRF3 を介する経路が気道障害形成に重要な役割を果たすことを明らかにした。また NF- $\kappa$ B を介する経路が主体である TNF- $\alpha$  産生にも IRF3 を介する経路が重要であることが明らかになった。

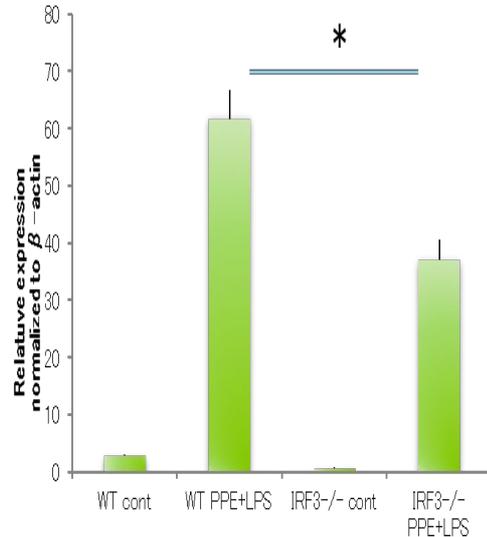


図2 IRF3 を介する経路の TNF- $\alpha$  mRNA 発現への関与

(野生型 WT マウスと IRF3-/- マウスを用いて検討した。各マウスの肺を採取し RNA を抽出した。TNF- $\alpha$  mRNA の発現をリアルタイム PCR で検討した)

特に IRF3 を介する経路は好中球の活性化に関与していることが明らかになった。好中球は

今後さらに気道リモデリングを制御するターゲットとして有用であるかについて解析を進める。

## 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3件)

Niikura Y, Ishii T, Hosoki K, Nagase T, Yamashita N. Ovary-dependent emphysema augmentation and osteopontin induction in adult female mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015.461.642-647.

doi: 10.1016/j.bbrc.2015.04.081.

Kitajima T1, Muroi M, Yamashita N, Tanamoto K. Toll-like receptors required for dermatophagoides farinae to activate NF- $\kappa$ B. *Biol Pharm Bull*. 2014.37(1) 74-80.

Narumoto O, Niikura Y, Ishii S, Morihara H, Okashiro S, Nakahari T, Nakano T, Matsumura H, Shimamoto C, Moriwaki Y, Misawa H, Yamashita N, Nagase T, Kawashima K, Yamashita N. Effect of secreted lymphocyte antigen-6/urokinase-type plasminogen activator receptor-related peptide-1 (SLURP-1) on airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013.438(1).175-179.

doi:10.1016/j.bbrc.2013.07.048. Epub  
2013 Jul 20.

〔学会発表〕(計8件)

新倉雄一、石井崇史、細木敬祐、山下直美

慢性閉塞性肺疾患および気管支喘息の病態形成における性差発現の比較解析

第136年会日本薬学会

2016年3月27日パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

石井崇史、新倉雄一、細木敬祐、棚元健一、室井正志、長瀬隆英、山下直美

ダニアレルギーの肺胞マクロファージおよび気道上皮細胞に対する反応惹起性の検討

第46回日本職業環境アレルギー学会

2015年7月4日東京大学伊藤国際学術センター(東京都文京区)

新倉雄一、本多桜子、細木敬祐、石井崇史、山下直美

卵巣に依存したオステオポンチン発現有d層とCOPD病態形成増悪化

第27回日本アレルギー学会

2015年5月26日高輪プリンス(東京都港区)

石井崇史、新倉雄一、細木敬祐、津久井利宏、坂口雅弘、三宅健介、長瀬隆英、山下直美

ダニアレルギー感作に於けるMD-2の役割

第55回日本呼吸器学会

2015年4月17日東京国際フォーラム(東京都千代田区)

新倉雄一、本多桜子、関夏実、脇野健太郎1、依田紗織、水戸部森歌、毛利真弓、村井愛美、大藪依子、山下直美

雌個体における慢性閉塞性肺疾患(COPD)の病態形成増悪化への卵巣の関与

日本薬学会第135年会

2015年3月27日兵庫医療大学(兵庫県神戸市)

石井崇史、新倉雄一、白井秀治、阪口雅弘、棚元憲一、室井正志、長瀬隆英、山下直美

IRF3の好酸球性気道炎症病態における役割

第26回日本アレルギー学会春季大会

2014年5月10日京都国際会館(京都府京都市)

金井梓、新倉雄一、長谷川敦子、井上雄太郎、小川志保、石井崇史、山下直美

気道収縮ストレス誘導型気道リモデリングについてのマウスモデルを用いた解析

第26回日本アレルギー学会春季大会

2014年5月9日京都国際会館(京都府、京都)

新倉雄一、石井崇史、長谷川敦子、小島香奈、金井梓、井上雄太郎、山下直美

気道リモデリング形成過程におけるヒアルロン酸およびヒアルロン酸合成酵素群の発現変動

第63回日本アレルギー学会秋季学術大会

2014年11月30日東京国際フォーラム(東京

都千代田区)

〔図書〕(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.musashino-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下直美 (NAOMI YAMASHITA)

武蔵野大学・薬学研究所・教授

研究者番号: 20239974

(2) 研究協力者

新倉雄一 (Yuichi Niikura)

武蔵野大学・薬学研究所・講師

研究者番号: 10615107

石井崇史

武蔵野大学 特別研究学生

細木佳祐

武蔵野大学 特別研究学生